

ÉRICA ABJAUDI CARDOSO

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE MÚSCULO
ESQUELÉTICO SUBMETIDO A Aalongamento PASSIVO,
EM RATOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2006**

ÉRICA ABJAUDI CARDOSO

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE MÚSCULO
ESQUELÉTICO SUBMETIDO A ALONGAMENTO PASSIVO,
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2006**

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva e co-orientação da Profa. Conceição Ribeiro da Silva Machado, com o auxílio do CNPq e Capes.

***Aos meus pais, meu irmão e,
ao meu marido: faróis
constantes nesta caminhada.***

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço a Deus, pela oportunidade do aprendizado e pela força necessária para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais, Antônio e Nágila, fontes inesgotáveis de amor e dedicação. As palavras são pequenas para expressar toda a minha gratidão!

Ao meu irmão, Dri, sempre companheiro e amigo leal.

Ao meu marido, Rommel Pires, pelo constante apoio e afeto imensuráveis. Obrigada por suportar fielmente todos os meus momentos de tensão e minha falta de tempo para você!

À minha querida sogra, prof^a Sueli Pires, pela disponibilidade inesgotável.

À minha orientadora, prof^a Elizabeth Ribeiro da Silva, por abrir as portas do laboratório para mim e permitir que este trabalho fosse realizado.

À minha co-orientadora, prof^a Conceição Machado, pelos conselhos imprescindíveis e pelo exemplo de força inquestionável.

À prof^a Patrícia Massara Martinelli, pela colaboração valiosa.

Aos técnicos Carlos Henrique e Luíza, por terem me ajudado nas técnicas laboratoriais.

Aos meus amigos da pós-graduação em Biologia Celular, principalmente a Dani, o Talles, a Patricinha, a Andréa e a Tina, que tantas vezes me ajudaram neste trabalho. Especialmente, à Ceci, pela ajuda e pelo apoio tão importante durante estes dois anos e meio.

Aos meus amigos externos ao ICB, pelos corações generosos e pelos ouvidos incansáveis durante todo este tempo. Os nomes de vocês prefiro deixar guardado em meu coração...

Aos membros do NBA que, tantas vezes, dispuseram de seu tempo para me ajudar.

Ao professor Dr. Paulo Iscold, cuja colaboração foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Bioterismo, pelo fornecimento de ratos, objeto de nosso estudo.

À Iraídes de Jesus, pela boa-vontade e disposição em me ajudar sempre.

Enfim, a todos vocês que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão deste trabalho. A vitória é nossa!

***“UMA MADEIRA FLEXÍVEL CURVA-SE COM O VENTO E NÃO SE QUEBRA. A
ÁRVORE RÍGIDA QUE RESISTE AO VENTO CAI VÍTIMA DE SUA PRÓPRIA
INSISTÊNCIA EM CONTROLAR-SE”.
(BORYSENKO, 1999)***

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Relação comprimento-tensão de musculatura esquelética.....	16
FIGURA 2 - Organização das proteínas acessórias do sarcômero.....	17
FIGURA 3 - Foto do sistema de alongamento montado pelos professores do Departamento de Engenharia Mecânica.....	28
FIGURA 4-Desenho esquemático do sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior, vista lateral.....	29
FIGURA 5-Foto do sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior.....	30
FIGURA 6 - Secção histológica de músculo tibial anterior controle (A) e submetido a oito sessões de alongamento passivo (B e C).....	40
FIGURA 7 - Fotomicrografias de secções de músculo tibial anterior controle (A e C) e submetido alongamento passivo por 8 semanas consecutivas (B e D).....	41
FIGURA 8 - Comprimento médio do ventre do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.....	42
FIGURA 9 - Diâmetro transversal médio do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.....	43

FIGURA 10 – Comprimento dos sarcômeros do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.....44

FIGURA 11 – Número de bandas A/100µm em fibras do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.....45

FIGURA 12 - Fibra muscular dissociada pela técnica de William & Goldspink (1971) para visualização de estriação transversal.....46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Peso corporal médio (g) $\pm$ d.p. de ratos com 9 a 16 semanas de idade submetidos a 8 sessões semanais, com duração de 20 minutos, de alongamento passivo do músculo tibial anterior direito.....	35
TABELA 2 – Média do deslocamento linear (mm) $\pm$ d.p. do músculo tibial anterior de ratos, com 9, 13 e 16 semanas de idade, após 1, 4 e 7 sessões de alongamento passivo, com duração de 15 minutos.....	36
TABELA 3 – Alongamento médio relativo em relação ao tempo 0 (%) do músculo tibial anterior submetido a alongamento passivo por 1, 3 e 7 semanas, de ratos com 9, 13 e 16 semanas de idade.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 METODOLOGIA	
3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE RATOS HOLTZMAN.....	27
3.2 PROTOCOLO DE ALONGAMENTO.....	27
3.3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS.....	31
3.3.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA.....	32
3.3.2 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA.....	32
3.4 TÉCNICAS HISTOMÉTRICAS.....	33
3.4.1 DIÂMETRO DE FIBRAS MUSCULARES.....	33
3.4.2 COMPRIMENTO E NÚMERO DE SARCÔMEROS.....	33
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS	
4.1 PESO CORPORAL.....	36
4.2 VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO LINEAR DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR.....	37
4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	38
4.4 ANÁLISES HISTOMÉTRICAS.....	42
4.4.1 COMPRIMENTO DO VENTRE MUSCULAR.....	42
4.4.2 DIÂMETRO TRANSVERSAL DAS FIBRAS MUSCULARES.....	43
4.4.3 COMPRIMENTO DO SARCÔMEROS.....	44
4.4.4 NÚMERO DE BANDAS A.....	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES.....	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O músculo esquelético tem sido objeto de estudo, há várias décadas, de pesquisas associadas a diferentes campos do conhecimento. Este tecido realiza tanto um trabalho dinâmico, que permite a locomoção e o posicionamento dos segmentos corporais no espaço, quanto um trabalho estático, responsável pela manutenção da postura corporal (McCOMAS, 1996). Patologias de origem diversa – genéticas, distróficas, ortopédicas e posturais – podem acometer este tecido e têm ampliado o interesse por sua organização estrutural e funcional.

A unidade estrutural contrátil do músculo esquelético é a fibra muscular esquelética ou miônio, célula cilíndrica - com 1 a 30 cm de comprimento e diâmetro de 10 a 100 μm - em que os vários núcleos se dispõem em posição subsarcolêmica e com numerosas miofibrilas no citoplasma (McCOMAS, 1996).

Um segundo tipo celular da linhagem miogênica é a célula satélite, mononucleada, sem miofibrilas e que se apóia na membrana basal do miônio. Essas células persistem na fase G0 do ciclo celular, mas, em resposta a determinados estímulos, podem entrar no ciclo mitótico, proliferar e se fundir ao miônio. Desse modo, contribuem para o crescimento, reparo e hipertrofia pós-natal do músculo esquelético. Quando em mitose, as células satélites expressam, temporariamente, moléculas específicas como os fatores de transcrição da família MyoD, as isoformas da cadeia pesada da miosina e a desmina (proteína de filamento intermediário), tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O MyoD é um membro da família de proteínas cuja expressão ectópica pode induzir células não-miogênicas a se submeterem à diferenciação miogênica. A família MyoD compreende MyoD, miogenina e Myf-5. Todas possuem um domínio protéico conservado, o motivo bHLH e podem ativar a expressão de genes musculares específicos. Cada membro da família pode regular um estágio diferente do desenvolvimento muscular. Myf-5 e MyoD parecem agir no estágio inicial da diferenciação dos mioblastos e a miogenina no estágio mais tardio do mesmo (KOISHI et al., 1994; FUCHTBAUER et al., 1992).

As células satélites também expressam as moléculas de adesão NCAM e M-caderina, no estado quiescente. A M-caderina está presente em células satélites de músculos normais, desnervados ou em regeneração (KUSCHEL et al., 1999).

Os miônios apresentam, no citoplasma, miofibrilas cilíndricas, de 1 a 2 μm de diâmetro que, freqüentemente, são tão longas quanto a própria célula muscular. Estas miofibrilas consistem de pequenas unidades contráteis repetidas, em série, –

sarcômeros -, cada um com comprimento de 2,2 μm , que conferem à miofibrila esquelética sua aparência estriada (Alberts et al., 2004). Cada sarcômero é formado por filamentos finos e espessos. Os primeiros são compostos de actina e proteínas associadas, sendo ligados por uma de suas extremidades à linha Z, em cada extremidade do sarcômero. As extremidades livres dos filamentos finos se estendem em direção ao centro do sarcômero, onde se sobrepõem aos filamentos espessos. Estes, por sua vez, são formados a partir de isoformas de miosina II específicas de músculo (Alberts et al., 2004). As proteínas do disco Z estão em troca dinâmica com um pool citoplasmático – incluindo até mesmo as proteínas previamente caracterizadas como componentes estruturais estáticos do disco Z, como a α -actinina e a miotilina (LANGE et al., 2006).

Sabe-se que a força ou a tensão exercida por um determinado músculo depende de seu comprimento. As alterações na tensão quando a fibra é alongada ou encurtada devem-se, primariamente, às alterações estruturais no sarcômero. A tensão isométrica máxima pode ser exercida quando os sarcômeros estão próximos ao seu comprimento de repouso (2.0 a 2.25 μm). Se os sarcômeros são alongados, há menor número de conexões entre os filamentos e a tensão ativa diminui. Com o comprimento do sarcômero próximo a 3.6 μm não há sobreposição entre os filamentos finos e espessos, e, então, não há tensão ativa. Se o sarcômero se encurta muito aquém do seu comprimento de repouso, a tensão ativa diminui. Com o comprimento do sarcômero menor que 1.65 μm , os filamentos grossos tornam-se próximos da linha Z e a tensão diminui bruscamente (McCOMAS, 1996).

Na figura 1 podemos comprovar o exposto acima. À medida que o sarcômero é alongado, assumindo um comprimento além do comprimento de repouso, ocorre rápida redução da tensão ativa, que é aquela gerada pelos componentes contráteis do sarcômero, ou seja, basicamente os miofilamentos de actina e miosina. Concomitante a este processo ocorre aumento da tensão gerada pelos componentes passivos, que são os elementos elásticos em série (tendão e titina) e em paralelo (endomísio, perimísio e epimísio) do sarcômero. O resultado disso é o aumento da tensão total gerada pelo músculo, à medida que é alongado. Entretanto, à medida que o músculo é encurtado, ou seja, assume um comprimento aquém do seu comprimento de repouso, ocorre redução da tensão total gerada por ele, agora representada apenas pela tensão ativa, uma vez que a contração muscular é um processo ativo do músculo em questão.

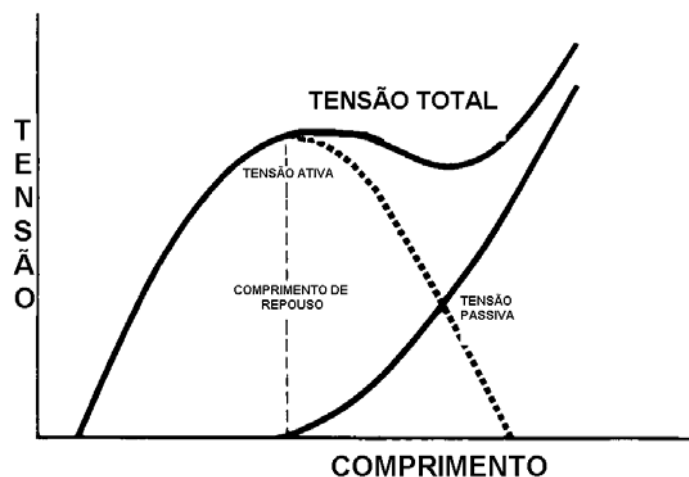


Figura 1 – Relação comprimento-tensão de musculatura esquelética

Quando uma célula muscular esquelética não ativada é passivamente alongada, a força passiva desenvolvida restaura o comprimento muscular após o término do alongamento. Durante uma contração ativa, a força passiva do comprimento do sarcômero ao longo das células musculares limita a assimetria das bandas A dentro do sarcômero. Se a célula é exposta a ciclos repetidos de alongamento e relaxamento, a força passiva é utilizada para aumentar o comprimento dos sarcômeros, de modo que, com o passar do tempo, a célula entra em fadiga. Quando uma célula muscular relaxada é alongada rapidamente até um certo comprimento do sarcômero, a força passiva diminui em função do tempo de manutenção do alongamento, em um processo conhecido como relaxamento ao estresse. A fadiga mecânica e o relaxamento ao estresse provavelmente derivam do mesmo mecanismo: reorganização nas estruturas que determinam a força muscular passiva dependente do tempo e da frequência do alongamento. Uma das principais determinantes da força muscular passiva é a proteína intrasarcomérica filamentosa, titina. É uma proteína de 3,6 milhões de daltons, que se estende da linha Z à linha M, na metade do sarcômero. Está ancorada nas linhas Z e M e aos filamentos grossos na banda A. O segmento da banda I da molécula é construído de domínios tipo imunoglobulinas ligados em série e intercalados por seqüências únicas, incluindo um domínio rico em prolina, glutamato, valina e lisina. Durante o alongamento, a tensão passiva é gerada pela extensão do segmento da banda I da titina. O segmento da banda A é composto primariamente de repetições de diferentes imunoglobulinas e domínios tipo fibronectina, e de regiões menos regulares que se conectam aos

segmentos da banda I e linha M. O segmento da banda A não participa na geração de força passiva em condições fisiológicas. Esta porção parece prover uma dobra estrutural responsável pela ligação com o filamento grosso. Quando uma molécula de titina é rapidamente alongada e mantida em um dado comprimento, a titina pode perder a elasticidade, a exemplo do que ocorre com toda a célula muscular (KELLERMAYER et al., 2001).

A figura 2 mostra um desenho esquemático simplificado da organização do sarcômero, incluindo a molécula de titina.

