UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LETÍCIA CAÇÃO BENEDINI DE OLIVEIRA

**Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em
secções longitudinais de músculo sóleo de ratas
imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo
manual intermitente**

Ribeirão Preto

2012

LETÍCIA CAÇÃO BENEDINI DE OLIVEIRA

**Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em
secções longitudinais de músculo sóleo de ratas
imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo
manual intermitente**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de **Mestre em Ciências, Programa
Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho
Locomotor.**

Área de Concentração: Reabilitação.

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Claudia Mattiello-Sverzut

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cação-Benedini, Letícia Oliveira

Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em secções longitudinais de músculo sóleo de ratas imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente, 2012.

111 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação.

Orientadora: Mattiello-Sverzut, Ana Claudia.

1. Ratas. 2. Imobilização. 3. Alongamento terapêutico. 4. Análise funcional da marcha. 5. Morfologia. 6. Músculo sóleo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Letícia Cação Benedini de Oliveira

Título da dissertação: Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em secções longitudinais de músculo sóleo de ratas imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor; Área de concentração: Reabilitação.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Gilberto e Izilda**, a minha irmã, **Priscila** pelo apoio incondicional.

Ao **Tiago**, meu esposo, pelo incentivo constante durante o período de elaboração deste trabalho.

Dedico a vocês que acreditaram neste sonho junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida **Orientadora Profa. Dra. Ana Claudia Mattiello-Sverzut**. Você me ensinou a inquieta arte da pesquisa. É um exemplo de profissional e de ser humano. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, pela confiança e principalmente pela amizade, pois esta permanecerá. Meus sinceros agradecimentos.

À aluna de Iniciação Científica, **Paula Guilherme Ribeiro**, por fazer parte deste projeto com tanta dedicação e competência. Sem você esta realização seria muito mais complicada. Obrigada pela confiança e amizade.

À amiga e professora, **Deise Lúcia Chesca**, pelos ensinamentos e pela ajuda. Você contribuiu muito com este trabalho. Muito obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Neuropatologia, **Renata, Anabelle, Tatiana, Juliana, Leonardo, Patrícia, Maikol, Eduardo, Keite, Maria Laura e Mariana**. Cada um de vocês contribuiu para a realização deste projeto. Agradeço também pela amizade. Especialmente, agradeço à Renata e à Anabelle. À Rê, pela amizade desde a faculdade e por conviver comigo também na fase do mestrado. À Belle, pelos ensinamentos durante os quatro anos que fui aluna de iniciação científica e participei do seu mestrado e do seu doutorado, pela amizade que ainda existe, muito obrigada.

A minha professora e também amiga, **Cyntia Rogean**, pelo incentivo profissional e por todos os valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Luciano Neder** do Departamento de Patologia, por ceder seu laboratório para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **José B. Volpon** do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, por ceder seu laboratório para realização de parte deste projeto.

Ao Prof. Dr. **Edson Martinez** do Departamento da Medicina Social e a toda equipe do **CEMEQ**, Centro de Métodos Quantitativos, pelos ensinamentos e todo suporte na estatística.

À **Maria Paula Scandar** por todo o ensinamento e ajuda, quando eu ainda era aluna de iniciação científica.

À **Universidade de São Paulo**, em especial ao Departamento de Biomecânica Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Programa de Pós-graduação em **Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor**.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor **Rita**, por todo atendimento e informações prestados.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelos auxílios financeiros nesta pesquisa (processos FAPESP: 2009/53342-0, 2009/53874-2).

À **Vanessa Vilela Monte-Raso** por contribuir com este estudo e pela colaboração na execução dos procedimentos experimentais de análise funcional da marcha.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por todos os momentos de trabalho e descontração. Especialmente, aos funcionários **Teresinha, Francisco, Luiz Henrique e Reginaldo**, pelos auxílios prestados durante a realização deste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Patologia **Rosângela, Camila e Neide**, por todo atendimento e informações prestados.

Ao funcionário do Biotério do Departamento de Patologia **Carlos Henrique de Carvalho Ribeiro**, pelo suporte dado durante a realização dos procedimentos experimentais.

Às técnicas do Departamento de Patologia **Mônica Azevedo de Abreu** (Laboratório de Patologia Cardíaca) e **Elaine Medeiros Floriano** (Laboratório de Patologia Pulmonar e Cardiovascular), por serem prestativas e ajudarem sempre.

À **Cibele Maria Prado** e à **Mara Rúbia Nunes Celes**, pelo auxílio na interpretação dos resultados da técnica de imunofluorescência e realização da técnica de Western blot.

Ao funcionário do Departamento de Patologia, **Felipe Denipotte Coelho** (Setor de informática) pelo suporte técnico.

Ao **Moisés Celestino de Souza**, por fornecer os materiais necessários para os procedimentos deste projeto e pelo suporte técnico.

A todos os **Professores da graduação e pós-graduação** pelos sábios ensinamentos.

A todas as pessoas que contribuíram de modo direto ou indireto para a realização deste estudo.

À inesquecível **Turma III de Fisioterapia** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em especial aos amigos **Ana Paula, Carlos Eduardo, Débora, Felipe, Fernando Cassiolato, Giovanna, Maya, Natália, Paula, Renata, Tércia e Tatiana**.

Aos amigos de infância, **Túlio, Gabriela, Natália, Patrícia** (também afillhada), **Ângela e Fabíola**, por investirem na nossa amizade e torcerem sempre por mim.

Aos **tios e primos**, pelo incentivo.

Aos meus queridos sogros **Antônio Carlos e Lourdes**, cunhados **Diego, Francine, Felipe e Lidiane** pelo valioso apoio e torcida.

Aos meus amados avós, **Mário** (em memória), **Hermantina, Geraldo** (em memória) e **Clarinda**, pelo apoio, pelas orações e pelo exemplo de vida.

A minha inseparável e amada irmã, **Priscila**, por ser minha melhor amiga, companheira e exemplo, ao meu lado em todos os momentos. Ao meu cunhado, **Moisés**, pelo constante incentivo e por me motivar em relação a minha profissão.

Ao meu amado esposo, **Tiago**, pelo amor, pela lealdade e admiração. Você é um ser humano singular e a sua compreensão constante muito contribuiu para a realização deste sonho.

Aos meus amados pais, **Gilberto e Izilda**, por tudo o que sou e por quem são, pela educação e pelo amor incondicional. Minha eterna gratidão! Vocês realmente são os melhores pais.

A **Deus, Jesus Cristo e Nossa Senhora**, agradeço pela vida. "A Fé é a certeza das coisas que se esperam, é a convicção dos fatos que se não veem" (Hebreus 11:1).

Muito Obrigada!

ATIVIDADES CIENTÍFICAS DESENVOLVIDAS COM OS DADOS DESTA DISSERTAÇÃO

1. Março de 2012: **Cação-Benedini L. O., Ribeiro P. G., Gomes A. R. S., Ywazaki J. L., Mattiello-Sverzut A. C.** Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. Artigo submetido no periódico Muscle & Nerve. (cópia da carta de confirmação da submissão do artigo - Anexo A).
2. Novembro de 2011: **Ribeiro P. G., Cação-Benedini L. O., Chesca D. L., Mattiello-Sverzut A. C.** Evolução da expressão dos colágenos I e III em músculo sóleo de ratas submetidas à alongamento terapêutico manual intermitente. Trabalho apresentado em formato de pôster no 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 21 a 25 de novembro (cópia do certificado - Anexo B).
3. Menção honrosa pelo trabalho apresentado em formato de pôster no 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 21 a 25 de novembro (cópia do certificado - Anexo C).
4. Outubro de 2011: **Ribeiro P. G., Cação-Benedini L. O., Martinez E. Z., Monte-Raso V. V., Mattiello-Sverzut A. C.** Avaliação funcional da marcha de ratas reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente após imobilização. Trabalho apresentado em formato de pôster no XIX Congresso Brasileiro de Fisioterapia que aconteceu em Florianópolis – SC, no período entre 09 a 12 de outubro (cópia do certificado - Anexo D).
5. Junho de 2011: **Mattiello-Sverzut A. C.; Cação-Benedini L. O., Ribeiro P. G., Martinez E. Z.** Functional evaluation of gait and dorsiflexion angle of ankle of rats rehabilitated from intermittent manual passive stretching post-immobilization. Trabalho apresentado em formato de pôster no World

Confederation for Physical Therapy que aconteceu em Amsterdam – Holanda, no período de 20 a 23 de junho (cópia do certificado - Anexo E).

6. Junho de 2011: **Mattiello-Sverzut A. C.; Cação-Benedini L. O., Ribeiro P. G., Martinez E. Z.** Functional evaluation of gait and dorsiflexion angle of ankle of rats rehabilitated from intermittent manual passive stretching post-immobilization. Resumo publicado na revista *Physiotherapy*, volume 97, suplemento S1 em 23 de junho (cópia do resumo - Anexo F).
7. Maio de 2011: **Cação-Benedini L. O., Ribeiro P. G., Martinez E. Z., Mattiello-Sverzut A. C.** Rehabilitation with intermittent manual passive stretching after immobilization of rats: a functional analysis of gait. Trabalho apresentado em formato de pôster no II Encontro Internacional de Fisiologia do Exercício que aconteceu em São Pedro – SP, no período entre 05 a 07 de maio (cópia do certificado - Anexo G).
8. Novembro de 2010: **Ribeiro P. G., Cação-Benedini L. O., Martinez E. Z., Mattiello-Sverzut A. C.** Avaliação funcional da marcha e do ângulo de dorsiflexão do tornozelo de ratas imobilizadas e reabilitadas por alongamento passivo. Trabalho apresentado em formato de pôster no 18º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 16 a 18 de novembro (cópia do certificado - Anexo H).
9. Outubro 2009: **Cação-Benedini L. O., Mattiello-Sverzut A. C.** Definição de metodologia: estudo científico de músculo em secções longitudinais. Trabalho apresentado em formato de pôster no XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia realizado no Rio de Janeiro, no período entre 14 a 17 de outubro (cópia do certificado - Anexo I).

RESUMO

CAÇÃO-BENEDINI, L. O. **Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em secções longitudinais de músculo sóleo de ratas imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente.** 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

No tecido muscular esquelético, a interface entre o sarcolema e a matriz extracelular é constituída por proteínas especializadas responsáveis pela transmissão de força transversal e longitudinal à miofibrila. As adaptações do músculo esquelético às forças fisiológicas e patológicas, como a imobilização segmentar e exercícios de reabilitação, podem contribuir para a percepção celular dos sinais mecânicos e, consequentemente, induzir modificações na flexibilidade e na força muscular. Este estudo investigou as respostas teciduais do músculo sóleo de ratas submetido ao estresse longitudinal induzido pela associação do treinamento do tipo alongamento passivo com a livre movimentação pós-imobilização dos membros posteriores direitos. O membro posterior direito das ratas foi imobilizado por 10 dias em flexão plantar, a fim de manter o músculo sóleo em posição de encurtamento. Após a imobilização, os animais passaram por um período de alongamento passivo manual intermitente. Antes da imobilização e durante o período de alongamento e de livre movimentação, foi realizada análise funcional da marcha dos animais. Noventa e seis ratas Wistar adultas foram divididas em 8 grupos: Imobilizado (I); Imobilizado e alongado por 1 dia ($IAL_{(1)}$); Imobilizado e alongado por 3 dias ($IAL_{(3)}$); Imobilizado e alongado por 10 dias ($IAL_{(10)}$); Imobilizado e livre por 1 dia ($IL_{(1)}$); Imobilizado e livre por 3 dias ($IL_{(3)}$); Imobilizado e livre por 10 dias ($IL_{(10)}$); Controle do Imobilizado ($C_{(Imob)}$). Após os procedimentos experimentais, o músculo sóleo foi removido e congelado, para o processamento de reação de coloração Hematoxilina-Eosina; imunoistoquímica para fibronectina, colágenos tipos I e III; imunofluorescência de laminina, distrofina e macrófagos; western blot de laminina e distrofina. Análises qualitativa e quantitativa em Microscópio de Luz e sistema de análise de imagens foram realizadas. As variáveis foram avaliadas inter- e intra-grupos pelo Modelo de Regressão Linear com Efeitos Mistos. Após a imobilização, os animais apresentaram perda de peso corporal e alterações no tamanho e formato das fibras. Ainda, a hipocinesia modificou as variáveis funcionais da marcha, reduziu a amplitude de movimento (ADM) de dorsiflexão, aumentou a relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras ($rFFI/NTF$), a expressão de distrofina, de laminina e dos colágenos tipos I e III. Após três dias de remobilização, as alterações morfológicas estavam exacerbadas: intensa celularidade, núcleos centralizados, corpos de inclusão, necrose. Estes achados foram mais intensos no $IAL_{(3)}$. Os grupos $IAL_{(3)}$ e $IL_{(3)}$ também apresentaram comprometimento funcional, restrição de ADM, aumento da $rFFI/NTF$ e da expressão do colágeno tipo III. Outros achados observados nestes grupos foram aumento da quantidade de macrófagos no tecido e de distrofina. As anormalidades relativas aos parâmetros da marcha e as alterações morfológicas geradas pela imobilização mostraram melhora no grupo $IAL_{(10)}$. A remobilização associada ao alongamento durante dez dias mostrou significativa efetividade na reversão das anormalidades musculoesqueléticas induzidas pelo desuso, especialmente nas variáveis funcionais.

Palavras-chave: Ratas. Imobilização. Alongamento terapêutico. Análise funcional da marcha. Morfologia. Músculo sóleo.

ABSTRACT

CAÇÃO-BENEDINI, L. O. **Study of costameric proteins in soleus muscle longitudinal sections of female rats immobilized and rehabilitated by intermittent passive manual stretching.** 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The interface between sarcolemma and extracellular matrix in skeletal muscle tissue is constituted by specialized proteins that are responsible for the transversal and longitudinal forces transmission to the myofiber. Skeletal muscle adaptations to physiological and pathological forces, such as segmental immobilization and rehabilitation exercises, may contribute to cellular perception of mechanical signals and consequently induce alterations related to flexibility and muscular force. This study investigated the tissue responses of the soleus muscle in female rats caused by longitudinal stress induced by the association of passive stretching training with the free movement after immobilization of the right hind limb. The right hind limbs of female rats were immobilized during 10 days in a plantar flexion in order to keep the soleus muscle in a shortened position. After the immobilization, the animals were submitted to intermittent passive manual stretching. The animals' gait was functionally analyzed before immobilization and during the period of stretching or free movement. Ninety-six adult female Wistar rats were divided into 8 groups: Immobilized (I); Immobilized and stretched for 1 day ($IS_{(1)}$); Immobilized and stretched for 3 days ($IS_{(3)}$); Immobilized and stretched for 10 days ($IS_{(10)}$); Immobilized and free for 1 day ($IF_{(1)}$); Immobilized and free for 3 days ($IF_{(3)}$); Immobilized and free for 10 days ($IF_{(10)}$); Immobilized control ($C_{(Immob)}$). After the experimental period, the soleus muscle was removed, frozen and further processed by Hematoxylin-eosin stain; immunohistochemistry reactions for fibronectin, types I and III collagen; immunofluorescence of laminin, dystrophin and macrophages; western blot of dystrophin and laminin. Qualitative and quantitative results were obtained using a Light Microscope and a system of image analysis. The between- and within-group data were analyzed using Mixed-Effects Linear Models. After the immobilization, the animals presented loss of body weight and alterations in size and shape of the fibers. Furthermore, the hypokinesia changed the functional variables of gait, reduced the dorsiflexion range of motion (ROM), increased the intracellular fibronectin/total number of fibers ratio (FIF/TNFr), the expression of dystrophin, of laminin and of the types I and III collagen. After three days of remobilization, the morphological changes were exacerbated: intense cellularity, nuclear centralization, inclusion bodies and necrosis. These findings showed increased in the $IS_{(3)}$. The groups $IS_{(3)}$ and $IF_{(3)}$ also showed functional impairment, ROM restriction, increased FIF/TNFr and immunoreactivity of the type III collagen. Others findings observed in these groups were increase of the amount of macrophages in the tissue and of dystrophin. The abnormalities related to gait parameters and the morphological changes induced by immobilization were improved in the $IS_{(10)}$ group. The remobilization using stretching for ten days showed significant effectiveness and reverted the skeletal muscle abnormalities induced by disuse, especially concerning the functional variables.

Keywords: Rats. Immobilization. Therapeutic stretching. Functional analysis of gait. Morphology. Soleus muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do músculo esquelético, ilustrando tecido conjuntivo intramuscular.	25
Figura 2 - Esquema das proteínas do costâmero e localização da matriz extracelular. Matriz extracelular e proteínas distrofina e lamininas destacadas pelos retângulos vermelhos.	26
Figura 3 - Esquema da estrutura de tripla-hélice do colágeno.	27
Figura 4 - Imobilização da articulação tíbio-társica em flexão plantar.	38
Figura 5 A e B - Modelo de imobilização de Coutinho et al., (2002). A: Parte superior, similar a uma camiseta de cotton. B: Parte inferior, dividida em anterior e posterior.	38
Figura 6 - Técnica de alongamento passivo manual. No detalhe (seta), observe o manuseio da região plantar, o que promove o movimento de dorsiflexão do tornozelo e conseqüentemente o alongamento do músculo.	39
Figura 7 - Mensuração do ângulo de dorsiflexão.	40
Figura 8 - Sistema de coleta dos vídeos para realização da análise funcional da marcha.	41
Figura 9 - Programa que calcula os parâmetros a partir da marcação dos pontos selecionados na imagem.	42
Figura 10 - Exposição e dissecação do músculo sóleo (seta preta).	43
Figura 11 - Músculo sóleo (seta branca) no sistema “cortiça-agulhas” com seu comprimento preservado com base no valor visualizado no paquímetro digital.	43
Figura 12 - Posição das patas posteriores da rata durante a marcha no período pré-imobilização na fase de duplo apoio.	50
Figura 13 - Posição das patas posteriores da rata durante a marcha no primeiro dia pós-imobilização com a pata posterior direita em flexão plantar.	51

Figura 14 - Posição das patas posteriores da rata durante a marcha no primeiro dia pós-imobilização; pata posterior direita na fase de apoio com toque dos artelhos.	51
Figura 15 – Fotomicrografias do músculo sóleo, A–H coloração: H.E.....	57
Figura 16 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais representativos de cada um dos grupos estudados, A–H lâminas processadas pelo anticorpo <i>goat polyclonal anti-human fibronectin</i>	59
Figura 17 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais representativos de cada um dos grupos estudados, A–H lâminas processadas pelo anticorpo <i>mouse anti-rat collagen type I</i>	61
Figura 18 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais representativos de cada um dos grupos estudados, A–H lâminas processadas pelo anticorpo <i>mouse anti-rat collagen type III</i>	62
Figura 19 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos C_(Imob) , I , IL₍₁₎ e IAL₍₁₎ , A–L lâminas processadas pelos anticorpos <i>rabbit polyclonal anti-dystrophin</i> (fluorescência verde) e <i>mouse monoclonal [ED1] anti-CD68</i> (fluorescência vermelha), marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul).....	64
Figura 20 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos IL₍₃₎ , IAL₍₃₎ , IL₍₁₀₎ e IAL₍₁₀₎ , A–L lâminas processadas pelos anticorpos <i>rabbit polyclonal anti-dystrophin</i> (fluorescência verde) e <i>mouse monoclonal [ED1] anti-CD68</i> (fluorescência vermelha), marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul).....	65
Figura 21 – Análise de Western blot para distrofina nos músculos sóleos dos animais dos grupos estudados. *, p<0.05 comparado ao C_(Imob) ; †, p<0.05 comparados ao I	66
Figura 22 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos C_(Imob) , I , IL₍₁₎ e IAL₍₁₎ , A–H lâminas processadas pelo anticorpo <i>rabbit polyclonal anti-laminin</i> (fluorescência verde) e marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul).....	68
Figura 23 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos IL₍₃₎ , IAL₍₃₎ , IL₍₁₀₎ e IAL₍₁₀₎ , A–H lâminas processadas pelo anticorpo <i>rabbit polyclonal anti-laminin</i> (fluorescência verde) e marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul)	68

Figura 24 – Análise de Western blot para laminina nos músculos sóleos dos animais dos grupos estudados. *, $p < 0.05$ comparados ao $C_{(Imob)}$ 70

