

Exercício excêntrico e alongamento para músculos flexores plantares aplicados durante 21 dias após imobilização não modificam o tecido não contrátil

Eccentric exercise and stretching for plantar flexor muscles applied during 21 days after immobilization do not modify the non-contractile tissue

Ejercicio excéntrico y estiramiento para músculos flexores plantares aplicados durante 21 días tras inmovilización no cambian el tejido no contráctil

Maria Laura Rezende Pucciarelli¹, Stela Márcia Mattiello², Edson Zangiacomí Martínez³, Ana Claudia Mattiello-Sverzut⁴

RESUMO | As adaptações da matriz extracelular, que está intimamente ligada à manutenção da integridade e do desempenho do sistema musculoesquelético, não estão consensualmente descritas na literatura após recarga por desuso. O objetivo deste estudo foi analisar a área de tecido conjuntivo perimisial e de secção transversa das fibras musculares nos músculos sóleo e plantar de ratas imobilizadas e posteriormente reabilitadas por protocolos de alongamento e exercício excêntrico. A expressão do tecido conjuntivo perimisial de ambos os músculos estudados não apresentou diferença significativa após o procedimento de imobilização e treinamento. O treino excêntrico aplicado por 10 dias foi suficiente para recuperar a área das fibras para o músculo plantar, enquanto a recuperação do músculo sóleo aconteceu somente após o protocolo de 21 dias.

Descritores | Imobilização; Tecido Conjuntivo; Exercício de Alongamento Muscular; Músculo Esquelético.

ABSTRACT | The adaptations of the extracellular matrix, which is closely related to the maintenance of the integrity and performance of the musculoskeletal system, are not widely described in the literature after rehabilitation due to prolonged disuse. The aim of this study was to analyze the perimisial connective tissue area and the cross-sectional area of muscle fibers in soleus and plantaris muscles of immobilized female rats, later rehabilitated due to stretching and eccentric exercise

protocols. The expression of the perimisial connective tissue of both studied muscles did not show significant differences after the procedure of immobilization and training. Eccentric training applied for 10 days was enough to recover the area of fibers for the plantaris muscle, while the recovery of the soleus muscle happened only after the 21-days protocol.

Keywords | Immobilization; Connective Tissue; Muscle Stretching Exercises; Muscle, Skeletal.

RESUMEN | No figuran descritas de manera consensual en la literatura las adaptaciones extracelulares, ligadas al mantenimiento de la integridad y del desempeño del sistema musculoesquelético tras inmovilizaciones. En este estudio se evalúa el área del perimio del tejido conjuntivo y de la sección transversal de las fibras musculares del sóleo y del plantar en ratas inmovilizadas y después rehabilitadas siguiendo los protocolos de estiramiento y de ejercicio excéntrico. En el área evaluada de ambos músculos no se observaron significativas diferencias tras el procedimiento de inmovilizarlos y entrenarlos. Aplicados en diez días, el entrenamiento excéntrico ha sido suficiente para recuperar el área de las fibras para el músculo plantar, mientras que el músculo sóleo ha tardado veintiuno días en recuperarse.

Palabras clave | Inmovilización; Tejido Conjuntivo; Ejercicios de Estiramiento Muscular; Sistema Musculoesquelético.

Projeto Desenvolvido no Laboratório de Neuropatologia e Estrutura e Função do Músculo Esquelético, Laboratório de Pesquisa Científica, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹Aluna do curso de graduação em Fisioterapia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

²Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos – São Carlos (SP), Brasil.

³Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁴Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Maria Laura Rezende Pucciarelli – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Av. Bandeirantes, 3.900, Campus Universitário – Ribeirão Preto (SP), Brasil – CEP: 14049-900 – Telefone: (16) 3602-0738 Fax: (16) 3633-0336 – E-mail: acms@fmrp.usp.br – Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Conflito de interesse: Nada a declarar – Apresentação: nov. 2014 – Aceito para publicação: maio 2016 – Parecer de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo nº 043/2007.

