

Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica

Effects of short-term joint immobilization in rats hindlimb muscle: metabolic and morphometrical analysis

título condensado: Metabolismo e morfometria muscular na imobilização

João Luiz Quagliotti Durigan¹, Karina Maria Cancelliero², Carolina Náglio Kalil Dias³, Carlos Alberto da Silva⁴, Rinaldo Roberto de Jesus Guirro⁴, Maria Luiza Ozores Polacow⁴

¹ Fisioterapeuta; doutorando em Ciências Fisiológicas na UFSCar (Universidade Federal de São Carlos)

² Fisioterapeuta; doutoranda em Fisioterapia na UFSCar

³ Fisioterapeuta; mestranda em Fisioterapia na UFSCar

⁴ Profs. Drs. do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Unimep (Universidade Metodista de Piracicaba)

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Karina Maria Cancelliero

R. Gomes Carneiro 875 Centro

13400-530 Piracicaba SP

e-mail: karca@terra.com.br

Apresentação: jul. 2005

Aceito para publicação: abr. 2006

RESUMO

Este estudo visou avaliar o efeito da imobilização aguda (três dias) dos músculos da pata posterior de ratos sobre o perfil metabólico e morfométrico. Dez ratos Wistar foram divididos em dois grupos (n=5 cada), controle e o grupo dos que tiveram uma pata posterior imobilizada com órtese de resina acrílica em posição neutra de tornozelo durante três dias. Após esse prazo, foram avaliados: conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo (S), extensor longo dos dedos (ELD), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV) e tibial anterior (TA), peso, área das fibras e tecido conjuntivo intramuscular do sóleo. Os dados coletados foram submetidos a análise estatística com índice de significância fixado em $p < 0,05$. A imobilização não promoveu alterações significativas ($p > 0,05$) nas reservas de glicogênio do músculo sóleo e no GV; houve porém redução significativa de 26% no GB, 40% no ELD e 36% no TA. Além disso, a imobilização não promoveu redução significativa do peso muscular do sóleo. A análise morfométrica mostrou redução significativa de 31% na área das fibras do sóleo e aumento significativo de 279% na densidade do tecido conjuntivo intramuscular. Conclui-se que as alterações morfométricas são evidenciadas já na fase aguda da imobilização, antecedendo as metabólicas e a do peso do sóleo. Isso leva a ressaltar a importância da intervenção fisioterapêutica durante a fase aguda da imobilização, para minimizar alterações musculoesqueléticas também observadas a longo prazo.

Descritores: Imobilização /aguda; Músculo esquelético/ metabolismo/ morfometria

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of acute (three-day) immobilization in rats hindlimb muscles onto the metabolic and morphologic profile. Ten Wistar rats were divided into two groups (n=5 each): control group and that of immobilized limb with acrylic resin orthosis in ankle neutral position during three days. After this period, analyses made were: glycogen reserves of the soleus muscle (S), extensor digitorum longus (EDL), white gastrocnemius (WB), red gastrocnemius (RG) and tibialis anterior (TA), soleus weight, fiber area, and intramuscular connective tissue. Data were statistically treated, with significance set at $p < 0,05$. Immobilization did not promote significant alterations in S glycogen reserves and in RG; however, there was significant reduction (of 26%) in the WG, 40% in ELD and 36% in TA. Moreover, immobilization did not promote significant reduction in S weight. The morphometric analysis showed significant reduction of the S fiber area in 31%, as well as significant increase (of 279%) in intramuscular connective tissue. It may thus be said that morphologic alterations take place *during* the immobilization acute phase, preceding S weight and metabolic changes. These data highlight the importance of early physical therapy intervention during the short-term immobilization phase, aiming at minimizing skeletal muscle alterations also observed in the long term.

Key words: Immobilization /short-term; Muscle, skeletal / metabolism / morphometry

INTRODUÇÃO

A imobilização é freqüentemente utilizada para o tratamento de distúrbios ortopédicos, apesar de induzir efeitos deletérios como hipotrofia muscular, proliferação do tecido conjuntivo, redução de extensibilidade, força e resistência muscular¹⁻⁴.