Figura 25 – Quantidade de macrófagos presente nos músculos sóleos dos grupos estudados. *, $p < 0.05$ comparados ao $C_{(Imob)}$ e ao I; †, $p < 0.05$ comparado ao $IAL_{(10)}$; #, $p < 0.05$ comparados ao $IAL_{(3)}$ 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos valores em gramas da massa corpórea dos animais dos grupos analisados nos diferentes procedimentos experimentais com os respectivos intervalos de confiança de 95%.	49
Tabela 2 - Média dos valores em milímetros das variáveis da marcha dos animais dos grupos analisados com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Comparações entre o período pré-imobilização com o período pós-imobilização do mesmo grupo.	53
Tabela 3 - Média dos valores em milímetros das variáveis da marcha dos animais dos grupos analisados com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Comparações entre os últimos dias pós-imobilização entre os grupos IAL ₍₁₎ e IL ₍₁₎ ; IAL ₍₃₎ e IL ₍₃₎ ; IAL ₍₁₀₎ e IL ₍₁₀₎	54
Tabela 4 - Média dos valores em graus da amplitude de movimento de dorsiflexão da pata direita dos animais dos grupos analisados com os respectivos intervalos de confiança de 95%.	55
Tabela 5 - Porcentagem do número de fibras e de animais que apresentaram as alterações histopatológicas, por grupo.	56
Tabela 6 - Médias dos valores da relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras (rFFI/NTF) dos músculos sóleos com os respectivos intervalos de confiança de 95%.	58
Tabela 7 - Análise semi-quantitativa da expressão dos colágenos tipos I e III dos músculos sóleos.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM	- Amplitude de movimento
ATD	- Abertura total dos dedos
BSA	- <i>Bovine serum albumin</i>
C _(Imob)	- Grupo Controle do imobilizado
CETEA	- Comissão de Ética em Experimentação Animal
CP	- Comprimento da pegada
DAB	- Diaminobenzidina
FAPESP	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF	- Fator de crescimento do fibroblasto
FMRP	- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
H.E.	- Hematoxilina-Eosina
HGF	- Fator de crescimento de hepatócito
HGFR	- Receptor de fator de crescimento de hepatócito
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HRP	- Horseradish peroxidase
I	- Grupo Imobilizado
IAL ₍₁₎	- Grupo Imobilizado e alongado por 1 dia
IAL ₍₃₎	- Grupo Imobilizado e alongado por 3 dias
IAL ₍₁₀₎	- Grupo Imobilizado e alongado por 10 dias
IC	- Intervalo de confiança
IFC	- Índice funcional do ciático
IGF	- Fator de crescimento insulínico
IL ₍₁₎	- Grupo Imobilizado e livre por 1 dia
IL ₍₃₎	- Grupo Imobilizado e livre por 3 dias
IL ₍₁₀₎	- Grupo Imobilizado e livre por 10 dias
MEC	- Matriz extracelular
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
Myf5	- <i>Myogenic factor 5</i>

NCAM	- <i>Neural cell adhesion molecule</i>
NO	- <i>Óxido nítrico</i>
p	- p-valor
PAX7	- <i>Paired box protein Pax-7</i>
PBS	- Tampão fosfato salino
PBS-T	- Tampão fosfato tamponado tween-20
PMSF	- <i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
PVDF	- <i>Polyvinylidene fluoride</i>
rFFI/NTF	- Relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras
SDS	- <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	- <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBST	- Tampão tris salino com tween 20
USP	- Universidade de São Paulo
vs	- Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- porcentagem
cm/s	- centímetros por segundo
g	- grama
±	- mais ou menos - símbolo que antecede o valor de desvio padrão
°C	- graus Celsius
ml/g	- mililitros por grama
mm	- milímetro
μm	- micrômetro
M	- molar
g/l	- gramas por litro
ml/l	mililitros por litro
ml	- mililitro
mg/ml	- miligramas por mililitro
~	- aproximadamente
μl	- microlitros
mM	- milimol
rpm	- rotações por minuto
nm	- nanômetros
<	- menor
>	- maior

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1. Músculo esquelético	25
2.2. Efeitos da imobilização no músculo estriado esquelético	28
2.3. Alongamento passivo manual e ação no músculo estriado esquelético	29
2.4. Análise funcional da marcha.....	31
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Animais	36
4.2. Grupos experimentais.....	36
4.3. Procedimentos experimentais	38
4.3.1. Técnica de imobilização.....	38
4.3.2. Técnica de alongamento passivo manual intermitente	39
4.3.3. Mensuração manual passiva da ADM de dorsiflexão.....	39
4.3.4. Análise funcional da marcha.....	40
4.3.5. Obtenção dos músculos	42
4.4. Processamentos imunoistoquímicos para fibronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo III e imunofluorescência para distrofina, laminina e macrófagos	43
4.5. Processamento histológico	45
4.6. Extração de proteínas e Western Blot	45
4.7. Estudo morfológico.....	46
4.8. Análise semi-quantitativa para os colágenos dos tipos I e III	46
4.9. Estudo morfométrico	47
4.9.1. Relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras	47
4.9.2. Densidade de macrófagos	47
4.10. Análise estatística	47
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Massa corpórea dos animais	49
5.2. Análise funcional da marcha.....	50

5.2.1. <i>Análise descritiva da marcha nos períodos pré e pós-imobilização</i>	50
5.2.2. <i>Análise das variáveis</i>	52
5.3. Amplitude de movimento de dorsiflexão da pata direita	54
5.4. Morfologia – análise da técnica H.E.	55
5.5. Fibronectina intracelular	58
5.6. Análise semi-quantitativa dos colágenos dos tipos I e III	60
5.7. Análise da distrofina	63
5.7.1. <i>Descrição das alterações na distribuição espacial de distrofina</i>	63
5.7.2. <i>Análise da técnica de Western Blot de distrofina</i>	65
5.8. Análise da laminina	66
5.8.1. <i>Descrição das alterações na distribuição espacial de laminina</i>	66
5.8.2. <i>Análise da técnica de Western Blot de laminina</i>	70
5.9. Quantidade de macrófagos	70
6. DISCUSSÃO	73
6.1. Limitações do estudo	81
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	99

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético apresenta elementos distintos que respondem de modo diferenciado a cargas tensionais. Tendão, fáscia, fascículos, fibras, proteínas contráteis e sarcolemas são algumas das estruturas que oferecem resistência às forças externas (LIEBER; LEONARD; BROWN-MAUPIN, 2000).

Quando submetido à tensão, o músculo é estimulado a alterar sua forma e tamanho. Estas mudanças são influenciadas diretamente pela quantidade e duração da força gerada (LIEBER; LEONARD; BROWN-MAUPIN, 2000; CAIOZZO, 2002). Quando em situação de desuso, várias adaptações podem ocorrer, dentre elas mudanças nas propriedades fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e mecânicas das fibras musculares (KELLY; RUBINSTEIN, 1994). Assim, modelos experimentais, em situações de hipocinesia seguidas por diferentes tipos de remobilização, têm sido explorados pela literatura científica com o objetivo de aprimorar o conhecimento sobre o restabelecimento morfofuncional do sistema músculo-esquelético (CARVALHO et al., 2002; CAIOZZO, 2002; AHTIKOSKI et al., 2003; COUTINHO et al., 2006; DURIGAN et al., 2006; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; HWANG et al., 2006; MATHEUS et al., 2007).

A imobilização é um recurso utilizado com frequência para o tratamento de lesões músculo-esqueléticas e conhecidamente induz alterações deletérias, como atrofia das células musculares, redução da extensibilidade, da força e da resistência da musculatura, o que determina aumento da fibrose intramuscular (TABARY et al., 1972; WILLIAMS; GOLDSPINK, 1984; KANNUS et al., 1998; da SILVA et al., 2006), além de modificações ligamentares e rigidez articular (NOYES, 1988; LOITZ et al., 1989). Estes eventos estão relacionados a mudanças na síntese e degradação das proteínas musculares e do colágeno produzido pela matriz extracelular (KARPAKKA et al., 1990; AHTIKOSKI et al., 2001), com desorganização do tecido conjuntivo e, repercussão direta sobre o desempenho funcional do membro.

Estímulos externos como a estimulação elétrica neuromuscular (CARVALHO et al., 2008), mobilização precoce (HWANG et al., 2006) ou técnicas como alongamento (POLIZZELO et al., 2009) podem favorecer a recuperação dos tecidos no período pós-imobilização. O alongamento muscular passivo é um dos procedimentos terapêuticos de remobilização mais indicado quando a amplitude de movimento (ADM) está limitada. A meta geral de um programa de alongamento é restabelecer a ADM aos padrões de normalidade das articulações e a mobilidade

dos tecidos moles que as cercam de forma a incrementar o desempenho funcional (KISNER; COLBY, 1998; WELDON; HILL, 2003). Tais resultados são alcançados mediante prevenção da proliferação de tecido conjuntivo e da perda de sarcômeros em série (JÄRVINEN et al., 1992; COUTINHO et al., 2004). Também tem sido indicado que o alongamento desencadeia hipertrofia tecidual (COUTINHO et al., 2006; CORNACHIONE et al., 2008; BENEDINI-ELIAS et al., 2009). Essa força longitudinal, tensional e passiva parece induzir lesões degenerativas no tecido muscular quando o alongamento foi aplicado durante o processo de imobilização (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; GOMES et al., 2007). No entanto, após 21 dias de treinamento de alongamento em ratos previamente imobilizados, poucos sinais de lesão tecidual foram observados (CORNACHIONE et al., 2012).

A dinâmica da fibra muscular relaciona-se a uma rede composta por filamentos que conectam o citoesqueleto sarcolemal aos componentes da matriz extracelular (MEC), às organelas intracelulares e ao núcleo. Esta rede contínua está envolvida em diversas funções, incluindo a manutenção da integridade celular, transmissão de força, sinalização mecânica e química, integração da estrutura e função das organelas (LARSEN et al., 2006; CAPETANAKI et al., 2007). Após realização de alongamento, o processo de remodelação observado nas fibras musculares esqueléticas relacionado à expressão destes filamentos é pouco estudado.

As repercussões funcionais do alongamento manual intermitente sobre a marcha dos animais imobilizados também guardam conclusões reservadas. A integridade do comprimento muscular é essencial para a correta execução das diferentes fases da marcha, sendo as fibras dos músculos flexores plantares constantemente recrutadas ou alongadas para que os dorsiflexores realizem adequadamente a sua função (VAREJÃO et al., 2002). Assim, a evolução temporal da relação entre variáveis funcionais da marcha e morfológicas referentes à dinâmica de proteínas do costâmero e de aspectos estruturais da MEC, que são limitadores mecânicos da ADM articular, não foi ainda investigada no âmbito da reabilitação pós-imobilização.

Portanto, o presente estudo examinará a efetividade da terapia pós-imobilização pelo alongamento passivo manual intermitente, associado à livre movimentação, mediante análise de variáveis cinético-funcionais e morfológicas das patas traseiras de ratas.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Músculo esquelético

O músculo esquelético é constituído por fibras que são células alongadas, cilíndricas com vários núcleos em sua periferia e que possuem tipos e subtipos, com diferentes propriedades. Cada miofibrila está envolvida por uma quantidade de tecido conjuntivo denominado endomísio. Agrupadas em feixes elas encontram-se envolvidas por outra camada de conjuntivo denominada perimísio, sendo esse conjunto denominado de fascículo. Ao redor do músculo encontra-se o epimísio, que representa a camada mais externa de tecido conjuntivo. Esse tecido possui continuidade até os tendões (Figura 1). Adicionalmente, nervos motores penetram pelo músculo e inervam por meio de axônios terminais cada miofibrila. Nervos sensoriais penetram no fuso muscular e enviam e recebem informações do estado de contração. Além destes constituintes, o músculo esquelético é altamente vascularizado o que fornece nutrientes essenciais para a função muscular (KJÆR et al., 2003).

Figura 1 - Esquema do músculo esquelético, ilustrando tecido conjuntivo intramuscular.

Fonte: http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Physiology/Muscular/muscle_structure.jpg

Cada fibra muscular contém miofibrilas, especializadas em promover contração, e tecido conjuntivo, responsável pela sustentação do tecido muscular (KJÆR et al., 2003; JÄRVINEN et al., 2005). A organização, o número, o tamanho e o tipo das fibras variam de músculo para músculo (WANG; KERNELL, 2001), mas cada fibra muscular é envolvida por uma membrana plasmática chamada sarcolema. Como as outras células do organismo, a fibra muscular é composta por citoplasma, denominado de

sarcoplasma. Essas duas regiões, sarcolema e sarcoplasma, estão interligadas por um conjunto de proteínas que formam o costâmero (Figura 2). Um dos constituintes do costâmero é o complexo de glicoproteínas-distrofina que, além de ancorar o sarcolema às proteínas do costâmero, o estabiliza e transmite as forças produzidas no alongamento ou na contração muscular pelas miofibrilas à MEC, e vice-versa (HERRMANN et al., 2007; JÄRVINEN et al., 2005; KOSEK; BAMMAN, 2008).

Figura 2 - Esquema das proteínas do costâmero e localização da matriz extracelular. Matriz extracelular e proteínas distrofina e lamininas destacadas pelos retângulos vermelhos.

Fonte: Clark et al. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2002) – Modificada.

A MEC é formada por duas principais classes de macromoléculas: cadeias de polissacarídeos e proteínas fibrosas (KJÆR et al., 2006). Estas proteínas podem ser estruturais (colágeno e elastina) ou adesivas. O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular. Sua estrutura é de tripla-hélice constituída por 3 cadeias- α de polipeptídios. As cadeias- α são configuradas por repetitivas sequências de aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina) (Figura 3) (ALBERTS et al., 2002). O tecido conjuntivo intramuscular é formado essencialmente por fibras de colágeno I e III, contendo também outros tipos de colágeno, como por exemplo, o IV e o V (LIGHT; CHAMPION, 1984). O colágeno tipo I proporciona maior força tênsil e está relacionado à maior rigidez de tecido, estando presente quase exclusivamente no epimísio. Por sua vez, o colágeno tipo III proporciona maior complacência e está presente onde a mobilidade entre as fibras musculares é necessária. Sendo assim,

pode ser encontrado no endomísio e no perimísio, apresentando maior quantidade neste em relação àquele (DUANCE et al., 1977; IMAMURA; IMAMURA; HIROSE-PASTOR, 1999, TAKALA; VIRTANEN, 2000, AHTIKOSKI et al., 2001; JÄRVINEN et al., 2002). As duas principais proteínas adesivas da MEC são a laminina e a fibronectina (Figura 2). A laminina é um complexo de 3 cadeias polipeptídicas com domínios de ligação para colágeno, heparan sulfato, entacina, receptores de lamininas na superfície celular, como as integrinas. A fibronectina é um dímero ligado por pontes dissulfeto e ajuda as células a aderirem à matriz, possui vários domínios de ligação para outras moléculas da MEC e para receptores da superfície celular (ALBERTS et al., 2002). As proteínas da MEC associam-se com proteínas de membranas e com o complexo glicoproteínas-distrofina (Figura 2), que interagem com proteínas contráteis e com proteínas sinalizadoras para síntese protéica, como a fosfatidilinositol 3 quinase. Com isso, quando há um estímulo mecânico, por exemplo, estas associações comportam-se como mecanoreceptores, pois são capazes de transmitir a energia mecânica e de transformá-la em eventos biológicos, o que define mecanotransdução celular (HORNBERGER; ESSER, 2004).

Figura 3 - Esquema da estrutura de tripla-hélice do colágeno.

Fonte: Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell* (2002) – Modificada.

Pelas informações relatadas acima, nota-se a extrema importância das proteínas distrofina, laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo III para a manutenção da função muscular. Por este motivo, analisar a localização e a distribuição das mesmas após situações de desuso e de técnicas de remobilização, como o alongamento, pode trazer informações relevantes que incrementam o conhecimento sobre essas estruturas teciduais.

2.2. Efeitos da imobilização no músculo estriado esquelético

Por ser uma condição encontrada com grande frequência, inúmeros estudos tem aplicado modelos de desuso em trabalhos experimentais a fim de mimetizar condições observadas em humanos, tais como imobilização gessada (AOKI et al., 2004; COUTINHO et al., 2004; da SILVA et al., 2006; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006), desnervação (ARRUDA et al., 2006; PATTERSON; STEPHENSON; STEPHENSON, 2006), transecção da medula espinal (CELICHOWSKYI et al., 2006; LEE et al., 2007) e simulação de vôos espaciais ou suspensão pela cauda (ADAMS et al., 2007; CORNACHIONE et al., 2008; KAWANO et al., 2008, HEINEMEIER et al., 2009).

O músculo esquelético de mamíferos possui alta capacidade de adaptar-se a diferentes condições e posturas. Sua adaptação pode ser de natureza reversível ou irreversível, de acordo com a posição adotada por determinado período. Uma mínima quantidade de carga repetitiva e tensão são fatores fundamentais para manter a massa, o trofismo e a citoarquitetura do músculo esquelético. A redução da atividade física, como em situações de restrição ao leito e imobilização, gera diminuição da excursão funcional e da força do músculo envolvido (OKITA et al., 2004). Essas condições provocam alterações citoarquiteturais importantes, observadas no eixo longitudinal (encurtamentos e contraturas) e transversal (atrofia e hipertrofia/hiperplasia) do músculo (PICQUET et al., 1998; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; GOMES et al., 2007). Ainda, a posição de encurtamento dos sarcômeros afeta o comprimento ótimo de ação dessas unidades com consequente redução do número de sarcômeros em série, a fim de manter o comprimento funcional ideal (TABARY et al., 1972; WILLIAMS; GOLDSPIK, 1978; WILLIAMS et al., 1988; GOLDSPIK, 2002; COUTINHO et al., 2004), o que resulta na rápida degradação das miofibrilas e proteínas musculares (GOLDSPIK, 1991; KASPER et al., 1993; BALDWIN et al., 1994; OKITA et al., 2001). Portanto, a redução da

atividade contrátil do músculo influencia o processo de mecanotransdução gerando adaptações tanto no tecido contrátil quanto nos elementos não contráteis, como tecido conjuntivo intra e extramuscular (WILLIAMS; GOLDSPIK, 1984; JÓZSA et al., 1988; KOVANEN, 2002; COUTINHO et al., 2006). Ao analisar os efeitos agudos da imobilização, observou-se que após 15 dias de imobilização pode ocorrer um aumento de 279% na densidade de tecido conjuntivo no músculo sóleo (DURIGAN et al., 2006). Este fato é devido à redução da massa e do comprimento muscular como consequência da rápida degradação da rede de fibrilas musculares e proteínas não colagênicas, como as proteínas de membrana, o que leva à redução no diâmetro individual de cada fibra e diminuição no número de miofibrilas em paralelo. Ainda, músculos de contração lenta, como o sóleo, tem maior concentração de colágeno que músculos de contração rápida, como o reto femoral (KOVANEN et al., 1984).

A reversibilidade dessas alterações depende da introdução de estímulos externos capazes de contribuir para a mecanotransdução celular como mobilização precoce (HWANG et al., 2006), e técnicas de alongamento (COUTINHO et al., 2006). As alterações dos aspectos citoarquiteturais determinadas pelo desuso, relatadas acima, são extensivamente destacadas na literatura científica. No entanto, relatos dos efeitos morfofuncionais determinados por diferentes procedimentos de remobilização são escassos.

2.3. Alongamento passivo manual e ação no músculo estriado esquelético

Diferentes protocolos terapêuticos têm sido utilizados na prática clínica da reabilitação para aperfeiçoar as funções musculares (ZAKAS et al., 2005). O alongamento muscular passivo é um dos procedimentos terapêuticos de remobilização mais indicado quando a ADM está limitada e há comprometimento do desempenho funcional. A meta geral de um programa de alongamento é restabelecer a ADM aos padrões de normalidade das articulações e a mobilidade dos tecidos moles que as cercam (KISNER; COLBY, 1998; WELDON; HILL, 2003). É uma importante técnica capaz de prevenir a proliferação de tecido conjuntivo e a perda de sarcômeros em série de músculos imobilizados (JÄRVINEN et al., 1992; COUTINHO et al., 2004), e tem sido indicada para prevenção de lesões, inclusive em atletas (WELDON; HILL, 2003). Pode-se salientar também que alguns estudos

sugerem que esta técnica é capaz de determinar hipertrofia tecidual (COUTINHO et al., 2006; CORNACHIONE et al., 2008; BENEDINI-ELIAS et al., 2009).

