

CURTO PERÍODO DE IMOBILIZAÇÃO PROVOCA ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS E MECÂNICAS NO MÚSCULO DE RATO

LIMA SC¹, CAIERÃO QM¹, DURIGAN JLQ¹, SCHWARZENBECK A², SILVA CA^{1,2}, MINAMOTO VB^{1,2} E GUIRRO RRJ^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, SP – Brasil

² Curso de Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, SP – Brasil

Correspondência para: Prof. Dr. Rinaldo Roberto Guirro, Universidade Metodista de Piracicaba, Curso de Mestrado em Fisioterapia, Bloco 7, Sala 46, Rod. do Açúcar Km 156, Taquaral, CEP 13400-911, Piracicaba, SP – Brasil,
e-mail: rjguirro@unimep.br

Recebido: 11/09/2006 - Revisado: 10/04/2007 - Aceito: 18/06/2007

RESUMO

Objetivo: Analisar as características morfométricas e mecânicas dos músculos sóleo e gastrocnêmio após imobilização na posição de encurtamento. **Método:** 20 ratos Wistar (250 ± 20 g) foram distribuídos igualmente em grupos imobilizado e controle. A imobilização foi realizada no membro posterior esquerdo por meio de órtese de resina acrílica, com a articulação do tornozelo em flexão plantar máxima. Após 7 dias da imobilização, a massa muscular, número e comprimento de sarcômeros em série, área das fibras musculares, densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular e força máxima de ruptura do tríceps sural foram avaliados. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** O músculo sóleo imobilizado apresentou alterações em todas as variáveis morfométricas analisadas, enquanto que, no músculo gastrocnêmio, algumas adaptações não foram observadas. Na análise do ensaio de tração, o grupo imobilizado apresentou redução de 20% na força máxima de ruptura muscular. **Conclusão:** Os resultados deste estudo revelaram que curto período de imobilização promove alterações nos parâmetros morfométricos das fibras musculares, com repercussões na mecânica muscular. Tais resultados permitem sugerir a necessidade da reabilitação em músculos submetidos à imobilização, mesmo a curto prazo, para que a mesma possibilite o retorno precoce das características musculares normais.

Palavras-chave: imobilização; músculo esquelético; ensaio mecânico; morfometria.

ABSTRACT

Short-term immobilization causes morphometric and mechanical alterations in rat muscles

Objective: to analyze the morphometric and mechanical characteristics of the soleus and gastrocnemius muscles after immobilization in a shortened position. **Methods:** 20 Wistar rats (250 ± 20 g) were divided equally into immobilized and control groups. The left hind limb was immobilized by means of an acrylic resin orthosis, with the ankle joint at maximum plantar flexion. After seven days of immobilization, the muscle mass, number and length of sarcomeres in series, muscle fiber cross-sectional area, density of the intramuscular connective tissue area and tensile strength of the triceps surae muscle were evaluated. The data were analyzed by the ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). **Results:** The immobilized soleus muscle presented changes in all the morphometric variables analyzed, while some of these changes were not observed in the gastrocnemius muscle. Analysis of the traction test showed that the immobilized group presented a 20% decrease in the maximum tensile muscle strength. **Conclusion:** The results from this study showed that short-term immobilization causes changes to the morphometric parameters of the muscle fibers, with repercussions on muscle mechanics. These results suggest the need for rehabilitation of muscles subjected to immobilization, even if only for a short period, in order to achieve early recovery of normal muscle characteristics.

Key words: immobilization; skeletal muscle; mechanical test; morphometry.

INTRODUÇÃO

O tecido muscular possui notável capacidade para adaptação estrutural e funcional frente a diversos estímulos. Um desses estímulos é a imobilização, procedimento comumente utilizado como forma de tratamento nas lesões musculoesqueléticas.

Vários são os efeitos da imobilização no músculo esquelético, destacando-se a redução da reserva de glicogênio muscular, proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, atrofia muscular, alteração do número de sarcômeros em série e diminuição da força muscular¹⁻⁵. Além disso, também foram relatadas modificações nas propriedades mecânicas do sistema músculo esquelético submetido à restrição de movimento^{6,7}.