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético representa uma estrutura biológica complexa, composta por elementos contráteis e não contráteis, que possui habilidade de adaptar-se diante dos diversos estímulos fisiológicos e patológicos. O procedimento de imobilização determina mudanças desfavoráveis no músculo, como atrofia muscular e aumento do tecido conjuntivo intramuscular, determinando perda da extensibilidade e limitação dos movimentos¹⁻⁴.

Diante das adaptações deletérias causadas pelo desuso e responsividade do sistema musculoesquelético, técnicas de reabilitação muscular vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o objetivo de amenizar ou reverter essas adaptações. Respostas do tecido não contrátil diante da imobilização e reabilitação têm sido pouco exploradas na literatura, ainda que o papel desses elementos tenham tornado-se mais evidentes nas últimas décadas com o aprimoramento de técnicas de biologia celular e molecular⁵.

A matriz extracelular do músculo esquelético é composta por colágeno, proteoglicanas e metaloproteinases, estruturas que envolvem as células satélites que, por sua vez, desempenham papel mandatório na regeneração muscular⁵. Estudos em ratos Wistar adultos têm mostrado que o procedimento de imobilização reduz significativamente a quantidade de colágeno tipo I, e que o colágeno tipo III não sofre alterações quantitativas, em comparação ao grupo controle⁶. Entretanto, o desuso seguido por reabilitação do tipo alongamento passivo aplicado por 10 dias, composto de 10 repetições de 30 segundos com intervalos de 30 segundos, determinou aumento significativo do colágeno tipo III, em comparação ao grupo controle⁶.

Após quatro semanas de imobilização e aplicação do alongamento em sessões diárias ou três vezes por semana (10 alongamentos mantidos por 1 minuto com intervalo de 30 segundos), concluiu-se que os protocolos foram efetivos em recuperar a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo, em comparação ao músculo contralateral e ao grupo controle⁷. O alongamento é uma importante técnica capaz de reduzir a desorganização e agregação dos feixes de colágeno e prevenir a perda de sarcômeros em série de músculos imobilizados^{1,7}, sendo indicada para prevenção de lesões⁸. Os programas de alongamento utilizados por diversos pesquisadores após imobilização de um segmento se mostram efetivos em restabelecer a amplitude de movimento aos padrões de normalidade das articulações^{6,8,9}.

O desenvolvimento de maior tensão nas contrações excêntricas em comparação às concêntricas ocorre pelo afastamento dos miofilamentos e pelo desenvolvimento de tensão passiva nos elementos elásticos, titina e desmina. Além disso, é sabido que o treinamento excêntrico determina maior desenvolvimento de força, fato diretamente associado ao aumento da síntese proteica miofibrilar e hipertrofia muscular¹⁰⁻¹². Apesar da localização anatômica adjacente, na parte posterior da perna, os músculos eleitos para este estudo diferem em suas características citoarquiteturais e bioquímicas. O músculo sóleo é composto predominantemente por fibras do tipo I, dada sua constante ativação na postura estática. Já o músculo plantar apresenta baixa proporção de fibras do tipo I, apresentando predominantemente fibras do tipo IID¹³. O músculo sóleo, músculo postural, é ainda vigoroso desacelerador da marcha na fase de apoio, e é potencialmente ativado durante o exercício excêntrico, treinamento mais fisiológico na fase pós-desuso. Esses resultados poderão subsidiar, mesmo que indiretamente, conhecimentos acerca da eleição e aplicação de técnicas de reabilitação na fisioterapia. Portanto, protocolos terapêuticos como alongamento e exercício excêntrico favorecem o restabelecimento morfofuncional da musculatura esquelética após situações de desuso.

Este estudo teve por objetivo investigar se a aplicação de 10 e 21 dias de exercício excêntrico ou alongamento muscular modifica a área de tecido conjuntivo e a área de secção transversa das fibras musculares e dos músculos sóleo e plantar de ratos submetidos a imobilização.