O ato de alongar um segmento corpóreo baseia-se na aplicação de uma força externa, controlada ou não, capaz de promover tensão em diferentes tecidos. Quando desenvolvida no músculo, a manobra de alongamento passivo transmite a força a um conjunto de estruturas localizadas no meio intra e extracelular. De Deyne (2001) descreve que a transmissão da força passiva é realizada inicialmente sobre o colágeno, seguido pelas glicoproteínas, passando pelas proteínas de membrana, como as integrinas e as distroglicanas, em sequência promove ativação do citoesqueleto, constituído por proteínas do costâmero, seguido pelo alcance do citoesqueleto não contrátil e finalmente as proteínas contráteis. Esta interação estrutural é primordial para o acontecimento da miofibrillogênese.

Em estudo prévio, Gomes et al. (2007) analisaram secções transversais de músculo sóleo de ratos e demonstraram que o alongamento muscular, realizado durante o procedimento de imobilização, pode causar intenso dano tecidual quando utilizado numa frequência igual ou superior a uma vez na semana por 40 minutos. Alterações ultraestruturais significativas relacionadas ao processo de tumefação celular e alta reatividade celular foram observadas, o que representa processos de degeneração e/ou regeneração. Porém, quando o alongamento foi aplicado em ratas por 21 dias após 10 dias de hipocinesia, poucos sinais de lesão foram observados no músculo sóleo destes animais (CORNACHIONE et al., 2012). Sabe-se que quando o tecido é alongado, além de sua fase plástica, microlesões são desencadeadas o que contribui para sequência de eventos ativadores das células satélites e consequente início de um ciclo reparativo. Células satélites são células tronco miogênicas localizadas abaixo da lâmina basal da fibra muscular. Sua função está intimamente ligada aos processos de crescimento, regeneração e reparação muscular. Estas células expressam marcadores miogênicos, como M-caderina, PAX7, Myf5, NCAM/CD56 e possuem capacidade de auto-renovação. Além disso, apresentam-se quiescentes no músculo esquelético e são ativadas por vias moleculares. A partir disso se proliferam e diferenciam-se para início da regeneração muscular (CHRISTOV et al., 2007). A ativação destas células é mediada pela liberação de fatores de crescimento, como o do hepatócito (HGF), o de fibroblastos (FGF) e o insulínico (IGF), além da produção de óxido nítrico (NO) (TEDESCO et al., 2010).

Há aproximadamente 30 anos, os efeitos morfológicos do alongamento em músculos encurtados vêm sendo estudados sob a vertente transversal, porém, sob a óptica longitudinal, os aspectos citoarquiteturais merecem melhor detalhamento científico, assim como o comportamento das proteínas do costâmero. Ainda, somam-se as dificuldades encontradas na adoção da periodicidade da aplicação deste programa de treinamento, quer seja durante a atividade física convencional, quer seja na reabilitação física (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1973; 1983; COUTINHO et al., 2004).

2.4. Análise funcional da marcha

A marcha do rato pode ser dividida em fase de balanço e de apoio. Durante a marcha normal, o quadril apresenta uma fase extensora na fase de apoio e uma fase flexora na fase de balanço. Já o joelho, apresenta dois ciclos de flexo-extensão: uma fase flexora e uma extensora na fase de apoio e uma fase flexora e uma extensora na fase de balanço (GILLIS, BLOB, 2001).

Varejão et al. (2002) avaliaram os movimentos do pé e tornozelo esquerdos de ratos Wistar normais durante a fase de apoio da marcha. Estes autores dividiram esta fase em três componentes principais: resposta à carga, médio apoio e pré-balanço. A resposta à carga ocorre nos primeiros 20% da fase de apoio, consiste no período entre o contato inicial realizado com os dedos e a transferência de peso propriamente dita. O médio apoio ocorre entre 20 e 40% da fase de apoio, é o período entre a resposta à carga, que marca o fim do duplo apoio e o início do apoio simples, e apoio terminal (calcanhar alto). Neste componente, a tíbia move-se sobre o pé fixo no chão o que proporciona uma dorsiflexão do tornozelo. Já o pré-balanço, ocorre nos últimos 60% desta fase e caracteriza-se pelo apoio terminal e pré-balanço. É neste momento que ocorre o pico de dorsiflexão, que antecede o início de uma nova flexão-plantar durante o pré-balanço.

Situações de desuso resultam em anormalidades teciduais que podem comprometer a função do segmento. Canu et al. (2005) realizaram uma análise tridimensional dos movimentos do membro posterior direito de ratos durante marcha em esteira após 14 dias de simulação de microgravidade. Neste estudo, foram utilizadas três velocidades diferentes (20, 25 e 30cm/s) na esteira. As alterações funcionais encontradas no grupo submetido à simulação de microgravidade foram aumento da duração da fase de apoio na velocidade baixa; aumento do

comprimento do passo nas três velocidades; redução da extensão da pata posterior no momento do contato inicial, ocorrida na velocidade baixa, para iniciar um duplo apoio e evitar um desequilíbrio durante a extensão do membro contralateral que estava no fim da fase de apoio. Ainda, no contato inicial, a pata não estava posicionada tão a frente do quadril, como visto no grupo controle. Ocorre também tendência à abdução do quadril.

Como os animais têm componentes biomecânicos do membro posterior modificados após situações de desuso, a avaliação do desempenho funcional após o período de imobilização e durante a realização de determinada técnica de remobilização é de extrema importância, pois aprimora a compreensão das anormalidades funcionais geradas e da reorganização das proteínas pela reabilitação.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

a. Gerais:

O objetivo deste estudo foi investigar as respostas teciduais do músculo sóleo frente ao estresse longitudinal induzido pela associação do treinamento do tipo alongamento passivo com a livre movimentação. E ainda, verificar a evolução temporal destas respostas durante a aplicação do alongamento, após hipocinesia dos membros posteriores de ratas, considerando aspectos histopatológicos, morfométricos e funcionais.

b. Específicos:

O objetivo do presente projeto de pesquisa foi:

Comparar as alterações das fibras musculares do músculo sóleo entre animais submetidos à imobilização, alongados por 1, 3, ou por 10 dias e animais “controle” através das análises:

- Funcional da marcha;
- Morfológica convencional;
- Quantitativas: peso corporal dos animais; amplitude de movimento de dorsiflexão da pata direita; relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras; expressão de distrofina, de laminina, e de macrófagos;
- Semi-quantitativa da expressão dos colágenos tipos I e III.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas 96 ratas Wistar, fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto – USP com peso médio de 248.2g ($\pm$ 5.3). Segundo dados deste biotério, este peso caracteriza ratas adultas jovens, em fase reprodutiva. Os animais foram divididos em gaiolas com quatro animais em cada, onde permaneceram em ambiente controlado com temperatura à 24°C e período de claro/escuro de 12/12h. Além disso, tiveram livre acesso à alimentação padrão e água *ad libitum* e as gaiolas foram higienizadas de acordo com os procedimentos do biotério. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa usaram fêmeas em seus experimentos e, para ampliar os conhecimentos, este gênero também foi utilizado no presente estudo. Este projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (processo número 129/2009 – Anexo J).

4.2. Grupos experimentais

Inicialmente, os animais foram pesados, identificados, numerados e distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Número	Procedimentos experimentais
I	12	Animais imobilizados por 10 dias. Massa corpórea e morfologia e (n = 8). Western Blot (n = 4).
C_(Imob)	12	Foram sacrificados após período de 10 dias. Grupo controle do I. Massa corpórea e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
IAL₍₁₎	12	Animais imobilizados por 10 dias, seguido de período de alongamento + livre movimentação de 1 dia. Massa corpórea, ADM de dorsiflexão, análise funcional da marcha e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
IAL₍₃₎	12	Animais imobilizados por 10 dias, seguido de período de alongamento + livre movimentação de 3 dias. Massa corpórea, ADM de dorsiflexão, análise funcional da marcha e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
IAL₍₁₀₎	12	Animais imobilizados por 10 dias, seguido de período de alongamento + livre movimentação de 10 dias. Massa corpórea, ADM de dorsiflexão, análise funcional da marcha e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
IL₍₁₎	12	Animais imobilizados por 10 dias, seguido de livre movimentação nas gaiolas por 1 dia. Massa corpórea, ADM de dorsiflexão, análise funcional da marcha e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
IL₍₃₎	12	Animais imobilizados por 10 dias, seguido de livre movimentação nas gaiolas por 3 dias. Massa corpórea, ADM de dorsiflexão, análise funcional da marcha e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
IL₍₁₀₎	12	Animais imobilizados por 10 dias, seguido de livre movimentação nas gaiolas por 10 dias. Massa corpórea, ADM de dorsiflexão, análise funcional da marcha e morfologia (n = 8). Western Blot (n = 4).
Total	96	

Neste estudo, apenas um grupo que não sofreu nenhum procedimento experimental (C_(Imob)) foi incluído. No trabalho de Cornachione (2011), não foram encontradas diferenças nas variáveis morfológicas e morfométricas do músculo sóleo analisadas entre os animais de grupos controles realizados com diferentes idades.

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1. Técnica de imobilização

Este procedimento teve duração de 10 minutos aproximadamente, não foi invasivo e nem doloroso, mas os animais foram anestesiados previamente com Hidrato de Cloral 4% intraperitoneal, sendo que metade da dose indicada foi utilizada (0,5ml/100g). Após a anestesia, realizou-se o encurtamento do músculo sóleo através da imobilização da articulação tíbio-társica direita em flexão plantar máxima, com auxílio de uma fita adesiva (WILLIAMS, 1988) (Figura 4). Os cuidados para a prevenção de úlceras e edemas de extremidade foram tomados. O modelo de imobilização do membro posterior dos animais utilizado seguiu o modelo proposto Benedini-Elias et al. (2009) e Coutinho et al. (2002) (Figura 5A e B).

Figura 4 - Imobilização da articulação tíbio-társica em flexão plantar.

Figura 5 A e B - Modelo de imobilização de Coutinho et al., (2002). A: Parte superior, similar a uma camiseta de cotton. B: Parte inferior, dividida em anterior e posterior.

4.3.2. Técnica de alongamento passivo manual intermitente

Após ficarem imobilizados por 10 dias, os animais dos grupos IAL₍₁₎, IAL₍₃₎ e IAL₍₁₀₎ passaram por um período de 1, 3 e 10 dias, respectivamente, de alongamento passivo manual intermitente. O primeiro dia que se realizou esta técnica foi no mesmo dia em que os animais saíram do sistema de imobilização. Todas as intervenções aconteceram às nove horas da manhã. O alongamento passivo manual foi realizado com a articulação do joelho do membro estudado em flexão completa. Aplicou-se uma força manual (não quantificada) na porção plantar da pata posterior direita para realização do movimento de dorsiflexão da articulação do tornozelo, o que gerou o alongamento passivo do músculo sóleo das ratas (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; POLIZZELO et al., 2009) (Figura 6). Os exercícios foram realizados por um período de 30 segundos cada, com intervalos 30 segundos entre os mesmos. Esta técnica foi realizada em uma única série de 10 exercícios passivos, por um período de 1, 3 e de 10 dias consecutivos.

Figura 6 - Técnica de alongamento passivo manual. No detalhe (seta), observe o manuseio da região plantar, o que promove o movimento de dorsiflexão do tornozelo e consequentemente o alongamento do músculo.

4.3.3. Mensuração manual passiva da ADM de dorsiflexão

A mensuração manual passiva da ADM de dorsiflexão da articulação do tornozelo direito foi realizada através de um goniômetro de dedo (Carci, São Paulo, Brasil). Oito animais dos grupos IAL₍₁₎, IAL₍₃₎, IAL₍₁₀₎, IL₍₁₎, IL₍₃₎ e IL₍₁₀₎ foram submetidos a este procedimento. Durante a mensuração, a pata traseira direita dos animais foi posicionada em extensão de quadril e de joelho, considerou-se 0 grau a flexão plantar máxima e, a partir desta posição, ângulos positivos no sentido da dorsiflexão (Figura 7). Em estudo piloto prévio, mensurou-se esta ADM em animais

controle e a angulação máxima de dorsiflexão atingida foi de 130 graus, por este motivo este ângulo foi considerado a ADM completa. Os valores foram mensurados antes da imobilização, para a obtenção dos valores de referência; imediatamente após a retirada do sistema de imobilização; uma vez por dia no período da manhã durante livre movimentação dos grupos $IL_{(1)}$, $IL_{(3)}$, $IL_{(10)}$; antes e após cada intervenção pelo alongamento para os grupos $IAL_{(1)}$, $IAL_{(3)}$, $IAL_{(10)}$ (Figura 7).

Figura 7 - Mensuração do ângulo de dorsiflexão.

4.3.4. Análise funcional da marcha

Impressão das pegadas pelo método proposto de filmagem com velocidade da marcha controlada

Oito animais dos grupos $IAL_{(1)}$, $IAL_{(3)}$, $IAL_{(10)}$, $IL_{(1)}$, $IL_{(3)}$ e $IL_{(10)}$ foram submetidos a uma análise funcional da marcha. Esta análise foi realizada no laboratório de Bioengenharia do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP. O sistema para coleta dos vídeos foi composto por uma esteira que permite a filmagem da marcha do animal, por meio de uma *webcam* com 1.3 megapixels acoplada a um computador portátil (Figura 8) utilizada no Pós-doutoramento da fisioterapeuta Vanessa Vilela Monte-Raso (colaboradora deste projeto), desenvolvida com recursos FAPESP (processo nº 07/54084-0), pela empresa Insight® de Ribeirão Preto.

Figura 8 - Sistema de coleta dos vídeos para realização da análise funcional da marcha.

Os animais passaram por um período de adaptação de três dias, sendo que os vídeos foram realizados para fornecerem dados controles dos respectivos animais antes do período de imobilização. Após dez dias de imobilização, as pegadas da marcha das ratas foram filmadas novamente por 1 dia para os grupos $IAL_{(1)}$ e $IL_{(1)}$, por 3 dias consecutivos para os grupos $IAL_{(3)}$ e $IL_{(3)}$, e por 10 dias consecutivos para os grupos $IL_{(10)}$ e $IAL_{(10)}$. Esta análise sempre foi realizada após o procedimento de alongamento manual intermitente para os grupos a ele submetidos e no período da manhã para os grupos apenas com livre movimentação, quando também era realizada a mensuração da ADM de dorsiflexão do tornozelo dos animais destes grupos.

As imagens das impressões das pegadas obtidas a partir das filmagens foram selecionadas de modo que as patas posteriores estavam na fase de duplo apoio: a pata direita estava na resposta à carga e a esquerda no pré-balanço. Estas imagens tiveram seu tamanho modificado para que o tamanho adequado fosse conseguido por meio do *software* Adobe *fotoshop*, versão CS3® e foram editadas para serem utilizadas no programa de análise.

Após a edição das imagens, estas foram introduzidas em um programa de computador chamado Índice Funcional do Ciático (IFC) de análise gráfica especialmente desenvolvido para esse fim (SELLI, 1999) (Figura 9), no Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP. Este programa foi modificado por Yamazita (2008) e permite a identificação, a análise das imagens segundo os parâmetros previamente selecionados e a armazenagem dos dados. Os parâmetros medidos em milímetros (mm) foram: o comprimento da pegada (CP) e a abertura total dos dedos, do 1° ao 5° (ATD) ambos sugeridos por Bain et al. (1989). Além desta análise, realizou-se também uma descrição da marcha no período pré e pós-imobilização (análise qualitativa).

Figura 9 - Programa que calcula os parâmetros a partir da marcação dos pontos selecionados na imagem.

4.3.5. Obtenção dos músculos

Após o período de experimento, os animais foram pesados e sacrificados com excesso de anestésico. Foi realizada uma incisão distal na tíbia do membro posterior direito, próxima à articulação do tornozelo, de forma a expor o músculo sóleo (Figura 10). A partir dessa exposição, a pata direita foi posicionada em rotação externa de quadril, extensão de joelho e articulação tibio-társica em posição neutra para a mensuração do comprimento entre as junções músculo-tendíneas proximal e distal através de um paquímetro digital (Marberg, São Paulo, Brasil). Posteriormente, o músculo foi dissecado e retirado integralmente. Para a realização dos procedimentos histológico, imunoistoquímicos e de imunofluorescência ($n = 8$), o mesmo foi envolvido em talco, colocado em um pedaço de cortiça revestido com parafilme e suas extremidades tendíneas foram fixadas por agulhas, com o intuito de preservar o seu comprimento original obtido através do paquímetro digital (Figura 11). Só assim foi congelado em nitrogênio líquido. A preservação do comprimento evitou a formação de ondulações no tecido que comprometeriam as análises realizadas. Depois de congelado, o músculo foi retirado do sistema cortiça-agulhas dentro do Criótomo Leica CM 1850 UV (Leica Microsystems, Frankfurt, Alemanha) a uma temperatura de -25°C , colocado em um criotubo que foi mergulhado em nitrogênio líquido para posterior estocagem em um freezer à -80°C até o processamento do material. Para a realização da técnica de Western Blot ($n = 4$), amostras do ventre do músculo sóleo foram coletadas, lavadas em solução salina estéril a 0,9%, secas

em papel de filtro, colocadas em criotubos de 2ml, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de proteínas.

Figura 10 - Exposição e dissecação do músculo sóleo (seta preta).

Figura 11 - Músculo sóleo (seta branca) no sistema "cortiça-agulhas" com seu comprimento preservado com base no valor visualizado no paquímetro digital.

4.4. Processamentos imunoistoquímicos para fibronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo III e imunofluorescência para distrofina, laminina e macrófagos

As técnicas foram realizadas no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Realizou-se imunoistoquímica para caracterização de fibronectina e colágenos tipos I e III. Cortes histológicos longitudinais de 5µm foram obtidos no mesmo criótomo citado anteriormente (-25°C) e colhidos em lâminas 26 × 76mm para posterior aplicação de anticorpo *goat polyclonal anti-human fibronectin* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Após obtenção dos cortes longitudinais, o fragmento muscular foi reorientado para obtenção de cortes transversais para aplicação dos anticorpos *mouse anti-rat collagen type I* e *type III* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). As lâminas foram fixadas em acetona gelada por 10 minutos, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas em solução a 1% de H₂O₂ por 15 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Lavou-se novamente as lâminas com PBS e depois com Tampão Tris Salino com 0.05% de Tween 20 (TBST) por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com Soro Albumina Bovina (Sigma-Aldrich) 2% e Soro Normal de Cabra (Vector S-1000, Vector Laboratories, Road Burlingame, California, USA) por 20 minutos. Os excessos de líquido foram removidos e as amostras foram incubadas com os anticorpos primários *mouse anti-rat collagen type I* (diluição 1:18.000), *mouse anti-rat collagen type III* (diluição 1:36.000) e *goat*

polyclonal anti-human fibronectin (diluição 1:100) à 4°C “overnight”. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBST por 9 minutos e incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:200) do kit Vector, durante 30 minutos. Seguiu lavagem com TBST para incubação por 30 minutos em avidina + biotina do kit Vector Laboratories (kit Vector PK6200). Após nova lavagem com TBST, realizou-se incubação em cromógeno Diaminobenzidina¹ (Sigma-Aldrich), durante 5 minutos. Seguiu lavagem em água destilada, contracoração com Hematoxilina (Merck, Darmstadt, Deutschland, Germany) por 10 segundos, desidratação, diafanização e montagem em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA).

A técnica de imunofluorescência foi realizada para laminina e dupla marcação para distrofina e CD68². Cortes histológicos longitudinais de 5µm foram obtidos através do criótomo Leica CM 1850 UV (-25°C) e colhidos em lâminas 26 × 76mm. As lâminas foram lavadas brevemente em PBS e fixadas em Xpress molecular fixative (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Holanda) por 4 minutos, seguiram três lavagens em PBS por 5 minutos cada. Realizou-se bloqueio com soro de cabra (Vector Laboratories) 10% diluído em PBS por 60 minutos. Depois foi realizado bloqueio com Avidina por 15 minutos (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories) e seguiu lavagem breve em PBS.