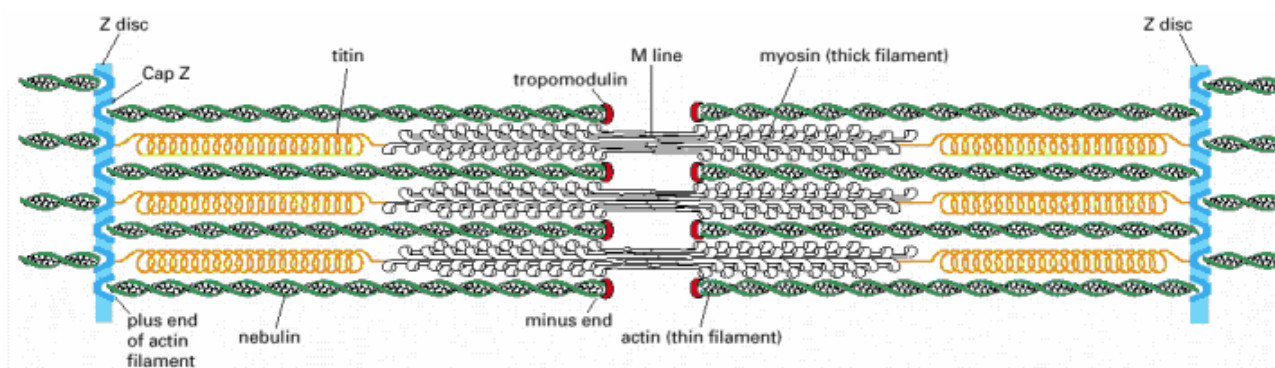


Figura 2 – Organização das proteínas acessórias do sarcômero (ALBERTS et al, 2004).

Em humanos, o comprimento máximo dos músculos pode ser avaliado, indiretamente, pela medida do ângulo de amplitude do movimento passivo máximo da articulação. Esta amplitude de movimento (ADM) é medida com auxílio de um goniômetro. Entretanto, não pode ser considerada uma medida absoluta do comprimento de um músculo porque outros fatores, como a própria estrutura articular e a ação de músculos antagonistas, podem interferir na avaliação da ADM (GAJDOSIK, 2001).

A ADM depende da mobilidade e da flexibilidade dos tecidos relacionados com a articulação – músculos, tecido conjuntivo e pele – como também da mobilidade articular. Esta ADM normal, livre de restrições e de dor, é fundamental para execução da maioria das tarefas cotidianas funcionais, assim como atividades ocupacionais e recreativas (KISNER & COLBY, 1998; 2005).

Como nossos grupos musculares passam em ponte sobre as articulações, todo músculo exageradamente encurtado comprime a articulação específica que ele sustenta. Paradoxalmente, cada vez que se tornam hipertônicos, os músculos que deveriam nos erigir, nos achatam (SOUCHARD, 1996).

De acordo com SAHRMANN (2002), a rigidez passiva e o comprimento muscular são propriedades que contribuem para a estabilidade postural, uma vez que durante a postura ortostática relaxada, o alinhamento articular é mantido por estas propriedades. A posição correta dos segmentos corporais contribui para a realização de movimentos adequados, minimizando a sobrecarga sobre as estruturas articulares e evitando o surgimento de processos patológicos decorrentes de disfunções do movimento. Alterações no alinhamento estão associadas a mudanças no comprimento e na rigidez muscular, determinando a postura de repouso da articulação.

De acordo com KENDALL et al. (1995), a postura pode ser definida como o arranjo relativo das partes do corpo. Para estes autores, “a boa postura é o estado de equilíbrio muscular e esquelético que protege as estruturas de suporte do corpo contra lesão ou deformidade progressiva, independentemente das atitudes (agachada, ereta, deitada) em que essas estruturas estão trabalhando ou repousando”. Sob tais condições, os músculos funcionam mais eficientemente e posições ideais são proporcionadas para os órgãos torácicos e abdominais.

Segundo SOUCHARD (1996), o sistema músculo-esquelético não só determina a forma do corpo, como também influencia suas funções, condiciona os movimentos e altera o psiquismo. Portanto, sua deformação é dispendiosa em energia e perturba, obrigatoriamente, a sensibilidade. Reencontrar a harmonia das formas é, então, bem mais que um desejo estético.

Em Reeducação Postural Global (RPG) busca-se a restituição das amplitudes de movimentos articulares normais, que traduzem um comprimento muscular próximo ao de repouso. O fisioterapeuta que trabalha com RPG guia-se a cada instante pela busca da perfeição morfológica.

A flexibilidade é definida como a habilidade em mover uma articulação ou articulações, utilizando toda a amplitude do movimento, sem restrição e sem dor. A flexibilidade depende da extensibilidade dos músculos, e permite que os mesmos cruzem uma articulação para conter ou ceder a uma força de tração. Geralmente, o termo flexibilidade é usado para referir-se mais especificamente à habilidade da unidade musculotendínea em alongar-se, enquanto um segmento corporal ou articulação se move através de toda a amplitude de movimento (KISNER E COLBY, 2005).

Flexibilidade é, então, um resultado puro e simples do alongamento. Ela é limitada primariamente pelos seguintes fatores: elasticidade dos tecidos; tensão e força musculares; coordenação motora; estruturas óssea e articular. Para aumentar a ADM de certa articulação, o alongamento deve aumentar a extensibilidade dos tecidos, reduzir a tensão muscular e aumentar a coordenação dos segmentos corporais envolvidos e a força do grupo muscular agonista (ALTER, 1999).

A flexibilidade tem importância qualitativa no desempenho desportivo e lúdico do ser humano. Ela é uma qualidade física freqüente no cotidiano de diversas atividades. É importante dispor de um bom nível de flexibilidade nos segmentos musculares. Para cada atividade e para cada pessoa existe um nível ótimo de flexibilidade nos segmentos musculares. Esse nível está relacionado às exigências que esta prática exerce sobre o aparelho locomotor e a estrutura dos seus componentes (FARINATTI, 2000).

À medida que o músculo perde sua flexibilidade normal, ocorre também uma alteração na relação comprimento-tensão do músculo. As limitações na ADM articular devido a contraturas (encurtamento adaptativo) podem ser tratadas com alongamento passivo (KISNER E COLBY, 2005).

Com o treinamento da flexibilidade, muitos benefícios são atingidos: melhora da aptidão corporal, postura e simetria, relaxamento muscular, relaxamento de estresse e de tensão e, principalmente, aumento da eficiência do movimento (ALTER, 1999).

A relação entre flexibilidade e boa postura é essencialmente teórica e clínica. Dessa forma, acredita-se que um desequilíbrio no desenvolvimento muscular e uma perda de flexibilidade em certos grupos musculares podem contribuir para uma pior postura. A protusão de ombros, por exemplo, tem sido associada com uma menor flexibilidade dos músculos peitorais e menor força muscular dos músculos adutores da escápula (rombóides e trapézio médio).

Já o limite elástico é o menor valor da força requerida para produzir uma deformação permanente. Abaixo deste limite, o material retorna ao seu comprimento original quando a força de deformação é removida. Este alongamento permanente é também chamado de alongamento plástico ou deformação plástica (KISNER, 2005; ALTER, 1988).

Pensando nisso, surge uma questão natural: para a flexibilidade ser desenvolvida, o músculo deve ser alongado até o seu limite elástico ou um pouco

além dele? A maioria dos pesquisadores indica o alongamento até o ponto de desconforto ou de tensão, mas não de dor. Porém, este ponto estaria aquém ou além do limite elástico? Embora a literatura não seja conclusiva sobre este assunto, vários estudos têm mostrado que certos fatores, como tipo e duração da força, irão determinar se o alongamento será permanente (isto é, plástico) ou se o tecido retornará ao seu comprimento inicial após a cessação da força.

Segundo ALTER (1988), quando uma força constante, de baixa intensidade, atua sobre o músculo, por um tempo relativamente longo, ocorre alteração progressiva no seu comprimento, que poderá permanecer após a interrupção da força. Já SOUCHARD (1996) considera serem permanentes as alterações induzidas por estiramentos suaves e prolongados. Essa premissa constitui um dos princípios básicos da RPG. Todavia, o próprio autor questiona se a manutenção do comprimento do músculo deve-se à alteração da fibra muscular ou do tecido conjuntivo. Sabe-se, entretanto, que as incorreções posturais podem tornar os músculos permanentemente hipertônicos, com conseqüente encurtamento de suas fibras.

Para aumentar a ADM (ou a flexibilidade) os fisioterapeutas, freqüentemente, usam o alongamento passivo como meio de aprimorar a excursão dos músculos relacionados a determinada articulação (DEYNE, 2001). De modo geral, os estudos realizados com pacientes utilizam protocolos de alongamento diário, por várias semanas. Nesses estudos, os músculos comumente utilizados são o isquiotibial, quadríceps femoral, gastrocnêmio; tríceps e bíceps braquiais.

Para BANDY et al. (1997), alongamento do músculo isquiotibial por trinta segundos, cinco vezes na semana, por seis semanas, é efetivo no aumento da ADM relacionada às articulações do joelho e do quadril. Entretanto, WILLY et al., (2001) afirmam que, nessas condições, não há manutenção do ganho de ADM quatro semanas após a interrupção do programa de alongamento. De acordo com DEPINO et al. (2000), a ADM ganha, relacionada às mesmas articulações acima, se mantém por apenas três minutos após a realização de quatro séries consecutivas de alongamento estático do músculo isquiotibial sustentado por trinta segundos, com intervalo de quinze segundos entre elas.

Vários estudos têm sido realizados para esclarecer os fatores envolvidos com o aumento da ADM, utilizando-se pacientes e modelos experimentais. A seguir, descrevemos os principais resultados obtidos nesta área.

Alguns autores reportam ganho de ADM, após alongamento passivo, aumentando inclusive o comprimento muscular em repouso, o que ocorreria devido aos componentes passivos - como o tendão e o tecido conjuntivo - ou ativos - como a titina e as pontes cruzadas entre actina e miosina - do músculo (TAYLOR et al., 1990; GAJDOSIK, 2001). O ganho de ADM, após alongamento, é dependente da temperatura (CHAN et al., 2001).

TAYLOR et al. (1990) realizaram séries consecutivas de alongamentos passivos com os músculos extensor longo dos dedos e tibial anterior de coelhos, sustentados por trinta segundos, e observou que a mudança no comprimento muscular ocorreu nos quatro primeiros alongamentos realizados. A partir daí, não há mais ganhos neste sentido. CHAN et al. (2001) utilizaram, em seu estudo, dois grupos compostos de humanos jovens. Ambos os grupos realizaram o alongamento do músculo isquiotibial através de cinco séries de 30 segundos cada, 3 vezes por semana; porém o primeiro grupo o fez por 8 semanas e o segundo grupo por 4 semanas. Desta forma, não houve diferença entre a ADM – relacionada às articulações do joelho e do quadril - ganha entre os dois grupos, mas o grupo que manteve esse procedimento por apenas quatro semanas apresentou aumento na resistência passiva correspondente à angulação articular máxima tanto do joelho quanto do quadril. Sabendo que, nas condições em que há relativamente menor resistência passiva no fim da ADM, há menor probabilidade de lesão, o protocolo de alongamento durante 8 semanas seria o mais recomendado.

GAJDOSIK (2001) conclui, em seu estudo de revisão, que a deformação muscular poderia explicar o aumento imediato na ADM e, portanto, no comprimento muscular, observado em resposta a procedimentos terapêuticos de alongamento em seres humanos.

De acordo com DEYNE (2001), também em um estudo de revisão, o aumento da ADM logo após o alongamento passivo pode ser explicado pelo comportamento viscoelástico do músculo - uma força de tração pequena, sustentada por um período longo, resulta em deformação tempo-dependente - e por alterações reversíveis no comprimento muscular. Esta é a razão biomecânica que pode explicar as alterações, a curto prazo, reversíveis, no comprimento muscular; no entanto, falha em explicar as alterações a longo prazo, permanentes.

O uso dos exercícios de alongamento para aumentar a flexibilidade é comumente baseado na idéia de que isto pode reduzir a incidência, intensidade ou duração das lesões musculotendíneas e articulares (ALTER, 1999).

A lesão muscular é um fenômeno comum que acompanha os exercícios de treinamento – de força e alongamento muscular - em humanos e animais. A dor muscular tardia, tão comum em atletas, é uma manifestação clínica da lesão muscular (JONES et al., 1986).

Diversos pesquisadores já provaram que as lesões musculares ocorrem preferencialmente nas regiões mais próximas à junção musculotendínea e que estas lesões constam de rupturas parciais das fibras musculares, na maior parte dos casos (TAYLOR et al., 1993; TIDBALL et al., 1993; NOONAN et al., 1994; SUN et al., 1994, 1998; GARRETT, 1996; GAJDOSIK, 2001). De acordo com NIKOLAOU et al. (1987), a ruptura das fibras musculares ocorre quando a força de tração é superior a 80% do peso corporal do animal. Esta lesão é seguida de resposta inflamatória e de processo de cicatrização e reparo tecidual.

Sabe-se, ainda, que em lesões musculares (ruptura total ou parcial da fibra muscular) decorrentes de alongamento ou de contração excêntrica ocorre aumento na síntese e liberação de fatores de transcrição como o MyoD, e de fatores de crescimento como o IGF (Insulin-like Growth Factor) e HGF (Hepatocyte Growth Factor), além de ativação de células satélites e aumento da síntese protéica e da expressão gênica como um todo. Há ainda aumento do diâmetro e comprimento da fibra, além de aumento do peso muscular. Não se sabe se este aumento da fibra muscular deve-se somente ao aumento do tamanho dos sarcômeros ou também do número de sarcômeros em cada fibra muscular. Já foi comprovado que o aumento do comprimento dos sarcômeros é reversível com o término do alongamento (CAMPIONE et al., 1993; BIGARD et al., 1996; GALLER et al., 1997; SADOSHIMA E IZUMO, 1997; YANG et al., 1999; ZÁDOR et al., 1999; GOLDSPINK, 1995; GOLDSPINK et al., 2002; TATSUMI et al., 2002; IKEDA et al., 2003).

