

Efeitos morfológicos do retorno da sobrecarga após imobilização em alongamento de músculo esquelético de ratas

Morphological effects of resumption of loading after immobilization of skeletal muscles in lengthened position in female rats

Juliana C. Polizello¹, Leonardo C. Carvalho¹, Fernando C. Freitas¹, Natália Padula¹, Edson Z. Martinez², Ana C. Mattiello-Sverzut¹

Resumo

Contextualização: Na reabilitação, a imobilização em alongamento do músculo esquelético é realizada como contramedida para reverter efeitos de encurtamento muscular severo e em eventos pós-cirúrgicos. Acredita-se que o retorno às atividades funcionais normais estimule mecanotransdutores capazes de reorganizar a citoarquitetura normal muscular, porém a descrição das alterações histopatológicas relacionadas a esses procedimentos são escassas na literatura. **Objetivos:** Avaliar e quantificar anomalias histológicas induzidas pela imobilização em alongamento do músculo EDL (*Extensor Digitorum Longus*) e confrontá-las com a livre movimentação do animal após esse procedimento. **Métodos:** Foram utilizadas 18 ratas Wistar, distribuídas nos grupos: controle (GC); imobilizadas em flexão plantar (EDL em posição alongada) por 14 dias (GI); imobilizadas por 14 dias e liberadas por dez dias (GIL). Fragmentos do EDL foram congelados, seccionados e processados com reações imuno-histoquímica para colágenos I e III e histoquímica para Adenosina Trifosfatase Miofibrilar e Hematoxilina-Eosina. **Resultados:** Os animais do GI apresentaram discreto aumento da expressão de colágeno I e de fibras em processo degenerativo/necrótico, redução da proporção de fibras tipo (FT) 2A e do diâmetro menor de todos os tipos de fibras, quando comparados com os animais do GC. Para o GIL, observou-se retorno da quantidade de colágeno I às condições controle, além de redução na proporção de FT2D, aumento do número de núcleos centralizados e do diâmetro menor das fibras quando comparadas com o GI, porém a expressão de FT2B e FT2D não atingiu os valores de referência. **Conclusões:** Os dados apresentados mostram que a retomada da função durante dez dias foi parcialmente eficiente na recuperação das características do músculo EDL após o período de imobilização e que, se extrapolados os dados à clínica fisioterapêutica, a adoção de procedimentos orientados às disfunções primárias do músculo pode favorecer a resposta morfofuncional do segmento e o seu íntegro restabelecimento.

Palavras-chave: músculo esquelético; imobilização; morfologia; colágeno; fibras musculares.

Abstract

Background: In rehabilitation, immobilization of skeletal muscles in the elongated position is performed as a countermeasure in order to reverse the effects of severe muscle shortening and postoperative events. The return to normal functional activities is believed to stimulate mechanotransducers capable of reorganizing the normal muscle cytoarchitecture, but few data describing the histopathological changes relating to these procedures are available in the literature. **Objectives:** To assess and quantify histological abnormalities induced by immobilization of the extensor digitorum longus (EDL) muscle in elongation and to compare them with free movement of the animal after this procedure. **Methods:** Eighteen female Wistar rats were used, divided into the following groups: Control; Immobilized in plantar flexion (EDL in an elongated position) for 14 days (GI); Immobilized for 14 days and released for 10 days (GIL). EDL fragments were frozen, sectioned and processed through immunohistochemical reactions for collagens I and III and histochemical methods for myofibrillar adenosine triphosphatase using hematoxylin-eosin. **Results:** GI animals presented slight increases in collagen I and fiber expression in a degenerative/necrotic process, and reductions in the proportion of FT2A fibers and in the diameters of all fiber types, compared with the controls. In GIL, the quantity of collagen I returned to control conditions; the proportion of FT2D decreased; the number of centralized nuclei increased; and the fiber diameter was smaller than in GI. However, FT2B and FT2D expression did not reach the reference values. **Conclusions:** The data presented show that the recovery of function over a 10-day period was partially efficient with regard to recuperation of the characteristics of the EDL muscle after the period of immobilization. If the data are extrapolated to physiotherapeutic clinical practice, use of procedures directed towards primary dysfunctions of the muscle may favor a morphofunctional response in the segment and its full recovery.

Key words: skeletal muscle; immobilization; morphology; collagen; muscle fibers.

Recebido: 23/03/2010 – **Revisado:** 01/07/2010 – **Aceito:** 13/10/2010

¹Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Departamento de Medicina Social, FMRP, USP

Correspondência para: Ana Cláudia Mattiello-Sverzut, Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes, 3.900, Monte Alegre, CEP 14048-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil, e-mail: acms@fmrp.usp.br

Introdução

Na prática clínica da reabilitação, o alongamento muscular mantido é realizado como contramedida para reverter efeitos de encurtamento muscular severo, como no alongamento seriado com gesso após a aplicação de toxina botulínica^{1,2} e nas distrações ósseas para promover aumento no comprimento do membro^{3,4}. Além disso, a imobilização em posição alongada é aplicada após cirurgia de alongamento muscular⁵ ou quando há ruptura tendínea do grupamento muscular contralateral^{6,7}.