METODOLOGIA

Animais e procedimentos

O presente estudo foi aprovado pela Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 043/2007. Quarenta e duas ratas Wistar com 81 dias de idade foram divididas em oito grupos: 1) controle imobilizado (GCI); 2) controle de 10 dias (GC_{10}); 3) controle de 21 dias (GC_{21}); 4) imobilizado por 10 dias (GI); 5) imobilizado por 10 dias e treinado excentricamente por 10 dias ($GITE_{10}$); 6) imobilizado por 10 dias e treinado excentricamente por 21 dias ($GITE_{21}$); 7) imobilizado por 10 dias e alongado por 10 dias ($GIAL_{10}$); e 8) imobilizado por 10 dias e alongado por 21 dias ($GIAL_{21}$). Os grupos controle de 10 e 21

dias foram utilizados para comparação pareada por idade com os grupos treinados. Para imobilização, os animais foram previamente anestesiados (Ketamina-95 mg/kg e Xylazina-12 mg/kg), a articulação tíbio-társica direita foi posicionada em flexão plantar máxima e uma estrutura de aço forrada foi utilizada para restringir anatomicamente o membro inferior direito^{14,15}.

Após a retirada da imobilização, os animais do GITE₁₀ e GITE₂₁ realizaram treinamento em esteira em declive com sessões iniciais de 10 minutos diários, tendo incrementos de 5 minutos por dia até completar 40 minutos, com velocidade média de 17 m/min e inclinação descendente de 16 graus, sendo três dias consecutivos de treino seguidos por um dia de descanso¹⁶⁻¹⁸. Os animais dos grupos GIAL₁₀ e GIAL₂₁ foram submetidos aos protocolos de alongamento mantido obtido pela flexão dorsal máxima realizada por fita adesiva¹⁹. O protocolo de alongamento seguiu os mesmos intervalos do treino excêntrico, iniciando-se com 10 minutos de alongamento diários por três dias consecutivos e um dia de intervalo. Houve incrementos diários de 5 minutos a partir do primeiro dia, até serem alcançados 40 minutos de alongamento mantido. Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos imediatamente após a última sessão do protocolo, e os músculos sóleo e plantar foram removidos. Os fragmentos foram envolvidos em talco, congelados em nitrogênio líquido e estocados em um freezer a -80 °C.

Processamento histológico e análise morfométrica

Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos em criótomo Leica CM 1850 UV (-25 °C) (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) e posteriormente corados com tricrômico de gomori modificado. Análise morfométrica foi realizada com auxílio do software QualiView (Atonus Engenharia de Sistemas Ltda., São José dos Campos, São Paulo, Brasil), cujas imagens foram capturadas, a partir do microscópio de luz Leica DM 2500, em câmera de vídeo digital Leica DFC 300FX conectada a um microcomputador. A área do tecido conjuntivo foi analisada a partir de três campos aleatórios das lâminas do músculo sóleo e do plantar na objetiva de 40×. A área total de cada campo foi de 91.860,51 µm², composta pelo tecido conjuntivo e pelas fibras musculares. Para determinar a área do tecido conjuntivo perimisial, inicialmente foram mensuradas manualmente todas as fibras musculares de cada campo, analisadas individualmente pelo mesmo

avaliador. Posteriormente, da área total dos três campos (3×91.860,51 µm²) foi subtraído o valor total da área de fibras obtidas nos três campos analisados.

