



AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS EM SÓLEOS DE RATOS SUBMETIDOS À REMOBILIZAÇÃO POR SALTO EM MEIO AQUÁTICO

EVALUATION OF HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF RAT'S SOLEUS, SUBMITTED TO JUMP REMOBILIZATION IN THE AQUATIC ENVIRONMENT

Lígia Inez Silva¹
Anamaria Meireles¹
Cassiane Merigo do Nascimento¹
Bruno Pogorzelski Rocha¹
Camila Thieime Rosa¹
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro²
Rose Meire Costa Brancalhão²
Gladson Ricardo Flor Bertolini¹

1. Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste).
2. Laboratório de Biologia Celular da Unioeste.

Correspondência:

Gladson Ricardo Flor Bertolini
Colegiado de Fisioterapia da Unioeste.
Rua Universitária, 2.069 – Jardim Universitário – Caixa Postal: 711 85819-110 – Cascavel, PR, Brasil.
gladson_ricardo@yahoo.com.br

RESUMO

Introdução: O tecido muscular é capaz de responder estímulos, como a imobilização que induz hipotrofia alterando o desempenho muscular, sendo importantes métodos que visem reverter tais efeitos deletérios no período pós-imobilização. **Objetivo:** Avaliar os parâmetros histomorfométricos transversais e longitudinais das fibras dos músculos sóleos, de ratos, imobilizados em posição de encurtamento e submetidos à remobilização por salto em meio aquático. **Métodos:** Foram utilizados 24 ratos, divididos em três grupos: G1 – remobilizado livremente, G2 – remobilizado com saltos diariamente, e G3 – saltos em dias alternados. A imobilização e remobilização ocorreram em duas semanas, para o membro direito. As variáveis analisadas foram: massa muscular, diâmetro da fibra muscular, comprimento muscular e estimativa de sarcômeros em série ao longo do músculo. **Resultados:** Houve redução na massa muscular para ambos os grupos, para o diâmetro houve diferença em G1 e G3, para o comprimento muscular não houve diferenças significativas, em contrapartida, para a estimativa de sarcômeros em série ao longo do músculo verificou-se alterações significativas em todos os grupos. **Conclusão:** O protocolo utilizado possui ação parcial contra os efeitos deletérios causados pela imobilização.

Palavras-chave: músculos, imobilização, exercício.

ABSTRACT

Introduction: The muscular tissue is able to respond stimuli such as immobilization that induces hypotrophy altering muscle performance and are important methods that aim to reverse these deleterious effects in the post-immobilization. **Objective:** The aim of this study was to evaluate transverse and longitudinal histomorphometric parameters of the soleus muscle fibers of rats immobilized in the shortened position and submitted to remobilization by jumping in water. **Methods:** It was used 24 rats divided into 3 groups: G1 – remobilized freely, G2 – remobilized with jumps daily, and G3 – jumps on alternate days. The immobilization and remobilization occurred in 2 weeks for the right limb. The variables analyzed were: muscle mass, muscle fiber diameter, length and series sarcomeres estimate along the muscle. **Results:** There was a reduction in muscle mass for both groups, to the diameter there was difference in G1 and G3, to the muscle length no significant differences, however, for the series sarcomeres estimate was found significant changes in all the groups. **Conclusion:** The protocol used has partial action against the deleterious effects of immobilization.

Keywords: muscles, immobilization, exercise.

INTRODUÇÃO

O tecido muscular ostenta uma admirável particularidade, sendo capaz de responder diferentemente diante de estímulos, tanto externos quanto internos, como alterações hormonais, exercícios físicos, nutrição, denervação, eletroestimulação, imobilização, dentre outros^{1,2}. Decorrente de tal característica, o mesmo é considerado o mais mutável dentre os tecidos biológicos, capaz de responder às demandas em condições normais ou alteradas por meio de adaptações morfológicas e funcionais³.

Pautando-se nos efeitos da imobilização para o tecido muscular, observa-se que a mesma acarreta tanto redução no número de sarcômeros em série, quanto redução na força muscular, complacência e perda de amplitude de movimento⁵. Curtos períodos, como entre sete e 10 dias, já são suficientes para promover importantes adaptações e alterações na morfometria dos músculos sóleos e gastrocnêmios de ratos e camundongos^{4,5}. Segundo Kasper *et al.*⁶, as fibras do tipo I têm menor

adaptação em relação às fibras do tipo II, sendo, por conseguinte, mais afetadas. Pode-se dizer, assim, que o músculo sóleo, por ser constituído predominantemente por fibras tônicas, sofre maior comprometimento frente à restrição de mobilidade⁷.