Os excessos de líquido foram removidos e as amostras foram incubadas com os anticorpos primários *rabbit polyclonal anti-laminin*, diluição 1:100 (Abcam, Cambridge, UK); ou *mix de rabbit polyclonal anti-dystrophin*, diluição 1:400 (Abcam) + *mouse monoclonal [ED1] anti-CD68*, diluição 1:200 (Abcam) à 37°C por 2 horas. Após este período, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS (5 minutos cada) e incubadas com os anticorpos secundários, diluição 1:1.000 (Invitrogen, Nova York,

¹ Tratamento de resíduos de diaminobenzidina (DAB): foram preparadas soluções-estoque de permanganato de potássio 0,2M (31,6g/litro) e de ácido sulfúrico 2M (112ml ácido concentrado/litro). Para cada 10ml de resíduo de DAB (0,9mg/ml), foi adicionado 5ml de solução de permanganato de potássio e 5ml de solução de ácido sulfúrico. A solução formada permaneceu em repouso por pelo menos 10 horas (ou *overnight*). Após este período, adicionou-se pequena quantidade de ácido ascórbico em pó até a descoloração da solução. Seguiu neutralização da solução descolorida com carbonato ou bicarbonato de sódio até pH ~ 7. Para finalizar, a solução foi descartada na pia com água em abundância. Este tratamento foi realizado no Laboratório de Resíduos Químicos - USP, Campus, Ribeirão Preto (Anexo K).

² O anticorpo escolhido para a marcação da proteína CD68 (*mouse monoclonal [ED1] anti-CD68*), presente na membrana celular dos macrófagos, resultará em fluorescência apenas de macrófagos ativos, visto que macrófagos residentes em músculo esquelético sem lesão são negativos para o clone ED1 (MCLENNAN, 1993). Ainda, os macrófagos ED1⁺ podem estar localizados tanto no meio extra quanto no meio intracelular do tecido muscular esquelético lesado (MCLENNAN, 1996).

USA): para laminina foi utilizado Molecular probes fluorescent goat anti-rabbit green 488, para distrofina + macrófago utilizou-se mix de Molecular probes fluorescent goat anti-rabbit green 488 + goat anti-mouse red 568, respectivamente, por 45 minutos. Três outras lavagens de 5 minutos com PBS foram feitas e as lâminas foram montadas em Prolong Gold Antifade (Invitrogen).

4.5. Processamento histológico

Os músculos foram seccionados transversalmente no Criótomo Leica CM 1850 UV a uma temperatura de -25°C. Foram obtidos cortes com espessura de 5µm colhidos em lâminas 26 × 76mm. O processamento contou com a aplicação da reação de coloração Hematoxilina-Eosina (H.E.), que foi desenvolvido no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMRP-USP, conforme a rotina de processamento de músculo esquelético deste laboratório.

4.6. Extração de proteínas e Western Blot

Para a extração das proteínas, foram adicionados 200µl de tampão de extração contendo inibidores de fosfatase (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1% SDS e 1mM PMSF; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, EUA) e inibidores de protease (Protease inhibitor cocktail, Amresco LLC, Solon, Ohio, EUA) ao tecido que foi triturado em homogeneizador de tecidos MA102 Mini (Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, Brasil). O material triturado foi centrifugado a 13.000rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e aliquoteado para dosagem de proteínas através do método de Bradford. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) utilizando-se o filtro específico para o comprimento de onda correspondente a 595nm.

Em seguida, amostras contendo 30µm de proteínas (n = 4 animais/grupo) foram separadas em gel de eletroforese SDS-PAGE a 5%, 7%, 10% ou 12% de acordo com o peso molecular da proteína a ser analisada. Após a corrida do gel, foi feita a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL; GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, Piscataway, NJ, EUA) ou de PVDF (Polyvinylidene Fluoride, BioRad Laboratories). A transferência completa das proteínas foi confirmada pela coloração de ambos, o gel e a membrana com os corantes Coomassie blue (Bio-Rad Laboratories) e Ponceau S (Sigma-Aldrich),

respectivamente, conforme instruções do fabricante. Em seguida, as membranas foram lavadas em água deionizada e colocadas em solução de bloqueio com albumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) a 5% diluída em solução tampão PBS-T 1× (Tampão fosfato tamponado Tween-20, pH = 7,6) durante 2 horas sob constante agitação. Após, as membranas foram lavadas em solução tampão PBS-T 1× (3 vezes de 5 minutos) e incubadas *overnight* à 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-distrofina (1:500, Santa Cruz Biotechnology) e anti-laminina (1:1000, Abcam) diluídos em solução de PBS-T 1× com BSA a 1%.

Após o período de incubação dos anticorpos primários as membranas foram lavadas com tampão PBS-T 1× (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com anticorpos secundários anti-rabbit conjugados com HRP (horseradish peroxidase, Santa Cruz Biotechnology), diluídos em solução de PBS-T 1× com BSA a 2%, por 45 minutos à temperatura ambiente. Por último, as membranas foram lavadas novamente com PBS-T 1×, e incubadas com solução de revelação (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Abcam) de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, as membranas foram expostas e documentadas através do equipamento de fotodocumentação ChemiDoc XRS (BioRad Laboratories). A quantificação das bandas foi realizada com o software Image J através da função *Gel Analyzes*. Os valores de cada banda foram proporcionais ao valor de intensidade integrada e expressa em unidades arbitrárias. O anticorpo anti- α -tubulina (anticorpo monoclonal de camundongo, diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc.) foi usado como controle da quantidade de proteína aplicada em cada poço nos géis, dependendo da porcentagem do gel utilizada.

4.7. Estudo morfológico

As análises qualitativas dos cortes histológicos transversais foram realizadas em Microscópio de Luz Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Frankfurt, Alemanha). Aspectos morfológicos genéricos do tecido muscular foram avaliados pela coloração H.E.

4.8. Análise semi-quantitativa para os colágenos dos tipos I e III

Esta análise foi realizada no Microscópio de Luz citado anteriormente, por três examinadores independentes, para todos os grupos experimentais aqui estudados. Na análise, foi utilizada a classificação descrita por Kurose et al. (2006) levando em

conta a reatividade dos mesmos: negativo (-); ligeiramente positivo ($\pm$); fracamente positivo (+); moderadamente positivo (++); fortemente positivo (+++).

4.9. Estudo morfométrico

Análise morfométrica foi realizada com auxílio do software Leica LAS V3.7 cujas imagens foram capturadas a partir do microscópio óptico Leica DM 2500 pela câmera de vídeo digital Leica DFC 300FX, conectada a um microcomputador.

4.9.1. Relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras

Através da imunomarcação pelo anticorpo *goat polyclonal anti-human fibronectin*, três campos aleatórios das lâminas do músculo sóleo de cada animal foram colhidos. A partir destas imagens, foram contadas as fibras com positividade intracelular para fibronectina e o número total fibras musculares por campo dos animais dos diferentes grupos experimentais. A partir destes dados, foi estabelecida a relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras.

4.9.2. Densidade de macrófagos

Com a utilização da imunofluorescência pelo anticorpo *mouse anti-rat CD68*, a partir de imagens colhidas em 5 campos aleatórios das lâminas do músculo sóleo dos animais dos grupos aqui estudados, foram contados macrófagos através do segmento interativo do software Leica LAS V3.7.

4.10. Análise estatística

A estatística referente ao peso corporal dos animais, análise funcional da marcha, amplitude de movimento de dorsiflexão da pata direita, relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras, densidade de macrófagos no músculo sóleo de cada animal foi realizada entre os grupos e intra-grupos utilizando o Modelo de Regressão Linear com Efeitos Mistos, o ajuste do modelo foi feito através do *software* SAS versão 9.2. Para a análise de western blot, múltiplas comparações foram realizadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Através do teste t de Student, realizarm-se as comparações entre os grupos. Para todas as análises considerou-se nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$) e um intervalo de confiança de 95% (IC=95%).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Massa corpórea dos animais

Os dados referentes às análises intra e inter-grupos podem ser observados na Tabela 1. *Análise intra-grupos.* A imobilização gerou redução significativa da massa corpórea dos animais de todos os grupos a ela submetidos ($p < 0.05$). Após os procedimentos experimentais, os animais dos grupos $IAL_{(3)}$ e $IL_{(1)}$ apresentaram ganho considerável de massa corpórea ($p < 0.05$), sendo esta similar aos valores dos pesos iniciais ($p > 0.05$). Já nos grupos $IAL_{(10)}$, $IL_{(3)}$ e $IL_{(10)}$, pôde ser observado aumento significativo dos valores dos pesos no período pós-imobilização ($p < 0.05$) e estes ultrapassaram consideravelmente os valores dos pesos iniciais ($p < 0.05$). *Análise inter-grupos.* Nesta análise, comparou-se os pesos iniciais e finais dos grupos $C_{(Imob)}$ e I, além das massas corpóreas iniciais, pós-imobilização e finais dos grupos correspondentes ($IAL_{(1)}$ vs $IL_{(1)}$, $IAL_{(3)}$ vs $IL_{(3)}$, $IAL_{(10)}$ vs $IL_{(10)}$). A imobilização reduziu consideravelmente o peso dos animais ($C_{(Imob)}$ vs I, $p < 0.05$). Não foi encontrada diferença entre os grupos correspondentes ao considerar as massas corpóreas iniciais e pós-imobilização. Entretanto, os grupos apenas livres por 3 e 10 dias apresentaram valores de pesos finais maiores que os respectivos grupos submetidos ao alongamento ($p < 0.05$).

Tabela 1 - Média dos valores em gramas da massa corpórea dos animais dos grupos analisados nos diferentes procedimentos experimentais com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

Peso \ Grupos	Grupos							
	$C_{(Imob)}$	I	$IAL_{(1)}$	$IAL_{(3)}$	$IAL_{(10)}$	$IL_{(1)}$	$IL_{(3)}$	$IL_{(10)}$
Inicial	243.3 (238.5-248.2)	253.5 (237.3-255.1)	256.4 (254.4-258.4)	250.4 (246.7-254.1)	251 (245.2-256.8)	255 (250.4-259.6)	252.1 (248-256.1)	252.9 (245.9-259.9)
Pós-imobilização	----	234 * (225.3-242.7)	230* (223.8-236.1)	231.8 * (223.7-239.9)	228.8 * (220.9-236.7)	236.5 * (227.9-245)	235.7 * (229.8-241.5)	227.6 * (219-236.3)
Final	284.4 (273-295.9)	234 # (225.3-242.7)	244.7 (238.8-250.6)	245 † (245-258.4)	275.2 †* (262.5-287.9)	247.9 † (240.7-255.1)	265.9†*‡ (258.6-273.2)	285.6†*§ (273.8-297.3)

----, sem valor; *, $p < 0.05$ comparados aos respectivos pesos iniciais (intra-grupos); †, $p < 0.05$ comparados aos respectivos pesos pós-imobilização (intra-grupos); #, $p < 0.05$ comparado ao $C_{(Imob)}$; ‡, $p < 0.05$ comparado ao $IAL_{(3)}$; §, $p < 0.05$ comparado ao $IAL_{(10)}$.

5.2. Análise funcional da marcha

5.2.1. Análise descritiva da marcha nos períodos pré e pós-imobilização

Pré-imobilização

Durante a fase de duplo apoio das patas posteriores, a abertura total dos dedos (ATD) apresentou uma média de valores de 16.7mm (± 1.4) para a pata esquerda e 16.9mm (± 2.3) para a pata direita. O comprimento da pegada (CP) da pata direita, que se encontrava na fase de resposta à carga teve um valor médio de 15.8mm (± 1.8) e da pata esquerda, que se encontrava na fase de pré-balanço, um valor médio de 15.4mm (± 1.2) (Figura 12). Durante a fase de balanço, observou-se flexão do quadril seguida de flexão e extensão do joelho. Na fase de apoio, o quadril realizou extensão e o joelho flexão e extensão.

Figura 12 - Posição das patas posteriores da rata durante a marcha no período pré-imobilização na fase de duplo apoio.

Primeiro dia pós-imobilização

Imediatamente após a remoção do dispositivo de imobilização, os dados da marcha dos animais submetidos ao alongamento e dos que permaneceram apenas livres, foram similares. No membro posterior esquerdo, observou-se maior abertura dos dedos (média de 17.5mm ± 1.3) no apoio total, devido à sobrecarga nesta pata. A pata posterior direita, em alguns casos, permaneceu com flexão de quadril e joelho, impedindo a realização do contato inicial (Figura 13). Quando este fato ocorreu observou-se que o mesmo foi realizado com toque dos artelhos (média de 5.5mm ± 3.7 para CP), com os dedos bem abertos (média de 14.9mm ± 2.2) (Figura 14). Durante a passada, o membro posterior direito não conseguiu ultrapassar o esquerdo, permanecendo posterior ou lateral. Observou-se limitação no movimento de dorsiflexão do tornozelo direito.

Figura 13 - Posição das patas posteriores da rata durante a marcha no primeiro dia pós-imobilização com a pata posterior direita em flexão plantar.

Figura 14 - Posição das patas posteriores da rata durante a marcha no primeiro dia pós-imobilização; pata posterior direita na fase de apoio com toque dos artelhos.

Nos casos em que a pata previamente imobilizada não realizou a fase de apoio da marcha e permaneceu em flexão com os dedos fechados, a marcha ocorreu predominantemente com a movimentação dos membros anteriores, que impulsionaram o animal para frente. A pata posterior esquerda realizou um passo curto com os dedos mais abertos (média de $17.5\text{mm} \pm 1.3$) do que no período pré-imobilização, pois havia sobrecarga de peso neste segmento. Nestes animais, o apoio da pata direita (média de $9.5\text{mm} \pm 1.4$ para CP) ocorreu somente quando a rata permanece parada na esteira, ainda que esta estivesse em movimento, ou seja, não ocorreu durante a execução da marcha. Em paralelo, houve aumento da velocidade da marcha devido a não realização da fase apoio pela pata posterior direita.

Terceiro dia pós-imobilização

Nas ratas alongadas, a pata previamente imobilizada estava com os dedos mais fechados (média de $11.7\text{mm} \pm 2.2$) e nas ratas livres os dedos encontravam-se mais abertos (média de $14.5\text{mm} \pm 1.9$). Ambas apresentaram limitação no movimento de dorsiflexão, que determinou flexão excessiva de quadril. O membro posterior direito ainda apresentou dificuldade para ultrapassar o membro esquerdo

na fase de balanço da marcha. Ainda não foi observada fase de apoio. Porém, nas ratas que a realizavam, os valores do comprimento da pegada aumentaram (média de $12.2\text{mm} \pm 3.9$).

A pata esquerda ainda apresentou os dedos mais abertos (média de $17.5\text{mm} \pm 1.6$) tanto nas alongadas quanto nas livres, devido à dificuldade em apoiar o membro direito, o que caracterizou uma marcha dessincronizada, muitas vezes com saltos que impediam o apoio da pata direita.

Décimo dia pós-imobilização

Não houve diferenças qualitativas no desenvolvimento da marcha quando comparados os animais dos grupos $IL_{(10)}$ e $IAL_{(10)}$. Em ambos os grupos, os dedos da pata que foi imobilizada encontravam-se mais abertos (média de $16.7\text{mm} \pm 2.5$) e os da pata contralateral mais fechados (média de $16.4\text{mm} \pm 2$). O membro posterior direito já ultrapassava o contralateral e a fase de apoio ocorreu adequadamente, como no período pré-imobilização (comprimento da pegada com média de $14.8\text{mm} \pm 2.7$).

5.2.2. Análise das variáveis

Os dados referentes à análise intra-grupos podem ser observados na Tabela 2. *Análise intra-grupos.* A CP sofreu redução significativa após o procedimento de imobilização ($p < 0.05$). Nos dias 1 e 3 dos grupos alongado e com livre movimentação ($IAL_{(1)}$, $IAL_{(3)}$, $IL_{(1)}$ e $IL_{(3)}$), a variável CP ainda manteve-se significativamente reduzida em relação às variáveis pré-imobilização ($p < 0.05$). Alguns animais, principalmente do $IAL_{(1)}$, deixaram de realizar apoio da pata imobilizada ou a realizavam apenas com toque de artelhos e claudicação. Outro achado interessante é que os animais desse grupo apresentaram dificuldade de transpor o membro contra-lateral na fase de balanço da marcha. Os animais do $IAL_{(10)}$ restabeleceram os valores de CP da fase pré-imobilização após o sexto dia de treinamento ($p > 0.05$). Por outro lado, os animais do $IL_{(10)}$ não restabeleceram os valores de CP ($p < 0.05$). Considerando a variável ADT, pode ser observado que os animais dos grupos $IAL_{(3)}$ e $IL_{(3)}$ apresentaram redução significativa da distância entre dedos quando comparado aos valores obtidos na fase pré-imobilização ($p < 0.05$). Os animais do $IAL_{(10)}$ restabeleceram os valores de ADT da fase pré-imobilização após o quarto dia de treinamento ($p > 0.05$). Por outro lado, para os

animais do IL₍₁₀₎ esse achado foi observado somente no último dia de liberação na gaiola ($p > 0.05$).

Tabela 2 - Média dos valores em milímetros das variáveis da marcha dos animais dos grupos analisados com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Comparações entre o período pré-imobilização com o período pós-imobilização do mesmo grupo.

Grupos	Comprimento da pegada	Abertura total dos dedos
IL ₍₁₎	pré-i x 1° pós-i 14 x 12.5 * (12.6-15.4) (10-14.9)	pré-i x 1° pós-i 17.3 x 17.6 (16.5-18.1) (17-18.2)
IAL ₍₁₎	pré-i x 1° pós-i 14.7 x 12.3 * (13.8-15.6) (10.8-13.7)	pré-i x 1° pós-i 14 x 13.3 (12.9- 15) (12.3-14.3)
IL ₍₃₎	pré-i x 3° pós-i 16.5 x 14.7 * (15.9-17) (13.7-15.7)	pré-i x 3° pós-i 18.4 x 14.4 * (17.9-18.9) (13.2-15.7)
IAL ₍₃₎	pré-i x 3° pós-i 16.5 x 9.8 * (16-16.9) (8.5-11.1)	pré-i x 3° pós-i 17.9 x 11.7 * (17.3-18.5) (11.2-12.2)
IL ₍₁₀₎	pré-i x 10° pós-i 16.2 x 14.1 * (15.3-17.1) (11.6-16.7)	pré-i x 10° pós-i 17.8 x 17.1 (16.6-19) (15.8-18.4)
IAL ₍₁₀₎	pré-i x 6° pós-i 15.8 x 14.6 (15.1-16.5) (13.8-15.5)	pré-i x 4° pós-i 14.8 x 13.6 (13.7-16) (12.6-14.7)

pré-i, período pré-imobilização (valores de referência); pós-i, dias do período pós-imobilização; *, $p < 0.05$.

Os dados referentes às análises inter-grupos podem ser observados na Tabela 3. *Análise inter-grupos*. Nessa análise, foram comparados os últimos dias de pós-imobilização entre os grupos alongados e livres. A variável CP apresentou diferença significativa entre os grupos de três (IAL₍₃₎ vs IL₍₃₎, $p < 0.05$) e de 10 dias (IAL₍₁₀₎ vs IL₍₁₀₎, $p < 0.05$). No primeiro caso, o maior valor corresponde ao IL₍₃₎ e no segundo caso, ao grupo IAL₍₁₀₎. Já a ATD apresentou diferença significativa em todas as comparações, apresentando maiores valores nos grupos livres ($p < 0.05$).

Tabela 3 - Média dos valores em milímetros das variáveis da marcha dos animais dos grupos analisados com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Comparações entre os últimos dias pós-imobilização entre os grupos IAL₍₁₎ e IL₍₁₎; IAL₍₃₎ e IL₍₃₎; IAL₍₁₀₎ e IL₍₁₀₎.

Grupos	Comprimento da pegada			Abertura total dos dedos		
IAL ₍₁₎ × IL ₍₁₎	12.3 (10.8 - 13.7)	×	12.5 (10 - 14.9)	13.3 (12.3 - 14.3)	×	14.9 * (13.9 - 15.9)
IAL ₍₃₎ × IL ₍₃₎	9.8 (8.5 - 11.1)	×	14.7 * (13.7 - 15.7)	11.7 (11.2 - 12.2)	×	14.4 * (13.2 - 15.7)
IAL ₍₁₀₎ × IL ₍₁₀₎	16 (15.5 - 16.6)	×	14.1 * (11.6 - 16.7)	14.5 (13.2 - 15.8)	×	17.1 * (15.8 - 18.4)

*, p<0.05.