O desuso muscular induz proliferação do tecido conjuntivo intramuscular tanto no perímio quanto no endomímio, além de induzir aumento da renovação (*turnover*) do colágeno no tecido conjuntivo⁵⁻⁸. Simultaneamente, ocorre redução na área das fibras musculares, bem como na densidade dos capilares^{9,10}. A homeostasia metabólica das fibras musculares também pode ser comprometida pelo desuso muscular, induzindo ao quadro de resistência à insulina e a um estado catabólico nos músculos esqueléticos afetados de humanos⁴.

Historicamente, vários modelos experimentais foram desenvolvidos para determinar as mudanças que ocorrem no músculo após um período de imobilização. Técnicas invasivas como desnervação, tenotomia, fixação da articulação por meio de pinos, bem como as não-invasivas, como imobilização por órteses de gesso, de resina acrílica, de tecido de algodão, suspensão do corpo e repouso em leito, fornecem a base científica para o conhecimento das alterações provocadas pelo desuso muscular^{11,12}.

Além dos diversos modelos utilizados para o estudo do desuso muscular, outros fatores se diferenciam como o tipo de fibra muscular analisada, a posição articular, o material utilizado para a confecção do dispositivo e, ainda, o período de imobilização.

A literatura apresenta vários trabalhos que utilizaram diferentes períodos de desuso muscular. Em 1998, Thompson *et al.*¹³ observaram os efeitos da suspensão na função dos músculos sóleo e gastrocnêmio, relatando redução de peso em 19% no sóleo e 13% no gastrocnêmio após uma semana de desuso. Mercier *et al.*¹⁴ estudaram a suspensão após 21 dias e observaram uma redução de 40% no peso do músculo sóleo e 18% no músculo extensor longo dos dedos. Em 2004, Kourtidou-Papadeli *et al.*¹⁵ relataram redução do peso muscular de 33,87% no sóleo e 15,08% no extensor longo dos dedos durante um período de 45 dias de imobilização. Assim, pode-se observar nos diversos estudos que, em um mesmo modelo, há diferentes respostas teciduais, decorrentes das variações do tempo de desuso.

Alguns autores sugerem que a maioria das mudanças ocorre nos primeiros sete dias^{7,8,16}. Outros trabalhos apontam evidências que, antes de um período de quatro dias de desuso, já existem alterações no peso e área das fibras musculares^{5,17-19}.

A manutenção do peso muscular é controlada por um balanço na síntese e na degradação das proteínas intramusculares. Nesse sentido, alguns trabalhos relatam que a síntese proteica decresce rapidamente nas primeiras horas de desuso muscular^{20,21}. Na mesma linha de pesquisa, Williams e Goldspink⁸ demonstraram que as alterações na proliferação do tecido conjuntivo são evidenciadas precocemente no músculo sóleo imobilizado em posição encurtada, já que apenas dois dias após a imobilização houve rápido aumento na quantidade de tecido conjuntivo no perímio.

Diante dessas observações, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da imobilização aguda (três dias) por órtese (de resina acrílica) em músculos de membro posterior de ratos sobre o perfil metabólico e morfométrico.

METODOLOGIA

Ratos Wistar (3 a 4 meses, 250-300g) foram mantidos em condições controladas de biotério, recebendo água e ração *ad libitum* e tratados segundo recomendações do *Guide for care use of laboratory animals*²². A caixa, contendo três animais, tinha a dimensão de 40x30cm e foi forrada com jornal, já que a serragem poderia entrar no compartimento interno da órtese, podendo provocar lesões cutâneas. Os animais foram divididos em dois grupos (n=5 cada): controle (GC) e imobilizado durante três dias (GI).