De acordo com ACHOUR (2002), o desenvolvimento da flexibilidade depende da integridade do tecido muscular. Porém, tanto o alongamento passivo quanto o ativo podem causar rompimento parcial ou total de suas fibras. Acredita-se que, no rompimento das fibras, as linhas Z dos sarcômeros rompem-se, desorganizando a estrutura miofibrilar, o que é seguido de edema, dor, infiltração celular, especialmente de macrófagos e aumento da atividade lisossômica.

MORGAN (1990) propõe aumento do número de sarcômeros em série e redução do comprimento médio dos sarcômeros como processo adaptativo pós-lesão induzida por contração excêntrica. Isso foi sustentado por trabalhos feitos por LYNN e MORGAN (1994) e por LYNN et al. (1998) onde ratos eram exercitados em uma esteira inclinada e declinada. As fibras submetidas à contração excêntrica durante uma corrida na descida, tiveram aumento de 11% do número de sarcômeros após uma semana, comparada com aquelas que foram submetidas à corrida na subida. Porém, isso tem sido contestado por KOH e HERZOG (1998), pois estes pesquisadores não encontraram evidências de que o músculo é capaz de se submeter a um processo de adaptação tão rápido e permanente, ao nível dos sarcômeros. Afinal, o aumento do número de sarcômeros que ocorre após imobilização prolongada é rapidamente reversível. Dessa forma, podemos observar que a literatura é inconclusiva quanto ao aumento do número de sarcômeros causado pelo alongamento muscular estático.

Há um grande número de estudos biomecânicos de ligamentos e músculos alongados até o ponto de ruptura, mas pouquíssimos estudos têm determinado o efeito do alongamento até o limite elástico (antes do ponto de ruptura). ALTER (1999) sugere a aplicabilidade em seres humanos somente daqueles estudos que mimetizam protocolos feitos nas clínicas e academias, diariamente, isto é, alongamentos mantidos por segundos ou minutos e repetidos algumas vezes, mas nunca aqueles mantidos por dias ou semanas.

Não há estudos sobre as alterações histológicas de músculos submetidos ao alongamento passivo em condição de ausência de ruptura de fibra muscular. O nosso trabalho pretende avaliar a ocorrência de alterações histológicas no músculo tibial anterior submetido a alongamento passivo. Para isso, escolhemos o rato como modelo experimental, não só pela facilidade de manutenção (REMIE et al., 1990; GREEN et al., 2002), como também a experiência prévia do Laboratório de Neurobiologia com esta espécie animal em estudos de lesão e regeneração muscular na tripanosomíase americana experimental (MALDONADO et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar em ratos Holtzman adultos jovens, as alterações estruturais do músculo tibial anterior após alongamento passivo, utilizando um protocolo de alongamento que não induza ruptura de fibra muscular. Desta forma, pretende-se contribuir para o esclarecimento da seguinte questão: o alongamento precisa atingir a região plástica da curva de comprimento-tensão para induzir alterações estruturais no músculo?

Escolhemos, para este estudo, o músculo tibial anterior devido ao fácil acesso, localização e forma (fusiforme) que facilitam a avaliação do comportamento biomecânico quando submetido ao alongamento passivo (NIKOLAOU et al., 1987; TAYLOR et al., 1990).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ratos Holtzman adultos jovens (9 semanas de idade), submetidos ao alongamento passivo do músculo tibial anterior, sustentado por vinte minutos, durante 8 semanas, pretende-se avaliar:

- a variação linear do alongamento muscular;
- as alterações histológicas do músculo;
- a ocorrência de processo inflamatório e, caso presente, o fenótipo das células inflamatórias;
- se há aumento do número e/ou do comprimento de sarcômeros;
- se há alteração nas dimensões transversal e longitudinal da fibra muscular.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE RATOS HOLTZMAN

Foram utilizados ratos Holtzman machos fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estes animais permaneceram no CEBIO até a idade de 21 dias, quando foram desmamados e transferidos para o Biotério de Experimentação do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG. Os animais permaneceram neste Biotério até a época do sacrifício, recebendo ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital) e água à vontade, em gaiolas de plástico com dimensões de 40x30x18 cm. Estas gaiolas, com dois a quatro ratos em cada uma, foram mantidas em estante ventilada Alesco, para ratos, à temperatura de 22°C, em ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais foram pesados semanalmente, antes de cada sessão de alongamento, e no dia do sacrifício.

Com a idade de 9 semanas, os ratos foram submetidos a alongamento passivo do músculo tibial anterior, uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas, i.e., da 9ª a 16ª semana de idade (N=15). Os animais deste grupo foram sacrificados 1, 3 e 7 dias após a última sessão de alongamento; cada um dos subgrupos com 5 animais, totalizando 15 animais.

Em cada um dos animais, o músculo tibial anterior da perna posterior direita foi alongado durante 20 minutos. O músculo tibial anterior da perna posterior esquerda serviu como controle.

3.2 PROTOCOLO DE ALONGAMENTO

Para o alongamento do músculo tibial anterior, adaptamos o protocolo de NIKOLAOU et al. (1987). Neste protocolo, o alongamento é realizado diretamente no tendão distal do músculo tibial anterior, exposto após incisão e rebatimento da pele da perna. Ao término do alongamento, a incisão é fechada e o animal recebe uma única dose profilática de antibiótico. Em nossos experimentos, optamos por proceder ao alongamento sem exposição cirúrgica do músculo, para evitar recrutamento de células inflamatórias e outras alterações histopatológicas. Nossa decisão baseou-se em experimentos preliminares realizados no Laboratório de Neurobiologia, em que

utilizamos o protocolo original de NIKOLAOU et al. (1987), com exposição cirúrgica do músculo tibial anterior. Neste estudo preliminar, observaram-se, em todos os cinco animais deste grupo experimental, edema na perna e inflamação na região da incisão, a partir do primeiro dia após o alongamento. Adicionalmente, os animais apresentavam marcha claudicante no período pós-operatório.

Para execução do protocolo de alongamento, adaptado de NIKOLAOU et al. (1987), contamos com a colaboração dos professores Marcos Pinotti e Paulo Iscold do Departamento de Engenharia Mecânica da UFMG, para desenvolvimento de um sistema que permite o alongamento muscular com força e velocidade constantes (Fig. 3).



Figura 3: Foto do sistema montado pelos professores do Departamento de Engenharia Mecânica, que permitiu a realização do protocolo de alongamento.

Este sistema é constituído por um dinamômetro unidirecional com célula de carga eletrônica e medidor de deslocamento. A capacidade da célula de carga é de

1kg com resolução de 10 bits ou aproximadamente 1 grama. Para leitura da célula de carga utilizou-se um microcontrolador PIC16F877 com transmissão para o computador através de porta serial padrão RS232 e com velocidade máxima de aquisição de 800Hz por canal.

Para mensuração do deslocamento utilizou-se um potenciômetro linear com linearidade menor que 2% com calibração não linear. Seu deslocamento máximo era de 25 mm e, para aquisição, utilizou-se o microcontrolador com resolução de 10 bits, com resolução de aproximadamente 0,025 mm. O *software* de aquisição de dados foi desenvolvido em ambiente MATLAB. Com este sistema foi possível obter 10 registros por segundo das variações de alongamento muscular ao longo de 20 minutos.

Para serem submetidos ao protocolo de alongamento do músculo tibial anterior, os ratos foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich), na dose de 25 mg/100 g de peso corporal, por via intraperitoneal.

Após pesagem, o rato era posicionado, em decúbito dorsal, sobre cortiça acoplada ao sistema de alongamento. O membro posterior direito era firmemente preso com linha URSO (número 4), que passava pela roldana e se prendia a uma pisseta com volume de água correspondente a 80% do peso corporal do rato (Fig. 4 e 5). Esta linha passava sobre o dorso do pé do rato, de maneira que, realizando a flexão plantar, alongava o músculo tibial anterior da pata posterior direita do rato. É importante ressaltar que este procedimento era realizado apenas uma vez por semana com cada rato, durante oito semanas consecutivas, totalizando oito sessões de alongamento.

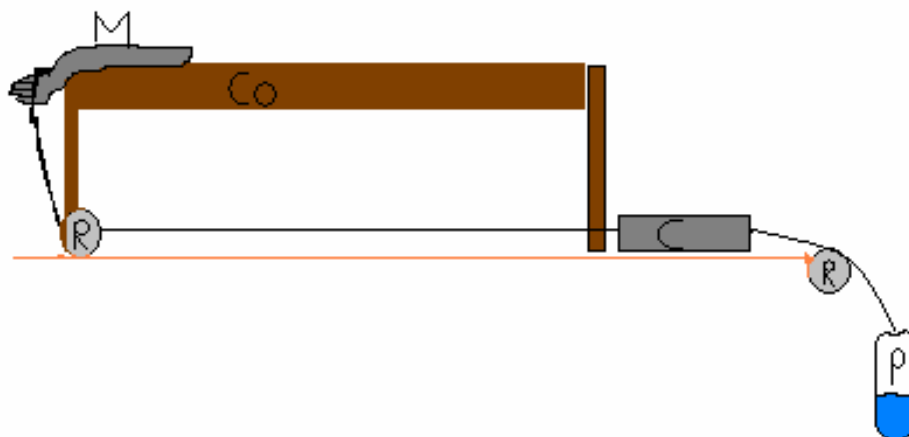


Figura 4. Desenho esquemático do sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior, vista lateral.

C: célula de carga; R: roldana; Co: cortiça para fixação do rato; P: pisseta com água; M: membro posterior direito do rato

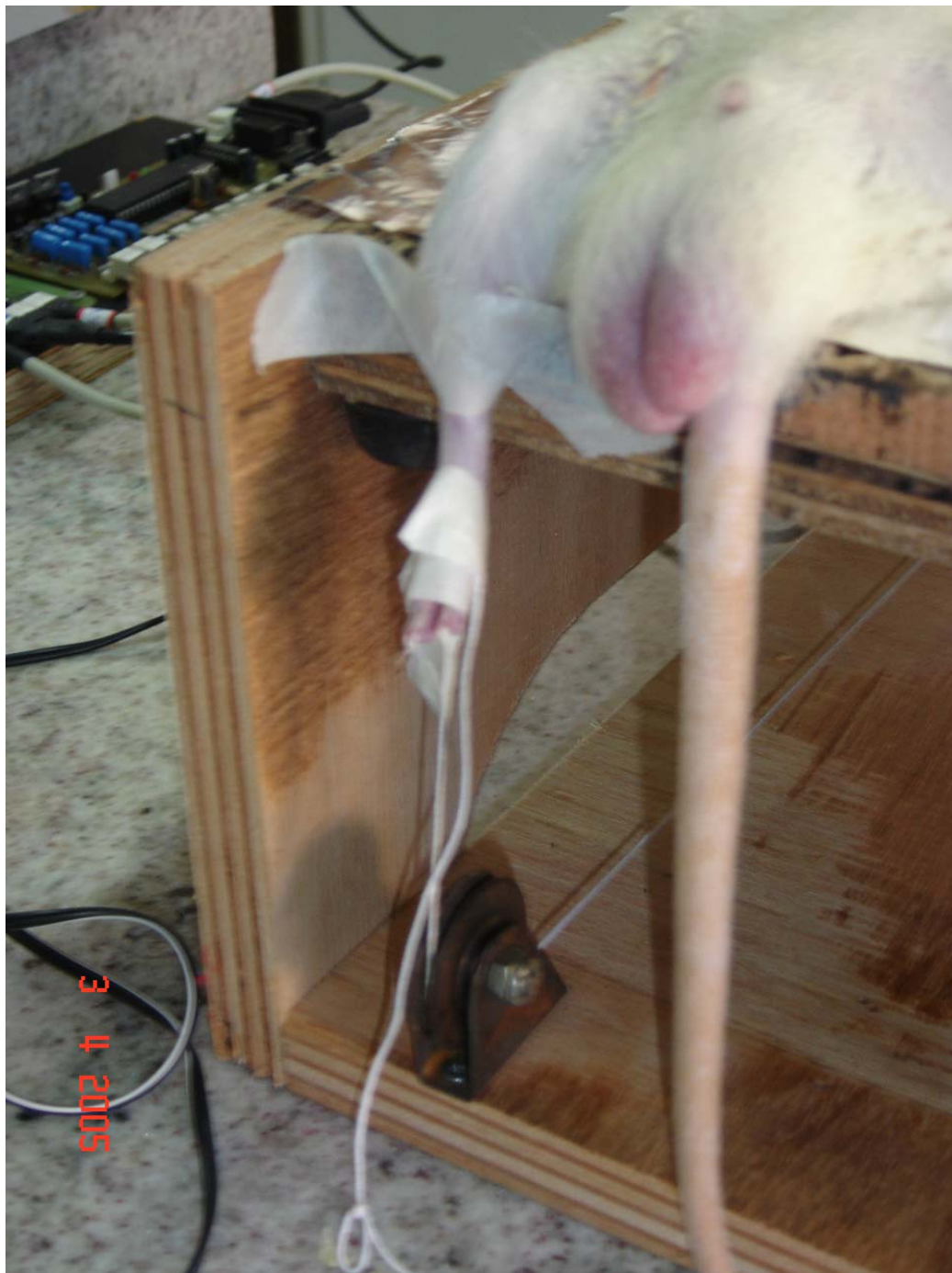


Figura 5. Foto do sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior.

Após o término do alongamento, os ratos foram recolocados em suas gaiolas, onde se recuperavam da anestesia. Não observamos, após cada sessão de alongamento, edema na perna posterior direita ou marcha claudicante.

3.3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS

No momento do sacrifício, todos os animais foram pesados e anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich) na dose de 25 mg/100 g de peso corporal.