5.3. Amplitude de movimento de dorsiflexão da pata direita

Os dados referentes às análises intra-grupos e inter-grupos podem ser vistos na Tabela 4. *Análise intra-grupos.* Os valores pós-intervenção foram utilizados nas comparações dos grupos submetidos ao alongamento. Os dados indicaram que o ângulo de dorsiflexão do tornozelo dos animais do grupo IAL₍₁₀₎ apresentaram valores equivalentes ao período pré-imobilização a partir do segundo dia de intervenção pelo alongamento e que esses valores ultrapassaram consideravelmente os valores de referência a partir do sétimo dia. Já para os animais do grupo IL₍₁₀₎, estes ângulos atingiram as condições controles apenas a partir do sexto dia. Os grupos IL₍₁₎, IAL₍₁₎, IL₍₃₎ e IAL₍₃₎ não restabeleceram as condições controle. Ao comparar os ângulos que os animais apresentaram no primeiro dia pós-imobilização com os do último dia, encontrou-se diferença significativa nos grupos IL₍₃₎ (p<0.05), IL₍₁₀₎ (p<0.05) e IAL₍₁₀₎ (p<0.05), sendo os maiores valores no último dia de intervenção em relação aos achados do primeiro dia. Este fato não foi evidenciado pelo grupo IAL₍₃₎. *Análise inter-grupos.* Compararam-se os valores dos últimos dias de remobilização de cada período correspondente. Foi encontrada diferença entre os valores dos grupos de 1 dia (IAL₍₁₎ vs IL₍₁₎, p<0.05) e 3 dias (IAL₍₃₎ vs IL₍₃₎, p<0.05), sendo que os grupos alongados apresentaram valores superiores aos grupos livres.

Tabela 4 - Média dos valores em graus da amplitude de movimento de dorsiflexão da pata direita dos animais dos grupos analisados com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

Intra-grupos - comparações: primeiro x último dia do período pós-imobilização					
IAL ₍₁₎	IAL ₍₃₎	IAL ₍₁₀₎	IL ₍₁₎	IL ₍₃₎	IL ₍₁₀₎
126.7 (124.4-128.9)	122.3 × 123.3 (119.2-125.4) (121.1-125.6)	121.1 × 130* (117.3-125)	116.8 (114.9-118.7)	91.3 × 110.1* (78.9-103.8) (106.5-113.6)	111.6 × 130* (109-114.2)
Inter-grupos - comparações: os grupos correspondentes (último dia pós-imobilização)					
IL ₍₁₎ × IAL ₍₁₎		IL ₍₃₎ × IAL ₍₃₎		IL ₍₁₀₎ × IAL ₍₁₀₎	
116.8 (114.9-118.7)	126.7* (124.4-128.9)	110.1 (106.5-113.6)	123.3* (121.1-125.6)	130	130

*, p<0.05.

5.4. Morfologia – análise da técnica de H.E.

Os sinais histopatológicos identificados nos músculos dos animais estão listados na Tabela 5 e ilustrados nas Figuras 15A-H. O procedimento de imobilização por 10 dias determinou no músculo sóleo alterações morfológicas como variação no tamanho e formato das fibras, células justapostas (Figura 15B). Os procedimentos de alongamento e livre movimentação isolada na gaiola desencadearam sinais histopatológicos similares nas amostras de sóleo, porém pôde ser observado que o alongamento gerou maior número de lesão e reatividade tecidual, principalmente após 3 dias de terapia (Figuras 15E, F). Destaca-se no grupo IL₍₁₎, núcleos centralizados, fibras lobuladas, fragmentação, lesão em delta e que a celularidade intersticial estava aumentada nos músculos de alguns animais (Figura 15C). No grupo IAL₍₁₎, observaram-se áreas de perda focal de células, indicando ausência de tecido funcional contrátil. A celularidade intersticial presente neste grupo era mais intensa do que no grupo IL₍₁₎, além de maior número de fibras lobuladas, núcleos centralizados e fragmentação (Figura 15D). Metade dos animais do grupo IAL₍₁₎ apresentaram corpos de inclusão. Nas lâminas do grupo IL₍₃₎, perda de tecido contrátil foi observada, ainda que pudesse ser observado evolução do quadro inflamatório, este também foi confirmado pela presença de intensa celularidade e atividade mitocondrial aumentada no centro da célula (Figura 15E). As fibras musculares apresentaram núcleos centralizados, fibras lobuladas, fragmentação e lesão em delta, assim como diferença no tamanho das fibras.

Corpos de inclusão foram observados em grande quantidade, como também células com sinais de necrose (Figura 15E). Todas as alterações supracitadas também estavam presentes no grupo IAL₍₃₎, porém em maior quantidade e intensidade. A partir da descrição dos achados histopatológicos nestes grupos, foi possível constatar intensa resposta inflamatória associada à necrose e perda de tecido funcional contrátil no terceiro dia de pós-imobilização, sendo mais evidente no grupo IAL₍₃₎ (Figura 15F). Após 10 dias, os achados estavam minimizados nos IL₍₁₀₎ e IAL₍₁₀₎ (Figuras 15G, H). Os músculos dos animais do grupo IL₍₁₀₎ apresentaram pequena quantidade de alterações histopatológicas, representadas por um pequeno número de núcleos centralizados, fibras lobuladas e corpos de inclusão estavam presentes na periferia da célula e também no centro de algumas delas (Figura 15G). No grupo IAL₍₁₀₎, foram encontradas as mesmas alterações descritas para o IL₍₁₀₎, somadas à fragmentação (Figura 15H).

Tabela 5 - Porcentagem do número de fibras e de animais que apresentaram as alterações histopatológicas, por grupo.

Número de fibras								
Grupos Alterações	C _(Imob)	I	IAL ₍₁₎	IAL ₍₃₎	IAL ₍₁₀₎	IL ₍₁₎	IL ₍₃₎	IL ₍₁₀₎
Núcleos centralizados	-----	0.3	7.5	3.2	1.2	9	5.2	1.5
Fibras lobuladas	0.5	----	7.8	5.8	0.2	5.5	6.8	0.7
Fragmentação	-----	1,0	1.2	0.2	----	0.7	1.7	----
Lesão em delta	----	0.8	0.2	----	----	1.5	2.5	----
Animais por grupo								
Núcleos centralizados	-----	16.7*	50	100*	33.3*	83.3	100	50*
Fibras lobuladas	16.7*	----	50	83.3	16.7*	83.3	66.7	50
Fragmentação	-----	33.3*	50	16.7*	----	66.7*	50*	----
Lesão em delta	----	50*	16.7*	----	----	33.3	50	----

----, ausente; *, menos de 5% das células.

Figura 15 – Fotomicrografias do músculo sóleo, A–H coloração: H.E.; A, ($C_{(Imob)}$): fibras poliédricas, núcleos periféricos; B, (I): discreta diferença no tamanho e formato das fibras; C, ($IL_{(1)}$): diferença no tamanho das fibras, núcleos centralizados (seta fina) e celularidade intersticial (*); D, ($IAL_{(1)}$) núcleos centralizados (seta fina), fragmentação (seta larga), celularidade intersticial (*); E, ($IL_{(3)}$): núcleos centralizados (setas finas), corpos de inclusão (cabeça de seta) e celularidade intersticial (*); F, ($IAL_{(3)}$): fibras lobuladas (*), núcleos centralizados (seta fina), atividade mitocondrial aumentada no centro da célula (seta larga); G, ($IL_{(10)}$): corpos de inclusão (seta fina); H, ($IAL_{(10)}$): corpos de inclusão (seta fina) (Barras = 50µm).

5.5. Fibronectina intracelular

Dez dias de imobilização resultaram em um aumento do número de fibras com positividade intracelular para fibronectina/total de fibras quando comparado ao $C_{(Imob)}$ ($p < 0.05$) (Tabela 6 e Figura 16B). Após 3 e 10 dias de livre movimentação na gaiola, pôde ser observado que essa relação ainda apresentou-se elevada quando comparada aos valores do $C_{(Imob)}$ ($p < 0.05$) (Tabela 6 e Figuras 16E, G). Por outro lado, o acentuado processo de degeneração tecidual observado após 3 dias de alongamento impossibilitaram a análise quantitativa da fibronectina (Figura 16F). Na sequência, após 10 dias de alongamento ainda observou-se diferença significativa da relação de fibras com positividade à fibronectina quando comparada aos valores controles ($p < 0.05$), porém esta relação encontra-se significativamente reduzida na comparação com os valores do procedimento de imobilização ($IAL_{(10)}$ vs I, $p < 0.05$) (Tabela 6 e Figura 16H).

Tabela 6 - Médias dos valores da relação fibras com fibronectina intracelular/número total de fibras (rFFI/NTF) dos músculos sóleos com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

Grupos	$C_{(Imob)}$	I	$IAL_{(1)}$	$IAL_{(3)}$	$IAL_{(10)}$	$IL_{(1)}$	$IL_{(3)}$	$IL_{(10)}$
rFFI/NTF	0.02 (0.01-0.03)	0.18* (0.14-0.21)	0.02 (0.001-0.04)	----	0.13* [†] (0.1-0.15)	0.009 (0.0002-0.0018)	0.14* (0.11-0.17)	0.16* (0.12-0.19)

*, $p < 0.05$ comparados ao $C_{(Imob)}$; [†], $p < 0.05$ comparado ao I; ---- a intensa degeneração tecidual impediu esta análise do $IAL_{(3)}$.

Figura 16 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais representativos de cada um dos grupos estudados, A–H lâminas processadas pelo anticorpo *goat polyclonal anti-human fibronectin*. A, (C_(Imob)), C, (IL₍₁₎), D, (IAL₍₁₎): fibras musculares com fibronectina marcada na MEC; B, (I), E, (IL₍₃₎), G, (IL₍₁₀₎), e H, (IAL₍₁₀₎): fibras musculares com marcação de fibronectina na MEC e no meio intracelular (setas); F, (IAL₍₃₎): acentuado processo de degeneração tecidual (Barras = 50μm).

5.6. Análise semi-quantitativa dos colágenos dos tipos I e III

A análise da reatividade dos colágenos pode ser observada na Tabela 7. É possível destacar que o colágeno tipo I aumentou nos grupos I, IAL₍₃₎ e IAL₍₁₀₎ (Figuras 17B, F, H) e diminuiu no IL₍₃₎ e IL₍₁₀₎ (Figuras 17E, G). O procedimento de imobilização desencadeou discreto aumento da expressão do colágeno tipo III, que se manteve nos demais grupos experimentais aqui abordados (Figuras 18B-H). Ao considerar a relação entre os dois tipos de colágeno, observou-se que a mesma encontrava-se similar ao grupo C_(Imob) no IAL₍₃₎ e no I. No grupo IAL₍₁₀₎, a expressão dos colágenos I e III apresentou o mesmo escore o que resultou numa relação de igualdade entre eles. Porém, os três grupos que permaneceram apenas em livre movimentação apresentaram relação diminuída entre os colágenos tipos I e III, visto que houve diminuição da expressão do colágeno tipo I e aumento da do tipo III (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise semi-quantitativa da expressão dos colágenos tipos I e III dos músculos sóleos.

Grupos	C _(Imob)	I	IAL ₍₁₎	IAL ₍₃₎	IAL ₍₁₀₎	IL ₍₁₎	IL ₍₃₎	IL ₍₁₀₎
Colágeno I	+	++	+	++	++/+++	+	±/+	±/+
Colágeno III	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++

±, ligeiramente positivo; +, fracamente positivo; ++, moderadamente positivo; +++, fortemente positivo

Figura 17 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais representativos de cada um dos grupos estudados, A–H lâminas processadas pelo anticorpo mouse *anti-rat collagen type I*. A, (C_(Imob)), C, (IL₍₁₎) e D, (IAL₍₁₎): imunomarcação sem alterações; E, (IL₍₃₎) e G, (IL₍₁₀₎): observe redução da expressão do colágeno I; B, (I), F, (IAL₍₃₎) e H, (IAL₍₁₀₎): observe aumento da expressão do colágeno I (Barras = 50µm).

Figura 18 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais representativos de cada um dos grupos estudados, **A–H** lâminas processadas pelo anticorpo *mouse anti-rat collagen type III*. **A**, ($C_{(Imob)}$): imunomarcacão sem alterações; **B**, (**I**), **C**, ($IL_{(1)}$), **D**, ($IAL_{(1)}$), **E**, ($IL_{(3)}$), **F**, ($IAL_{(3)}$), **G**, ($IAL_{(10)}$) e **H**, ($IAL_{(10)}$): observe aumento da expressão do colágeno III (Barras = 50 μm).

5.7. Análise da distrofina

5.7.1. Descrição das alterações na distribuição espacial de distrofina

A distribuição espacial de distrofina no eixo longitudinal das fibras dos músculos sóleos pode ser vista nas Figuras 19 (A, B, C, D) e 20 (A, B, C, D). O grupo I apresentou espessamento da fluorescência para distrofina presente no sarcolema ao ser comparado com o $C_{(Imob)}$ (Figuras 19B, A, respectivamente). Nos grupos $IL_{(1)}$ (Figura 19C) e $IAL_{(1)}$ (Figura 19D), notou-se maior número de fibras na área da imagem, espessamento da fluorescência para distrofina presente no sarcolema, este apresentou ondulações, principalmente no $IAL_{(1)}$. Nas figuras dos grupos $IL_{(3)}$ (Figura 20A) e $IAL_{(3)}$ (Figura 20B), foi observado descontinuidade da marcação ao longo das fibras, o que sugere ruptura sarcolemal. Além de ondulações no sarcolema e expressões esparsas de distrofina nas áreas com perda tecidual. Espessamento da fluorescência para distrofina ainda foi observado nos grupos $IL_{(10)}$ (Figura 20C) e $IAL_{(10)}$ (Figura 20D), mais evidente no primeiro.

Figura 19 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos $C_{(l\text{mob})}$, I , $IL_{(1)}$ e $IAL_{(1)}$. A-L lâminas processadas pelos anticorpos *rabbit polyclonal anti-dystrophin* (fluorescência verde) e *mouse monoclonal [ED1] anti-CD68* (fluorescência vermelha), marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul). A, ($C_{(l\text{mob})}$): marcação para distrofina sem alterações; B, (I): espessamento da marcação; C, ($IL_{(1)}$) e D, ($IAL_{(1)}$): maior número de fibras na área da imagem, espessamento da marcação, ondulações sarcolemas. E, ($C_{(l\text{mob})}$) e F, (I): ausência de marcação para a proteína CD68; G, ($IL_{(1)}$) e H, ($IAL_{(1)}$): marcação imunofluorescente para a proteína CD68 expressa na membrana celular de macrófagos (setas). I, ($C_{(l\text{mob})}$) e J (I): *merge* da distrofina e DAPI; K, ($IL_{(1)}$) e L, ($IAL_{(1)}$): *merge* da distrofina, CD68 e DAPI, observe localização dos macrófagos e seus respectivos núcleos (setas) (Barras = 50 μm).

Figura 20 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos $IL_{(3)}$, $IAL_{(3)}$, $IL_{(10)}$ e $IAL_{(10)}$. A-L lâminas processadas pelos anticorpos *rabbit polyclonal anti-dystrophin* (fluorescência verde) e *mouse monoclonal [ED1] anti-CD68* (fluorescência vermelha), marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul). A, ($IL_{(3)}$) e B, ($IAL_{(3)}$): descontinuidade da marcação, ondulações sarcolemas e marcações esparsas de distrofina; C, ($IL_{(10)}$) e D, ($IAL_{(10)}$): espessamento da marcação e algumas ondulações sarcolemas. E, ($IL_{(3)}$), F, ($IAL_{(3)}$), G, ($IL_{(10)}$) e H, ($IAL_{(10)}$): marcação imunofluorescente para a proteína CD68 expressa na membrana celular de macrófagos (setas). I, ($IL_{(3)}$), J, ($IAL_{(3)}$), K, ($IL_{(10)}$) e L, ($IAL_{(10)}$): *merge* da distrofina, CD68 e DAPI, observe localização dos macrófagos e seus respectivos núcleos (setas) (Barras = 50 μ m).

5.7.2. Análise da técnica de Western blot de distrofina

A simulação de hipocinesia aumentou a quantidade de distrofina no músculo sóleo em relação àquela encontrada no $C_{(Imob)}$ ($p < 0.05$) (Figura 21). Este aumento também pôde ser encontrado no $IAL_{(3)}$ ($C_{(Imob)}$ vs. $IAL_{(3)}$, $p < 0.05$), além disso, entre os grupos submetidos ao alongamento, este o grupo foi o que apresentou a maior

quantidade de distrofina. Porém, os grupos IAL₍₁₎, IAL₍₁₀₎, IL₍₁₎, IL₍₃₎ e IL₍₁₀₎ diminuíram significativamente a quantidade dessa proteína em relação à imobilização ($p < 0.05$), apresentando valores similares às condições controle ($p > 0.05$) (Figura 21).

Figura 21 – Análise de Western blot para distrofina nos músculos sóleos dos animais dos grupos estudados. *, $p < 0.05$ comparado ao C_(mob); †, $p < 0.05$ comparados ao I.

5.8. Análise da laminina

5.8.1. Descrição das alterações na distribuição espacial de laminina

A distribuição espacial de laminina no eixo longitudinal das fibras dos músculos sóleos pode ser vista nas Figuras 22A, B, C, D e 23A, B, C, D. O grupo I apresentou discreto espessamento da fluorescência para laminina presente na membrana basal quando comparado ao C_(mob) (Figuras 22B, A, respectivamente). Nos grupos IL₍₁₎ (Figura 22C) e IAL₍₁₎ (Figura 22D), pôde ser observado maior número de fibras na área da imagem e espessamento da fluorescência para laminina. Nas figuras dos grupos IL₍₃₎ (Figura 23A) e IAL₍₃₎ (Figura 23B), foi observado espessamento da fluorescência para laminina e expressão de laminina

em regiões do meio intracelular, ambas as alterações são mais evidentes no grupo alongado. Espessamento da fluorescência para laminina foi observado nos grupos IL₍₁₀₎ (Figura 23C) e IAL₍₁₀₎ (Figura 23D).

Figura 22 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos $C_{(mob)}$, I, $IL_{(1)}$ e $IAL_{(1)}$, A-H lâminas processadas pelo anticorpo *rabbit polyclonal anti-laminin* (fluorescência verde) e marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul). A, ($C_{(mob)}$): marcação para laminina sem alterações; B, (I): espessamento da marcação; C, ($IL_{(1)}$) e D, ($IAL_{(1)}$): maior número de fibras na área e espessamento da marcação. E, ($C_{(mob)}$), F, (I), G, ($IL_{(1)}$) e H, ($IAL_{(1)}$): *merge* da laminina e DAPI, observe localização dos núcleos (em azul) (Barras = 50 μ m).

Figura 23 – Fotomicrografias do músculo sóleo de animais dos grupos $IL_{(3)}$, $IAL_{(3)}$, $IL_{(10)}$ e $IAL_{(10)}$, A-H lâminas processadas pelo anticorpo *rabbit polyclonal anti-laminin* (fluorescência verde) e marcação nuclear com DAPI (fluorescência azul). A, ($IL_{(3)}$) e B, ($IAL_{(3)}$): espessamento da marcação e expressão de laminina em áreas intracelulares. C, ($IL_{(10)}$) e D, ($IAL_{(10)}$): espessamento da marcação. E, ($IL_{(3)}$), F, ($IAL_{(3)}$), G, ($IL_{(10)}$) e H, ($IAL_{(10)}$): *merge* da laminina e DAPI, observe localização dos núcleos (em azul) (Barras = 50 μ m).

5.8.2 Análise da técnica de Western blot de laminina

A imobilização aumentou a quantidade de laminina no músculo sóleo em relação aos valores obtidos no controle ($p < 0.05$) (Figura 24). Os procedimentos de alongamento e livre movimentação na gaiola, durante 1, 3 e 10 dias, não modificaram significativamente a quantidade dessa proteína em relação à imobilização ($p > 0.05$) (Figura 24). Após 10 dias de livre movimentação na gaiola ($IL_{(10)}$), os valores encontrados foram superiores aos obtidos no $C_{(Imob)}$ ($p < 0.05$) (Figura 24).