Estatística

O procedimento PROC MIXED do programa SAS foi utilizado, e as comparações múltiplas das áreas médias do tecido conjuntivo entre os diferentes grupos foram feitas em modelo heterocedástico (que considera grupos com variâncias diferentes) de regressão linear, considerando um ajuste de Bonferroni. A informação de medidas repetidas da área para cada animal foi introduzida no modelo por efeitos aleatórios. O pressuposto de normalidade de resíduos do modelo foi verificado por métodos gráficos. Para as inferências, considerou-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Análise morfológica e morfométrica

Os resultados obtidos indicaram que nenhum grupo mostrou alteração significativa na área de tecido conjuntivo perimisial dos músculos sóleo e plantar (Figuras 1 e 2). Por outro lado, a área média de secção transversa das fibras musculares do músculo sóleo do GI reduziu significativamente em comparação ao GCI (GCI × GI; $p < 0,0001$). Ambos os protocolos de treino excêntrico e alongamento mantido, aplicados por 10 ou 21 dias, promoveram o aumento da média das áreas das fibras musculares (GI × GIAL₁₀; GI × GIAL₂₁; GI × GITE₁₀; GI × GITE₂₁; $p < 0,0001$). Entretanto, somente o treino excêntrico realizado por 21 dias foi eficiente no restabelecimento da área de secção transversa das fibras, em comparação aos controles (GC₂₁ × GITE₂₁; NS) (Tabela 1).

No músculo plantar, o período de imobilização reduziu significativamente a área de secção transversa das fibras musculares (GCI × GI; $p < 0,0001$). Diante de ambos os protocolos de reabilitação, alongamento e treino excêntrico por 10 e 21 dias, houve aumento significativo da área média das fibras musculares (GI × GIAL₁₀; GI × GITE₁₀; GI × GIAL₂₁; GI × GITE₂₁; $p < 0,001$). Também foi observado que, nesse músculo, o treino excêntrico aplicado por 10 e 21 dias foi eficiente no restabelecimento da área de secção transversa das fibras musculares (GC₁₀ × GIATE₁₀; GC₂₁ × GITE₂₁; NS) (Tabela 2).

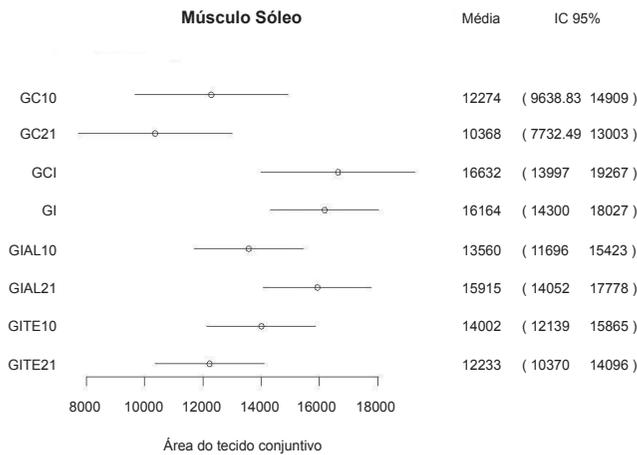


Figura 1. Médias da área do tecido conjuntivo com os respectivos intervalos de confiança de 95% do músculo sóleo dos diferentes grupos estudados

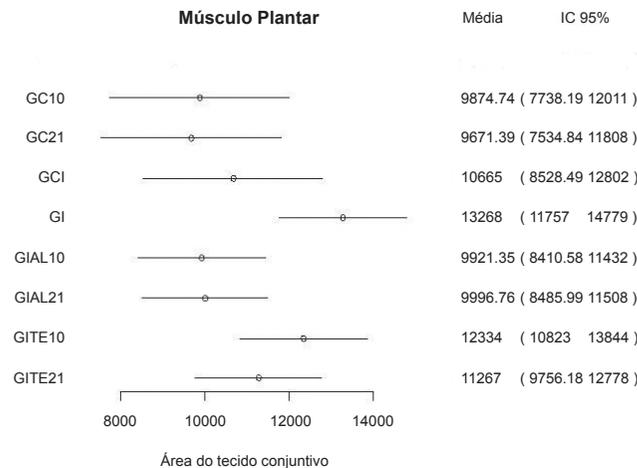


Figura 2. Médias da área do tecido conjuntivo com os respectivos intervalos de confiança de 95% do músculo plantar dos diferentes grupos estudados

Tabela 1. Média da área das fibras musculares dos grupos experimentais do músculo sóleo