O músculo tibial anterior foi cuidadosamente dissecado e dividido em três porções longitudinais:

- a porção medial foi imersa em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4, por 24 horas, e a seguir processada para inclusão em resina à base de glicolmetacrilato;
- a porção lateral foi embebida em “Tissue Tek-OCT Compound” e imediatamente congelada em gelo seco com acetona comercial e armazenada em freezer à -80°C , para posterior identificação de antígenos por técnica imunohistoquímica;
- a porção central permaneceu inserida na tibia e na base do primeiro metatarso. Deste modo, a perna e o pé foram processados de acordo com Williams e Goldspink (1971), para mensuração de sarcômeros. A peça foi imersa em solução de glutaraldeído (Sigma) a 2,5% / glicose a 0,5% (Merck) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4, por 4 horas. A seguir, a peça foi transferida para solução de ácido nítrico a 30% (Merck) onde permaneceu por 24 horas. Durante todo este procedimento, o músculo foi mantido em sua posição de repouso, mediante a manutenção do pé em posição neutra de dorsiflexão, minimizando-se a contração e/ou distensão muscular durante o processo de fixação química. A porção central do músculo tibial anterior foi, então, retirada de sua inserção óssea e estocada em solução de glicerol a 50% (Merck) em água.

Antes de o músculo tibial anterior ser dissecado, mediu-se o comprimento do ventre muscular usando régua de precisão. Devido à convexidade do músculo em questão, este comprimento era obtido indiretamente através de uma linha URSO (número 4), cujo comprimento era posteriormente medido com régua de precisão.

3.3.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA

Após a fixação com solução de paraformaldeído a 4%, a porção medial do músculo tibial anterior foi dividida em dois fragmentos, proximal e distal. Estes fragmentos foram processados como se segue: desidratação com etanol em concentrações crescentes, seguindo-se à infiltração e inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (Leica Historesin). Os fragmentos musculares foram incluídos de modo a fornecer, durante a microtomia, secções longitudinais e transversais, com espessura de 4 µm. Utilizou-se micrótomo Reichert-Jung, modelo 1140/Autocut e navalhas de vidro preparadas em aparelho apropriado (LKB, modelo 7800B), no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB/UFMG. As secções foram distendidas em água destilada, colocadas sobre lâminas histológicas (Solidor) e secas em chapa aquecida, durante 1 minuto. Foram preparadas 8 lâminas por animal contendo cada uma 4 secções histológicas com intervalo de 40 µm. As secções foram coradas com solução de azul de toluidina (Merck) a 1%/borato de sódio a 0,5%. Após a coloração, as secções foram lavadas em água corrente durante 20 segundos, secas à temperatura ambiente e diafanizadas em xilol para montagem com bálsamo de Canadá. Para análise destas secções histológicas utilizou-se microscópio Axioplan 2 Zeiss.

3.3.2 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a caracterização das células ED1⁺ e ED2⁺ foram utilizados os seguintes anticorpos em diluições testadas previamente:

- Anti ED1 - marca Serotec - identifica macrófagos/monócitos - diluição 1:400;
- Anti ED2 - marca Serotec – identifica macrófagos residentes - diluição 1:400

Secções seriadas de 7 µm foram obtidas em criostato, à temperatura de -20°C e coletadas em lâminas histológicas tratadas previamente com solução de silano (3-Aminopiltrietoxi-silano, Sigma) a 2%. Para seleção de área adequada, utilizou-se coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). As secções foram fixadas em acetona por 10 minutos e secas à temperatura ambiente por 10 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena, incubaram-se as lâminas em solução de azida sódica 0,1M; peróxido de hidrogênio em salina tamponada (PBS) e água oxigenada

por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram mergulhadas em PBS por 10 minutos e, em seguida, por 20 minutos em solução de PBS-BSA a 2%. Incubaram-se, novamente, as lâminas em PBS por 10 minutos e em seguida em anticorpo primário diluído em PBS-BSA 2% por 1 hora. Nos controles da técnica, utilizou-se apenas PBS-BSA 2%. Novamente as lâminas foram colocadas em PBS por 10 minutos e incubadas, em seguida, por 1 hora com o anticorpo secundário diluído em PBS-BSA 2%. Findo este tempo, PBS por 10 minutos e foi feita, então, a revelação com o 3-3'diaminobenzidina (DAB) dissolvido em DMSO e água oxigenada. Para interrupção da reação, as lâminas foram lavadas em PBS. Foram, então, desidratadas em solução de álcool etílico (Merck) a 70%, 80%, 95% e 100% (MERK) por 5 minutos cada etapa, diafanizadas em três banhos de xilol por 3 minutos e montadas em bálsamo do Canadá.

3.4 TÉCNICAS HISTOMÉTRICAS

3.4.1 DIÂMETRO DE FIBRAS MUSCULARES

Com auxílio do software KS400 Zeiss, mediu-se o diâmetro transversal médio de 50 fibras musculares, por animal, em diferentes secções histológicas da porção medial do músculo tibial anterior. A medida foi realizada sob objetiva de 20X – aumento final de 256X. O diâmetro médio de cada fibra resultou da média aritmética entre o maior e o menor diâmetro transversal. Todas as medidas foram realizadas sem identificação prévia dos músculos controles e alongados.

3.4.2 COMPRIMENTO DO SARCÔMERO E NÚMERO DE BANDAS A

Os fragmentos estocados em glicerol a 50% foram colocadas em placa de Petri e, sob lupa, as fibras musculares foram individualizadas e montadas em lâminas histológicas com o próprio glicerol. Com auxílio do software KS400 Zeiss, sob a objetiva de imersão 100X, mediu-se o comprimento longitudinal de um sarcômero por fibra, sendo utilizadas 5 fibras aleatoriamente, por animal. Esta medida era repetida três vezes, sendo considerada a média aritmética. Feito isso, contamos o número de bandas A presentes em uma distância de 100 µm, nas

mesmas 5 fibras musculares de cada preparação, para obtenção do número de sarcômeros em série no intervalo de 100 μm .

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de peso corporal, medidas de diâmetro da fibra muscular, tamanho do sarcômero e número de bandas A foi realizada pelo teste *t* pareado de Student, com a utilização do programa Prisma, versão 3.0.

A análise estatística dos gráficos de tempo x deslocamento foi realizada através do método de delineamento das parcelas subdivididas, conforme indicado pelo professor Ivan Sampaio, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária (SAMPAIO, 2002).

4.1 PESO CORPORAL

Durante todo o experimento, os animais apresentaram aspecto saudável, sem manifestação de distúrbios locomotores. Os animais apresentaram ganho de peso corporal de 19,34% ao final do primeiro mês de sessões de alongamento e de 29,07% ao final do segundo mês. A tabela 1 mostra o peso corporal médio dos animais nos diferentes períodos de tempo analisados. O ganho de peso está dentro dos parâmetros normais para ratos Holtzman nas diferentes idades analisadas.

Tabela 1 - Peso corporal médio (g) $\pm$ desvio padrão de ratos com 9 a 16 semanas de idade submetidos a 8 sessões semanais, com duração de 20 minutos, de alongamento passivo do músculo tibial anterior direito.

Semana	Peso corporal (g) $\pm$ dp
1	279,18 $\pm$ 16,66
2	293,51 $\pm$ 13,78
3	321,56 $\pm$ 22,22
4	333,17 $\pm$ 18,40
5	342,31 $\pm$ 19,12
6	320,61 $\pm$ 33,22
7	351,63 $\pm$ 16,61
8	360,34 $\pm$ 17,12
Δ Peso coproral	19,34% (4 semanas) 29,07% (8 semanas)

4.2 VARIAÇÃO DO DESLOCAMENTO LINEAR DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR

Para avaliação da porcentagem de alongamento do músculo tibial anterior, analisaram-se os dados obtidos aos 60 (1 min), 120 (2 min), 360 (6 min) e 900 segundos (15 min). Esta escolha baseou-se nos intervalos de tempo em que havia maior número de dados coletados, de modo homogêneo, em cada um dos animais. Para verificar a variação no alongamento desse músculo ao longo das semanas, utilizaram-se os dados obtidos na 1ª, 4ª e 7ª semanas. Os resultados estão expressos na tabela 2.

Nossos dados indicam a ocorrência de variação significativa na proporção de deslocamento do músculo tibial anterior a partir de 6 minutos de alongamento, na primeira sessão, ou seja, na 1ª semana. Na 4ª e na 7ª semanas, a significância ocorre aos 2 minutos e se mantém ao longo da sessão de alongamento.

Em relação à variação ao longo das semanas, no mesmo intervalo de tempo de alongamento, nossos resultados mostram que o alongamento do músculo tibial é maior no primeiro minuto da 4ª semana, em relação ao mesmo intervalo da 1ª semana. Esse resultado se repete em todos os intervalos de tempo analisados. Após 7 semanas de alongamento, a proporção de alongamento do músculo decresce em relação aos valores observados na 4ª semana, mas se mantém diferente daquele observado na primeira semana.

Tabela 2 – Média do deslocamento linear (mm) $\pm$ desvio padrão do músculo tibial anterior de ratos, com 9, 13 e 16 semanas de idade, após 1, 4 e 7 sessões de alongamento passivo, com duração de 15 minutos.

	60 segundos	120 segundos	360 segundos	900 segundos
Semana 1	8,55 ^a	9,13 ^a	10,34 ^b	11,77 ^c
Semana 4	14,45 ^{a,*}	15,37 ^{b,*}	16,85 ^{c,*}	18,30 ^{d,*}
Semana 7	13,55 ^{a,**}	14,46 ^{b,**}	16,08 ^{c,**}	18,05 ^{d,**}

a,b,c,d: letras diferentes mostram significância ($p < 0,05$) na mesma semana.

* mostra significância ($p < 0,05$) entre a 1ª e 4ª semanas, no mesmo intervalo de tempo.

** mostra significância ($p < 0,05$) entre a 1ª e 7ª semanas, no mesmo intervalo de tempo.

A tabela 3 mostra a porcentagem de alongamento do músculo tibial anterior, em relação ao tempo zero.

Tabela 3 – Alongamento médio relativo em relação ao tempo 0 (%) do músculo tibial anterior submetido a alongamento passivo por 1, 3 e 7 semanas, de ratos com 9, 13 e 16 semanas de idade.

	60 segundos	120 segundos	360 segundos	900 segundos
Semana 1	1.36	1.46	1.65	1.88
Semana 4	1.25	1.33	1.46	1.59
Semana 7	1.35	1.44	1.60	1.80

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

O músculo tibial anterior da perna controle apresentou organização histológica característica (Fig. 6A e 6B). Os miônios apresentaram estriação transversal característica, com núcleos alongados dispostos na periferia da célula e diâmetro, numa mesma célula, homogêneo. As fibras apresentaram-se envolvidas por tecido conjuntivo frouxo, nem sempre bem preservado nas preparações. Entre as fibras musculares, observaram-se núcleos bem corados, alongados, além de mastócitos com granulação citoplasmática característica. Vasos sanguíneos de diferentes calibres eram vistos no tecido conjuntivo. Os músculos submetidos a alongamento passivo apresentaram organização histológica semelhante a do músculo controle, não sendo possível apontar diferenças significativas entre eles.

Nas secções transversais do músculo tibial anterior, também observamos organização histológica característica, tanto nos músculos submetidos a alongamento passivo quanto nos controles (Fig. 6C).

Nos diferentes intervalos de tempo analisados, não observamos sinais de hemorragia, de processo inflamatório ou de ruptura de fibras musculares.

A técnica imunohistoquímica para identificação de macrófagos mostrou a ocorrência de macrófagos ED2⁺ nas fibras musculares, tanto no músculo controle (Fig. 7A) quanto no submetido a alongamento passivo (Fig. 7B). Não observamos macrófagos ED1⁺ nas fibras musculares dos músculos controles alongados (Fig.

7C). Esses resultados foram semelhantes aos 1, 3 e 7 dias após a última sessão de alongamento.

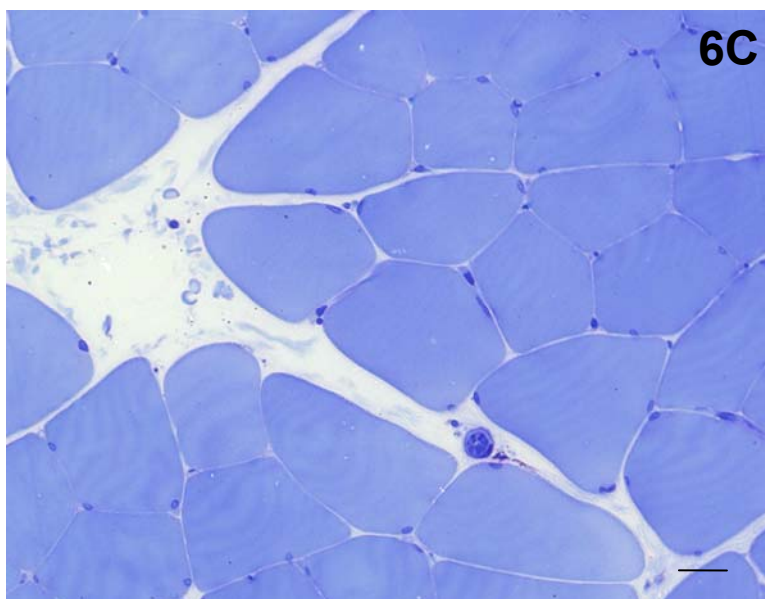
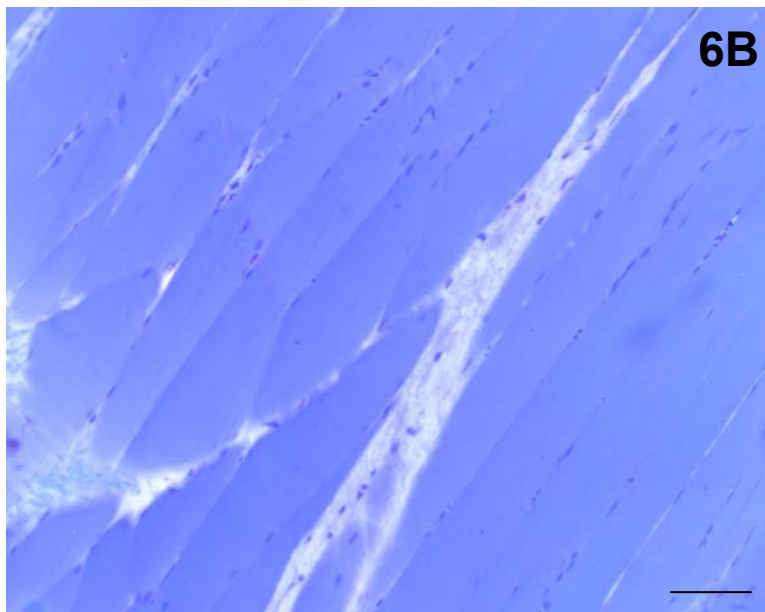
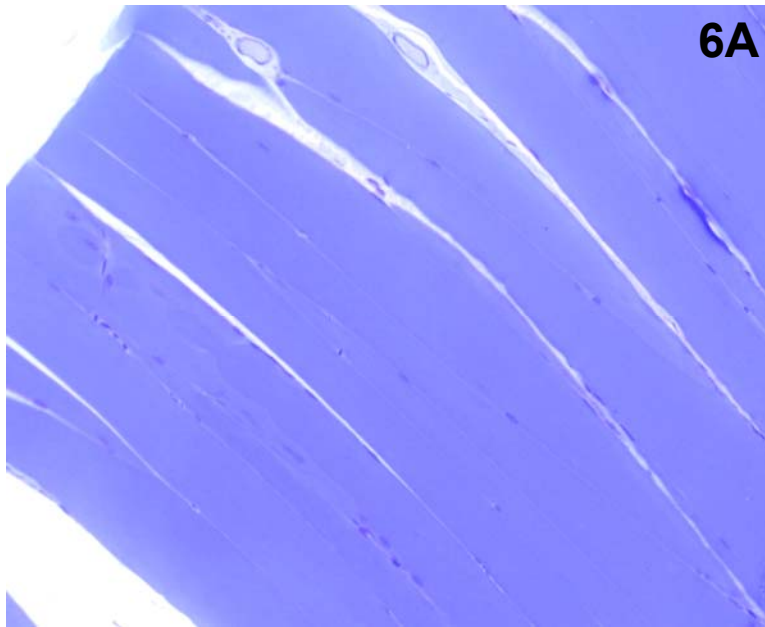