Experimentações em animais identificaram que a imobilização na posição alongada causa aumento da síntese proteica, redução da capacidade de gerar força e aumento do tecido conjuntivo^{8,9} e, ainda, que esse procedimento causa atrofia muscular menos marcante associada à menor perda das propriedades elásticas do que aqueles imobilizados em posição de encurtamento¹⁰. Além disso, promovem um aumento de cerca de 17% do número de sarcômeros em série^{11,12}. Acerca da composição muscular dos diferentes tipos de MHC, os estudos são contraditórios. Em músculos de contração rápida, alguns autores identificaram um aumento na fração de fibras lentas, observando uma transição na expressão de isoformas rápidas de MHC no sentido das lentas^{11,13}, enquanto outros observaram a transição de fibras rápidas para mais rápidas^{12,14}. Porém, as anomalias histopatológicas e morfométricas, induzidas pelo alongamento mantido, são pouco correlacionadas e destacadas na literatura, dificultando a compreensão do complexo mecanismo de organização das proteínas do costâmero e a da mecanotransdução celular.

A liberação, seguida de um período de desuso, induz lesão às fibras musculares^{15,16}. A sobrecarga imposta ao músculo após um período de inatividade pode causar danos ao sarcolema e à rede de proteínas do costâmero¹⁷. As alterações nessas proteínas estruturais ativam mecanorreceptores que, por meio de uma cascata de eventos, modificam a expressão gênica, favorecendo a síntese proteica^{18,19}. Isso se traduz em aumento na expressão e síntese de colágeno²⁰, ativação de células satélites¹⁹ e aumento na produção de proteínas contráteis²¹ e proteínas sinalizadoras^{22,23}, sendo esses os principais eventos do retorno das atividades de sobrecarga após a imobilização. A conjunção desses eventos favorece o retorno do volume muscular e organização das proteínas estruturais, restabelecendo, portanto, as características biomecânicas e funcionais. Recentemente, estudos avaliaram as alterações sofridas pelo retorno da sobrecarga após a imobilização, porém poucos deles avaliaram tais alterações em músculos submetidos à imobilização contínua em alongamento¹¹. Portanto, este estudo teve por objetivos avaliar e quantificar as alterações histopatológicas induzidas pela liberação do animal do sistema de contenção após duas semanas de imobilização do músculo EDL de ratas em posição alongada.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizadas 18 ratas (*Rattus norvegicus albinus*) da variedade *Wistar*, adultas jovens, com massa corporal média de 200g±30, que foram mantidas em gaiolas plásticas em ambiente controlado com temperatura a 24°C e período de claro/escuro de 12/12h, com livre acesso à alimentação padrão e água, no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (protocolo nº 06.1.692.53.8) do *Campus* de Ribeirão Preto – USP.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de seis animais cada: controle (GC), os animais permaneceram em gaiolas plásticas por um período de 14 dias a fim de obedecer ao período de contenção dos animais dos demais grupos; imobilizado (GI), os animais permaneceram com o membro posterior direito imobilizado em flexão plantar do tornozelo por um período de 14 dias consecutivos; imobilizado e liberado (GIL), os animais tiveram o membro posterior direito imobilizado em flexão plantar por um período de 14 dias e, em seguida, foram liberados nas gaiolas por um período de dez dias consecutivos.

Em sequência, foram submetidos à eutanásia seguida da coleta do músculo EDL. Obteve-se a porção central do músculo dissecado, que foi envolvido em talco e submetido ao congelamento rápido em nitrogênio líquido. Os fragmentos foram armazenados em freezer -70° até o processamento.

Técnica de imobilização

A imobilização do membro posterior direito dos animais foi realizada após aplicação de anestésico intramuscular, utilizando uma mistura de Cloridrato de Ketamina (80 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (15 mg/kg), na dose de 0,05 mg/100g de peso corporal do animal. Posteriormente, foi elaborado um aparelho gessado que incluía pelve, quadril, joelho em total extensão e tornozelo em flexão plantar a fim de promover o alongamento do músculo EDL (para maior detalhe, consulte Mattiello-Sverzut et al.¹⁶).