Segundo Koh e Tidball⁸, a manutenção do número de sarcômeros em série no músculo esquelético é importante para o desenvolvimento e função muscular. Pautam-se na afirmação que o estímulo mecânico esteja envolvido em tal regulação, e que o mesmo seria responsável por liberar fatores de crescimento, sendo precursores do acréscimo do número de sarcômeros no tecido muscular. Além disso, a imobilização em posição muscular alongada ou encurtada produz alteração do número de sarcômeros, alterando assim a relação normal de comprimento-tensão, produzindo força máxima em um ponto anormal na amplitude de movimento fisiológica, comprometendo assim o desempenho muscular⁹.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros histomorfométricos transversais, bem como os aspectos

longitudinais das fibras dos músculos sóleos, de ratos, imobilizados em posição de encurtamento e posteriormente submetidos à remobilização por salto em meio aquático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização de amostra e grupos

Foram utilizados 24 ratos, machos, da linhagem Wistar, com idade de 10 ± 2 semanas, obtidos no Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O estudo conduziu-se segundo as Normas Internacionais de Ética na Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Estudos com Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná sob número 1.110. Os animais inseridos no estudo foram agrupados e mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições ambientais controladas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 25°C, com acesso à água e ração *ad libitum*. Os mesmos tiveram o membro posterior direito imobilizado em flexão plantar máxima, por 15 dias consecutivos, a fim de manter o músculo sóleo em posição máxima de encurtamento e posteriormente foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com sete animais cada para a intervenção terapêutica:

- Grupo 1 (G1; n = 10): após o período de imobilização os animais foram remobilizados livremente, sem sofrerem intervenções.
- Grupo 2 (G2; n = 10): após o período de imobilização os animais foram submetidos à remobilização por salto em meio aquático, diariamente, por um período de duas semanas, conforme protocolo de remobilização.
- Grupo 3 (G3; n = 10): remobilização semelhante ao G2, porém, os saltos foram realizados em dias alternados, por um período de duas semanas.

Protocolo de imobilização

Para realizar o estudo, utilizou-se como aparato de imobilização o modelo desenvolvido por Coutinho *et al.*¹⁰, o qual visa obter o encurtamento do músculo sóleo. Para tanto, a articulação do tornozelo foi imobilizada em flexão plantar máxima. Os animais foram diariamente observados, durante os 15 dias de imobilização, a fim de observar possíveis danos ao aparato.

Protocolo de remobilização

Após a retirada do aparato de imobilização, os animais do G1 foram apenas colocados em contato com a água, a fim de garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com a água. Já os animais do G2, foram submetidos a saltos em meio aquático com sobrecarga de 50% do peso do animal, semelhante ao de Rogatto *et al.*¹¹. Para a sobrecarga, utilizou-se pesos de chumbo acoplados a uma tira de Velcro®, a qual foi posicionada no tórax do animal, visando não prejudicar a movimentação do mesmo. Os saltos foram efetuados em quatro séries de cinco saltos cada série, com intervalo de três minutos entre cada série, diariamente, durante 15 dias no período vespertino. Para os animais do G3, a intervenção foi semelhante a do G2, no entanto, os saltos foram realizados em dias alternados, durante 15 dias. Os saltos foram realizados, em um reservatório de água de 200 litros, circular, com profundidade de 50 cm, com a temperatura da água mantida entre 31° e 33°C, verificadas por termômetro Inconterm®. Prévio ao treinamento, todos os animais eram pesados, para que desta forma fosse estabelecida a quantidade de peso utilizada como sobrecarga.

Preparo das lâminas e análise histológica

Ao final do experimento, todos os animais foram pesados e sofreram eutanásia por decapitação em guilhotina. Em seguida, os músculos sóleos direito e esquerdo foram dissecados, limpos e pesados em

balança analítica Shimadzu®. Em seguida, os músculos sóleos foram fixados em placa de isopor no qual foi avaliado o comprimento máximo, em repouso, do músculo por meio de um paquímetro analógico (Mitutoyo®)

Posteriormente, os músculos foram colocados em formol 10% e submetidos à secção em seu sentido longitudinal, na qual a parte medial foi utilizada para análise transversal e a lateral para análise dos aspectos longitudinais.