Figura 6:
Secção histológica de músculo tibial anterior controle (A) e submetido a oito sessões de alongamento passivo (B e C). Coloração com solução de azul de touidina a 1 %. Barra= 50 μ m (A e B) ou 25 μ m (C)

Observa-se organização histológica característica do tecido muscular esquelético, tanto no cortes longitudinal quanto no transversal.

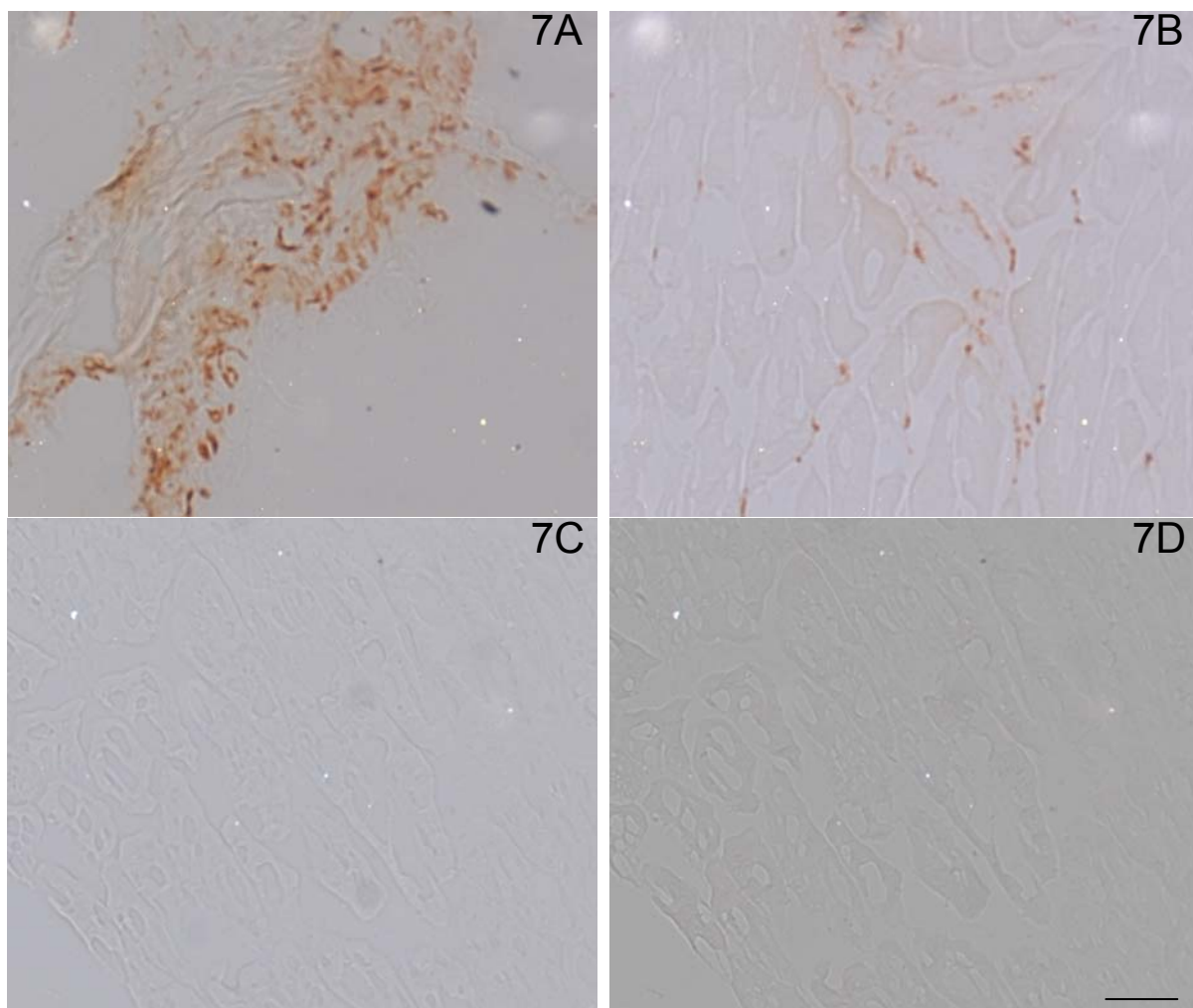


Figura 7: Fotomicrografias de secções de músculo tibial anterior controle (A e C) e submetido alongamento passivo por 8 semanas consecutivas (B e D). Coloração: Imunoperoxidase com revelação por diaminobenzidina. Barra = 50 μ m.

Observam-se macrófagos ED2⁺ (A e B) entre as fibras musculares e no tecido conjuntivo do músculo tibial anterior, com distribuição semelhante, no tecido muscular, em ambos os grupos. Os macrófagos ED1⁺ não foram observados, tanto nos músculos controles quanto nos alongados. Em D, controle negativo da técnica, por omissão de anticorpo primário.

4.4 ANÁLISES HISTOMÉTRICAS

4.4.1 COMPRIMENTO DO VENTRE MUSCULAR

O comprimento do ventre do músculo tibial anterior submetido ao alongamento passivo, mostrou-se semelhante ao músculo controle, nos diferentes períodos analisados (Fig. 8).

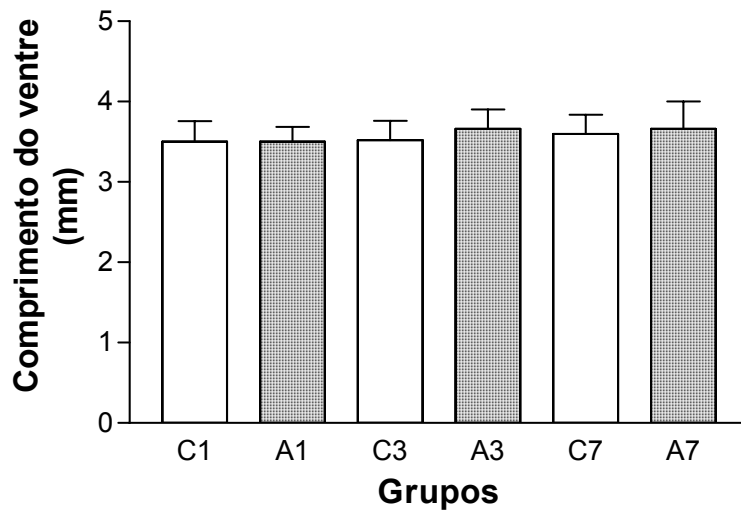


Figura 8 - Comprimento médio do ventre do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.

C1, C3, C7: músculo controle, um a sete dias após última sessão de alongamento;
A1, A3, A7: músculo alongado, um a sete dias após última sessão de alongamento.

4.4.2 DIÂMETRO TRANSVERSAL DAS FIBRAS MUSCULARES

Observamos diferença significativa no diâmetro transversal médio de fibras musculares do músculo tibial anterior de animais sacrificados aos 3 e aos 7 dias após a última sessão de alongamento (Fig. 9), em relação aos seus respectivos músculos controles.

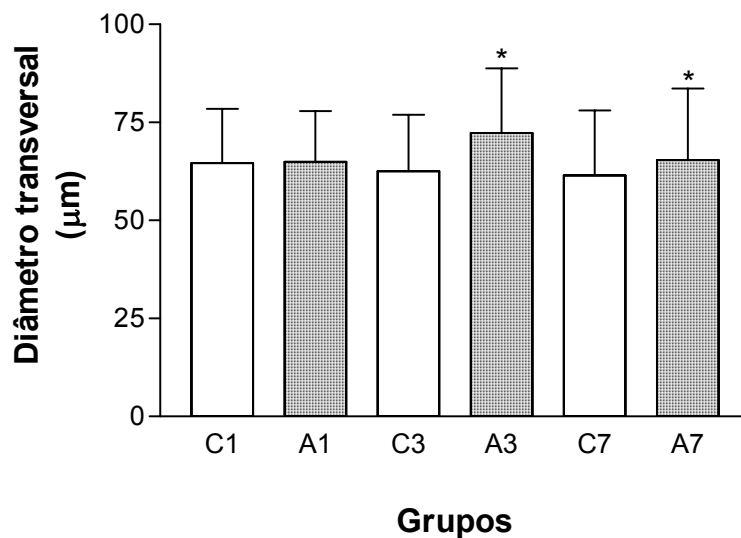


Figura 9 – Diâmetro transversal médio do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.

* $P < 0,05$ em relação ao controle de mesma idade

C1, C3, C7: músculo controle, um a sete dias após última sessão de alongamento;

A1, A3, A7: músculo alongado, um a sete dias após última sessão de alongamento.

4.4.3 COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS

A Figura 10 mostra o comprimento dos sarcômeros em fibras musculares do músculo tibial anterior de ratos sacrificados um, três e sete dias após a última sessão de alongamento. Não observamos diferença significativa entre os músculos submetidos a alongamento e os controles.

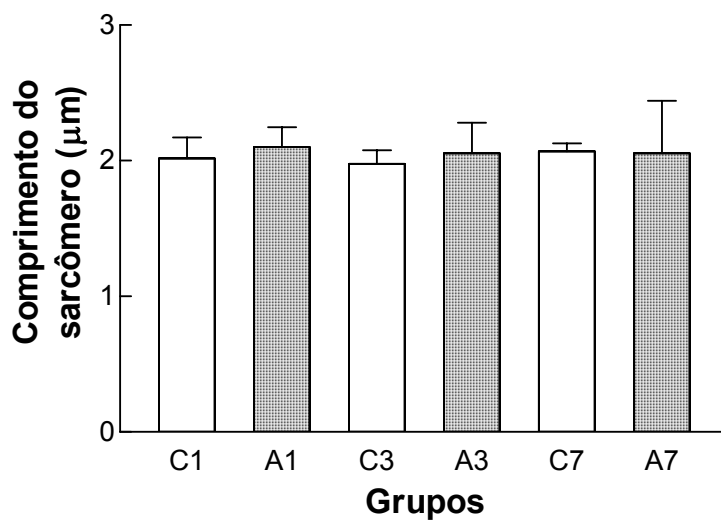


Figura 10 – Comprimento dos sarcômeros do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.

C1, C3, C7: músculo controle, um a sete dias após última sessão de alongamento;

A1, A3, A7: músculo alongado, um a sete dias após última sessão de alongamento.

4.4.4 NÚMERO DE BANDAS A

A figura 11 mostra a densidade de bandas A na extensão de 100 μm , ao longo da miofibrila, no músculo tibial anterior submetido ou não a alongamento passivo. Observou-se diferença significativa no número de bandas A, em relação ao controle, nos músculos de ratos mortos aos 7 dias após a última sessão de alongamento. A figura 12 mostra uma fibra muscular processada de acordo com William & Goldspink (1971), para visualização de estriação transversal.

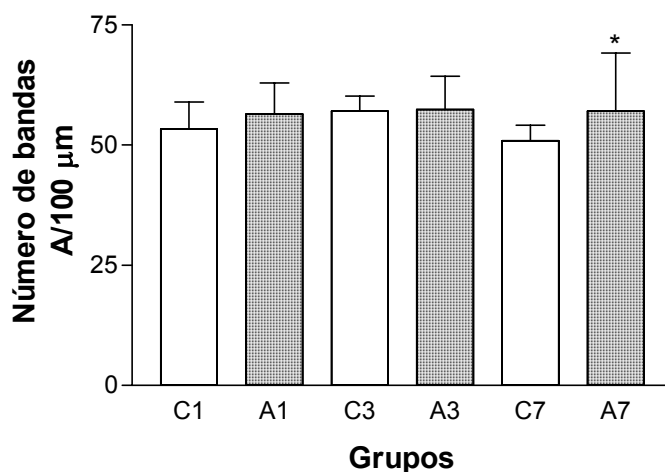


Figura 11 – Número de bandas A/100 μm em fibras do músculo tibial anterior de ratos com 17 semanas de idade submetidos a 8 sessões de alongamento passivo, com duração de 20 minutos.