Grupos	Área média das fibras musculares
GC ₁₀	2895,59 (2705,8 - 3085,38)
GC ₂₁	2718,56 (2529,11 - 2908,01)
GCI	2824,9 (263,51 - 3015,29)
GI	1470,59* (1293,81 - 1647,37)
GIAL ₁₀	2038,06# (1860,73 - 2215,4)
GIAL ₂₁	2356,79# (2178,97 - 2534,61)
GITE ₁₀	2361,4# [□] (2182,81 - 2539,99)
GITE ₂₁	2562,94# [◊] (2384,2 - 2741,68)

*p<0,001 quando comparado a GCI
 #p<0,001 quando comparado a GI
 □p<0,001 quando comparado a GIAL₁₀
 ◊p<0,001 quando comparado a GIAL₂₁

Tabela 2. Média da área das fibras musculares dos grupos experimentais do músculo plantar

Grupos	Área média das fibras musculares
GC ₁₀	1882,93 (1722,42 - 2043,43)
GC ₂₁	2001,59 (1840,77 - 2162,41)
GCI	1793,32 (1633,21 - 1953,44)
GI	1380,84* (1222,55 - 1539,14)
GIAL ₁₀	1607,74# (1449,43 - 1766,05)
GIAL ₂₁	1819,63# (1661,29 - 1977,98)
GITE ₁₀	1815,31# [□] (1656,94 - 1973,68)
GITE ₂₁	1922,38# [◊] (1763,99 - 2080,77)

*p<0,001 quando comparado a GCI
 #p<0,001 quando comparado a GI
 □p<0,001 quando comparado a GIAL₁₀
 ◊p<0,001 quando comparado a GIAL₂₁

DISCUSSÃO

Após períodos de imobilização em posição encurtada, ocorrem importantes adaptações, como atrofia muscular e alteração do tecido conjuntivo intramuscular^{1,3}. São poucos os estudos que buscaram investigar a resposta do tecido conjuntivo intramuscular diante de intervenções de desuso e reabilitação¹⁻⁴. Coutinho et al.¹⁴ observaram que, após imobilização por quatro semanas, ocorreu desorganização e redução do estado de agregação dos feixes de colágeno para o músculo sóleo.

Por outro lado, Järvinen et al.¹ e Józsa et al.²⁰ observaram aumento pronunciado do tecido conjuntivo nas regiões peri e endomisial no músculo sóleo de ratas após três e quatro semanas de imobilização gessada. Entretanto, Mattiello-Sverzut et al.²¹, também avaliando o músculo sóleo, não observaram alterações na área de tecido conjuntivo perimisial em animais adultos após 14 dias de imobilização gessada. Da mesma forma, Benedini-Elias et al.¹⁵ não encontraram diferença significativa na área do tecido conjuntivo perimisial após analisarem o músculo sóleo de ratas bebês submetidas a desuso durante 10 dias.

As divergências nos resultados diante da expressão de tecido conjuntivo perimisial desencadeada por imobilização parecem estar relacionadas ao tempo e ao tipo de restrição funcional. Soma-se a isso o fato de a composição do tecido conjuntivo perimisial ser majoritariamente colágeno tipo III e, como demonstrado por Cação-Benedini et al.⁶, o procedimento de imobilização aplicado por 10

dias não causar alterações quantitativas do colágeno tipo III quando comparado ao grupo controle. É sabido ainda que diferentes padrões de adaptações podem se manifestar no músculo esquelético nas diferentes fases da vida²², e estudos científicos discutem a síntese de colágeno em diferentes condições fisiológicas e experimentais. Karpakka et al.²³ observaram diminuição de marcadores da síntese de colágeno durante a redução da atividade muscular.