Imuno-histoquímica para colágenos

A técnica realizada no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMRP-USP contou com aplicação dos anticorpos *Monoclonal Anti-Collagen Type I* (clone COL-1, Sigma) e *Monoclonal Anti-Collagen Type III* (clone FH-7A, Sigma) para caracterização dos colágenos do tipo I e III, na diluição de

1:3000 e 1:12000, respectivamente. Os diferentes anticorpos foram aplicados em diferentes lâminas que continham cortes de 5 μ m de espessura dos fragmentos musculares. As lâminas foram então fixadas em acetona gelada por 20 minutos, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com anticorpo *Monoclonal Anti-Collagen Type I* e *Monoclonal Anti-Collagen Type III* a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e incubadas com o kit *NovoLink™ Max Polymer* (Novocastra), composto por um polímero pós-primário e um polímero conjugado. Primeiro, o pós-primário foi aplicado, e os cortes permaneceram incubando por 10 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem e incubação com o polímero conjugado por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento, realizou-se nova lavagem para incubação com Diaminobenzidina (DAB) durante 15 minutos. Posteriormente, ocorreu lavagem em água destilada, contracoloração com Hematoxilina por 1 minuto, desidratação, diafanização e, por fim, montagem em Permount (Fisher). Esse protocolo resulta em mionúcleos e proteínas de membrana corados em azul e fibras do tecido conjuntivo coradas em marrom. A avaliação dos diferentes tipos de colágeno do músculo EDL foi feita de forma semiquantitativa, seguindo o protocolo descrito por Kurose et al.²⁴ da imunomarcagem dos colágenos do tipo I e III por três examinadores independentes. Na análise, utilizou-se a classificação descrita a seguir, considerando a reatividade dos mesmos: (-) negativo; (\pm) ligeiramente positivo; (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo.

Estudo morfológico

A análise qualitativa das lâminas foi feita em Microscópio Óptico (MO) de luz, Leica DM 2500, por dois observadores, quando foram avaliados aspectos morfológicos genéricos e contabilizadas as alterações anatomopatológicas do tecido muscular de cada animal pela reação de Hematoxilina-Eosina (HE).

Análise morfométrica

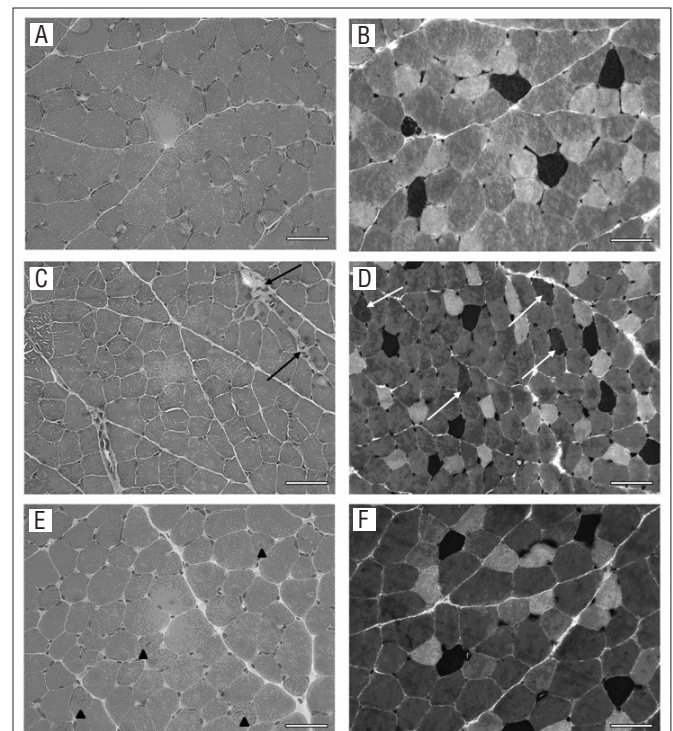
Utilizando o software QualiView – Atonus, foram fotomicrografados três campos aleatórios do fragmento muscular de cada animal, processados pela reação de mATPase²⁵, em pH de pré-incubação 4,6, confrontando com os cortes processados em pH 4,3 e 9,4. Em cada imagem, foram contados os diferentes tipos de fibras presentes no músculo EDL, bem como medido o diâmetro menor de cada fibra, descartando da análise aquelas que se apresentavam incompletas na imagem. A medida do diâmetro menor foi eleita para representação da área de secção transversa a fim de eliminar possíveis distorções no valor da área das fibras decorrentes do seccionamento oblíquo da amostra²⁶.

Análise estatística

A estatística referente ao diâmetro menor e proporção de fibras dos músculos EDL de cada animal foi realizada entre os grupos utilizando o Modelo Linear de Efeitos Mistos, com nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$) e um intervalo de confiança de 95% (IC=95%), usando PROC MIXED do programa SAS, versão 9.2.

Resultados

Os fragmentos do músculo EDL dos animais do GC apresentaram fibras poliédricas, núcleos periféricos e variação no tamanho das fibras (Figura 1A). A imobilização provocou ligeiro aumento no número de fibras em processo degenerativo/necrótico (Figura 1C). Os animais do GIL (Figura 1D e 1E) apresentaram quantidade aumentada de núcleos centralizados quando comparados com os do GC (Figura 1A). A Tabela 1 apresenta os valores médios e desvio-padrão dos achados anatomopatológicos identificados nos animais dos diferentes grupos analisados. Observa-se que, em valores absolutos, os



Grupo controle (A e B), grupo imobilizado (C e D), grupo imobilizado e liberado (E e F). (Barra: 50 μ m). Observe: (A) variação no tamanho das fibras e (B) predomínio de fibras de contração rápida e rarefação de fibras tipo 1 (fibras escuras); (C) Fibras em processo degenerativo/necrótico (seta escura) e (D) presença de fibras de coloração intermediária (setas claras); (E) Centralização nuclear (cabeça de seta) e (F) predomínio de fibras de contração rápida e rarefação de fibras tipo 1 (fibras escuras).