Para a imobilização, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg peso) e o membro posterior esquerdo imobilizado com o modelo de resina acrílica, o qual foi adaptado no membro posterior dos ratos, associado a uma cinta de PVC (diâmetro 40mm) revestida com látex, a dois rotadores laterais (15 mm de extensão), os quais permitiram sua movimentação¹¹(Figura 1a). O conjunto, com aproximadamente $22,72 \pm 2,25$ (média $\pm$ dp) gramas não interferiu na deambulação do animal, havendo descarga de peso no membro imobilizado durante a deambulação (Figura 1b).

inserir Figura 1- p.f.substituir A e B maiúsculas por a e b minúsculas

Figura 1 a: órtese em posição neutra do tornozelo constituída do modelo de resina acrílica (1), rotadores laterais (2) e cinta abdominal (3). **b:** adaptação da órtese no membro posterior esquerdo, mantendo a articulação do tornozelo em posição neutra

Após o período experimental, foram avaliados: conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo (S), extensor longo dos dedos (ELD), gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV) e tibial anterior (TA), peso do sóleo, área das fibras e tecido conjuntivo intramuscular do sóleo.

Para a determinação do glicogênio muscular seguiu-se o protocolo descrito por Siu *et al.*²³, que consiste na digestão das amostras musculares em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado pela passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol. Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

Para a análise morfométrica do sóleo, o segmento ventral foi fixado e tamponado em solução de formol a 10%. O material foi processado em parafina obtendo-se vários cortes transversais não-seriados de 7 μ m de espessura, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Foi utilizado um sistema de análise de imagens constituído do *software* Image Pro-plus 4.0 (Media Cybernects), câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram obtidas com objetiva de 10x.

Foram analisadas as áreas de 375 fibras do músculo sóleo por animal, assim escolhidos: 15 fibras por área, sendo 5 áreas por corte, num total de 5 cortes por animal. Utilizou-se um retículo quadriculado para a escolha de 15 fibras por corte, aleatoriamente, que coincidiam com as interseções de retas. Para a análise da densidade do tecido conjuntivo intramuscular foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos proposto por Mathieu *et al.*²⁴ e a quantificação foi realizada por meio de um retículo com quadrados de 2.500 μ m² contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal, perfazendo um total de 1.400 pontos por

animal. Desse modo, a área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) pelo número total de pontos.

Apesar de cinco músculos do membro posterior serem escolhidos para a análise metabólica, o sóleo foi o escolhido para a morfométrica por ser o músculo que apresenta maior grau de atrofia segundo a literatura, devido ao fato de ser predominantemente composto de fibras tipo I, ou seja, fibras posturais, além de uniarticular^{1, 25-27}.

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis peso muscular e glicogênio, que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student. Para as variáveis área das fibras musculares e densidade do tecido conjuntivo foi utilizado o teste das ordens assinaladas de Wilcoxon, já que as mesmas não apresentaram distribuição normal. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A imobilização do membro posterior durante três dias não promoveu alterações significativas ($p > 0,05$) nas reservas de glicogênio do músculo sóleo e no GV, conforme mostra a Tabela 1. Por outro lado, houve redução significativa ($p < 0,05$) de 26% no GB, 40% no ELD e 36% no TA. Vale destacar que a imobilização não promoveu redução significativa ($p > 0,05$) no peso muscular do sóleo (GC: $123,5 \pm 5,28$; GI: $127,2 \pm 13,59$).

Tabela 1 Concentração (média $\pm$ dp) de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco (GB), gastrocnêmio vermelho (GV), extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) nos grupos controle (GC) e imobilizado (GI)

Grupos	S	GB	GV	ELD	TA
GC	$0,37 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,08$
GI	$0,35 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,03^*$	$0,37 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,05^*$	$0,22 \pm 0,02^*$

n=5; $p < 0,05$; *comparado ao C

Quanto à análise morfométrica, a imobilização promoveu redução significativa ($p < 0,05$) da área das fibras do músculo sóleo em 31% (Tabela 2), bem como aumento significativo ($p < 0,05$) da densidade do tecido conjuntivo intramuscular em 279% em relação ao grupo controle, conforme mostram a Tabela 3 e a Figura 2.