A imobilização determinou redução significativa da área média das fibras musculares em relação aos controles. Cação-Benedini et al.⁶ e Cornachione et al.¹² também observaram redução significativa do diâmetro das fibras do músculo sóleo após 10 dias de imobilização utilizando dispositivo idêntico e técnica de análise diferente. O treinamento físico adotado após situações de desuso determina regeneração muscular mediante um processo altamente estruturado e dependente da interação de fatores ligados à degeneração e regeneração tecidual⁵.

Elementos da matriz extracelular, anteriormente considerados apenas estruturais e passivos, desenvolvem papel fundamental na regeneração muscular pós-lesão, uma vez que a matriz extracelular libera fatores de crescimento para a sinalização celular necessária a esse processo⁵. A regulação da síntese de colágeno, um dos principais componentes da matriz extracelular, desenvolve o papel de cicatrização muscular, evitando seu excesso⁵. Por esse motivo, é importante a realização de estudos que analisem o comportamento dos elementos contráteis e não contráteis do músculo esquelético confrontando diferentes procedimentos terapêuticos pós-imobilização.

É sabido que alongamento e exercício excêntrico promovem adaptações musculares; Cornachione et al.²⁴ observaram melhora do trofismo dos músculos sóleo e tibial anterior, previamente submetido a desuso, após 21 dias de corrida em esteira em declive. Em relação ao alongamento mantido, não foram observados resultados satisfatórios para a área das fibras nos músculos estudados. Mattiello-Sverzut et al.²¹ demonstraram que o alongamento manual, por 10 dias consecutivos, sendo 10 séries de 15 segundos cada, não foi capaz de aumentar o diâmetro das fibras do músculo sóleo, em comparação ao grupo somente imobilizado. O programa de exercícios excêntricos realizado em declive por 21 dias promoveu a recuperação da área das fibras musculares dos músculos aqui estudados, apresentando características similares às observadas nas condições controle.

Em associação aos protocolos de reabilitação, os animais foram mantidos em gaiola, podendo caminhar livremente utilizando os quatro membros. A descarga de peso nos membros proporciona ao músculo uma carga mecânica tênsil, que, por sua vez, determina adaptações teciduais tróficas que refletem, sob a ótica morfológica, centralização nuclear, lesões em delta, *splitting* e lobulação de fibras⁶. Porém, alguns estudos mostram a inabilidade do exercício de alongamento em aumentar a área de secção transversa das fibras musculares¹⁸. Assim, neste estudo, o treino de marcha livre pode ter representado um estímulo adicional que favoreceu as adaptações observadas na área de secção transversa das fibras musculares, em especial no grupo alongado.

CONCLUSÃO

O tecido conjuntivo perimisial não sofre modificações quantitativas após 10 dias de imobilização associada ou não à reabilitação. O programa de treinamento excêntrico de apenas 10 dias restabelece a área das fibras musculares para o músculo plantar. O músculo sóleo requer maior período de reabilitação, 21 dias de treino excêntrico, para atingir suas características de base.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais ao professor doutor Luciano Neder, do Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e à professora doutora Anabelle Silva Cornachione pela colaboração no desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