Figura 1. Fotomicrografia do músculo EDL. HE (A, C, E); mATPase pH 4,6 (B, D, F).

itens centralização nuclear do GIL e processos degenerativos/necróticos do GI foram os mais modificados em relação aos achados do GC.

A avaliação do tecido conjuntivo intramuscular do músculo EDL indicou discreto aumento na quantidade de colágeno do tipo I nos animais do GI e discreta redução na quantidade de colágeno do tipo III nos animais do GIL, conforme evidenciado na Tabela 2.

Tabela 1. Quantidade média (±DP) de fibras com alterações histopatológicas do músculo EDL nos diferentes grupos analisados.

	GC	GI	GIL
Centralização nuclear	1,3 (±1)	2,8 (±2,3)	6,3 (±7)
Fibras lobuladas	0,5 (±1,2)	0,2 (±0,4)	0,5 (±0,5)
Degeneração/Necrose	3 (±1,7)	4,2 (±1,9)	1,3 (±0,8)
Regeneração	0,2 (±0,4)	0,2 (±0,4)	0
Splitting	1,2 (±1,6)	0,3 (±0,8)	1 (±0,9)

GC=grupo controle; GI=grupo imobilizado; GIL=grupo imobilizado e liberado.

Tabela 2. Avaliação semiquantitativa do conteúdo de colágeno intersticial do músculo EDL.

	GC	GI	GIL
Colágeno I	±/+	+	±/+
Colágeno III	++	++	+/**

GC=grupo controle; GI=grupo imobilizado; GIL=grupo imobilizado e liberado;
 - negativo; ± ligeiramente positivo; + fracamente positivo; ++ moderadamente positivo; +++ fortemente positivo.

A análise da proporção dos diferentes tipos de fibras do músculo EDL indicou que a imobilização provocou redução apenas no número de FT2A (GI x GC, $p < 0,001$), e a liberação na gaiola, após o período de imobilização, reduziu o número de FT2D (GIL x GC, $p < 0,01$; GIL x GI, $p < 0,0001$) em relação aos animais do GC e do GI (Figura 2). Dados do diâmetro menor das fibras musculares demonstraram que a imobilização determinou redução do diâmetro menor de todos os tipos de fibras em relação aos respectivos valores controle (GI x GC, $p \leq 0,03$) (Tabela 2). Por outro lado, a liberação dos animais na gaiola provocou aumento dos valores de diâmetro das FT1, FT2A, FT2AD, FT2D e FT2B, quando comparados com os do GI (GIL x GI, $p < 0,01$) (Tabela 3).

Discussão

Na prática clínica da reabilitação física, ainda existem questionamentos sobre a readaptação de algumas variáveis do tecido muscular submetido a procedimentos de desuso e posterior liberação às atividades de vida diária. A efetividade da indicação de um procedimento terapêutico específico ou a conduta de não indicação deve ser abordada sob diversos aspectos, dentre eles, o tipo de desuso, o período de restrição ao movimento, as características contráteis do músculo (ou grupo muscular) debilitado e achados de caráter morfológico.