Figura 24 – Análise de Western blot para laminina nos músculos sóleos dos animais dos grupos estudados. *, $p < 0.05$ comparados ao $C_{(Imob)}$.

5.9. Quantidade de macrófagos

A simulação de hipocinesia não alterou a quantidade de macrófagos presentes no músculo sóleo (Figura 25). Os grupos $IL_{(1)}$, $IAL_{(1)}$, $IL_{(3)}$, $IAL_{(3)}$, $IL_{(10)}$ e $IAL_{(10)}$ apresentaram quantidades aumentadas de macrófagos ao serem comparados tanto ao $C_{(Imob)}$ quanto ao I ($p < 0.05$) (Figuras 19G, H, 20E, F, G, H e 25). O $IAL_{(1)}$ apresentou maior número de macrófagos que o $IAL_{(10)}$ ($p < 0.05$) (Figura 19H), porém considerando os grupos alongados, o $IAL_{(3)}$ foi o que mais apresentou macrófagos

em relação ao IAL₍₁₎ IAL₍₁₀₎ ($p < 0.05$) (Figura 20F e 25). Não houve diferenças entre os grupos IL₍₁₎, IL₍₃₎ e IL₍₁₀₎. Ao comparar o IAL₍₃₎ com o IL₍₃₎, tem-se quantidade significativamente maior de macrófagos para o primeiro ($p < 0.05$) (Figuras 20F e 25).

Figura 25 – Quantidade de macrófagos presente nos músculos sóleos dos grupos estudados. *, $p < 0.05$ comparados ao C_(imob) e ao I; †, $p < 0.05$ comparado ao IAL₍₁₀₎; #, $p < 0.05$ comparados ao IAL₍₃₎.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Durante dez dias, acompanhou-se o processo de remobilização pela livre movimentação isolada ou associada ao alongamento passivo manual intermitente na reversão do quadro causado pela imobilização. A avaliação deste processo fornece informações relevantes para o entendimento de mecanismos adaptativos frente a diferentes estímulos externos (De DEYNE, 2001; ITAI, KARIYA, HOSHINO, 2004; GIROUX-METGES et al., 2005, BENEDINI-ELIAS et al., 2009).

Imobilização. Em nosso estudo, observou-se redução da massa corporal dos animais do grupo I. A literatura científica subsidia a compreensão do nosso resultado, uma vez que estudos que aplicaram suspensão ou imobilização em animais identificaram redução da massa corporal dos animais quando comparados com os animais do grupo controle. Acredita-se que o desuso e a atrofia muscular causada pela hipoatividade reduzam a síntese protéica corporal e a absorção de nutrientes (COUTINHO et al., 2004; KAWANO et al., 2008; BENEDINI-ELIAS et al. 2009), além de provocarem certo grau de estresse, reduzindo a ingestão de água e alimento (GEHRKE et al., 2004; TANAKA; KARIYA; HOSHINO, 2004; SAKURAI et al., 2005), o que dificulta ainda mais o ganho de peso.

Como resultado da simulação de hipocinesia, foram observadas alterações histopatológicas, como centralização nuclear, fragmentação e lesão em delta. Não foi encontrado aumento da celularidade, que corrobora com o resultado da análise de macrófagos que demonstrou não existir diferença entre os grupos I e C_(Imob). Ainda, a hipomobilidade é capaz de provocar aumento na centralização nuclear e alterações de caráter degenerativo/necrótico (FRIMEL et al., 2005; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006). Porém, os achados deste estudo não apontaram para alterações significativas na quantidade de fibras que apresentaram núcleos centralizados ou degeneração/necrose.

O grupo I apresentou aumento na expressão dos dois tipos de colágenos aqui estudados, o que também foi relatado em outros trabalhos (JOSZA et al., 1988; COUTINHO et al., 2006). Possivelmente, com a redução nas tensões passivas no músculo imobilizado, ocorra um aumento no volume do tecido conjuntivo, a fim de prevenir lesões, como que acontece durante uma atividade de alongamento (TABARY et al., 1972; OKITA et al., 2001; JÄRVINEN et al., 2002). A imobilização causa expressivo aumento na concentração de ácido hialurônico – substância presente na matriz extracelular (GERDIN; HÄLGREN, 1997). O aumento desta

substância está relacionado ao aprisionamento de água causando aumento da rigidez intramuscular nos primeiros estágios da imobilização, o que pode, por sua vez, levar a alterações na configuração de colágeno após período de imobilidade (OKITA et al., 2001). Além disso, essa molécula é capaz de modular a proliferação de mRNA pró-colágeno III (YAMADA et al., 2007). Järvinen et al. (2002) sugeriram que as mudanças ocorridas no tecido conjuntivo intramuscular contribuem para a perda funcional e propriedades biomecânicas do músculo esquelético imobilizado. Estas consequências podem alterar a relação da expressão dos colágenos tipos I e III o que modifica as propriedades de força tênsil, rigidez e complacência muscular.

Após a imobilização, foi possível visualizar espessamento de distrofina e de laminina nas fibras do músculo sóleo. Além disso, as expressões de distrofina e de laminina estavam consideravelmente aumentadas em relação às do $C_{(Imob)}$. Entretanto, durante situações de desuso, há redução da transdução de sinais nas fibras musculares, com consequente redução da síntese proteica e aumento da proteólise (POWERS et al., 2005). Durante o procedimento de imobilização, o músculo sóleo foi mantido na posição de encurtamento. Possivelmente, ocorreu um “afrouxamento” das membranas plasmática e basal. Consequentemente, pode-se hipotetizar que maior área destas membranas estava presente no fragmento muscular submetido à técnica de Western Blot. Este fato pode justificar a quantidade total aumentada dessas proteínas no grupo I. Em nosso estudo, não foi encontrada interrupção da marcação de distrofina, indicando ausência de ruptura sarcolemal no grupo I. Em pacientes portadores de polineuropatia, que representa uma forma de inatividade física, Anastasi et al. (2008) analisaram a expressão de proteínas do costâmero (sarcoglicanas e distrofina) no músculo gastrocnêmio e observaram distribuição normal de distrofina associada à redução da marcação das sarcoglicanas.

Primeiro dia de remobilização. Após um período de redução do uso de um segmento corporal, as consequências ocorridas parecem refletir de maneira importante na marcha do rato. No grupo $IAL_{(1)}$, os resultados quantitativos da análise funcional da marcha mostraram que a média dos valores referentes ao comprimento da pegada (CP) foi reduzida em relação aos valores pré-imobilização. Para os grupos $IL_{(1)}$ e $IAL_{(1)}$, observou-se que a ADM do tornozelo estava limitada ao serem comparados ao $C_{(Imob)}$, possivelmente pela rigidez articular gerada pela hipocinesia (NOYES, 1988), entretanto, na comparação entre eles, o $IAL_{(1)}$ apresentou valores

de ângulos consideravelmente maiores, ainda que a relação entre os colágenos tipos I e III fosse a mesma em ambos os grupos.

Um estudo conduzido por Warren et al. (2004) não identificou alterações importantes na função muscular de flexores plantares de camundongos, após 28 dias de suspensão, sugerindo que as alterações na arquitetura muscular e do tecido conjuntivo tenham sido de pequena magnitude. Por sua vez, a liberação teve impacto negativo na função desses animais, indicando efeito deletério da sobrecarga após o desuso. No músculo sóleo dos animais dos grupos IL₍₁₎ e IAL₍₁₎, encontrou-se índice relativamente elevado de fibras que sofreram fragmentação, sugestivo de lesão celular (GOMES et al., 2004), além de núcleos centralizados, diferença no tamanho das fibras e outras alterações que indicam microlesões nas fibras musculares. Estas foram mais intensas no grupo IAL₍₁₎ do que no IL₍₁₎. O quadro morfofuncional supracitado pode vir acompanhado do sintoma de dor, o que pode justificar a redução da variável CP.

Após lesão tecidual, ocorrem eventos químicos que podem ativar macrófagos (TIDBALL, 2005). McLennan (1996) realizou criolesão no músculo tibial anterior de ratos Wistar e, após três horas, macrófagos ED1⁺ estavam presentes na periferia da lesão. Este achado está de acordo com os nossos, pois, após um dia de retorno da sobrecarga associado ou não à técnica de alongamento, macrófagos foram encontrados no músculo sóleo dos animais. Em relação à massa corpórea, não houve diferença entre os valores de pesos finais destes grupos, porém apenas o IL₍₁₎ equiparou-se aos valores dos pesos iniciais. O manuseio dos animais para a realização da técnica de alongamento pode ter causado dor e consequente estresse nos mesmos, fato que pode ter contribuído para o menor ganho de massa corporal do IAL₍₁₎.

O acúmulo de tecido conjuntivo intramuscular pode contribuir para a diminuição do fluxo sanguíneo, obliterando a luz dos capilares, e a diminuição do fluxo nos capilares provoca aumento na quantidade de tecido conjuntivo, o que inicia um ciclo vicioso (JÓZSA et al., 1990). Pelo aumento da reatividade do colágeno tipo III, a relação entre os colágenos tipos I e III está diminuída em relação às condições controle tanto no IL₍₁₎ quanto no IAL₍₁₎, o que pode tornar o tecido mais susceptível à lesão favorecendo a ocorrência de microlesões, como as observadas nas fibras musculares. O aumento da expressão do colágeno tipo III nesta fase está de acordo com resultados da comunidade científica: níveis elevados de mRNA para o colágeno

tipo III foram encontrados horas após indução de lesão em músculo gastrocnêmio de ratos (HURME et al., 1991).

Terceiro dia de remobilização. Ao considerar a análise funcional da marcha dos grupos $IL_{(3)}$ e $IAL_{(3)}$, tem-se que as variáveis CP e ATD do membro imobilizado não conseguiram atingir os valores correspondentes ao período pré-imobilização, permanecendo significativamente menores. A ADM do tornozelo ainda estava limitada, porém o grupo $IAL_{(3)}$ apresentou valores de ângulos consideravelmente maiores que o grupo apenas livre. O retorno da sobrecarga muscular gera um estresse longitudinal que induz o aumento do comprimento muscular total, portanto, acrescentar sarcômeros em série pode ser uma estratégia compensatória do tecido muscular. Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com a mesma metodologia experimental, teve como resultado o aumento significativo no número de sarcômeros em série no músculo sóleo dos animais destes grupos (CAÇÃO-BENEDINI et al. 2012), este achado pode justificar o aumento da ADM aqui encontrado.

O esclarecimento dos achados supracitados pode ser auxiliado pelo quadro morfológico apresentado por estes grupos. Este quadro foi caracterizado por intensa resposta inflamatória associada à necrose e perda de tecido funcional contrátil, mais evidente no $IAL_{(3)}$. O aumento na quantidade de tecido conjuntivo perimisial e celularidade intersticial são comuns em fibras em processo de regeneração (CARPENTER; KARPATI, 2001). O aumento da quantidade de macrófagos no tecido muscular dos animais destes grupos, principalmente no $IAL_{(3)}$, é confirmada pelas características histopatológicas apresentadas. Além disso, os macrófagos presentes previamente e seus metabólitos exercem ação quimiotática, via citocinas e fatores de crescimento, que ativaram outras células circulantes inflamatórias (JÄRVINEN et al., 2005; MCLENNAN, 1996), o que resultou na amplificação da resposta. Esta não é apenas destrutiva, visto que a fagocitose de detritos do tecido muscular pode promover a regeneração (TIDBALL, 2005; GROUNDS, 1991). Ambos os grupos apresentaram aumento de massa corpórea em relação ao peso pós-imobilização, o $IAL_{(3)}$ equiparou-se ao valor do peso inicial, entretanto o $IL_{(3)}$ ultrapassou o valor inicial de massa corporal e apresentou valor de peso final consideravelmente maior que o grupo alongado. O manuseio dos animais para a realização da técnica de alongamento associado ao quadro morfológico apresentado pelo $IAL_{(3)}$ pode ter resultado no sintoma de dor e consequente estresse nos

animais, fato que pode auxiliar o esclarecimento do menor ganho de massa corporal dos animais do IAL₍₃₎.

A mecanotransdução representa um mecanismo pelo qual o estresse mecânico atua sobre uma célula e desencadeia sinalizações intracelulares (BURKHOLDER, 2008). A partir disso, eventos biológicos podem ocorrer e, assim, regular a morfologia das células (HAMILL; MARTINAC, 2001; KJÆR, 2004). A transmissão de forças no músculo esquelético acontece através de uma série de estruturas importantes para a manutenção da integridade das fibras (GROUNDS; SOROKIN; WHITE, 2005). A transmissão da força passiva no músculo é realizada inicialmente sobre o colágeno, seguido pelas glicoproteínas, passando pelas proteínas de membrana, como as integrinas e distroglicanas, em sequência promove ativação do citoesqueleto, constituído por proteínas do costâmero, seguido pelo alcance do citoesqueleto não contrátil e finalmente as proteínas contráteis (De DEYNE, 2001). Em relação à expressão dos tipos de colágeno, observou-se no IL₍₃₎ menor reatividade do colágeno tipo I e maior do colágeno tipo III, o que leva a uma diminuição da relação entre eles. No IAL₍₃₎, os dois tipos de colágeno apresentaram expressão aumentada, porém este fato resultou numa relação semelhante às condições controle. O aumento no comprimento muscular, provocado pelo alongamento, altera a relação entre as fibras de colágeno e as fibras musculares, permitindo uma maior resistência ao torque passivo (GAJDOSIK et al., 2007), este achado auxilia o esclarecimento do aumento da expressão do colágeno I encontrado neste grupo.

Pôde-se constatar também expressão intracelular aumentada de fibronectina no IL₍₃₎ e no IAL₍₃₎ (não quantificada). Após indução de lesão no músculo gastrocnêmio de ratos, Hurme et al. (1991) analisaram através de Northern blot a expressão de mRNAs específicos para fibronectina e colágeno tipo III. Estes autores obtiveram como resultado aumento da expressão de mRNA para fibronectina a partir do segundo dia pós-lesão, que foi seguido pelo aumento de mRNA para colágeno tipo III. Além disso, Chargé e Rudnicki (2004) relataram que estes componentes proteicos da MEC desempenham papel importante na manutenção das células satélites tanto no estado quiescente, como na regulação da proliferação e fusão das mesmas. No estudo de Järvinen et al. (2005), foi observado que, no segundo dia após lesão, as regiões necrosadas das miofibras estavam sendo removidas pelos macrófagos, enquanto ocorria a formação de tecido conjuntivo pelos fibroblastos e

no terceiro dia após lesão, entre outros eventos celulares, houve ativação das células satélites, que liberaram diversas substâncias responsáveis pela amplificação da reação inflamatória, o que corrobora os resultados aqui encontrados.

A simulação de hipocinesia fragiliza as miofibras do músculo esquelético, e a adição de exercício ao retorno da sobrecarga pode causar lesões sarcolemas (KOVANEN et al., 1988; AHTIKOSKI et al., 2003). Estas informações corroboram com os nossos resultados, pois ocorreram descontinuidade da marcação de distrofina e ondulações no sarcolema nos dois grupos, porém mais evidente no IAL₍₃₎. O alongamento passivo, e em menor grau a liberação, podem provocar descontinuidade de componentes da MEC ou do sarcolema (KÄÄRIÄINEN et al. 2000; ERVASTI 2003; KJÆR, 2003). O aumento da quantidade de distrofina no IAL₍₃₎ pode estar relacionado à síntese da mesma em resposta ao aumentado grau de lesão sarcolemal observado neste grupo. Talvez o estímulo mantido (diário) cause lesão, mas, como efeito protetor, haja aumento na síntese dessa proteína que esta envolvida na transdução de força. De maneira inversa, Lovering and de Deyne (2004) observaram que após um único estímulo do tipo excêntrico em ratos Sprague-Dawley, houve redução significativa da expressão de distrofina foi encontrada pela análise de Western blot após 3 dias do estímulo. Esses resultados contraditórios demonstram que a resposta tecidual parece ser dependente da frequência da aplicação do estímulo assim como do tipo (ativo ou passivo). Os grupos IL₍₃₎ e IAL₍₃₎ apresentaram espessamento da marcação e laminina no meio intracelular, mais evidentes no IAL₍₃₎. A presença de laminina intracelular também foi relatada por Smith et al. (2007) 48 horas após contrações excêntricas em músculo gastrocnêmio de ratas. Porém, a baixa qualidade das fotomicrografias publicadas pelos autores supracitados impossibilitou a confirmação de tal evidência. Segundo os mesmos, esse achado é indicativo de lesão celular. Como neste estudo, os grupos IAL₍₃₎ e IL₍₃₎ apresentaram lesão celular confirmada pelas diversas técnicas adotadas, e a presença de laminina intracelular pode ser mais um indicativo desse contexto.

Décimo dia de remobilização. Neste período, a análise funcional do nosso estudo demonstrou que a marcha dos animais dos grupos IAL₍₁₀₎ e IL₍₁₀₎ tornou-se semelhante àquela do período pré-imobilização. Em relação às variáveis CP e ATD, os animais do IL₍₁₀₎ não atingiram os valores pré-imobilização para a CP e alcançaram tardiamente os valores de referência da ATD em relação ao IAL₍₁₀₎. Em

estudo que utilizou uma técnica de alongamento muscular (programa: trinta minutos, seis vezes por semana durante três semanas) e livre movimentação (durante três semanas), após quatro semanas de imobilização, foi observado que a ADM de dorsiflexão aumenta em ambos os grupos se comparados àquele apenas imobilizado. Após duas semanas de remobilização, os grupos alongado e livre aumentaram 40 graus de amplitude de dorsiflexão e não foi observada diferença significativa na comparação entre si (OKITA et al., 2001). Sugere-se que apenas o retorno da sobrecarga pela livre movimentação seja suficiente para aumentar a ADM, pois durante a fase de apoio, que compreende 67% do ciclo da marcha de ratos normais, a ADM de dorsiflexão pode ser superior a 30 graus (VAREJÃO et al., 2002). Além disso, o estímulo para mecanotransdução no músculo, gerado pelo alongamento associado à livre movimentação, demonstra regular a via do óxido nítrico derivado da isoforma neuronal óxido nítrico síntase responsável pela adição de sarcômeros em série (KOH; TIDBALL, 1999). Estudos que aplicaram técnica de alongamento em humanos identificaram aumento significativo da amplitude de movimento (ZAKAS et al., 2005; GAJDOSIK et al., 2007). Estes resultados estão de acordo aos encontrados neste estudo, visto que ambos os grupos restabeleceram os valores de ADM da dorsiflexão do tornozelo. Contudo, deve-se ressaltar que a técnica de alongamento promoveu este restabelecimento precocemente em relação à livre movimentação isolada. Fato este pode ter contribuído para o restabelecimento, também precoce, da função das patas dos animais do IAL₍₁₀₎ no desempenho da marcha.

Os achados histopatológicos demonstraram remodelamento do tecido muscular, assim como em estudos prévios (GOLDSPINK, 1977; YANG et al., 1997; GOLDSPINK, 1999), porém as fibras musculares ainda não estavam completamente recompostas e alguns macrófagos ainda estavam presentes. Estes achados estão de acordo com a literatura científica: macrófagos ED1 foram encontrados no músculo tibial anterior de ratos após 21 dias de criolesão (MCLENNAN, 1996). Adicionalmente, Järvinen et al. (2005) mostraram ser necessário um período de tempo maior do que 10 dias para o restabelecimento completo das características morfológicas musculares do período pré-lesão. Achados prévios podem explicar a presença de alguns núcleos centralizados nesta fase: a lesão da fibra muscular desencadeia uma cascata de eventos que culmina na ativação de células satélites, as quais se diferenciam e se fundem às miofibras lesadas. Esses novos núcleos,

incorporados à fibra em regeneração, iniciam a síntese proteica e permanecem em posição central até a completa recuperação da fibra, posteriormente migrando para a periferia (MATTIELO-SVERZUT, CHIMELLI, 1999; HUARD, LI, FREDDIE, 2002; MITCHELL, PAVLATH, 2004). Contudo, deve-se ressaltar que, no grupo IAL₍₁₀₎, os aspectos histopatológicos que persistiram até o décimo dia pós-imobilização apareceram em menor número de fibras e de animais quando comparado ao IL₍₁₀₎. Este grupo apresentou valor de peso final consideravelmente maior que o grupo alongado, porém ambos os grupos apresentaram aumento de massa corporal em relação ao peso pós-imobilização e ultrapassaram o valor inicial de massa corpórea. Após imobilização gessada da pata traseira de ratas por 14 dias, Carvalho (2009) realizou os mesmos programas de alongamento e/ou livre movimentação adotados no presente estudo, e, após 10 dias de remobilização, os animais de ambos os grupos aumentaram consideravelmente o peso corporal.