Tabela 2 Mediana da área das fibras (μm^2) do sóleo nos grupos controle (GC) e imobilizado (GI)

Grupos	1º Quartil	Mediana	3º Quartil
GC	2180,23	2496,13	2878,66
GI	1382,704	1733,59 *	2099,445

n=5; $p < 0,05$; *comparado ao C

Tabela 3 Mediana da densidade de área (%) do tecido conjuntivo dos grupos controle (GC) e imobilizado (GI)

Grupos	1º Quartil	Mediana	3º Quartil
GC	7,14	8,93	10,71
GI	26,79	33,93 *	41,07

n=5; $p < 0,05$; *comparado ao C

inserir Figura 2 por aqui - idem A e B por a e b

Figura 2 **a:** imagem das fibras do sóleo do grupo controle. **b:** imagem do sóleo do grupo imobilizado. Nota-se redução da área das fibras musculares (*) e aumento do tecido conjuntivo em relação ao grupo controle (⇒)

DISCUSSÃO

A imobilização muscular, condição freqüente na prática clínica da fisioterapia, pode comprometer a homeostasia metabólica das fibras musculares, além de causar hipotrofia muscular, alterações do tecido conjuntivo, redução das reservas de glicogênio, da creatina quinase, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga²¹.

Tem sido observado que a maior vulnerabilidade das fibras musculares lentas (tipo I) é devido a diferenças de metabolismo, quando comparadas às fibras musculares rápidas (tipo II), sendo que a imobilização parece ter efeitos diferentes na síntese protéica dos diferentes tipos de fibras musculares²⁵. Nesse sentido, foi observado que as enzimas oxidativas respondem por meio da diminuição de sua atividade durante a imobilização, sugerindo que as fibras musculares que têm metabolismo predominantemente oxidativo (tipo I) são as mais susceptíveis à atrofia muscular¹.

Além da susceptibilidade à atrofia inerente ao metabolismo das fibras tipo I, outro fator que determina essa condição são as características de fibras posturais. Nesse sentido, Ploug *et al.*²⁷ relacionaram a maior susceptibilidade do sóleo à atrofia por inatividade devido a ser este um músculo postural e ter uma atividade basal maior do que os não-posturais. Esses estudos corroboram a afirmação de Lieber²⁶, reforçando o que a literatura relata, de que os músculos considerados antigravitacionais, os uniarticulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas são os mais vulneráveis à atrofia induzida pelo desuso muscular.

Sendo assim, o músculo sóleo, predominantemente composto por fibras tipo I, foi o escolhido para a análise morfométrica devido a sua maior susceptibilidade à atrofia muscular inerente ao desuso. A análise do conteúdo de glicogênio também foi realizada nesse músculo, além dos demais que compõem o tríceps sural e o compartimento anterior do membro inferior.

Com relação ao peso do músculo sóleo, não foi observada redução significativa, nem de suas reservas de glicogênio. Por outro lado, ocorreu redução significativa na área da fibra, além do aumento do tecido conjuntivo. Apesar de neste estudo não se revelarem alterações no conteúdo de glicogênio e no peso do sóleo no período de três dias, em estudo anterior¹¹ já relatamos alterações metabólicas e morfológicas em músculos submetidos a sete dias de imobilização articular, sugerindo-se que o estímulo agudo de imobilização no presente estudo não foi suficiente para promover alterações metabólicas ou no peso do músculo sóleo.