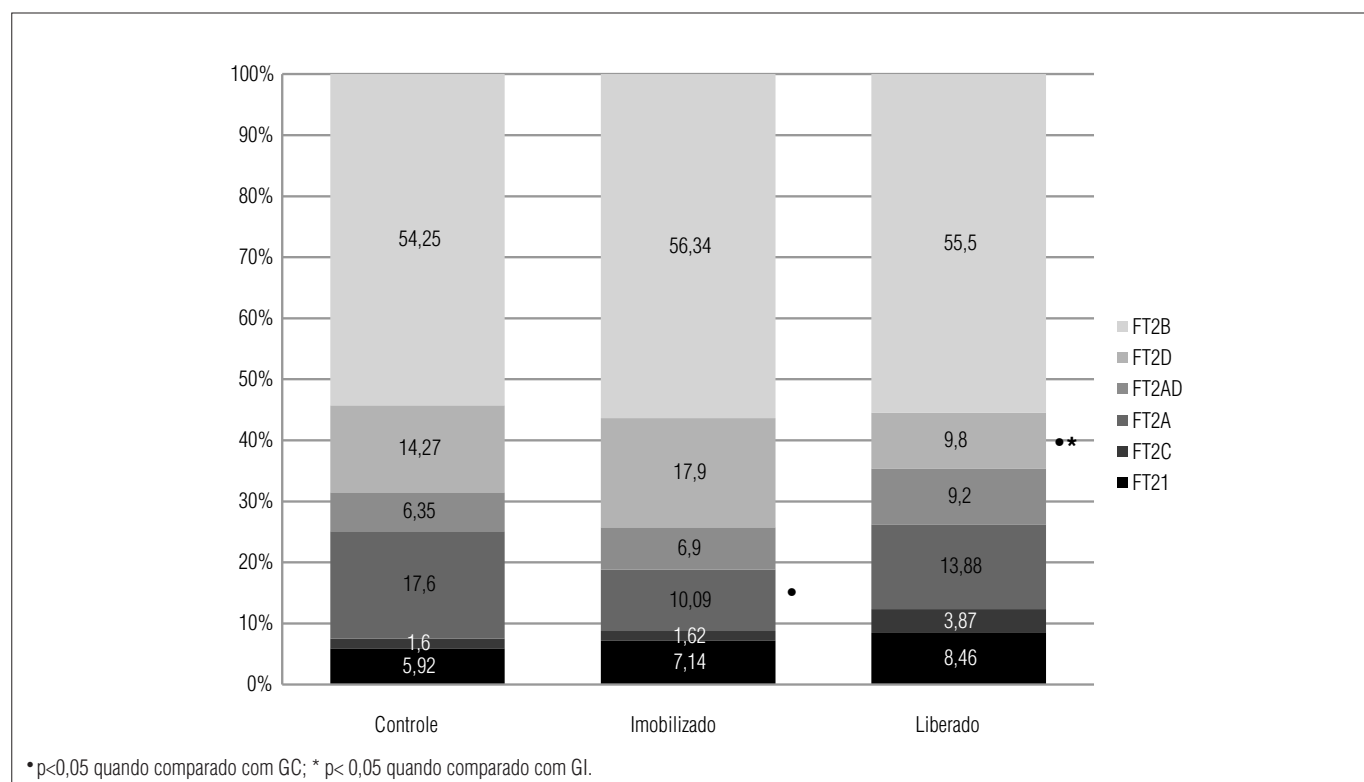


Figura 2. Porcentagem dos diferentes tipos de fibra do músculo EDL nos grupos analisados.

Nessa direção, este estudo experimental conduzido em ratas Wistar pôde verificar que 14 dias de imobilização do músculo EDL em alongamento e consecutiva liberação dos animais na gaiola por dez dias determinaram alterações importantes na expressão de colágenos intersticiais na proporção e no trofismo das fibras musculares.

Efeitos da imobilização em alongamento

Especificamente, o procedimento de imobilização do músculo EDL, em posição alongada, durante 14 dias, determinou atrofia dos diferentes tipos de fibra muscular, redução somente na proporção de FT2A e discreto aumento na quantidade de colágeno I. A imobilização em alongamento é considerada um estímulo à tensão longitudinal, porém não determina sobrecarga no músculo esquelético, mas pode induzir modificações nos fatores relacionados à regulação miogênica. Um estudo conduzido por Gomes et al.²⁷ identificou que sessões diárias de alongamento mantido por 30 minutos, durante 7 dias, em sóleo de ratos normais, somente modificou a expressão de mRNA para Atrogina-1, não tendo alterado a expressão de mRNA para MyoD e miostatina. Segundo Kim et al.²⁸, existe uma relação entre a expressão de atrogina e a ubiquitina-ligase, que desempenha um importante papel no processo de degradação proteica e, consequentemente, na regulação da massa muscular. Em paralelo, estudos conduzidos por Williams et al.²⁹ e Ahtikoski et al.³⁰ identificaram que a imobilização em alongamento, por uma semana, não provocou alteração na quantidade de tecido conjuntivo, sendo que, no segundo estudo, a manutenção do músculo em alongamento preveniu a redução dos níveis de mRNA para colágeno I. Ainda, a concentração de mRNA para colágenos tipo I e III mostrou-se reduzida no terceiro dia de imobilização do músculo tibial anterior, mas retornou aos valores controle após o sétimo dia³¹. Por outro lado, estudos conduzidos por Józsa et al.¹¹ identificaram que a quantidade de tecido conjuntivo perimisial do músculo sóleo e gastrocnêmio de animais submetidos à imobilização em dorsiflexão aumentou na primeira semana pós-procedimento, porém progrediu em 5x esse valor após a terceira semana. Os dados acima destacados sugerem que o tempo de restrição articular mostra-se uma variável importante para a instalação das alterações do colágeno e de tecido conjuntivo, como as identificadas no presente estudo. Na matriz extracelular, o colágeno tipo I determina força tênsil e rigidez e, portanto, sob a ótica biomecânica, a redução dessa proteína pode comprometer o suporte de carga na fase elástica^{32,33}, que antecede o rompimento, vulnerabilizando o tecido ao estresse longitudinal.

A imobilização em alongamento de músculos de contração rápida pode causar aumento na fração de fibras rápidas, levando a uma transição de fibras rápidas para mais rápidas¹². Sendo o EDL composto predominantemente por fibras

Tabela 3. Média e intervalo de confiança do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibra do músculo EDL.