As adaptações musculares em resposta à imobilização são influenciadas pela posição em que o músculo é imobilizado. De maneira geral, a posição de encurtamento é a que provoca maiores adaptações do tecido, quando comparada à posição neutra ou de alongamento^{8,9}. Além da posição articular, as adaptações ocorridas após imobilização dependem do músculo envolvido, sendo os oxidativos mais afetados do que os glicolíticos^{9,10}.

Trabalhos prévios mostraram aumento da proliferação de tecido conjuntivo, redução do comprimento da fibra, atrofia muscular e diminuição das propriedades mecânicas musculares após duas ou três semanas da imobilização em posição de encurtamento^{4,7,11}. Por outro lado, há estudos que mostram que algumas dessas adaptações já podem ser observadas entre 1 e 7 dias^{6,12}.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se somente 1 semana de imobilização é suficiente para provocar adaptações de sarcômero e na morfometria das fibras do sóleo e do gastrocnêmio, assim como alteração na propriedade mecânica do músculo tríceps sural.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos

Foram utilizados 20 ratos *Wistar*, com peso corporal de 250 ± 20 g, mantidos em biotério em condições controladas com ciclo claro-escuro de 12 horas, sob temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com livre acesso à água e à ração. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (parecer nº 15/06). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: imobilizado ($n=10$) e controle ($n=10$), sendo que 5 animais de cada grupo foram utilizados para o ensaio mecânico e 5 para a análise dos músculos sóleo e gastrocnêmio. Para os procedimentos de imobilização articular e retirada dos músculos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (50mg/mL) e cloridrato de tiazina (2g/100mL), na proporção de 1:1, em dose de 0.1 mL/100g de peso corporal. Todos os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical.

Procedimento para imobilização articular

Posteriormente à anestesia, os animais foram submetidos à imobilização do membro posterior esquerdo, utilizando-se modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al.¹³ Os animais foram imobilizados durante 7 dias, com os músculos sóleo e gastrocnêmio mantidos em posição de encurtamento, com flexão máxima de tornozelo, com aproximadamente 170° .

Procedimento para ensaio mecânico de tração

Após o sacrifício dos animais, o membro posterior esquerdo dos mesmos foram dissecados e desarticulados do coxofemoral. As características mecânicas do músculo tríceps sural foram analisadas por ensaio mecânico de tração na máquina universal de ensaio DL 2000 (EMIC - Brasil). Para isso, os ossos tibial e fibular foram removidos, e os músculos sóleo e gastrocnêmio posicionados longitudinalmente em um dispositivo confeccionado para a fixação do fêmur e do calcâneo (Figura 1). Os ensaios foram padronizados com pré-tensão inicial de 0,15N, sendo a velocidade de tração de 5 milímetros por minuto, com as medidas realizadas a cada 0,5 milímetro.

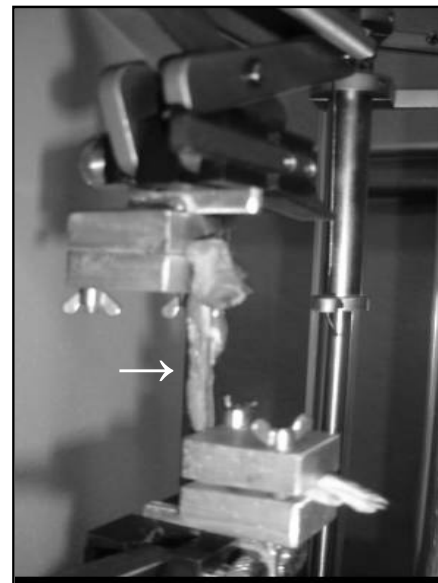


Figura 1. Vista lateral do ensaio de tração com destaque para o ponto de ruptura do músculo (seta).