Outros estudos também demonstraram que a maioria das mudanças no sistema musculoesquelético ocorre nos primeiros sete dias de desuso muscular^{7,8,16}. Apesar de existir um consenso na literatura sobre as alterações mais evidentes no período de sete dias, este trabalho observou modificações nos parâmetros morfométricos no sóleo mesmo no período de três dias, além do comprometimento metabólico dos outros músculos, como GB, TA e ELD. Vale destacar que o sóleo e o GV, de fibras tipo I, não reduziram suas reservas de glicogênio, diferentemente dos outros músculos,

predominantemente compostos de fibras tipo II. Isso pode ser justificado pela diferença de metabolismo nas fibras de tipos I e II, já que as fibras tipo I têm metabolismo do tipo oxidativo e as do tipo II metabolismo predominantemente glicolítico. As fibras oxidativas obtêm energia por meio de várias reservas como os ácidos graxos livres, fosfocreatina e glicogênio. Por outro lado, as fibras de metabolismo glicolítico mobilizam energia principalmente por meio da glicogenólise²⁸.

Nesse sentido, possivelmente ocorreu redução do conteúdo de glicogênio nas fibras do tipo II por ser este utilizado como principal substrato para obtenção de energia, fato não observado para as fibras tipo I. No estudo de Silva *et al.*¹¹, observou-se que sete dias de imobilização foram suficientes para a redução das reservas de glicogênio tanto nas fibras tipo I quanto nas tipo II, sugerindo que o tempo de desuso muscular pode ser um fator determinante para essa resposta.

De maneira geral, a imobilização por diferentes períodos resulta em atrofia variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados e das fibras avaliadas²². Gomes *et al.*⁹ observaram redução de 43% da área da fibra do músculo sóleo imobilizado durante três semanas. Kannus *et al.*¹⁰ relataram redução de 69% da área da fibra do músculo sóleo imobilizado por meio de aparelho gessado durante três semanas.

Outros trabalhos efetuaram a avaliação dos efeitos da imobilização aguda no comprometimento do sistema musculoesquelético. Williams e Goldspink⁸ imobilizaram a articulação do tornozelo em posição encurtada e alongada durante duas semanas e não observaram alterações no diâmetro da fibras do músculo sóleo após dois dias de imobilização. Por outro lado, Smith *et al.*¹⁹ avaliaram o sóleo de coelhos no segundo e sexto dia após imobilização em posição encurtada e observaram redução no peso muscular (15%), bem como na área de secção transversa (16%) em apenas dois dias de imobilização, sendo que a redução foi mais significativa no sexto dia. Outros autores também relataram redução (19%) do peso muscular do sóleo de ratos após quatro dias de imobilização¹⁸.

Resultados semelhantes foram descritos por Ahtikoski *et al.*⁵, que estudaram a imobilização articular durante três dias em ratos e observaram redução de 20% do peso do músculo sóleo em posição encurtada e 17% em posição alongada. Bodine *et al.*¹⁷ compararam o peso do gastrocnêmio de ratos em três modelos de desuso (imobilização, suspensão e denervação). Concluíram que já nos primeiros três dias de desuso ocorreu redução de aproximadamente 10% do peso muscular nos três modelos estudados.

A redução da área das fibras, bem como do peso do músculo sóleo ocorre pelas modificações no balanço da síntese e degradação protéica, já evidenciada nas fases iniciais do desuso muscular. Nesse sentido, Booth e Sneider²⁰ demonstram que ocorre redução na síntese protéica de 37% já nas primeiras 6 horas de imobilização. Ainda foi observada, nas primeiras 24 horas de suspensão, redução de 50% na síntese de proteínas do músculo sóleo de ratos²¹. Esses trabalhos corroboram os resultados deste estudo, já que foi observada redução de 31% na área das fibras do músculo sóleo imobilizados durante 3 dias.

Em relação à densidade de área do tecido conjuntivo do músculo sóleo, os resultados do presente estudo são semelhantes aos de outros pesquisadores que

demonstraram aumento da densidade na condição de imobilização. Nesse contexto, Williams e Goldspink⁸ observaram que, em apenas dois dias de imobilização na posição encurtada, o sóleo apresentou aumento na quantidade de tecido conjuntivo no perímio. Ainda foi constatado que as fibras de colágeno do perímio apresentavam um ângulo de fixação mais agudo do que o observado nos músculos normais, com conseqüente diminuição da elasticidade muscular e aumento da tensão passiva. Outros autores relataram redução da concentração do colágeno tipo IV no músculo sóleo de ratos após três dias de imobilização em posição encurtada e alongada em ratos⁵.