* $P < 0,05$ em relação ao controle de mesma idade

C1, C3, C7: músculo controle, um a sete dias após última sessão de alongamento;

A1, A3, A7: músculo alongado, um a sete dias após última sessão de alongamento.

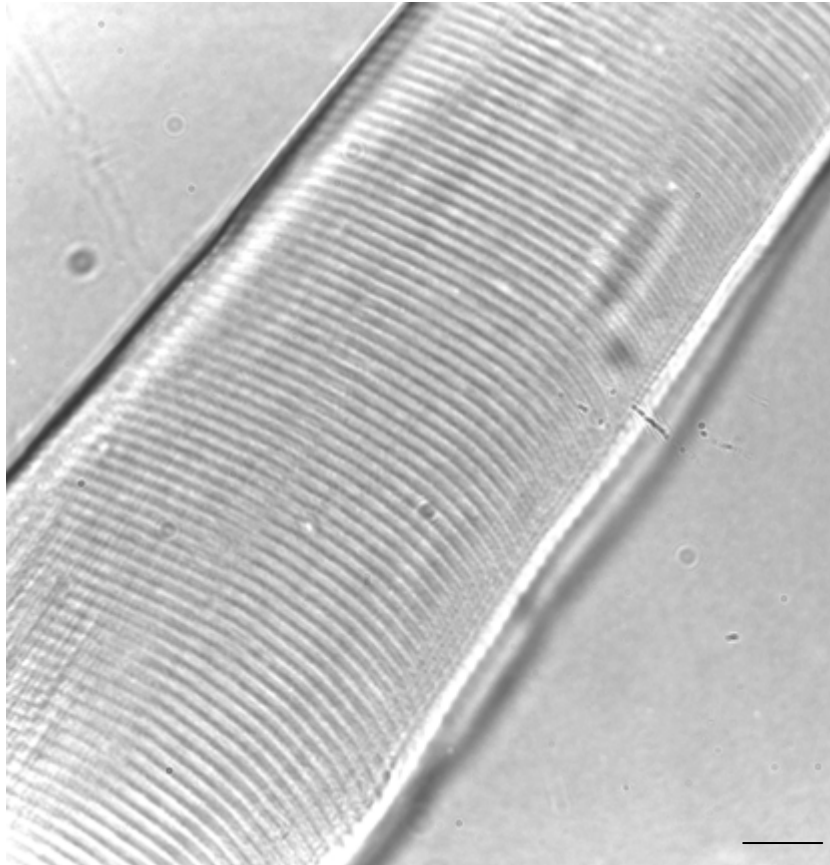


Figura 12: Fibra muscular dissociada pela técnica de William & Goldspink (1971) para visualização de estriação transversal. Barra = 10 μ m.

Nossos resultados mostram que o modelo experimental utilizado para alongamento do músculo tibial anterior não resultou em lesão tecidual, seja da fibra muscular ou resultante de processo inflamatório. Assim, podemos afirmar que os resultados obtidos referem-se à situação de alongamento na ausência de ruptura da fibra muscular.

Neste aspecto, o nosso trabalho difere da literatura pertinente a modelos experimentais, em que se realiza o alongamento muscular após dissecação e exposição do músculo (TAYLOR et al., 1990; TIDBALL et al., 1993; SUN et al., 1994, 1995, 1998; UCHIYAMA et al., 2001).

Ao longo de uma mesma sessão de alongamento, observamos aumento significativo na extensão do alongamento do músculo tibial anterior. Entretanto, essa proporção de alongamento, em uma mesma sessão, mostrou-se mais efetiva na quarta e na sétima semanas. Por outro lado, observamos, também, a manutenção do alongamento muscular até a sétima semana, em nível superior ao da primeira semana.

Em relação à força de tração muscular mínima suficiente para causar lesão muscular, há controvérsias na literatura. SUN et al. (1994), concluem, em seu estudo com coelhos que este valor corresponde a 12% além do comprimento de repouso do músculo. Para eles, 16% já pode ser considerado um alongamento plástico, com a presença de ruptura de fibras musculares. TSUANG et al. (1998) consideram este valor como 25% e TAYLOR et al. (1990), como 65%. No nosso protocolo, baseado em NIKOLAOU et al. (1987), utilizamos um peso correspondente a 80% do peso corporal. Contudo, nossos dados mostram que o músculo tibial anterior foi alongado além do comprimento de repouso, em até 88%, na ausência de lesão tecidual.

Nossos dados diferem dos obtidos por BANDY e IRION (1994) em humanos jovens. Esses autores analisaram, em humanos jovens, o alongamento dos músculos isquiotibiais, em sessões realizadas 5 vezes por semana, durante 6 semanas, em que cada sessão de alongamento compreendia três repetições de 15, 30 ou de 60 segundos cada. Esses autores observaram que alongamentos sustentados por 30 ou por 60 segundos são mais eficientes para o ganho de ADM que aquele sustentado por 15 segundos. Entretanto, observaram, também, que o ganho de ADM é o mesmo em 30 e 60 segundos.

Os mesmos autores (BANDY et al., 1997), analisaram, nos mesmos músculos, se o número de repetições de alongamento interfere com a ADM. Nesse estudo, havia

quatro grupos de intervenção: alongamento sustentado por um minuto e repetido, ou não, por 3 vezes; alongamento sustentado por 30 segundos e repetido, ou não, por 3 vezes. Todos os grupos apresentaram o mesmo ganho de ADM.

Já HALBERTSMA et al. (1996) descrevem que uma sessão única de alongamento estático, por 10 minutos, dos músculos isquiotibiais, em humanos, não influencia a curva de comprimento-tensão.

De acordo com BLACK et al. (2006), o alongamento pode ter efeitos a curto e a longo prazos. Os efeitos a curto-prazo ou agudos (segundos ou minutos) podem incluir eventos como alteração no comprimento do tendão; nos elementos dos componentes elásticos em série ou em paralelo ou na distribuição do comprimento dos sarcômeros dentro das fibras musculares. Portanto, os efeitos imediatos do alongamento (primeiros 60 segundos) contemplam as alterações viscoelásticas passivas, o que leva à redução da resistência ao alongamento. Há ainda redução das pontes actina-miosina, devido ao reflexo de inibição (proveniente do alongamento), o que também resulta em alterações viscoelásticas. Os efeitos a longo prazo do alongamento (várias semanas), são a hipertrofia induzida que pode aumentar a força tecidual (MALLIAROPOULOS et al., 2004; KUBO et al., 2002; MAGNUSSON, 1996). Não há dúvidas, na literatura, de que, de alguma forma, o alongamento passivo altera as propriedades mecânicas do músculo e aumenta o comprimento muscular (WEIR et al., 2005; AVELA et al., 2004; FOWLES et al., 2000; TAYLOR et al., 1990).

Muitos estudos têm demonstrado, tanto em animais quanto em humanos, que ocorre uma alteração nas propriedades viscoelásticas musculares gerada por alongamentos repetidos (TAYLOR et al., 1990; MAGNUSSON et al., 1996). Entretanto, estes efeitos são transitórios e não duram mais que uma hora. Com relação aos efeitos a longo prazo, o aumento da ADM alcançado através do alongamento estático é principalmente uma consequência do aumento da tolerância ao alongamento (MAGNUSSON et al., 1996).

Segundo GOLDSPINK (1995), as modificações na estrutura e propriedades musculares são possíveis devido à alta capacidade de remodelação do tecido muscular.

Sabe-se que, durante o alongamento de fibras musculares ativadas, os diferentes sarcômeros na mesma fibra muscular não apresentam o mesmo grau de alongamento (isto é, alteração no seu comprimento). Os sarcômeros presentes nas extremidades das fibras alongam-se menos que a média enquanto aqueles localizados próximos aos

centros das fibras alongam-se mais que a média. Isso foi demonstrado em miofibrilas isoladas (RASSIER et al., 2003).

Em nosso estudo, as preparações onde as fibras musculares eram isoladas para a mensuração do tamanho dos sarcômeros, contaram com a escolha aleatória destas fibras. Não observamos diferença significativa no comprimento dos sarcômeros do músculo tibial anterior submetido ao alongamento passivo quando comparado ao seu controle. Entretanto, observamos aumento do número de sarcômeros em série no músculo dos animais mortos aos sete dias após a última sessão de alongamento, quando comparado ao seu controle.

Estudos anteriores têm demonstrado que o músculo esquelético pode regular o número de sarcômeros em série. O comprimento do sarcômero determina o número de conexões de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, o que afeta diretamente a quantidade de tensão que um músculo pode gerar durante a contração. O número de sarcômeros aumenta após 20% de alongamento muscular (LINDSEY et al., 2002).

Segundo FRIDÈN et al. (2000), o limiar para sarcomerogênese ocorre quando o sarcômero é alongado até um comprimento de aproximadamente 4,5 a 5,0 μm , no máximo. O comprimento em repouso do sarcômero, no rato, é de $2,34 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (ANDRUCHOV et al., 2006).

Em nosso estudo, obtivemos o valor médio de 2,02; 1,98 e 2,07 μm para o sarcômero de músculos controles e de 2,10; 2,05 e 2,05 μm para os sarcômeros de músculo alongado, de animais mortos um, três e sete dias, respectivamente, após a última sessão de alongamento. Não observamos diferença significativa entre eles. Entretanto, nossas medidas foram realizadas ao longo de uma semana após a última sessão de alongamento. Não podemos afirmar sobre a variação no comprimento do sarcômero durante a sessão de alongamento.

São mecanismos para manter o comprimento do sarcômero: a reorientação das fibras musculares em relação ao eixo de geração de força, a redução da distância entre origem e inserção musculares, o aumento do comprimento do tendão muscular e a adição de novos sarcômeros (LINDSEY et al., 2002).

Em nosso estudo, observamos aumento da densidade de bandas A, o que poderia indicar a ocorrência de adição de novos sarcômeros em série. Em relação à alteração na distância entre origem e inserção musculares, medimos apenas o ventre

muscular, não incluindo o comprimento do tendão. Os animais do não apresentaram diferença significativa no comprimento do ventre muscular.

Desde 1979, através do estudo de TOUR et al., sabe-se que o comprimento muscular e não a tensão parece ser o fator determinante na regulação do número de sarcômeros. Segundo GAJDOSIK (2001), as adaptações no comprimento muscular resultam de alterações do número de sarcômeros em série, o que depende da extensão imposta ao músculo e não do nível de ativação ou tensão muscular. É importante lembrar que, em nosso estudo, a carga usada foi constante (sempre 80% do peso corporal), o que implicaria na mesma extensão muscular semanal.

É possível que a adição de sarcômeros em série, com o conseqüente aumento do comprimento do músculo, produza uma diminuição da rigidez muscular passiva, o que, por sua vez, facilitaria o alongamento muscular (AQUINO, 2005).

MORGAN (1990) propõe aumento do número de sarcômeros em série e redução do comprimento médio dos sarcômeros como processo adaptativo pós-lesão induzida por contração excêntrica. Isso foi sustentado por trabalhos feitos por LYNN e MORGAN (1994) e por LYNN et al (1998). Porém, isso tem sido contestado por KOH e HERZOG (1998), pois estes pesquisadores não encontraram evidências de que o músculo é capaz de se submeter a um processo de adaptação tão rápido e permanente, ao nível dos sarcômeros.

RENNER et al. (2006), em seu estudo, realizaram dez séries, com duração de 60 segundos cada, de alongamento passivo do músculo tríceps sural de ratos machos de 16 semanas de idade, durante três semanas. Eles analisaram a celularidade da cartilagem, multiplicação de condrócitos e a espessura da cartilagem articular do tornozelo dos ratos, comparando a pata alongada com a controle, e não obtiveram diferença significativa entre elas em nenhum dos itens pesquisados.

Segundo TASCA (2004), os ganhos de flexibilidade proporcionados pelo alongamento apenas são mantidos quando incorporados nas atividades do dia-a-dia. Se os animais tiverem incorporado este ganho de forma simétrica, ou seja, bilateralmente, nas atividades do dia-a-dia, então, as diferenças entre o tibial anterior direito e o esquerdo certamente não seriam identificadas. Como apenas obtivemos medidas relacionadas diretamente ao tecido muscular e não ao tecido conjuntivo (tendão), não nos é possível assegurar que todas estas adaptações devem-se apenas ao tecido muscular. Estudos posteriores deverão ser realizados com este objetivo.

Mas, um ponto merece reflexão: tendo em vista que os animais não apresentaram diferença significativa no comprimento do ventre muscular, não seria porque, após a quarta sessão de alongamento, os ganhos obtidos na flexibilidade não foram incorporados nas atividades do dia-a-dia? Seria possível, desse modo, realizar o alongamento passivo na pata traseira direita e obter ganho de flexibilidade na pata traseira esquerda, devido ao uso potencializado de ambas, isto é, em uma maior amplitude de movimento (ADM). Como esta variável não foi mensurada, não nos é possível responder seguramente a esta questão.

Quando os tecidos são alongados, eles se tornam mais extensíveis como resultado de mecanismos mecânicos a curto-prazo e adaptações a longo prazo da estrutura tecidual. MOSELEY et al. (2005), ao analisar quanto de alongamento é necessário para induzir a adaptações clínicas significativas, aplicou um protocolo de quatro semanas de duração em grupos de pessoas que permaneceram certo tempo com o tornozelo imobilizado, com a diferença que o primeiro grupo o realizava 6 minutos por dia e o segundo, 30 minutos por dia, todos os dias, para todos os grupos musculares envolvidos com essa articulação. Esses autores não observaram diferença significativa na ADM entre os dois grupos.

No estudo realizado por GAJDOSIK et al. (2004), mulheres com limitação no ângulo de dorsiflexão do tornozelo, tiveram seus músculos gastrocnêmio e tibial anterior alongados passivamente 3 vezes por semana, durante 8 semanas e obtiveram reversão total da restrição articular inicialmente apresentada. Provavelmente, ocorreram adaptações nas estruturas da perna, possibilitando melhora significativa em suas atividades funcionais, especialmente a marcha.