Análise morfométrica

Os animais previamente anestesiados tiveram os músculos sóleo e gastrocnêmio retirados, pesados e divididos longitudinalmente em duas partes, uma para avaliação morfométrica (análise de densidade de área de tecido conjuntivo e área de secção transversa das fibras) e a outra para análise das adaptações de sarcômeros (número e comprimento de sarcômeros). Para a análise morfométrica, o ventre muscular de cada músculo selecionado foi preso com alfinetes em placas de cortiça, sendo congelados por

imersão em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Cortes de 12 μm de espessura foram obtidos em micrótomo criostato 300 (ANCAP - Brasil) e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). O melhor corte histológico, livre de artefatos e vasos sangüíneos, foi escolhido e fotografado com objetiva de 20x em toda a sua extensão. As imagens foram obtidas por um microscópio óptico BX-41 (Olympus - Japão) acoplado à câmera digital C5050 (Olympus - Japão), sendo a densidade de área de tecido conjuntivo mensurada por planimetria por contagem de pontos¹⁴, utilizando o software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics - USA). A área de secção transversa (AST) de aproximadamente 200 fibras/músculo foi mensurada utilizando-se o software Motic Image Advanced 3.2 (Motic Instruments - Canadá).

Para a análise das adaptações de sarcômeros, os músculos foram presos com alfinete em placas de cortiça em posição de repouso e fixados por 3 horas em 2,5% de glutaraldeído. Após esse período, as amostras foram colocadas em ácido nítrico a 30% por 3 dias, sendo posteriormente mantidas em glicerol a 50% até o momento da análise¹⁵. Todos os músculos tiveram seus comprimentos obtidos por meio de paquímetro. Para mensuração do número de sarcômeros, foram retiradas 5 fibras de cada músculo e fotografados 6 campos/fibra. De cada campo foi contado o número de sarcômeros ao longo de 50 μm , somando uma distância de 300 μm /fibra. Todas as imagens foram captadas com objetiva de 100x. O número total de sarcômeros em cada fibra muscular foi determinado por correlação entre o número de sarcômeros identificados em uma distância de 300 μm e o comprimento total do músculo¹⁶, e o comprimento médio de cada sarcômero foi obtido pela divisão do comprimento muscular pelo número de sarcômeros.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Após a observação de que as variáveis contemplaram a metodologia paramétrica, foram utilizados a ANOVA e o teste F, sendo que, quando a diferença apresentada era significativa, aplicou-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas. Para todos os cálculos, foi estabelecido nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O músculo sóleo imobilizado apresentou redução de 35% da massa muscular e 21% do número de sarcômeros em série quando comparado ao controle ($p < 0,05$; Tabela 1). O gastrocnêmio imobilizado apresentou redução somente no número de sarcômeros, sendo essa de 10% em relação ao músculo controle ($p < 0,05$; Tabela 1). Em relação ao comprimento dos sarcômeros, foi observado aumento de 5 a 6% para os músculos gastrocnêmio e sóleo imobilizados, respectivamente, quando comparados aos respectivos controles

($p < 0,05$; Tabela 1). No comprimento do músculo, apenas o sóleo apresentou redução de 16% em relação ao controle ($p < 0,05$; Tabela 1).

Os músculos sóleo e gastrocnêmio imobilizados apresentaram redução da AST em torno de 13%, e aumento da densidade de área de tecido conjuntivo de 50% e 132%, respectivamente, quando comparados aos músculos controles ($p < 0,05$; Tabela 1 e Figura 2).

A análise do ensaio de tração não permitiu avaliar o comportamento dos músculos sóleo e gastrocnêmio separadamente, mas do tríceps sural como um todo. Os resultados demonstram redução de 20% para a força máxima de ruptura no grupo imobilizado, quando comparado ao controle ($p < 0,05$, Tabela 1). O local da ocorrência de ruptura de todos os músculos foi na porção média do ventre muscular.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o curto período de imobilização, apenas 1 semana, é suficiente para promover importantes adaptações de sarcômero e alterações na morfometria e mecânica dos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos. No entanto, é importante considerar que, embora as variáveis analisadas apresentem coerência entre elas, os resultados apresentados devem ser considerados com cautela devido ao pequeno número da amostra (5 animais/grupo).