	GC	GI	GIL
FT1	24,16 (22,25 - 26,07)	20,80* (18,94 - 22,66)	24,31* (22,41 - 26,20)
FT2C	23,89 (21,07 - 26,71)	20,19* (17,45 - 22,92)	22,77 (20,58 - 24,97)
FT2A	23,72 (22,04 - 25,40)	20,87* (19,10 - 22,65)	23,22* (21,41 - 25,02)
FT2AD	24,59 (22,70 - 26,47)	21,49* (19,57 - 23,39)	23,64* (21,75 - 25,53)
FT2D	29,95 (28,24 - 31,66)	23,37* (21,70 - 25,05)	28,46** (26,57 - 30,35)
FT2B	32,65 (31,05 - 34,23)	23,12* (21,54 - 24,71)	31,48** (29,88 - 33,08)

GC=grupo controle; GI=grupo imobilizado; GIL=grupo imobilizado e liberado; * $p < 0,05$ quando comparado com GC; ** $p < 0,05$ quando comparado com GI.

de contração rápida, após o período de imobilização desse músculo, foi possível observar redução significativa de FT2A, porém sem aumento estatístico de outros tipos de fibras. Portanto, acredita-se que o tempo de imobilização utilizado neste estudo tenha sido insuficiente para confirmar o sentido da transição induzida pela intervenção do alongamento mantido, como destacado pelos autores anteriores.

O valor médio de diâmetro menor das fibras dos animais imobilizados em alongamento encontrou-se reduzido em relação ao controle, assim como observaram Chopard, Pons e Marini³⁴, Stelzer e Widrick³⁵ e Gehrke et al.³⁶. Por outro lado, Yang et al.³⁷ aplicaram a imobilização em alongamento no músculo EDL por seis dias e identificaram aumento na massa muscular e aumento na expressão local de IGF-1. Segue-se que um estudo desenvolvido por De Deyne et al.³ apontou que as alterações do IGF-1 pouco podem contribuir para as transformações sofridas pelo EDL imobilizado em posição alongada, de forma que é possível que o tempo de imobilização tenha sido um fator importante ou que essa proteína tenha outros papéis, que não somente a promoção do crescimento muscular. Apesar de a metodologia aplicada no presente estudo não permitir a verificação de alterações ultraestruturais e de proteínas específicas do costâmero, a presença de fibras em processo degenerativo/necrótico e outras com centralização nuclear permite sugerir que houve dano sarcolemal e subsequente modificação arquitetural das proteínas do costâmero, que são de fundamental importância à estabilização do sarcolema e posicionamento do núcleo³⁸, principalmente para o músculo EDL, como identificou O'Neill et al.³⁹. A desestruturação sarcolemal e das proteínas a ela associadas, por sua vez, pode ter evocado a cascata relacionada à proteólise lisossomal via catépsina e proteossomo ubiquitina ATP-dependente^{40,41}. Além disso, a titina, uma proteína estrutural importante para manutenção

da estrutura sarcomérica, pode ter sido danificada pela intensidade do alongamento desenvolvido durante a imobilização, talvez excedendo a amplitude funcional de deformação do domínio PEVK (*Proline-glutamine-valine-lysine-rich domain*), provocando desorganização das miofibrilas contráteis e, conseqüentemente, sinalizando para a degeneração da fibra^{42,43}. Em paralelo ao desarranjo subsarcolemal, houve reparação-regeneração tecidual destacada pela centralização nuclear e discreto aumento de colágeno I. Em suma, deve-se considerar que a imobilização promove redução na síntese proteica e aceleração na degradação de proteínas, porém o grau de atrofia e de modificações na síntese de colágeno parece ser diferente para cada músculo, dependendo do tipo de fibra que o compõe³⁰ e da posição em que permaneceu imobilizado³⁵.

Efeitos da liberação pós-imobilização em alongamento

A livre movimentação dos animais foi capaz de restaurar os valores de diâmetro e proporção aos valores observados no GC para a quase totalidade dos tipos de fibras, com exceção das FT2B e FT2D. Sendo o EDL composto principalmente por fibras de contração rápida, que são as primeiras recrutadas, o retorno à atividade pode ter provocado maior lesão nessas fibras durante a fase inicial da liberação⁴⁴, atrasando seu processo de recuperação e de ganho de volume. Estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa têm evidenciado que a recuperação do músculo plantar, também composto predominantemente por fibras de contração rápida, imobilizado em encurtamento por dez dias, recupera suas características morfológicas após dez dias de reabilitação, seja com alongamento ou treino excêntrico (Cornachione et al.⁴⁵, resultados não publicados). Além disso, foi possível observar uma discreta redução na expressão do colágeno III. Esse tipo de colágeno é responsável pela complacência da matriz extracelular, permitindo maior mobilidade entre as fibras musculares. Assim como outros autores observaram no sétimo dia pós-imobilização em alongamento^{30,31}, neste trabalho, o conteúdo de colágeno tipo III também não apresentou diferença em relação àquele observado no GC no décimo quarto dia pós-imobilização. Ainda que não existam relatos na literatura para expressão de mRNA e/ou pró-colágeno tipo III sob a metodologia aqui utilizada no período pós-imobilização, é possível inferir que a liberação tenha favorecido a reorganização macromolecular dessas estruturas, assim como sugerem Coutinho, DeLuca e Salvini⁴⁶. Além disso,