O trabalho de SELLES et al. (2005) usou alongamento do tibial anterior e do gastrocnêmio de pessoas com alto grau de espasticidade e contraturas nestes grupos musculares, durante 45 minutos, 3 vezes por semana, por 4 semanas, obteve melhora significativa na ADM passiva do tornozelo, diminuição da rigidez articular e melhora na velocidade da marcha.

Estudos usando modelos animais têm demonstrado que a extensibilidade normal do músculo esquelético é uma função do número de sarcômeros em série tanto quanto da quantidade e da organização do tecido conjuntivo intramuscular, de forma que os músculos podem aumentar ou reduzir seu comprimento para se acomodar a ADM comumente usada (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1971).

De acordo com DEYNE (2001), o aumento da ADM logo após o alongamento passivo pode ser explicado pelo comportamento viscoelástico do músculo - uma força pequena, sustentada por muito tempo, resulta em deformação tempo-dependente - e por alterações reversíveis no comprimento muscular (AVELA et al., 2004; MCNAIR e STANLEY, 1996).

O alongamento da unidade músculo-tendínea é uma intervenção freqüentemente utilizada para promover mudanças das propriedades musculares (MAGNUSSON, 1996; GAJDOSIK, 2001; BANDY e IRION, 1997).

Estes achados indicam que, possivelmente, o efeito sobre estas propriedades é resultado do comportamento viscoelástico do músculo em resposta à aplicação de uma força externa. Dessa forma, as adaptações produzidas no tecido muscular após o alongamento, incluindo as mudanças de comprimento, rigidez e energia absorvida, parecem ser temporárias e resultarem de deformação viscoelástica. Para ocorrer alterações duradouras destas propriedades musculares são necessárias modificações na estrutura do músculo, ou seja, remodelação tecidual. Entretanto, não está estabelecido na literatura se o alongamento é capaz de induzir este processo de remodelação do tecido muscular e qual o tempo necessário para que ele ocorra em consequência de um programa de alongamento muscular.

Segundo COUTINHO et al. (2004) e GOMES et al. (2004), o alongamento realizado durante 40 minutos em músculos de ratos submetidos à imobilização por três semanas preveniu a atrofia muscular. No primeiro estudo, o grupo de ratos que apenas foram submetidos ao alongamento durante as mesmas condições citadas, apresentou aumento da área da fibra muscular. Já no segundo estudo, o alongamento foi realizado apenas uma vez por semana durante 40 minutos e não houve diferença significativa na área da fibra muscular dos ratos submetidos apenas ao alongamento, sem a imobilização. Mas, no grupo imobilizado e submetido ao alongamento nas mesmas condições propostas, houve redução da atrofia muscular quando comparado ao grupo de ratos apenas submetidos à imobilização. Sendo assim, eles concluem que o alongamento é um fator de proteção à atrofia muscular.

Em nosso trabalho, observamos aumento significativo no diâmetro das fibras musculares do tibial anterior submetido a alongamento nos animais mortos três e sete dias após a última sessão de alongamento.

O músculo tem uma habilidade intrínseca em alterar sua massa e fenótipo em resposta à atividade. Este processo envolve alterações quantitativas e qualitativas na

expressão gênica (GOLDSPINK, 2002). As fibras musculares esqueléticas resultam da fusão de mioblastos embrionários durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Os miotubos sintetizam, então, proteínas contráteis e outras proteínas características de fibras musculares maduras. Alguns mioblastos, entretanto, não se submetem à fusão e se tornam mioblastos quiescentes, denominados células satélites, localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal de miofibras maduras (CANTINI et al., 1994). A maioria das células satélites em ratos adultos (15-20 semanas de idade) está se dividindo lentamente ou são quiescentes (KOISHI et al., 1994).

Sabe-se que o canal ativado pelo alongamento é um dos canais de membrana celular que responde a estresses mecânicos externos, e quando a membrana se alonga, este canal é ativado, permitindo que uma grande quantidade de cálcio entre na célula. O fluxo de cálcio ativa a calcineurina, uma fosfatase dependente de cálcio/calmodulina, e quando o fator de transcrição NF-AT1 é transportado para dentro do núcleo, a hipertrofia muscular é induzida (SAKIYAMA et al., 2005).

Embora possamos inferir que o alongamento realizado uma vez por semana, sustentado durante vinte minutos, por oito semanas, pode levar tanto à hipertrofia (aumento do diâmetro transversal) quanto à hiperplasia muscular (adição de sarcômeros). Torna-se necessário analisar a expressão de MyoD em células satélites, para sustentar a hipótese de incorporação dessas células aos miôníos nos músculos alongados.

Não podemos deixar de mencionar que o músculo tibial anterior de ratos possui 65% de fibras tipo IIB, glicolíticas rápidas, 31% de fibras tipo IIA (intermediárias) e 4% de fibras tipo I (lentas). A área de secção transversa das fibras musculares depende primariamente do tamanho e da idade do rato, e não do tipo de fibra muscular (STARON et al., 1999; DEVECI et al., 2001; ANDRUCHOV et al., 2006).

Através de experimentos com irradiação em camundongos foi demonstrado que a proliferação e a fusão de células satélites ocorrem mesmo na ausência de células inflamatórias e que os macrófagos podem contribuir para a regulação da atividade mitótica das células satélites, uma vez que eles secretam fatores de crescimento e citocinas. Muitos fatores de crescimento possuem efeito mitogênico tanto nos mioblastos embrionários quanto nas células satélites in vitro. Os fatores de crescimento mais estudados são: FGF, EGF, PDGF e IGF (CANTINI et al., 1994). Além disso, o alongamento muscular provoca a liberação de HGF de forma dependente do NO, o qual pode ativar células satélites (TATSUMI et al., 2002). O

óxido nítrico (NO) é uma molécula envolvida em uma variedade de funções fisiológicas, incluindo regulação vascular, neurotransmissão, regulação imune e sinalização celular. Também possui efeitos nas funções do músculo esquelético, incluindo contratilidade, tônus do vaso sanguíneo, fluxo sanguíneo e ativação da célula satélite, podendo ter efeitos diretos na função muscular, reparo e crescimento. Possui propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (SAKURAI et al., 2005).

A expressão de MyoD não ocorre apenas em fibras lesadas experimentalmente, mas também em fibras lesadas pelo super-alongamento ou estiramento muscular. O aumento da expressão do MyoD após o alongamento ocorre mesmo quando não há dano tecidual aparente e é possivelmente uma consequência direta do próprio alongamento e não de uma provável lesão degenerativa (KOISHI et al., 1994). Os músculos predominantemente glicolíticos rápidos, como o tibial anterior, expressam altos níveis de RNAm do MyoD, ao contrário dos músculos oxidativos lentos, como o sóleo (KOISHI et al., 1994).

De acordo com IKEDA et al. (2004), o alongamento realizado 15 vezes por minuto em ratos de oito semanas de idade durante 15, 30 e 60 minutos, levou ao aumento da expressão RNAm da miogenina, naqueles ratos onde o alongamento durou 60 minutos apenas.

Nosso estudo caracterizou-se pela aplicação de protocolo de alongamento na ausência de lesão tecidual, em que o alongamento foi realizado no rato imobilizado temporariamente, com força constante de tração no tibial anterior e mensuração do deslocamento do mesmo ao longo dos vinte minutos. Como estudo pioneiro no Laboratório de Neurobiologia, apresenta lacunas que abrem perspectivas para estudos posteriores. Tornar-se-á necessária a realização de um novo trabalho onde repetiremos a metodologia utilizada neste estudo para compararmos o alongamento de vinte minutos, até então não descrito na literatura desta forma, e o alongamento de trinta segundos, cujos efeitos encontram-se bem descritos na literatura. Poderemos, ainda, medir a ADM na perspectiva dos benefícios do alongamento serem incorporados bilateralmente ou não; fazer marcação imunohistoquímica para MyoD para avaliarmos a ativação de células satélites; dosar actina/miosina para avaliarmos a ocorrência da síntese protéica; comparar o peso do músculo isolado com o peso corporal; fazer análise morfométrica do tendão; analisar o tendão realizar um protocolo de alongamento de doze semanas, em que se variem a força de tração (para

avaliarmos a presença da lesão) e períodos de tempo superiores a sete dias após a última sessão de alongamento.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista o protocolo de alongamento utilizado em nosso trabalho, baseado em NICHOLAOU et al. (1987), em que o músculo tibial anterior de ratos adultos jovens foi submetido a oito sessões de alongamento, com utilização de peso correspondente a 80% do peso corporal e com duração de vinte minutos, nossos resultados permitem concluir que:

- O protocolo não resultou em rompimento de fibras musculares ou em processos inflamatórios;
- A porcentagem de alongamento do músculo se manteve pelo período de tempo analisado, oito semanas, embora na sétima semana, os valores lineares de deslocamento sejam inferiores aos da quarta semana;
- Aos três e sete dias após a última sessão de alongamento, ocorreu aumento no diâmetro transversal das fibras musculares;
- Aos sete dias após a última sessão de alongamento, ocorreu aumento do número de bandas A;
- O comprimento do ventre muscular manteve-se inalterado, assim como o comprimento dos sarcômeros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOUR, A. Exercícios de Alongamento-Anatomia e Fisiologia, Rio de Janeiro: Manole, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. e WALTER, P. Biologia molecular da célula, São Paulo: Artmed, 2004.

ALTER, M.J. Science of Stretching, Champaign: Human Kinetics, 1999.

ANDRUCHOV, O.; ANDRUCHOVA, O.; WANG, Y. e GALLER, S. Dependence of cross-bridge kinetics on myosin light chain in rabbit and rat skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, v. 571, n. 1, p. 231-242, 2006.

AQUINO, C.F. Comparação de dois programas de intervenção para modificação das propriedades musculares: fortalecimento em amplitudes iniciais de movimento x alongamento muscular. Belo Horizonte: Escola de Educação Física, Fisioterapia e T.O.da UFMG, 2005. 78p. Dissertação, (Mestrado em Ciência da Reabilitação).

ARMSTRONG, R.B.; OGILVIE, R.W.; SCHWANE, J.A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v.54, n.1, p.80-93, 1983.

AVELA, J; FINNI, T; LIIKAVAINIO, T; NIEMELÄ, E; KOMI, P.V. Neural and mechanical responses of the triceps surae muscle group after 1h of repeated fast passive stretches. *Journal of Applied Physiology*, v.96, p. 2325-2332, 2004.

BANDY, W.D. e IRION, J.M. The effect of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscles. *Physical Therapy*, v. 74, n. 9, p. 845-852, 1994.

BANDY W.D.; IRION, J.M.; BRIGGLER, M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. *Physical Therapy*, v.77, n.10, p.1090-1096, 1997.

BIGARD, X.A.; JANMOT, C.; MERINO, D.; LIENHARD, F.; GUEZENNEC, Y.C.; D'ALBIS, A. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *Journal of Applied Physiology*, v.81, n.6, p.2658-2665, 1996.

BLACK, J.D.J.; FREEMAN, M.; STEVENS, E.D. A 2 week routine stretching programme did not prevent contraction-induced injury in mouse muscle. *Journal of Physiology*, v.544, p. 137-147, 2006.

CAMPIONE, M.; AUSONI, S.; GUEZENNEC, C.Y.; SCHIAFFINO, S. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology*, v.74, n.3, p.1156-1160, 1993.

CANTINI, M.; MASSIMINO, M.L.; BRUSON, A.; CATANI, C.; LIBERA, L.D.; CARRARO, U. Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.202, n.3, p.1688-1696, 1994.

CHAN, S.P.; HONG, Y.; ROBINSON, P.D. Flexibility and passive resistance of the hamstrings of young adults using two different static stretching protocols. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, v.11, p.81-86, 2001.

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

DEVECI, D.; MARSHALL, J.M.; EGGINTON, A.S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology*, v.281, p. H241-252, 2001.

DEPINO, G.M.; WEBRIGHT, W.G.; ARNOLD, B.L. Duration of maintained hamstring flexibility after cessation of an acute static stretching protocol. *Journal of Athletic Training*, v.35, n.1, p. 56–59, 2000.

DEYNE, P.G.D. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. *Physical therapy*, v.81, n.2, p.819-827, 2001.

DURIGON, O.F.S. O Alongamento Muscular: parte I – A interação neuromuscular. *Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo*, v.2, n.1, p.40-44, 1995.

DURIGON, O.F.S. O Alongamento Muscular: parte II – A interação mecânica. *Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo*, v.2, n.2, p.72-78, 1995.

FARINATTI, P.T.V. Flexibilidade e Esporte: Uma revisão da literatura. *Revista Paulista de Educação Física*, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2000.

FOWLES, J. R.; SALE, D. G.; MACDOUGALL J. D. Reduced strength after passive stretch of the human plantarflexors. *Journal of Applied Physiology*, v. 89, p. 1179–1188, 2000.

FRIDÈN, J.; PONTÉN, E.; LIEBER, R. L. Effect of muscle tension during tendon transfer on sarcomerogenesis in a rabbit model. *The Journal of Hand Surgery*, v. 25A, p. 138-143, 2000.

FUCHTABUER, E-M.; WESTPHAL, H. MyoD and Myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Developmental Dynamics*, v.193, p.34-39, 1992.

GAJDOSIK, R. L.; LINDEN, D. W. V.; MCNAIR, P. J.; WILLIAMS, A. K.; RIGGIN, T. J. Effects of an eight-week stretching program on the passive-elastic properties and function of the calf muscles of older women. *Clinical Biomechanics*, v.20, n. 9, p. 973-83, 2004.

GAJDOSIK, R.L. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. *Clinical Biomechanics*, v.16, p.87-101, 2001.

GALLER, S.; HILBER, K.; PETTE, D. Stretch activation and myosin heavy chain isoforms of rat, rabbit and human skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v.18, p.441-448, 1997.