Conhecer as propriedades elásticas de um tecido é de importância para os profissionais de reabilitação, pois este conhecimento auxilia no diagnóstico, tratamento e prevenção de lesões esportivas e ortopédicas. O ensaio de tração é muito utilizado como forma de estudo dessas propriedades, sendo que o mesmo é de fácil execução e permite reprodutibilidade dos resultados.

Entre os tecidos biológicos estudados por ensaio de tração destacam-se o tendão¹⁷, ligamento^{17,18} e músculo^{6,7,19}. Diferente do tendão, que é capaz de suportar altas tensões sem perda da integridade de suas fibras, o músculo esquelético, quando submetido à altas tensões, responde com rompimento de suas fibras.

Os estudos de ensaio mecânico de tração muscular focam, basicamente, a influência de estímulos como a imobilização nas propriedades mecânicas dos músculos. Sabe-se que a imobilização altera a propriedade elástica do músculo, fazendo com que o mesmo sofra ruptura de suas fibras com a aplicação de menor força^{6,7,19}.

Segundo Jarvinen¹⁹, os pontos de ruptura do músculo gastrocnêmio, quando submetido a ensaio de tração, variaram muito pouco, sendo que, em 94% dos músculos, a ruptura ocorreu no ventre muscular. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com esses achados, uma vez que o local de ruptura muscular, em todos os músculos avaliados, foi na porção média do ventre. Uma das hipóteses para a susceptibilidade de lesão na região ventral é que essa apresenta maior concentração de tecido muscular do que de

Tabela 1. Média \pm intervalo de confiança das variáveis de todos os grupos experimentais.

Variáveis	SC	GC	SI	GI
Massa muscular (mg)	120 \pm 4,5	641 \pm 69,9	78 \pm 5,5*	599 \pm 48,3
Número de sarcômeros	7181 \pm 679	12132 \pm 514	5684 \pm 772*	10860 \pm 495*
Comprimento sarcômeros (μm)	2,02 \pm 0,1	2,14 \pm 0,08	2,14 \pm 0,17*	2,24 \pm 0,1*
Comprimento muscular (mm)	14,2 \pm 0,7	25,8 \pm 1,1	12 \pm 1,06 *	24,2 \pm 0,96
Densidade de área de TC (%)	15,64 \pm 1,4	9,52 \pm 2,2	23,53 \pm 6,06*	22,07 \pm 5,5*
AST da fibra muscular (μm^2)	2637 \pm 601,2	2800 \pm 252	2302 \pm 688*	2414 \pm 177*
Força máxima de ruptura (Kgf)	47,02 \pm 2,6		37,74 \pm 3,0*	

*quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Tecido conjuntivo (TC), área de secção transversa (AST), sóleo controle (SC), sóleo imobilizado (SI), gastrocnêmio controle (GC) e gastrocnêmio imobilizado (GI).