em músculos com predomínio de fibras glicolíticas, exercícios de sobrecarga aumentam os níveis da expressão de mRNA e da própria metaloproteinase 2 (MMP-2)⁴⁷. Essa, por sua vez, além de atuar na degradação de tecido conjuntivo da matriz extracelular, aumenta a ativação de células satélites⁴⁸, auxiliando no processo de regeneração tecidual⁴⁹, que pode ser evidenciado pela presença aumentada de núcleos centralizados, assim como foi encontrado neste estudo. Em paralelo, o aumento no diâmetro menor da maioria das fibras pode ser justificado pela ativação da cascata de eventos que envolvem fatores de crescimento/regeneração muscular, como IGF-1 e MGF^{27,50}.

Considerando as variáveis analisadas e a metodologia empregada, conclui-se que a imobilização em alongamento por 14 dias consecutivos gera no músculo EDL alterações histopatológicas condizentes com o desuso, caracterizando atrofia de todos os tipos de fibras e aumento de colágeno I. O retorno da sobrecarga por dez dias, com a liberação do animal, gerou estímulos mecânicos capazes de promover ativação de mecanismos competentes em recuperar os padrões do músculo EDL, com exceção do trofismo e proporção das fibras de contração rápida. A partir dos resultados obtidos neste estudo com ratas, hipotetiza-se que alguns cuidados devem ser considerados na clínica da reabilitação fisioterapêutica quando da sobrecarga segmentar após breves períodos de imobilização em alongamento. Destaca-se a fragilidade dos componentes celular e intersticial frente ao estresse longitudinal, assim como a provável debilidade funcional do músculo caracterizada pela atrofia das fibras rápidas e em menor proporção. Portanto, sugere-se que a retomada da função deve ser gradativa a partir da adoção de exercícios que potencializem a atividade das fibras oxidativas/glicolíticas (FT2A) que sofreram redução em número e em volume. Uma ação paralela seria a utilização de eletroestimulação de média frequência⁵¹ no grupo muscular mantido em alongamento pela imobilização, o que contribuiria para recuperação estrita dessas fibras e, conseqüentemente, para o restabelecimento da força e da função muscular.

Agradecimentos : : : .

Apoio financeiro Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP e Pró-Reitoria de Pesquisa-USP.