GARRETT, W.E. Muscle strain injuries. *The American Journal of Sports Medicine* v.24, n.6, p.S2-S8, 1996.

GILL, T.J.; SMITH, G.J.; WISSLER, R.W.; KUNZ, H.W. The rat as an experimental animal. *Science*, v.245, p.269-276, 1989.

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

GOLDSPINK, G.; WILLIAMS, P.; SIMPSON, H. Gene expression in response to muscle stretch. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.403S, p.S146-S152, 2002.

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*, v.194, p.323-334, 1995.

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 Journal of Medicine and Biological Research*, v.37, n.10, p. 1473-1480, 2004.

GREEN, S.A.; HORTON, E.; BAKER, M.; UTKAN A.; CAIOZZO, V. Distraction of skeletal muscle: evolution of a rat model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.1, n.403, p.S126-S132, 2002.

GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E.; BEILHARZ, M.W. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Research*, v.267, p. 99-104, 1992.

GUISSARD, N; DUCHATEAU, J. Effect of static stretch training on neural and mechanical properties of the human plantar-flexor muscles. *Muscle Nerve*, v. 29, n. 2, p. 248-255, 2000.

HALBERTSMA, J.P.K.; BOLHUIS, A.I.V.; GILKIN, L.N.H. Sport Stretching: Effect on passive muscle stiffness of short hamstrings. *Archives of Physical Medicine Rehabilitation*, v. 77, p. 688-92, 1996.

IKEDA, S.; YOSHIDA, A.; MATAYOSHI, S.; TANAKA, N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v.84, p.419-423, 2003.

IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. *Cell and Tissue Research*, v.249, p.509-521, 1987.

JONES, D.A.; NEWHAM, D.J.; ROUND, J.M.; TOLFREE, E.J. Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *Journal of Physiology*, v.375, p.435-448, 1986.

KELLERMAYER, M.S.Z.; SMITH, S.B.; BUSTAMANTE, C.; GRANZIER, H.L. Mechanical fatigue in repetitively stretched single molecules of titin. *Biophysical Journal*, v.80, p.852-863, 2001.

KENDALL, F.P.; MCCREARY, E.K.; PROVANCE, P.G. Músculos, provas e funções, São Paulo: Manole, 1995.

KISNER, C.; COLBY, L.A. Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas, São Paulo: Manole, 2005.

KOH, T.J.; HERZOG, W. Eccentric training does not increase sarcomere number in rabbit dorsiflexor muscles. *Journal of Biomechanics*, v.31, p.499-501, 1998.

KOISHI, K.; ZHANG, M.; McLENNAN, I.S.; HARRIS, J. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Developmental Dynamics*, v.202, p. 244-254, 1994.

KUBO, K; KANEHISA, H; FUKUNAGA, T. Effects of resistance and stretching training programmes on the viscoelastic properties of human tendon structures in vivo. *Journal of Physiology*, v.538, n.1, p. 219-226, 2002.

KUSCHEL, R.; REUVENI, Z.Y. e BORNEMANN, A. Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.47, n.11, p. 1375-1383, 1999.

LANGE, S.; EHLER, E. e GAUTEL, M. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *TRENDS in Cell Biology*, v.16, n.1, p. 11-18, 2006.

LINDSEY, C.A.; MAKAROV, M. R.; SHOEMAKER, S.; BIRCH, J. G.; BUSCHANG, P. H.; CHERKASHIN, A. M.; WELCH, R. D.; SAMCHUKOV, M. L. The effect of the amount of limb lengthening on skeletal muscle. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 402, pp. 278–287, 2002.

LUQUE, E; JIMENA, I; NOGUERA, F; PEÑA, J; JIMÉNEZ-REINA, L. Effects of tenotomy on regenerating anterior tibial muscle in rats. *Basic Applied Myology*, v.12, n.5, p. 213-218, 2002.

LYNN, R.; MORGAN, D.L. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. *Journal of Applied Physiology*, v.77, n.3, p.1439-1444, 1994.

LYNN, R.; TALBOT, J.A.; MORGAN, D.L. Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *Journal of Applied Physiology*, v.85,n.1, p.98-104, 1998.

MACPHERSON, P.C.D.; SCHORK, M.A.; FAULKNER, J.A. Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *American Journal of Physiology*, v.271, p. C1438-C1446, 1996.

MAGNUSSON, SP; SIMONSEN, EB; AAGAARD, P; KJAER, M. Biomechanical responses to repeated stretches in human hamstring muscle in vivo. *The American Journal of Sports Medicine*, v.24, n.5, p. 622-28, 1996.

MALDONADO, I.R.S.C.; FERREIRA, M.L.; CAMARGOS, E.R.S.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R.S. Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi*- induced myositis in rats. *Histology and Histopathology*, v.19, p.85-93, 2004.

MALLIAROPOULOS, N; PAPALEXANDRIS, S; PAPALADA, A; PAPACOSTAS, E. The role of stretching in rehabilitation of hamstring injuries: 80 athletes follow-up. *Medicine and Science of Sports and Exercise*, v. 36, n. 5, p. 756-759, 2004.

McCOMAS, A.J. Skeletal muscle: form and function. Champaign: Human Kinetics, 1996.

MCNAIR, P.J. e STANLEY, S.N. Effect of passive stretching and jogging on the series elastic muscle stiffness and range of motion on the ankle joint. *British Journal of Sports Medicine*, v. 30, p. 313-318, 1996.

MINAMOTO, V.B.; BUNHO, S.R.; SALVINI, T.F. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Brazilian Journal of Medicine and Biology Research*, v.34, n.11, p.1447-1452, 2001.

MORGAN, D.L. New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophysical Journal*, v.57, p.209-221, 1990.

MOSELEY, A.M.; HERBERT, R.D.; NIGHTINGALE, E.J.; TAYLOR, D.A.; EVANS, T.M.; ROBERTSON, G.J.; GUPTA, S.K.; PENN, J. Passive stretching does not enhance outcomes in patients with plantarflexion contracture after cast immobilization for ankle fractures: a randomized controlled trial. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v.86, p. 1118-26, 2005.

MUHL, Z.F.; GRIMM, A.F.; GLICK, P. Technique for measurement of sarcomere length of striated muscle. *Journal of Dentology Research*, v.55, p.170, 1976.

NIKOLAOU, P.K.; MACDONALD, B.L.; GLISSON, R.R.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. *The American Journal of Sports Medicine*, v.15, n.1, p.9-14, 1987.

NOONAN, T.J.; BEST, T.M.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Identification of a threshold for skeletal muscle injury. *The American Journal of Sports Medicine*, v.22, n.2, p.257-261, 1994.

RASSIER, D.E.; HERZOG, W.; POLLACK, G.H. Dynamics of individual sarcomeres during and after stretch in activated myofibrils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1525, p. 1735-1740, 2003.

REDDY A.S.; REEDY, M.K.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Restriction of the injury response following an acute muscle strain. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.25, n.3, p. 321-327, 1993.

REMIE, R.; DONGEN, J.J.V.; RENSEMA, J.W.; WUNNIK, G.H.J.V. The rat as an experimental animal. In: Dongen, J.J.V.; Remie, R.; Rensema, J.W.; Wunnik, G.H.J.V. *Manual of Microsurgery on the Laboratory Rat - part I*, Elsevier Science Publishers B.V., 1990.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. The celular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annual review of Physiology*, v.59, p.551-571, 1997.

SAHRMANN, S. Diagnosis and treatment of movement impairment syndromes. 2002.

SAKIYAMA, K.; ABE, S.; TAMATSU, Y.; IDE, Y. Effects of stretching stress on the muscle contraction proteins of skeletal muscle myoblasts. *Biomedical Research*, v.26, n.2, p. 61-68, 2005.

SAKURAI, T.; HOLLANDER, J.; BRICKSON, S.L.; OHNO, H.; JI, L.L.; IZAWA, T.; BEST, T.M. Changes in nitric oxide and inducible nitric oxide synthase following stretch-induced injury to the tibialis anterior muscle of rabbit. *Japanese Journal of Physiology*, v.55, p. 101-107, 2005.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 2002.

SELLES, R. W.; MSE, X. L.; LIN, F.; CHUNG, S. G.; ROTH, E. J.; ZHANG, L. Q. Feedback-controlled and programmed stretching of the ankle plantarflexors and dorsiflexors in stroke: effects of a 4-week intervention program. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v. 86, n. 12, p. 2330-6, 2005.

SILVA, G.C. Avaliação da infecção por diferentes inóculos da cepa JG de *Trypanosoma cruzi* em ratos. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1999. 38p. Dissertação, (Mestrado em Ciências - Biologia Celular).

SMITH, F.H.; EGGINTON, S.; ZHOU, A.L.; HUDLICKA, O. Growth of arterioles precedes that of capillaries in stretch-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Microvascular Research*, v.62, p. 1-14, 2001.

SOUCHARD, E.Ph.E. O stretching global ativo, São Paulo: Manole, 1996.

STARON, R.S.; KRAEMER, W.J.; HIKIDA, R.S.; FRY, A.C.; MURRAY, J.D.; CAMPOS, G.E.R. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fischer 344 rats. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 111, p. 117-123, 1999.

SUN, J-S.; TSUANG, Y-H.; LIU, T-K; HANG, Y-S.; CHENG, C-K. Failure sites and peak tensile forces of the composite triceps surae muscle by passive extension in the rabbit. *Clinical Biomechanics*, v.9, p.310-314, 1994.

SUN, J-S.; TSUANG, Y-H.; HOU, S-M.; HANG, Y-S.; LIU, T-K.; CHENG, C-K.; TSAO, K-T. Microfailure of peroneus longus muscle during passive extension. *Proceedings of the National Science Council*, v.18, n.1, p.24-29, 1994.

SUN, J-S; TSUANG, Y-H.; LIU, T-K.; HANG, Y-S.; CHENG, C-K.; LEE, W.W-L. Viscoplasticity of rabbit skeletal muscle under dynamic cyclic loading. *Clinical Biomechanics*, v.10, n.5, p.258-262, 1995.

SUN, J-S.; HANG, Y-S.; TSUANG, Y-H.; CHENG, C-K.; TSAO, K-Y.; HSU, S-H. Morphological changes of the triceps surae muscle-tendon unit during passive extension: an *in vivo* rabbit model. *Clinical Biomechanics*, v.13, p.634-640, 1998.

TASCA, G.N.F. Impacto da flexibilidade no desempenho muscular do joelho. Belo Horizonte: Escola de Educação Física, Fisioterapia e T.O. da UFMG, 2004. 78p. Dissertação, (Mestrado em Ciência da Reabilitação).

TATSUMI, R.; HATTORI, A.; IKEUCHI, Y.; ANDERSON, J.E.; ALLEN, R.E. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Molecular Biology of the Cell*, v.13, p.2909-2918, 2002.

TATSUMI, R.; LIU, X.; PULIDO, A.; MORALES, M.; SAKATA, T.; DIAL, S.; HATTORI, A.; IKEUCHI, Y.; ALLEN, R.E. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, v.290, n.6, p. C1487-94, 2006.

TAYLOR, D.C.; DALTON, J.D.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Viscoelastic properties of muscle-tendon units. *The American Journal of Sports Medicine*, v.18, n.3, p.300-309, 1990.

TAYLOR, D.C.; DALTON, J.D.; SEABER, A.V.; GARRETT, W.E. Experimental muscle strain injury – Early functional and structural deficits and the increased risk for reinjury. *The American Journal of Sports Medicine*, v.21, n.2, p.190-193, 1993.

TELLEY, I.A.; STEHLE, R.; RANATUNGA, K.W.; PFITZER, G.; STUSSI, E.; DENOTH, J. Dynamic behaviour of half-sarcomeres during and after stretching in activated rabbit psoas myofibrils: sarcomere asymmetry but no “sarcomere popping”. *Journal of Physiology*, v.573, p. 173-185, 2006

TIDBALL, J.G.; SALEM, G.; ZERNICKE, R. Site and mechanical conditions for failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. *Journal of Applied Physiology*, v.74, n.3, p.1280-1286, 1993.

TIMSON, B.F.; DUDENHOEFFER, G.A. Skeletal muscle fibre number in the rat from youth to adulthood. *Journal of Anatomy*, v. 173, p. 33-36, 1990.

TSUANG, Y. H.; SUN, J. S.; CHEN, I. H.; HSU, S. H.; TSAO, K. Y.; WEI, K. Y.; HANG, Y. S. The effects of cyclic stretching on tensile properties of the rabbit's skeletal muscle. *Clinical Biomechanics*, v. 13, n. 1, p. 48-53, 1998.

UCHIYAMA, Y.; TAMAKI, T.; FUKUDA, H. Relationship between functional deficit and severity of experimental fast-strain injury of rat skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, v.85, p.1-9, 2001.

WALLIN, D; EKBLOM, B; GRAHN, R; NORDENBORG, T. Improvement of muscle flexibility: a comparison between two techniques. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.13, n.4, p. 263-68, 1989.

WEIR, D.E.; TINGLEY, J; ELDER, G.C.B. Acute passive stretching alters the mechanical properties of human plantar flexors and the optimal angle for maximal voluntary contraction. *European Journal of Applied Physiology*, v. 93, p. 614-623, 2005.

WERNIG, A.; IRINTCHEV, A.; WEISSHAUPT, P. Muscle injury, cross-sectional area and fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel-running. *Journal of Physiology*, v.428, p.639-652, 1990.

WERNIG, A.; SALVINI, T.F.; IRINTCHEV, A. Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage. *Journal of Neurocytology*, v.20, p.903-913, 1991.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. *Journal of Cell Science*, v. 9, p. 751-767, 1971.

WILLY, R.W.; KYLE, B.A.; MOORE, S.A.; CHLEBOUN, G.S. Effect of cessation and resumption of static hamstring muscle stretching on joint range of motion. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, v.31, n.3, p.138-144, 2001.

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*, v.190, p.613-622, 1999.

ZÁDOR, E.; DUX, L.; WUYTACK, F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRbNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v.20, p.395-402, 1999.