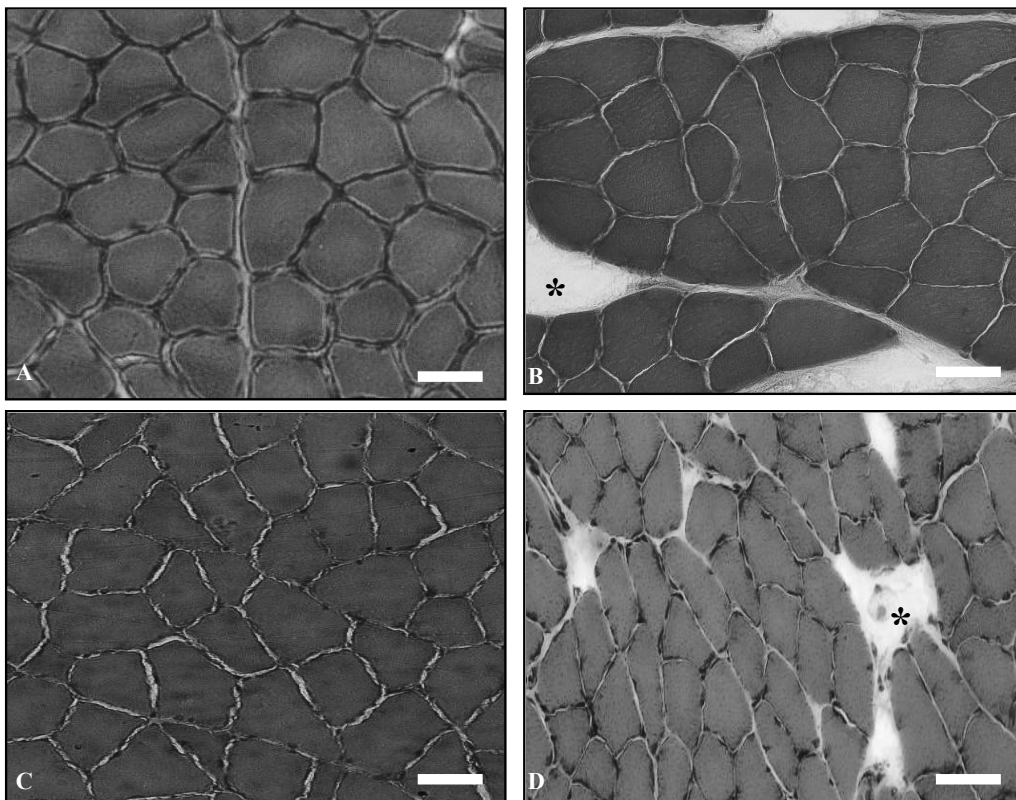


Figura 2. Cortes transversais dos músculos gastrocnêmio medial e sóleo dos grupos controle (A, C) e imobilizado (B, D). Observar o aumento da densidade de área de tecido conjuntivo no perímio nos músculos imobilizados (*) H&E, 20x. Barra = 50 μm .

tecido conjuntivo, podendo ser considerada, portanto, como o ponto mais frágil do músculo.

Importante notar que, embora os resultados do presente estudo mostrem maior densidade de área de tecido conjuntivo nos músculos imobilizados, esse aumento não causou maior resistência muscular ao ensaio de tração, isso porque a densidade de área de tecido conjuntivo parece não ser fator determinante para resistir ao aumento de estresse tecidual, sendo a organização desse tecido a característica que mais contribui para a capacidade do músculo de resistir ao estresse.

De acordo com Lieber et al.²⁰, músculos de indivíduos com espasticidade apresentam alta densidade de matriz extracelular, porém com inferior capacidade mecânica devido à limitada organização de sua matriz extracelular.

Assim, embora no presente estudo não se tenha feito uma análise qualitativa do tecido conjuntivo, os resultados permitem sugerir que os animais imobilizados por uma semana, por suportarem menor força necessária para ruptura muscular, apresentam má organização desse tecido.

A proliferação de tecido conjuntivo intramuscular após imobilização parece estar relacionada com a diminuição da atividade contrátil muscular¹⁶, sendo que o aumento da densidade de área desse tecido ocorre a curto prazo, apenas 2 dias após imobilização, precedendo as adaptações que ocorrem com os sarcômeros²¹. Além da diminuição da atividade contrátil, a diminuição da carga mecânica, imposta ao músculo imobilizado, também afeta a proliferação desse tecido, uma vez que a mesma regula a produção de fatores de crescimento e a síntese de colágeno²². Desse modo, os fibroblastos, que estão sujeitos à tensão ativa e passiva muscular, têm o seu metabolismo alterado com a diminuição de tensão provocada pela imobilização, o que acarreta aumento da densidade de área de tecido conjuntivo intramuscular.

O comprimento do sarcômero também pode ser uma variável que contribui para a diminuição da força máxima de ruptura muscular, uma vez que o aumento do comprimento do mesmo faz com que os sarcômeros apresentem-se mais tensos, portanto mais susceptíveis a lesão¹⁰. No presente estudo, houve aumento do comprimento do sarcômero em ambos os músculos imobilizados, o que mostra adaptação a curto prazo dos sarcômeros após imobilização.