1. Järvinen TH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles: an immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil.* [Internet]. 2002 [acesso em 10 out. 2013];23(3):245-54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12500904>
2. Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat.* [Internet]. 1988 [acesso em 10 out. 2013];158:109-14. Disponível em:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1261981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Kannus P, Jozsa L, Järvinen TL, Kvist M, Vieno T, Järvinen TA, et al. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol*. [Internet]. 1998 [acesso em 10 out. 2013];84(4):1418-24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516212>
 4. Kannus P, Jozsa L, Kvist M, Järvinen T, Järvinen M. Effects of immobilization and subsequent low and high-intensity exercise on morphology of rat calf muscles. *Scand J Med Sci Sports*. [Internet]. 1998 [acesso 10 out 2013];8(3):160-71. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0838.1998.tb00187.x/abstract>
 5. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo*. [Internet]. 2009 [acesso 10 out. 2013];23(5):779-96. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779115>
 6. Cação-Benedini LO, Ribeiro PG, Gomes AR, Ywazaki JL, Monte-Raso VV, Prado CM, et al. Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. *Acta Histochem*. [Internet]. 2013 jun [acesso 4 jul 2013];115(5):460-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265777>
 7. Coutinho EL, Gomes AR, França CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. [Internet]. 2004 dez [acesso 10 out. 2013];37(12):1853-61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558192>
 8. Weldon SM, Hill RH. The efficacy of stretching for prevention of exercise-related injury: a systematic review of the literature. *Man Ther*. [Internet]. 2003 ago [acesso 26 set 2013];8(3):141-50. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1356689X03000109>
 9. Kisner C, Colby LA. Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas. 3ª ed. São Paulo: Manole; 1998.
 10. Krentz JR, Farthing JP. Neural and morphological changes in response to a 20-day intense eccentric training protocol. *Eur J Appl Physiol*. [Internet]. 2010 set [acesso 18 set 2013];110(2):333-40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495928>
 11. Barroso R, Tricoli V, Ugrinowitsch C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. *R Bras Ci e Mov*. [Internet]. 2005 [acesso 10 out 2013];13(2):111-22. Disponível em: <http://portalrevistas.ucb.br/index.php/RBCM/article/viewFile/632/643..>
 12. Cornachione AS, Cação-Benedini LO, Chesca DL, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Effects of eccentric exercise in rehabilitation of phasis and tonic muscles after leg immobilization in rats. *Acta Histochem*. 2014;116(8):1216-24.
 13. Cornachione AS, Benedini-Elias PCO, Polizello JC, Carvalho LC, Mattiello-Sverzut AC. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochem Cytochem*. [Internet]. 2011 abr 28 [acesso 8 abr 2014];44(2):43-50. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 14. Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res*. [Internet]. 2002 nov [acesso 10 out. 2013];35(11):1329-32. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426632>
 15. Benedini-Elias PC, Morgan MC, Gomes ARS, Mattiello-Sverzut AC. Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat. *Anat Sci Int*. [Internet]. 2009 [acesso 12 out 2013];84:218-25. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12565-009-0016-3>
 16. Takekura H, Fujinami N, Nishizawa T, Ogasawara H, Kasuga N. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol*. [Internet]. 2001 [acesso 10 out. 2013];533(Pt 2):571-83. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2278631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 17. Hayward R, Ferrington DA, Kochanowski LA, Miller LM, Jaworsky GM, Schneider CM. Effects of dietary protein on enzyme activity following exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sport Exerc*. [Internet]. 1999 [acesso 10 out. 2013];31(3):414-20. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188746>
 18. Lynn R, Morgan DL. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. *J Appl Physiol*. [Internet]. 1994 [acesso 10 out. 2013];77(3):1439-44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836150>
 19. Gomes ARS, Cornachione A, Salvini TF, Mattiello-Sverzut AC. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. *J Anat*. [Internet]. 2007 mar [acesso 10 out 2013];210(3):328-35. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2100284&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 20. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue: a morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br*. [Internet]. 1990 [acesso 10 out. 2013];72(2):293-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2312572>
 21. Mattiello-Sverzut AC, Carvalho LC, Cornachione A, Nagashima M, Neder L, Shimano AC. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. *Histol Histopathol*. [Internet]. 2006 set [acesso 10 out. 2013];21(9):957-64. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763945>
 22. Alnaqeeb MA, AlZaid NS, Goldspink G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. *J Anat*. [Internet]. 1984 dez [acesso 10 out. 2013];139(Pt 4):677-89. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1164979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 23. Karpakka J, Virtanen P, Väänänen K, Orava S, Takala TE. Collagen synthesis in rat skeletal muscle during immobilization and remobilization. *J Appl Physiol*. 1991;70(4):1775-80.
 24. Cornachione A, Cação-Benedini LO, Shimano MM, Volpon JB, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. *Scand J Med Sci Sports*. [Internet]. 2008 [acesso 12 out 2013];18(4):453-61. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0838.2007.00720.x/full>