Em relação à análise dos colágenos, tanto a expressão quanto a relação entre os eles apresentaram-se diferentes das condições controle, seja no IL₍₁₀₎ seja no IAL₍₁₀₎. Sabe-se que o colágeno do endomísio está conectado às proteínas contráteis da fibra muscular através de uma associação de proteínas que conferem estabilidade às fibras e auxiliam na transmissão de força da matriz extracelular para o interior da fibra muscular (RYBAKOVA, PATEL, ERVASTI, 2000; SUNADA et al, 1994; ERVASTI, 2003). Acredita-se que o aumento do colágeno tipo III nos músculos dos animais destes grupos tenha provocado uma distribuição uniforme das forças através das proteínas do costâmero. O tecido muscular é conhecido por aumentar a síntese de colágeno durante qualquer atividade física (TAKALA, VIRTANEN, 2000). No IAL₍₁₀₎, o aumento na rede de fibrilas do colágeno tipo I pode ter ocorrido pela tentativa do tecido de proteger a integridade das fibras musculares, frente ao estresse longitudinal adicional causado pelo alongamento passivo (MACKEY et al., 2008), visto que este tipo de fibra colagênica confere resistência à força tênsil e rigidez ao tecido (KOVANEN 2002), indicando menor suscetibilidade do músculo ao mecanismo de lesão. Pode-se relatar também que a expressão intracelular de fibronectina permaneceu aumentada nestes grupos. A literatura científica subsidia a compreensão dos nossos resultados. Em estudo já citado anteriormente, Hurme et al. (1991) observaram que a redução das expressões de mRNAs para fibronectina e para colágeno tipo III iniciou apenas a partir do sétimo dia após lesão. Além disso, este grupo de pesquisa também analisou a expressão

de mRNA para colágeno tipo I. Esta aumentou dias após a elevação das expressões de mRNAs para fibronectina e para colágeno tipo III e permaneceu elevada por três semanas. O aumento da reatividade do colágeno tipo I ocorre em estágios tardios da regeneração (LEHTO et al., 1985).

O alongamento é recebido pelo músculo como um estímulo passivo tensional. A laminina é a proteína da MEC que transfere o estímulo mecânico para as proteínas costaméricas sensíveis a ele (GROUNDS; SOROKIN; WHITE, 2005), dentre elas destacam-se as integrinas (LARSEN et al., 2006) e as distroglicanas, componentes do complexo glicoproteínas-distrofina (BURKHOLDER et al., 2008; CHOCKALINGAM et al., 2002). A partir daí, o estímulo é transmitido aos filamentos intermediários extrasarcoméricos, como a desmina (PAULIN; LI, 2004), e intrasarcoméricos, como a titina, proteína responsável pela integridade estrutural dos sarcômeros (FUKUDA; ISHIWATA; KURIHARA, 2008). No presente estudo, o espessamento da fluorescência para distrofina persistiu até o décimo dia de remobilização, porém sem diferença estatística entre os grupos e na quantidade desta proteína em relação à do $C_{(Imob)}$. No estudo de Lovering and de Deyne (2004), a expressão de distrofina no músculo tibial anterior estava similar à controle, após 7 dias de lesão por uma única contração do tipo excêntrica. Para a laminina, o espessamento da marcação também pôde ser visualizado nos dois grupos, mas apenas o $IL_{(10)}$ apresentou aumento significativo na expressão de laminina ao ser comparado com o $C_{(Imob)}$. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre a quantidade de laminina do $IL_{(10)}$ e as quantidades dos demais grupos. Estes resultados sugerem que a transmissão de forças entre as regiões externa e interna das células, gerada pelo retorno da sobrecarga e pela aplicação da técnica de alongamento, resultou em modificações na conformação espacial destas estruturas até este momento, e possivelmente ainda proporciona a conversão de sinais mecânicos em eventos biológicos (LARSEN et al., 2006).

6.1. Limitações do estudo

Algumas limitações do estudo devem ser consideradas. O efeito isolado do alongamento não pôde ser estabelecido, pois após procedimento o animal permaneceu livre na gaiola por aproximadamente 23 horas, o que também resulta em um tipo de estresse longitudinal aos tecidos. Além disso, algumas variáveis séricas poderiam incrementar dados referentes ao peso corporal e à intensidade de

lesão tecidual induzida pelos procedimentos aqui abordados. Pode-se ressaltar também que a análise semi-quantitativa da expressão dos colágenos tipos I e III é subjetiva, ainda que realizada por três avaliadores independentes. Estudos mostram que a quantificação do RNAm dos colágenos e da enzima prolil 4-hidroxilase refletem a biossíntese dos mesmos (KARPAKKA et al., 1990; SAVOLAINEN et al., 1988). Sendo assim, nos próximos projetos de pesquisa é pretendido realizar correlação com variáveis quantitativas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Do conjunto de dados obtidos neste estudo, a partir de técnicas que avaliaram a marcha dos animais e o estudo de proteínas relacionadas ao costâmero, foi possível concluir que:

1. A restrição da ADM e as alterações cinético-funcionais da marcha foram completamente revertidas em 10 dias mediante treinamento do tipo alongamento. Este fato não foi observado quando se utilizou apenas a livre movimentação;
2. O procedimento de desuso e posterior remobilização pela livre movimentação isolada ou associada ao alongamento determinaram lesão tecidual mais intensa nos dias 1 e 3. A magnitude dessas alterações foi maior no músculo submetido ao alongamento passivo;
3. O remodelamento do tecido muscular foi mais efetivo após 10 dias de alongamento passivo.

Portanto, a aplicação da técnica de alongamento por 10 dias foi o recurso mais eficaz para reverter as alterações cinético-funcionais da marcha e minimizar as alterações histopatológicas potencializadas pelo desuso.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. R.; HADDAD, F.; BODELL, P. W.; TRAN, P. D.; BALDWIN, K. M. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 103, p. 1644-1654, 2007.

AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; TAKALA, T. E. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 172, n. 2, p. 131-141, 2001.

AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; RISTELI, J.; TAKALA, T. E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 177, n. 4, p. 473-481, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, Garland Science Press: New York and London, 2002.

ANASTASI, G.; CUTRONEO, G.; SANTORO, G.; ARCO, A.; RIZZO, G.; BRAMANTI, P.; RINALDI, C.; SIDOTI, A.; AMATO, A.; FAVALORO, A. Costameric proteins in human skeletal muscle during muscular inactivity. **Journal of Anatomy**, London, v. 213, n. 3, p. 284-295, 2008.

AOKI, M. S.; LIMA, W. P.; MIYABARA, E. H.; GOUVEIA, C. H. A.; MORISCOT, A. S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 23, p. 1176-1183, 2004.

ARRUDA, E. M.; CALVE, S.; DENNIS, R. G.; MUNDY, K.; BAAR, K. Regional variation of tibialis anterior tendon mechanics is lost following denervation. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 101, p. 1113-1117, 2006.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, R. T. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 83, p. 129-138, 1989.

BALDWIN, K. M.; CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F.; BAKER, M. J.; HERRICK, R. The effects of space flight on the contractile apparatus of antigravity muscles: implications for aging and deconditioning. **Journal of Gravitational Physiology**, El Cerrito, Galileo Foundation, v. 1, p. 8-11, 1994.

BENEDINI-ELIAS, P. C.; MORGAN, M. C.; GOMES, A. R.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 84, n. 3, p. 218-225, 2009.

BURKHOLDER, T. J. Mechanotransduction in skeletal muscle. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, Tampa, Frontiers In Bioscience Publications, v. 12, p. 174-191, 2007.

CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; RIBEIRO, P. G.; GOMES, A. R. S.; YWAZAKI, J. L.; MONTE-RASO, V. V.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. **Muscle & Nerve**, New York, manuscrito submetido, 2012.

CAIOZZO, V. J. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. **Muscle & Nerve**, New York, v. 26, n. 6, p. 740-768, 2002.

CANU, M. H.; GARNIER, C.; LEPOUTRE, F. X.; FALEMPIN, M. A. 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. **Behavioural Brain Research**, San Francisco, v. 157, p. 309-321, 2005.

CAPETANAKI, Y.; BLOCH, R. J.; KOULOUMENTA, A.; MAVROIDIS, M.; PSARRAS, S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. **Experimental Cell Research**, New York, v. 313, n. 10, p. 2063-2076, 2007.

CARPENTER, S.; KARPATI, G. Major pathological reactions and their consequences for skeletal muscle cells. In: **Pathology of Skeletal Muscle**. 2nd edition, Oxford University Press: New York, 2001.

CARVALHO, C. M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, São Paulo, v. 18, p. 65-73, 2002.

CARVALHO, L. C.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C. H. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 161-164, 2008.

CARVALHO, L. C. **Alongamento passivo manual associado à estimulação elétrica neuromuscular no músculo gastrocnêmio pós-imobilização. Estudo biomecânico e histomorfométrico em ratas**. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências da Reabilitação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

CELICHOWSKI, J.; MRÓWCZYŃSKI, W.; KRUTKI, P.; GÓRSKA, T.; MAJCZYŃSKI, H.; SLAWIŃSKA, U. Changes in contractile properties of motor units of the rat medial gastrocnemius muscle after spinal cord transaction. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 91, n. 5, p. 887-895, 2006.

CHARGÉ, S. B. & RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHOCKALINGAM, P. S.; CHOLERA, R.; OAK, S. A.; ZHENG, Y.; JARRETT, H. W.; THOMASON, D. B. Dystrophin-glycoprotein complex and Ras and Rho GTPase signalling are altered in muscle atrophy. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 283, p. 500-511, 2002.

CHRISTOV, C.; CHRÉTIEN, F.; ABOU-KHALIL, R.; BASSEZ, G.; VALLET, G.; AUTHIER, F.J.; BASSAGLIA, Y.; SHININ, V.; TAJBAKHSH, S.; CHAZAUD, B.; GHERARDI, R.K. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 18, n. 4, p. 1397-1409, 2007.

CLARK, K. A.; McELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. C.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 18, p. 637-706, 2002.

CORNACHIONE, A.; CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; SHIMANO, M.; VOLPON, J. B.; MARTINEZ, E. Z.; NEDER, L.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in female rats after hindlimb suspension. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Copenhagen, v. 18, n. 4, p. 453-461, 2008.

Cornachione, A. S. **Efeitos da aplicação de diferentes protocolos de reabilitação em músculos esqueléticos de ratas submetidas previamente à imobilização do membro posterior direito**. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências da Reabilitação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

CORNACHIONE, A. S.; CAÇÃO-BENEDINI, L.O.; BENEDINI-ELIAS, P. C.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. The effects of 40 minutes of maintained stretch in different periods of application of the rat soleus and plantaris after immobilization. **Medical Molecular Morphology**, Tokyo, submitted manuscript, 2012.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hindlimb. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, p. 1329-1332, 2002.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 12, p. 1853-1861, 2004.

COUTINHO, E. L.; DELUCA, C.; SALVINI, T. F.; VIDAL, B. C. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connect Tissue Research**, Philadelphia, v. 47, p. 278-286, 2006.

da SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O.; CANCELLIERO, K. M.; DURIGAN, J. L. Q. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 39, n. 7, p. 979-985, 2006.

De DEYNE, P. G.; KINSEY, S.; YOSHINO, S.; JENSEN-VICK, K. The adaptation of soleus end edl in rat model of distraction osteogenesis: IGF-1 and fibrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 20, p. 1225-1231, 2002.

De DEYNE, P. G. Application of passive stretch and its implication for muscle fibers. **Physical Therapy**, Albany, v. 81, n. 2, p. 819-827, 2001.

DUANCE, V. C.; RESTALL, D. J.; BEARD, H.; BOURNE, F. J.; BAILEY, A. J. The location of three collagen types in skeletal muscle. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 248-252, 1977.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. K. N.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 10, n. 3, p. 297-302, 2006.

ERVASTI, J. M. Costameres: the achilles' heel of herculean muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 15, p. 12599-12600, 2003.

FRIDÉN, J.; LIEBER, R. L.; THORNELL, L. E. Subtle indications of muscle damage following eccentric contractions. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 142, p. 523-524, 1991.

FRIMEL, T. N.; KAPADIA, F.; GAIDOSH, G. S.; LI, Y.; WALTER, G. A.; VANDENBORNE, K. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. **Muscle & Nerve**, New York, v. 32, n. 5, p. 672-674, 2005.

FUKUDA, N.; GRANZIER, H. L.; ISHIWATA, S.; KURIHARA, S. Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. **Journal of Physiological Sciences**, Tokyo, v. 58, n. 3, p. 151-159, 2008.

GAJDOSIK, R. L.; ALLRED, J. D.; GABBERT, H. L.; SONSTENG, B. A. A stretching program increases the dynamic passive length and passive resistive properties of the calf muscle-tendon unit of unconditioned younger women. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 99, p. 449-454, 2007.

GEHRKE, A. G.; KRULL, M. S.; MCDONALD, R. S.; SPARBY, T.; THOELE, J.; TROJE, S. W.; ZUMBERGE, J.; THOMPSON, L. V. The effects of non-weight bearing on skeletal muscle in older rats: an interrupted bout versus an uninterrupted bout. **Biological Research for Nursing**, Thousand Oaks, v. 5, p. 195-202, 2004.

GERDIN, B.; HÄLLGREN, R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activations and inflammation. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 242, p. 49-55, 1997.

GILLIS, G. B.; BLOB, R. W. How muscles accommodate movement in different physical environments: aquatic vs. terrestrial locomotion in vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 131, n. 1, p. 61-75, 2001.

GIROUX-METGES, M-A.; PENNEC, J-P.; PETIT, J.; MORELA, J.; TALARMIN, H.; DROGUET, M.; DORANGE, G.; GIOUX, M. Effects of immobilizing a single muscle on the morphology and the activation of its muscle fibers. **Experimental Neurology**, New York, v. 194, p. 495-505, 2005.

GOLDSPINK, D. F. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, London, v. 264, p. 267-282, 1977.

GOLDSPINK, D. F. Exercise-related changes in protein turnover in mammalian striated muscle. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 160, p. 127-148, 1991.

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. **Journal of Anatomy**, London, v. 194, p. 323-334, 1999.

GOLDSPINK, G. Gene expression in skeletal muscle. **Biochemical Society Transactions**, London, n. 30, p. 285-290, 2002.

GOMES, A. R. S.; COUTINHO, E.L.; FRANÇA, C.N.; POLONIO, J.; SALVINI, T.F. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian of Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 10, p. 1473-1480, 2004.

GOMES, A. R. S.; CORNACHIONE, A.; SALVINI, T. F.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **Journal of Anatomy**, London, v. 210, p. 328-335, 2007.

GROUND, M. D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathology, Research and Practice**, Stuttgart, v. 187, n. 1, p. 1-22, 1991.

GROUND, M. D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 381-391, 2005.

HAMILL, O. P.; MARTINAC, B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 81, p. 685-740, 2001.

HEINEMEIER, K. M.; OLESEN, J. L.; HADDAD, F.; SCHJERLING, P.; BALDWIN, K. M.; KJAER, M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 106, n. 1, p. 178-186, 2009.

HERRMANN, H.; BÄR, H.; KREPLAK, L.; STRELKOV, S. V.; AEBI, U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, p. 562-573, 2007.

HORNBERGER, T. A. ; ESSER, K. A. Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 63, n. 2, p. 331-335, 2004.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 81-A, n. 5, p. 822-823, 2002.

HURME, T.; KALIMO, H.; SANDBERG, M.; LEHTO, M.; VUORIO, E. Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, Baltimore, v. 64, p. 76-84, 1991.

HWANG, J. H.; YUN-JU, R. A.; LEE, K. M.; LEE, J. Y.; GHIL, S. H. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Philadelphia, v. 87, p. 20-26, 2006.

IMAMURA, S. T.; IMAMURA, M.; HIROSE-PASTOR, E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. **Revista Brasileira de Reumatologia**. Campinas, v. 39, n. 1, p. 35-40, 1999.

ITAI, Y.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Morphological changes in rat hindlimb muscle fibres during recovery from disuse atrophy. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 181, p. 217-224, 2004.

JÄRVINEN, M. J.; EINOLA, S. A.; VIRTANEN, E. O. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Philadelphia, v. 73, n. 3, p. 253-257, 1992.

JÄRVINEN, T. A.; JOZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T. L.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 245-254, 2002.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

JÓZSA, L.; THÖRING, J.; JÄRVINEN, M.; KANNUS, P.; LEHTO, M.; KVIST, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 49, n. 2, p. 267-278, 1988.

JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THÖRING, J.; REFFY, A.; JÄRVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v. 72-B, n. 2, p. 293-297, 1990.

KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, T.; JÄRVINEN, M.; RANTANEN, J.; KALIMO, H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Copenhagen, v. 10, p. 332-337, 2000.

KANNUS, P.; JOZSA, L. M.; KVIST, M.; VIENO, T.; JARVINEN, T. L.; NATRI, A.; JARVINEN, M. Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 84, p. 1418-1424, 1998.

KARPAKKA, P.; VAANANEN, K.; ORAVA, S.; TAKALA, T. E. The effects of preimmobilization training and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. **International Journal Sports of Medicine**, Stuttgart, v. 11, p.484-488, 1990.

KASPER, C. E.; MCNULTY, A. L.; OTTO, A. J.; THOMAS, D. P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: An empirical model. **Research in Nursing and Health**, New York, v. 16, p. 265-273, 1993.

KAWANO, F.; TAKENO, Y.; NAKAI, N.; HIGO, Y.; TERADA, M.; OHIRA, T.; NONAKA, I.; OHIRA, Y. Essential role of satellite cells in the growth of rat soleus muscle fibers. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 295, p. C458–C467, 2008.

KELLY, A. E. ; RUBINSTEIN, N. A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. (editors). **The International Journal of Oral Myology**, New York: McGraw-Hill, v. 4, p.119-131, 1994.

KISNER, C. ; COLBY, L. A. **Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas**. 3ª edição, São Paulo, Editora: Manole, capítulo 5, p. 146-159, 1998.

KJÆR, M.; KROGSGAARD, M.; MAGNUSSON, P.; ENGBRETTSEN, L.; ROOS, H.; TAKALA, T.; WOO, S. L-Y. **Textbook of sports medicine. Basic science and clinical aspects of sports injury and physical activity**. Blackwell Science LTD, Oxford, 2003.

KJÆR, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 84, p. 649-698, 2004.

KJÆR, M.; MAGNUSSON, P.; KROGSGAARD, M.; MOLLER, J. B.; OLESEN, J.; HEINEMEIER, K.; HANSEN, M.; HARALDSSON, B.; KOSKINEN, S.; ESMARCK, B.; LANGBERG, H. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. **Journal of Anatomy**, London, v. 208, p. 445-450, 2006.

KOH, T. J. ; TIDBALL, J. G. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology**, Washington, v. 519, n. 1, p. 189-196, 1999.

KOSEK, D. J. ; BAMMAN, M. M. Modulation of the dystrophin-associated protein complex in response to resistance training in young and older men. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 104, n. 5, p. 1476-1484, 2008.

KOVANEN, V.; SUOMINEN, H.; HEIKKINEN, E. Mechanical properties of fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training. **Journal of Biomechanics**, New York, v. 17, n. 10, p. 725-735, 1984.

KOVANEN, V. Intramuscular extracelular matrix: complex enviroment of muscle cells. **Exercise and Sports Science Reviews**, Amherst, v. 30, n. 1, p. 20-25, 2002.

KUROSE, T.; ASAI, Y.; MORI, E.; DAITOKU, D.; KAWAMATA, S. Distribution and change of collagen types I and II and elastin in developing leg muscle in rat. **Hiroshima Journal of Medical Sciences**, Hiroshima, v. 55, n. 3, p. 85-91, 2006.

LARSEN, M.; ARTYM, V. V.; GREEN, A. J.; YAMADA, K. M. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 18, n. 5, p. 463-471, 2006.

LEE, Y-S.; LIN, C-Y.; CAIOZZO, V. J.; ROBERTSON, R. T.; YU, J.; LIN, V. W. Repair of spinal cord transection and its effects on muscle mass and myosin heavy chain isoform phenotype. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 103, p. 1808-1814, 2007.