Concomitante ao aumento do comprimento do sarcômero, ocorreu diminuição do número dos mesmos. Esse ajuste ocorre para que haja sobreposição ideal dos filamentos de actina e miosina, o que permite ótimo desenvolvimento de tensão durante as contrações²³. Essa adaptação do número de sarcômeros é necessária, uma vez que os filamentos de miosina e actina possuem comprimento constante, sendo assim, a maneira de causar sobreposição ótima dessas estruturas, após período de imobilização, é alterando-se o número dos sarcômeros.

Enquanto ambos os músculos imobilizados, sóleo e gastrocnêmio, apresentaram diminuição da AST de suas fibras, somente o músculo sóleo mostrou redução na massa muscular. O maior comprometimento do sóleo após a imobilização pode ser explicado por pelo menos 2 hipóteses: diferença dos tipos de fibras e diferença da posição anatômica entre os músculos. Sabe-se que as fibras do tipo I, com predominante metabolismo oxidativo, são as mais vulneráveis à atrofia induzida pelo desuso^{2,10}, sendo que o músculo sóleo apresenta maior proporção dessas fibras do que o músculo gastrocnêmio. Além da diferença histoquímica das fibras entre esses músculos, o gastrocnêmio (músculo biarticular) sofreu menor efeito da imobilização quando comparado com o músculo sóleo (mono-articular), uma vez que, no modelo de imobilização utilizado, a articulação do joelho do animal permanecia livre.

Embora seja bem estabelecido que a atrofia muscular é caracterizada pela diminuição do conteúdo protéico, do diâmetro da fibra, da produção de força muscular e pela fadiga, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na instalação da atrofia muscular por desuso não estão totalmente determinados^{24,25}. No entanto, sabe-se que a instalação da atrofia

por desuso inicia-se com a redução da tensão muscular, o que irá refletir tanto na síntese quanto na degradação protéica, sendo os mecanismos relacionados à proteólise mais conhecidos do que os envolvidos na diminuição da síntese protéica²⁶. Os sistemas proteolíticos envolvidos na atrofia muscular são: o sistema calpaína dependente de cálcio, as proteases lisossomais (catepsinas) e o sistema ubiquitina-proteosoma. Existem evidências de que esses 3 sistemas não sejam ativados simultaneamente, sendo o estágio inicial do processo de atrofia dependente do sistema calpaína, enquanto o estágio final é dependente do sistema ubiquitina-proteosoma^{24,26}. A ação inicial do sistema calpaína é necessária porque o sistema ubiquitina-proteosoma não degrada miofibrilas intactas, sendo necessária primeiro a desorganização dessas proteínas para posterior proteólise. Como a calpaína tem como substrato a proteína titina, a ativação inicial desse sistema provoca o desalinhamento dos sarcômeros, com conseqüente desorganização das miofibrilas e proteólise das mesmas pelo sistema ubiquitina-proteosoma.

Entre alguns candidatos indutores da ativação desses sistemas, encontram-se o glicocorticóide, as citocinas inflamatórias (interleucina-1 e TNF- α) e o estresse oxidativo, que está associado com a atrofia induzida pela imobilização^{24,27}.

Uma vez que a imobilização provoca significativas alterações musculares, vários autores tiveram o interesse de estudar os efeitos de programa de exercício após esse procedimento^{3,28-30}. Os resultados encontrados merecem atenção, pois, embora alguns autores mostrem que programa de exercício é capaz de reverter essas alterações^{3,29}, existem também relatos de que a carga mecânica imposta ao músculo atrofiado pode provocar lesões musculares transientes, com prejuízo à força isométrica máxima^{28,30}. Esses resultados contraditórios podem estar relacionados aos diferentes procedimentos metodológicos utilizados nesses estudos, como diferentes tempos de restrição de movimento imposto ao músculo (entre 7 dias a 4 semanas), diferente técnica de remoção da carga muscular (imobilização *versus* suspensão do membro) e também diferente intensidade de carga imposta ao músculo atrofiado após a imobilização (mobilização livre, exercício isocinético ou corrida em esteira). Os resultados obtidos nesses estudos sugerem que a carga mecânica é importante fator para o processo de reabilitação, porém a quantidade da carga a ser utilizada permanece, ainda, indeterminada.