Para Józsa *et al.*³, independente do modelo de desuso muscular estudado (imobilização, tenotomia ou denervação), a quantidade de tecido conjuntivo intramuscular aumenta significativamente, variando de 50% a até 700%. Além disso, outros autores demonstraram que o aumento da densidade do tecido conjuntivo ocorre no endomísio e perímio¹⁰. Também foi relatado que durante a imobilização ocorre aumento do *turnover* do colágeno no tecido conjuntivo exposto à imobilização⁸. Segundo Amiel *et al.*²¹, a falta de forças fisiológicas atuando sobre o colágeno durante o desuso muscular impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas que são responsáveis pela fibrose.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as alterações morfológicas já são evidenciadas na fase aguda da imobilização, antecedendo as alterações no glicogênio e de peso do músculo sóleo. Por outro lado, os demais músculos predominantemente compostos de fibras tipo II apresentaram alterações nas reservas glicogênicas. Vale pois ressaltar a importância da intervenção fisioterapêutica durante a fase precoce da imobilização, visando minimizar as alterações musculoesqueléticas também observadas a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- 1 Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization. *Sports Med.* 1990;7:42-58.
- 2 Caiozzo VJ, Green S. Breakout session 3: issues related to muscle growth, atrophy, and tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;403:252-61.
- 3 Józsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg.* 1990;72:293-7.
- 4 Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2001;24:893-9.
- 5 Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Ristel J, Takala TE. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physio Scand.* 2003;177:473-81.
- 6 Amiel D, Woo SLY, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scand.* 1982;53:325-32.
- 7 Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat muscle. *J Microsc.* 2004;25:159-66.
- 8 Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat.* 1984;138:343-50.
- 9 Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:1473-80.

- 10 Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TA, et al. Free mobilization and low-to-high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol*. 1998;84:1418-24.
 - 11 Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthoses with acrylic resin model. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39: (in press).
 - 12 Musacchia XJ, Stefen JM, Fell RD. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. *Exerc Sport Sci Rev*. 1988;16:61-87.
 - 13 Thompson LV, Johnson SA, Shoeman JA. Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. *J Appl Physiol*. 1998;84:1937-42.
 - 14 Mercier C, Jobin J, Lépine C, Simard C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. *Mech Ageing Dev*. 1999;106:305-20.
 - 15 Kourtidou-Papadeli C, Kyparos A, Albani M, Frossinis A. Electrophysiological, histochemical, and hormonal adaptation of rat muscle after prolonged hindlimb suspension. *Acta Astronaut*. 2004;54:737-47.
 - 16 Józsa L, Thoring J, Jarvinen M, Kannus P, Lehto M, Kvist M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol*. 1988;49:267-78.
 - 17 Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23; 294(5547):1704-8.
 - 18 Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, Hori S, Itokawa Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*. 1993;265:839-44.
 - 19 Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ. Nuclear DNA fragmentation and morphological alteration in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res*. 2000;302:235-41.
 - 20 Booth FW, Seider MJ. Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J Appl Physiol*. 1979;47:974-7.
 - 21 Taillandier D, Aurousseau E, Combaret L, Guezennec CY, Attaix D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:665-75.
 - 22 National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.
 - 23 Siu LO, Rousseau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28:234-6.
 - 24 Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*. 1981;121:75-88.
 - 25 Heslinga HJ, Kronnie G, Huijing PA. Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995;70:49-57.
 - 26 Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation. 3rd.ed. Philadelphia: Lippincott; 2001.
 - 27 Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo, H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1995;268:980-6.
 - 28 Zierath JR, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol*. 2004;10:337-48.
 - 29 Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*. 1997;78:512-7.
- Agradecimento ao apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).