Referências

1. Farmer SE, James M. Contractures in orthopaedic and neurological conditions: a review of causes and treatment. *Disabil Rehabil.* 2001;23(13):549-58.
2. Kay RM, Rethlefsen SA, Fern-Buneo A, Wren TA, Skaggs DL. Botulinum toxin as an adjunct to serial casting treatment in children with cerebral palsy. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A(11):2377-84.
3. De Deyne PG, Kinsey S, Yoshino S, Jensen-Vick K. The adaptation of soleus end edl in a rat model of distraction osteogenesis: IGF-1 and fibrosis. *J Orthop Res.* 2002;20(6):1225-31.
4. Thorey F, Bruenger J, Windhagen H, Witte F. Muscle response to leg lengthening during distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 2009;27(4):483-8.
5. Fucs PM, Svartman C, Santili C, De Assumpção RM, de Almeida Leite LF, Quialheiro LS, et al. Results in the treatment of paralytic calcaneus-valgus feet with the Westin technique. *Int Orthop.* 2007;31(4):555-60.
6. Leppilahti J, Orava S. Total Achilles tendon rupture. A review. *Sports Med.* 1998;25(2):79-100.
7. Metz R, Kerkhoffs GM, Verleisdonk EJ, van der Heijden GJ. Acute Achilles tendon rupture: minimally invasive surgery versus non operative treatment, with immediate full weight bearing. Design of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007;8:108.
8. Järvinen MJ, Einola SA, Virtanen EO. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* 1992;73(3):253-7.
9. Da Silva CA, Guirro RRR, Polacow MLO, Cancellero KM, Durigan JLO. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(7):979-85.
10. Järvinen TAH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TLN, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(3):245-54.
11. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Refy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72(2):293-7.
12. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Res Tech.* 2000;50(6):500-9.
13. Loughna PT, Izumo S, Goldspink G, Nadal-Ginard B. Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adults contractile protein genes in skeletal muscle. *Development.* 1999;109(1):217-23.
14. Guillot C, Steinberg JG, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y, Badier M. Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *J Electromyogr Kinesiol.* 2008;18(2):276-83.
15. Ploutz-Snyder LL, Tesch PA, Hather BM, Dudley GA. Vulnerability to dysfunction and muscle injury after unloading. *Arch Phys Med Rehabil.* 1996;77(8):773-7.
16. Mattiello-Sverzut AC, Carvalho LC, Cornachione A, Nagashima M, Neder L, Shimano AC. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. *Histol Histopathol.* 2006;21(9):957-64.
17. Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA, Vandenborne K. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle Nerve.* 2005;32(5):672-4.
18. Goldspink D. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1997;264(1):267-82.
19. Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(1):52-9.
20. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Schjerling P, Baldwin KM, Kjaer M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol.* 2009;106(1):178-86.
21. Boonyarom O, Inui K. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf).* 2006;188(2):77-89.
22. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):1974-84.
23. Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol.* 2009;106(4):1367-73.
24. Kurose T, Asai Y, Mori E, Daitoku D, Kawamata S. Distribution and change of collagen types I and III and elastin in developing leg muscle in rat. *Hiroshima J Med Sci.* 2006;55(3):85-91.
25. Stevens A, Palmer J. Enzyme histochemistry: Diagnostic application. In: Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practice of histological techniques.* 4ª edição. New York: Churchill Livingstone; 1996.
26. Aherne WA, Dunhill MS. Methods of estimating myofibre size. *Morphometry.* Great Britain: Edward Arnold; 1982.
27. Gomes AR, Soares AG, Peviani S, Nascimento RB, Moriscot AS, Salvini TF. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin, and atrogen-1 gene expressions. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006;87(2):241-6.
28. Kim SJ, Roy RR, Kim JA, Zhong H, Haddad F, Baldwin KM, et al. Gene expression during inactivity-induced muscle atrophy: effects of brief bouts of a forceful contraction countermeasure. *J Appl Physiol.* 2008;105(4):1246-54.
29. Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat.* 1988;158:109-14.
30. Ahtikoski AM, Koskinen OA, Virtanen P, Kovanen V, Takala TE. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 2001;172(2):131-40.
31. Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Viikho V, et al. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Arch.* 1999;437(6):857-64.
32. Carvalho LC, Polizello JC, Padula N, Freitas FC, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras.* 2009;17(5):269-72.
33. Polizello JC, Carvalho LC, Freitas FC, Padula N, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas, imobilizado e posteriormente submetido a diferentes protocolos de alongamento. *Rev Bras Med Esporte.* 2009;15(3):195-9.
34. Chopard A, Pons F, Marini J-F. Cytoskeletal protein contents before and after hindlimb suspension in fast and slow rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(2):R323-30.
35. Stelzer JE, Widrick JJ. Effect of hindlimb suspension on the functional properties of slow and fast soleus fibers from three strains of mice. *J Appl Physiol.* 2003;95(6):2425-33.
36. Gehrke AG, Krull MS, McDonald RS, Sparby T, Thoele J, Troje SW, et al. The effects of non-weight bearing on skeletal muscle in older rats: an interrupted bout versus an uninterrupted bout. *Biol Res Nurs.* 2004;5(3):195-202.
37. Yang H, Alnaqeb M, Simpson H, Goldspink G. Changes in muscle fiber type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat.* 1997;190(Pt 4):613-22.
38. Shah SB, Davis J, Weisleder N, Kostavassili I, McCulloch AD, Raiston E, et al. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys J.* 2004;86(5):2993-3008.
39. O'Neill A, Williams MW, Resneck WG, Milner DJ, Capetanaki Y, Block RJ. Sarcolemmal organization in skeletal muscle lacking desmin: evidence for cytokeratins associated with the membrane skeleton at costameres. *Mol Biol Cell.* 2002;13(7):2347-59.
40. Chopard A, Arrighi N, Carnino A, Marini JF. Changes in dystrophin, proteins from dystrophin glycoprotein complex, costameres, and cytoskeleton in human soleus and vastus lateralis muscles after a long-term bedrest with or without exercise. *FASEB J.* 2005;19(12):1722-4.
41. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 2007;37(9):737-63.
42. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophys J.* 1993;64(4):1161-77.
43. Kellermayer MS, Bustamante C, Granzier HL. Mechanics and structure of titin oligomers explored with atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1604(2):105-14.
44. Mitchell PO, Pavlath GK. Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(6):C1753-62.
45. Cornachione AS, Oliveira LCB, Beneditini-Elias PCO, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Resultados não publicados.
46. Coutinho EL, DeLuca C, Salvini TF. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. *Connect Tissue Res.* 2006;47(5):278-86.
47. Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol.* 2005;90(4):613-9.
48. Yamada M, Tatsumi R, Kikuri T, Okamoto S, Nonoshita S, Mizunoya W, et al. Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve.* 2006;34(3):313-9.
49. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol.* 1997;170:143-223.
50. Goldspink G, Wessner B, Bachl N. Growth factors, muscle function and doping. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(3):352-7.
51. Sinacore DR, Delitto A, King DS, Rose SJ. Type II fiber activation with electrical stimulation: a preliminary report. *Phys Ther.* 1990;70(7):416-22.