Embora os resultados do presente estudo mostrem importantes alterações a curto prazo nas características morfométricas e mecânicas musculares, não foi possível determinar quais fatores influenciaram diretamente a diminuição da resistência muscular à tração. Nesse sentido, futuras investigações, correlacionando adaptações de sarcômeros, morfometria e mecânica muscular, são necessárias para o melhor entendimento dos efeitos da imobilização no músculo esquelético.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância deste estudo é que o mesmo mostrou que somente 1 semana de imobilização é suficiente para provocar significativas alterações musculares, sugerindo-se, portanto, a reabilitação em músculos submetidos à imobilização a curto prazo. Os resultados encontrados, com enfoque na mecânica e estrutura muscular, fornecem subsídios para eleição de tratamento terapêutico a ser utilizado após imobilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization: a review. *Sports Med*. 1990;10(1):42-58.
- Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb*. 2004;18(9):1025-7.
- 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(10):1473-80.
- Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ. Imobilização altera o conteúdo de glicogênio e peso muscular de acordo com o período e a posição articular. *Rev bras fisioter*. 2005;9(2):173-9.
- Jarvinen M, Einola SA, Virtanen EO. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehabil*. 1992;73(3):253-7.
- Carvalho CMM, Shimano AC, Volpon JB. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Eng Biomed*. 2002;18(2):65-73.
- Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. *J Anat*. 1984;138(2):343-50.
- Fournier M, Roy RR, Perham H, Simard CP, Edgerton VR. Is limb immobilization a model of muscle disuse? *Exp Neurol*. 1983;80:147-56.
- Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. 2ª ed. Philadelphia: Lippincott (USA); 2002.
- Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J Anat*. 1978;127(Pt 3):459-68.
- Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TES. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(4):473-81.
- Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(7):979-85.
- 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.
- Williams PE, Goldspink G. Longitudinal growth of striated muscle. *J Cell Sci*. 1971;9(3):751-67.
- Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J Anat*. 1988;158:109-14.
- Yasuda K, Hayashi K. Changes in biomechanical properties of tendons and ligaments from joint disuse. *Osteoarthr Cartil*. 1999;7(1):122-9.
- Larsen NP, Forwood MR, Parker AW. Immobilization and retraining of cruciate ligaments in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1987;58(3):260-4.
- Jarvinen M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chir Scand*. 1976;142(1):47-56.
- Lieber RL, Runesson E, Einarsson F, Fridén J. Inferior mechanical properties of spastic muscle bundles due to hypertrophic but compromised extracellular matrix material. *Muscle Nerve*. 2003;28:464-71.
- Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. *J Anat*. 1984;138(2):343-50.
- Hwang JH, Ra YJ, Lee KM, Lee JY, Ghil SH. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Arch Phys Med Rehabil*. 2006;87:20-6.
- Williams PE, Goldspink G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. *J Anat*. 1973;116:45-55.
- Kandarian SC, Stevenson EJ. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exer Sports Sci Rev*. 2002;30:111-6.
- Glass DJ. Molecular mechanisms modulation muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003;9(8):344-50.
- Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C834-43.
- Konodo HI, Nakagaki SS, Hori S, Itokawa Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am. J Physiol*. 1993;265:E839-44.
- Pottle D, Gosselin LE. Impact of mechanical load on functional recovery after muscle reloading. *Med Sci Sport Exerc*. 2000;32(12):2012-7.
- Venojarvi M, Kvist M, Atalay M, Loza L, Kalimo H. Recovery from immobilisation: response of fast-twitch muscle fibres to spontaneous and intensive exercise in rat calf muscles. *Pathophysiology*. 2004;11:17-22.
- Kasper CE, White TP, Maxwell LC. Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J Appl Physiol*. 1990;68:533-9.