LEHTO, M.; DUANCE, V. C.; RESTALL, D. Collagen and fibronectin in healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on repair of injured gastrocnemius muscle in rat. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, London, v. 67, p. 820-828, 1985.

LIEBER, R. L.; LEONARD, M. E.; BROWN-MAUPIN, C. G. Effects of muscle contraction on the load-strain properties of frog aponeurosis and tendon. **Cells Tissues Organs**, Switzerland, v. 166, p. 48-54, 2000.

LIGHT, N. ; CHAMPION, A. E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagen. **The Biochemical Journal**, London, v. 219, p. 1017-1026, 1984.

LOITZ, B. J.; ZERNICKE, R. F.; VAILAS, A. C.; KODY, M. H.; MEALS, R. A. Effects of short-term immobilization versus continuos passive motion on the biomechanical and biochemical properties of the rabbit tendon. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 244, n. 6, p. 265-271, 1989.

LOVERING, R. M.; De DEYNE, P. G. Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury. **American journal of physiology. Cell physiology**, Bethesda, v. 286, n. 2, p. C230-C238, 2004.

MACKEY, A. L.; HEINEMEIER, K. M.; KOSHIKEN, S. O.; KJAER, M. Dynamic adaptation of tendon and muscle connective tissue to mechanical loading. **Connective Tissue Research**, New York, v. 49, n. 3, p. 165-168, 2008.

MATHEUS, J. P. C.; OLIVEIRA, J. G. P.; GOMIDE, L. B.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 13, p. 1-5, 2007.

MATTIELLO-SVERZUT, A. C. ; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esquelético. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 132-139, 1999.

MATTIELLO-SVERZUT, A. C.; CARVALHO, L. C.; CORNACHIONE, A.; NAGASHIMA, M.; NEDER, L.; SHIMANO, A. C. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. **Histol Histopathology**, Murcia, v. 21, p. 957-964, 2006.

McLENNAN, I. S. Resident macrophages (ED2 and ED3 positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 272, p. 193-196, 1993.

McLENNAN, I. S. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. **Journal of Anatomy**, London, v. 188, p. 17-28, 1996.

MITCHELL, P. O.; PAVLATH, G. K. Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 287, p. C1753-C1762, 2004.

NOYES, F. R. Functional properties of knee ligaments and alterations induced by immobilization. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 123, p. 210-242, 1977.

OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKANO, J.; SAEKI, A.; UEHARA, A.; MINESHITA, A.; EGUCHI, K. Effects of short duration stretching on disuse muscle atrophy in immobilized rat soleus muscle. **Journal of the Japanese Physical Therapy Association**, Tokyo, v. 4, p. 1-5; 2001.

OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKANO, J.; MOTOMURA, M.; EGUCHI, K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, London, v. 25, p. 159-166, 2004.

PATTERSON, M. F.; STEPHENSON, G. M.; STEPHENSON, D. G. Denervation produces different single fiber phenotypes in fast-and- slow-twitch hindlimb muscle of the rat. **American Journal of Physiology. Cell physiology**, Bethesda, v. 291, n. 3, p. C518-C528, 2006.

PAULIN, D. ; LI, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the Structural integrity and function of muscle. **Experimental Cell Research**, New York, v. 301, p.1-7, 2004.

PICQUET, F.; STEVENS, L.; BUTLER-BROWNE, G. S.; MOUNIER, Y. Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscles at two developmental stages. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, London, v. 19, p. 743-755, 1998.

POLIZZELO, J. C.; CARVALHO, L. C.; PADULA, N.; FREITAS, F. C.; SHIMANO, A. C.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas, imobilizado e posteriormente submetido a diferentes protocolos de alongamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 15, p. 195-199, 2009.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; DERUISSEAU, K. C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 288, p. R337-R344, 2005.

RYBAKOVA, I. N.; PATEL, J. R.; ERVASTI, J. M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 150, n. 5, p. 1209-1214, 2000.

SAKURAI, T.; FUJITA, Y.; OHTO, E.; OGURO, A.; ATOMI, Y. The decrease of the cytoskeleton tubulin follows the decrease of the associating molecular chaperone α B-crystallin in unloaded soleus muscle atrophy without stretch. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 19, n. 9, p. 1199-1201, 2005.

SAVOLAINEN, J.; VAÈÀÈNAÈENEN, K.; PURANEN, J.; TAKALA, T. E. S.; KOMULAINEN, J.; VIHKO, V. Collagen synthesis and proteolytic activities in rat skeletal muscles: effect of castimmobilization in the lengthened and shortened positions. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 69, p. 964-966, 1988.

SELLI, M. F. **Desenvolvimento de um método computadorizado para avaliação das lesões nervosas periféricas através da análise da marcha: modelo experimental em ratos**. 1999. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

SMITH, C. A.; STAUBER, F.; WATERS, C.; ALWAYS, S. E.; STAUBER, W. T. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 102, n. 2, p. 755-761, 2007.

SUNADA, Y.; BERNIER, S. M.; KOZAK, C. A.; YAMADA, Y.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 19, p. 13729-13732, 1994.

TABARY, J. C.; TABARY, C.; TARTIEU, C.; TARDIEU, G.; GOLDSPINK, G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different length by plaster casts. **The Journal of Physiology**, London, v. 224, p. 231-244, 1972.

TAKALA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Copenhagen, v. 10, n. 6, p. 321-325, 2000.

TANAKA, T.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association**, Tokyo, v. 9, p. 76-85, 2004.

TEDESCO, F. S.; DELLAVALLE, A.; DIAZ-MANERA, J.; MESSINA, G.; COSSU, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 120, n. 1, p. 11-19, 2010.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 2, p. R345-R353, 2005.

VAREJÃO, A. S.; CABRITA, A. M.; MEEK, M. F.; BULAS-CRUZ, J.; GABRIEL, R. C.; FILIPE, V. M.; MELO-PINTO, P.; WINTER, D. A. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. **Muscle & Nerve**, New York, v. 26, p. 630-635, 2002.

WANG, L. C. ; KERNELL, D. Quantification of fibre type regionalization: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat. **Journal of Anatomy**, London, v. 198, p. 295-308, 2001.

WARREN, G. L.; STALLONE, J. L.; ALLEN, M. R.; BLOOMFIELD, S. A. Functional recovery of the plantarflexor muscle group after hindlimb unloading in the rat. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 93, p. 130-138, 2004.

WELDON, S. M. ; HILL, R. H. The efficacy of stretching for prevention of exercise-related injury: a systematic review of literature. **Manual Therapy**, Edinburgh, v. 8, n. 3, p. 141-150, 2003.

WILLIAMS, P. E. ; GOLDSPINK G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. **Journal of Anatomy**, London, v. 116, p. 45-55, 1973.

WILLIAMS, P. E. ; GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, London, v. 127, n. 3, p. 459-468, 1978.

WILLIAMS, P. E. ; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilised muscle. **Journal of Anatomy**, London, v. 138, n. 2, p. 343-350, 1983.

WILLIAMS, P. E. ; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, London, v. 138, n. 2, p. 343-350, 1984.

WILLIAMS, P. E. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 47, p. 1014-1016, 1988.

WILLIAMS, P. E.; CATANESE, T.; LUCEY, E. G.; GOLDSPINK, G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. **Journal of Anatomy**, London, v. 158, p. 109-114, 1988.

YAMADA, T.; GOTOH, M.; NAKAMA, K.; MITSUI, Y.; HIGUCHI, F.; NAGATA, K. Effects of hyaluronan on cell proliferation and mRNA expression of procollagens alpha 1 (I) and alpha 1 (III) in tendon-derived fibroblasts from patients with rotator cuff disease: an in vitro study. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v. 35, n. 11, p. 1870-1876, 2007.

YAMASITA, A. V.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H. Desenvolvimento de um software flexível no estudo de regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 177-179, 2008.

YANG, S.; 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. **Journal of Anatomy**, London, v. 190, p. 613-622, 1997.

ZAKAS, A.; BALASKA, P.; GRAMMATIKOPOULOU, M. G.; ZAKAS, N.; VERGOU, A. Acute effects of stretching duration on the range of motion of elderly. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, Australian, n. 9, p. 270-276, 2005.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Cópia da carta de confirmação da submissão do artigo intitulado “Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat” submetido no periódico *Muscle & Nerve* em março de 2012.

ANEXO B - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Evolução da expressão dos colágenos I e III em músculo sóleo de ratas submetidas à alongamento terapêutico manual intermitente” no 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 21 a 25 de novembro de 2011.

ANEXO C - Cópia do certificado de Menção Honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Evolução da expressão dos colágenos I e III em músculo sóleo de ratas submetidas à alongamento terapêutico manual intermitente” apresentado no 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 21 a 25 de novembro de 2011.

ANEXO D - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Avaliação funcional da marcha de ratas reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente após imobilização” no XIX Congresso Brasileiro de Fisioterapia que aconteceu em Florianópolis – SC, no período entre 09 a 12 de outubro de 2011.

ANEXO E - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Functional evaluation of gait and dorsiflexion angle of ankle of rats rehabilitated from intermittent manual passive stretching post-immobilization” no World Confederation for Physical Therapy que aconteceu em Amsterdam – Holanda, no período de 20 a 23 de junho de 2011.

ANEXO F - Cópia do resumo intitulado “Functional evaluation of gait and dorsiflexion angle of ankle of rats rehabilitated from intermittent manual passive stretching post-immobilization” publicado na revista *Physiotherapy*, volume 97, suplemento S1 em 23 de junho de 2011.

ANEXO G - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Rehabilitation with intermittent manual passive stretching after immobilization of rats: a functional analysis of gait” no II Encontro Internacional de Fisiologia do Exercício que aconteceu em São Pedro – SP, no período entre 05 a 07 de maio de 2011.

ANEXO H - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Avaliação funcional da marcha e do ângulo de dorsiflexão do tornozelo de ratas imobilizadas e reabilitadas por alongamento passivo” no 18º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 16 a 18 de novembro de 2010.

ANEXO I - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Definição de metodologia: estudo científico de músculo em secções longitudinais” no XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia realizado no Rio de Janeiro, no período entre 14 a 17 de outubro de 2009.

ANEXO J - Protocolo de aprovação do trabalho pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

ANEXO K – Declaração do Laboratório de Resíduos Químicos - USP, Campus Ribeirão Preto referente ao tratamento de resíduos de diaminobenzidina.

ANEXO A - Cópia da carta de confirmação da submissão do artigo intitulado “Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat” submetido no periódico Muscle & Nerve em março de 2012.

ScholarOne Manuscripts
Página 1 de 1

Muscle and Nerve

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Authoring Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Ana Cláudia Mattiello-Sverzut

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Muscle and Nerve*.

Manuscript ID: MUS-12-0196

Title: REMOBILIZATION THROUGH STRETCHING IMPROVES RECOVERY OF RAT'S GAIT

Authors: Cação-Benedini, Letícia
Ribeiro, Paula
Gomes, Anna Raquel
Ywazaki, Julye
Monte-Raso, Vanessa
Mattiello-Sverzut, Ana Cláudia

Date Submitted: 13-Mar-2012

Print
Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts[™] v4.8.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO B - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Evolução da expressão dos colágenos I e III em músculo sóleo de ratas submetidas à alongamento terapêutico manual intermitente” no 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 21 a 25 de novembro de 2011.

ANEXO C - Cópia do certificado de Menção Honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Evolução da expressão dos colágenos I e III em músculo sóleo de ratas submetidas à alongamento terapêutico manual intermitente” apresentado no 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 21 a 25 de novembro de 2011.

ANEXO D - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Avaliação funcional da marcha de ratas reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente após imobilização” no XIX Congresso Brasileiro de Fisioterapia que aconteceu em Florianópolis – SC, no período entre 09 a 12 de outubro de 2011.

09 a 12 de outubro
Centro Sul - Florianópolis

Certificado

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MARCHA DE RATAS REABILITADAS PELO ALONGAMENTO PASSIVO MANUAL INTERMITENTE APÓS IMOBILIZAÇÃO

Certificamos que o trabalho

Ribeiro, Paula Guilherme; Oliveira, Leticia Cação Beneditini de; Martinez, Edson Zangiacomi; Monte-Raso, Vanessa Vilela; Mattiello-Sverzut, Ana Cláudia

do(s) autor(es)

foi apresentado na forma

Pôster Eletrônico

Florianópolis, 12 de outubro de 2011.

Reginaldo Antolin Bonatti
Presidente da AFB

Márcio José dos Santos
Presidente do Congresso

Amélia Pasqual Marques
Presidente da Comissão Científica

Florianópolis, 12 de outubro de 2011.

ANEXO E - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Functional evaluation of gait and dorsiflexion angle of ankle of rats rehabilitated from intermittent manual passive stretching post-immobilization” no World Confederation for Physical Therapy que aconteceu em Amsterdam – Holanda, no período de 20 a 23 de junho de 2011.

World Physical Therapy
2011
16th International WCPT Congress
20-23 June 2011 Amsterdam Holland

This is to certify that

Ana Cláudia Mattiello-Sverzut

presented

Research report poster display number RR-PO-304-9-Thu

FUNCTIONAL EVALUATION OF GAIT AND DORSIFLEXION ANGLE OF ANKLE OF RATS REHABILITATED FROM INTERMITTENT MANUAL PASSIVE STRETCHING POST-IMMOBILIZATION

at the 16th International Congress of the
World Confederation for Physical Therapy on

23 June 2011

Marielya Mollet
WCPT President

Arifone
Chair, International Scientific Committee

World Confederation
for Physical Therapy

Ref: Thu-13.00-304

ANEXO F - Cópia do resumo intitulado "Functional evaluation of gait and dorsiflexion angle of ankle of rats rehabilitated from intermittent manual passive stretching post-immobilization" publicado na revista *Physiotherapy*, volume 97, suplemento S1 em 23 de junho de 2011.

World Physical Therapy
2011

16th International
WCPT Congress
20-23 June 2011
Amsterdam Holland

World Confederation
for Physical Therapy

Research Report Poster Display

Number: RR-PO-304-9-Thu
Physiotherapy Volume 97 Supplement S1

Thursday 23 June 2011 13:00
RAI: Exhibit Halls 2 & 3

FUNCTIONAL EVALUATION OF GAIT AND DORSIFLEXION ANGLE OF ANKLE OF RATS REHABILITATED FROM INTERMITTENT MANUAL PASSIVE STRETCHING POST-IMMOBILIZATION
 Mattiello-Sverzut A.C.¹, Cação-Benedini L.O.¹, Ribeiro P.G.¹, Martinez E.Z.²
¹Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Department of Biomechanics, Medicine and Rehabilitation of the Locomotor Apparatus, Ribeirão Preto, Brazil, ²Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Department of Social Medicine, Ribeirão Preto, Brazil

Purpose: To evaluate and relate the functional alterations of gait and the goniometric values of dorsiflexion in ankles of rats that had their right hindlimb immobilized and were after submitted to training of intermittent manual passive stretching (IMPS) for 3 days.
Relevance: The pathological adaptations in flexibility and the muscular force are intrinsically related to the cellular perception of the mechanical signals of intra and extracellular origin, consequently, they influence the functional performance of the individual gait.
Participants: Sixteen Wistar rats.
Methods: Sixteen Wistar rats (average 250g) were divided into 2 groups: immobilized and stretched for 3 days group (ISG), immobilized and free for 3 days group (IFG). The right hindlimb of the rats was immobilized for 10 days in plantar flexion (soleus in a shortened position). After immobilization the rats go through a period of IMPS. Before the immobilization and during the period of stretching and free movement, an evaluation was made of dorsiflexion and a functional analysis of gait (FAG). The goniometry was realized using the articulations of the knee and hip in extension. FAG required a treadmill (Insight®) and a 1.3 megapixel webcam. Three images were captured a day for each rat when the hindlimbs were in the double support phase. The following measurements were obtained: footprint length (FL), total opening of the 1st to 5th toes (TS), and the opening of the 2nd and 4th intermediate toes (IT), the same being for the right paw (Exp) as for the left paw (N).
Analysis: The variables were analyzed for inter-group and intra-group with the technique of the linear statistical model of mixed effects adjusted by the SAS software version 9.0.
Results: In the 3 post-immobilization days the values of the dorsiflexion angles of the animals in ISG increased significantly when compared to those presented by the IFG. Regarding the gait, the inter-group analysis showed significant differences for the variables ExpFL, ExpTS and ExpIT, which presented higher values in the IFG. The values found for the variables NFL, NIT and NTS were similar to both groups. In the intra-group analysis, the variables ExpFL, ExpIT and ExpTS of the IFG presented higher values in the pre-immobilization period than in the subsequent days of the free movement. This same finding was only observed in the variables NFL and ExpIT of the ISG. The variable ExpFL of the ISG presented higher values on the 2nd and 3rd days in relation to the pre-immobilization findings and to the 1st day of post-immobilization.
Conclusions: In the ISG, the gain in the increase in movement of dorsiflexion was significant even though it was disproportional to the improved gait function. In this context, both of the variables indicate development in relation to the first day of post-immobilization. What is more, the functional improvement of gait was better in the animals which had free movement in the cage.
Implications: The data demonstrates that in the animals studied the stretching procedure has immediate efficacy in the gain in increase of movement, when analyzed 3 days post-immobilization, but it can restrict the functional gain of gait.
Key-words: 1. gait 2. immobilization 3. stretching
Funding acknowledgements: FAPESP (Grants 09/53342-0, 09/53874-2); FAEPA, FMRP-USP.
Ethics approval: Animal Ethics Committee of the Ribeirão Preto Medical School process 129/2009.

Session name:
MUSCULOSKELETAL: Lower Limb 6

Programme track/theme:
Professional Practice - MUSCULOSKELETAL: Upper Limb

All authors, affiliations and abstracts have been published as submitted.
 Published in partnership with Elsevier publishers and the *Physiotherapy* journal.

ANEXO G - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado "Rehabilitation with intermittent manual passive stretching after immobilization of rats: a functional analysis of gait" no II Encontro Internacional de Fisiologia do Exercício que aconteceu em São Pedro – SP, no período entre 05 a 07 de maio de 2011.

ANEXO H - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado "Avaliação funcional da marcha e do ângulo de dorsiflexão do tornozelo de ratas imobilizadas e reabilitadas por alongamento passivo" no 18º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo que aconteceu em Ribeirão Preto – SP, no período entre 16 a 18 de novembro de 2010.

ANEXO I - Cópia do certificado de apresentação do trabalho intitulado “Definição de metodologia: estudo científico de músculo em secções longitudinais” no XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia realizado no Rio de Janeiro, no período entre 14 a 17 de outubro de 2009.

ANEXO J - Protocolo de aprovação do trabalho pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

1934 | 2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº **129/2009**, sobre o projeto intitulado *“Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em secções longitudinais de músculo sóleo de ratas imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente”*, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Ana Cláudia Mattiello Sverzutt** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **31 de agosto de 2009**.

(We certify that the protocol nº 129/2009, about *“Evaluation of proteins related to costamere in longitudinal sections of the rat soleus skeletal muscle immobilized and rehabilitated using manual passive stretching”*, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in **08/31/2009** meeting.

Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
 Presidente da Comissão de Ética em
 Experimentação Animal

ANEXO K – Declaração do Laboratório de Resíduos Químicos - USP, Campus Ribeirão Preto referente ao tratamento de resíduos de diaminobenzidina.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Coordenadoria do Campus de Ribeirão Preto
www.pcarp.usp.br/lrq e-mail: lrq.pc@usp.br
fone: (16) 3602 - 3945

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o resíduo químico diaminobenzidina (DAB) gerado no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMRP-USP, durante a execução do projeto “Estudo de proteínas relacionadas ao costâmero em secções longitudinais de músculo sóleo de ratas imobilizadas e reabilitadas pelo alongamento passivo manual intermitente”, desenvolvido pela Profa. Dra. Ana Cláudia Mattiello-Sverzut (Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, FMRP-USP) receberá tratamento adequado (destruição por foto-fenton) neste Laboratório de Resíduos Químicos.

Ressalto ainda que este Laboratório não está apto a emitir um parecer, visto que isto cabe apenas a uma Comissão.

Ribeirão Preto, 12 de agosto de 2009

Dr. Adriano César Pimenta
Químico Responsável pelo
Laboratório de Resíduos Químicos