Para a confecção das lâminas para avaliação das variáveis transversais, os músculos sóleos passaram por um processo de desidratação e seguidamente as amostras foram emblocadas em parafina, na qual foram realizados cortes transversais com a utilização de um micrótomo rotativo, na espessura de 7 µm, e foram coradas em hematoxilina e eosina (HE). Posteriormente, realizou-se a leitura em microscópio óptico Opton®, com objetiva de 10x, em que as imagens foram capturadas e digitalizadas para análise no programa Image-Pro-Plus 3.0®, quanto ao diâmetro médio das fibras.

Com relação à análise no sentido longitudinal, retirou-se a parte lateral dos músculos sóleos do formol 10% após três horas, e foram colocados em ácido nítrico 30% por 72 horas, posteriormente armazenados em solução de glicerol 50%. Para a confecção das lâminas histológicas, foram isoladas cinco fibras de tendão a tendão e montadas sobre lâmina contendo verniz. Novamente, realizou-se a leitura em microscópio óptico Opton®, com objetiva de 10x, em que as imagens foram capturadas e digitalizadas para contagem da estimativa de sarcômeros em série ao longo do músculo. Para isso, ocorreu contagem ao longo de 50 µm, em seis campos distintos, totalizando 300 µm. O cálculo realizado para fazer a estimativa do total de sarcômeros em série, ao longo do músculo, foi regra de três simples.

Análise estatística

As variáveis inseridas no estudo foram avaliadas comparando os resultados obtidos no sóleo esquerdo e direito entre os animais do mesmo grupo experimental e entre os grupos, utilizando o teste de ANOVA com medidas repetidas e unidirecional, respectivamente, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Com base na análise dos parâmetros transversais dos músculos sóleos imobilizados a cerca da massa muscular, houve diferença significativa para ambos os grupos quando comparou-se o músculo esquerdo (controle) e direito (experimental) sendo que $p < 0,05$. No que tange ao diâmetro da fibra muscular, G1 e o G3 apresentaram o músculo direito dos sóleos analisados menores que os músculos esquerdos ($p < 0,05$). Mas tal fato não ocorreu para G2 ($p > 0,05$) (tabela 1).

Acerca dos parâmetros longitudinais encontrados, com relação ao

Tabela 1. Resultados da massa muscular e diâmetro da fibra muscular, de acordo com o grupo avaliado, comparando os valores do músculo sóleo direito (MSD) com os do músculo sóleo esquerdo (MSE).

		MSD	MSE
Massa muscular	G1	0,1249 ± 0,0118 g	0,1561 ± 0,0235 g*
	G2	0,1340 ± 0,0224 g	0,1678 ± 0,0224 g*
	G3	0,1217 ± 0,0241 g	0,1525 ± 0,0283 g*
Diâmetro da fibra muscular	G1	14,05 ± 1,98 µm	23,01 ± 3,94 µm*
	G2	18,53 ± 2,34 µm	18,56 ± 4,87 µm
	G3	13,37 ± 3,06 µm	19,49 ± 4,82 µm*

* Diferença estatisticamente significativa.

comprimento do músculo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Em contrapartida, na estimativa do total de sarcômeros ao longo do músculo sóleo, houve diferença significativa para todos os grupos ao se comparar os músculos direitos e esquerdos ($p < 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2. Resultados do comprimento muscular e do total de sarcômeros no músculo sóleo, de acordo com o grupo avaliado, comparando os valores do músculo sóleo direito (MSD) com os do músculo sóleo esquerdo (MSE).

		MSD	MSE
Comprimento do músculo	G1	1,99 ± 0,18 cm	2,21 ± 0,18 cm
	G2	1,99 ± 0,20 cm	2,12 ± 0,31 cm
	G3	1,88 ± 0,20 cm	1,99 ± 0,20 cm
Total de sarcômeros ao longo do músculo	G1	9.560 ± 592,3	10.993 ± 544,4*
	G2	9.456 ± 723,5	10.108 ± 1.188*
	G3	8.609 ± 1.163	9.488 ± 909,6*

* Diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

A atrofia do músculo esquelético é um grande problema para pacientes que se submetem à restrição de movimentos de um membro devido à cirurgias, doenças articulares ou até mesmo imobilização gessada¹², produzindo hipotrofia muscular, com redução da secção transversa e da força muscular, mesmo em curtos períodos, como duas semanas¹³⁻¹⁵, sendo que para músculos tônicos, como o sóleo, a hipotrofia é mais acentuada¹⁶. Por isso, o uso de recursos, visando restauração de características musculares ótimas perdidas, por imobilização ou por causa de retirada de carga, apresenta importância, como eletroestimulação e exercícios físicos¹⁷⁻²². O exercício físico é benéfico na recuperação muscular, como relatado por Malysz *et al.*²³ na recuperação muscular de ratos Wistar diabéticos e com lesão de nervo isquiático submetidos a exercícios em esteira. Contudo, há uma carência na literatura sobre o uso de exercícios anaeróbios, resistidos, na recuperação após período de imobilização. Como Ju *et al.*²⁴ que analisaram o efeito de saltos, em caixa de madeira, sobre a remobilização de ratos Wistar, submetidos à duas semanas de suspensão de peso nos membros posteriores. Observaram que cinco semanas de exercícios foram suficientes para recuperação total da arquitetura trabecular de metáfise femoral, fato que não aconteceu com a remobilização livre.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a sobrecarga funcional induzida pelo exercício físico, feito de forma diária, possui a capacidade de reverter parcialmente os efeitos deletérios causados pela imobilização, com relação ao diâmetro transversal médio das fibras musculares, em contrapartida, o exercício físico realizado em dias alternados não produziu o mesmo efeito. Sendo assim, pode-se dizer que o mesmo condiz com estudos que investigaram a recuperação do tecido muscular, após imobilização, como Kannus *et al.*²⁵ os quais observaram que o exercício de alta intensidade de caminhada em esteira produziu efeitos benéficos na recuperação da área de secção transversa das fibras musculares de sóleos de ratos. Sakakima *et al.*²⁶ também observaram que, após três semanas de imobilização, um período de remobilização de seis semanas, em esteira, produziu efeitos de restauração de valores da área de secção transversa das fibras do sóleo, de forma mais pronunciada do que observado para a remobilização livre. Foram avaliadas 100 fibras musculares, pois, segundo Brito *et al.*²⁷, tal número é suficiente para uma avaliação confiável do estado de trofismo médio. Contudo, para a outra variável, relacionada com o trofismo muscular, ou seja, a massa muscular, não houve restauração de valores, semelhante ao

lado não imobilizado.

Segundo Butterfield *et al.*²⁸, a adição de sarcômeros em série tem um grande impacto sobre o desempenho muscular, pois aumenta a velocidade contrátil e potência. Visto que a imobilização promove redução dos sarcômeros²⁹, no presente estudo também se testou a hipótese de que o exercício com salto poderia prover retorno às características morfológicas longitudinais do músculo sóleo de ratos. Apesar de não haver diferenças para o lado imobilizado com o não imobilizado, para o comprimento muscular, tal fato foi observado também para o grupo controle, o que pode indicar que o período de remobilização foi suficiente para reverter alguns efeitos deletérios da imobilização. Como observado por Koh e Tidbal⁹ que relataram efeitos positivos da remobilização em três semanas, após período de imobilização de quatro semanas.

No entanto, para a análise da estimativa de sarcômeros em série ao longo do músculo, não foi possível vislumbrar vantagem do protocolo de exercício físico por meio de salto, frente à remobilização livre. A perda do número de sarcômeros em série, ao longo da estrutura muscular, é causada por um ajuste das fibras, em suas extremidades, para sobreposição ideal de actina e miosina em miofibrilas visando desenvolver a tensão máxima²⁹, visto as diferenças observadas, tal comprimento ótimo não foi restaurado. Ou seja, tanto para o grupo controle, quanto para o remobilizado por meio de saltos diários ou saltos em dias alternados, todos apresentaram redução na estimativa de sarcômeros ao longo do músculo sóleo de ratos.

Tais achados corroboram com estudos anteriores que usaram o mesmo modelo e igualmente apresentaram redução do número de sarcômeros ao longo do músculo, quando os animais foram submetidos à remobilização com natação, caminhada de baixa intensidade em esteira ou séries de alongamento estático¹⁹⁻²¹. Butterfield e Herzog³⁰ salientaram que a tensão na unidade músculo tendínea não é a fonte primária de sarcomerogênese, mas, que pode acontecer em casos de exercício excêntrico²⁸, tipo de contração não utilizada no presente estudo.

A ausência de um grupo apenas imobilizado, sem período de remobilização, pode ser entendida como uma das limitações do presente estudo. Contudo, tal grupo foi suprimido pela noção de redução em estudos com animais, visto que os criadores do método de imobilização o apontam como produtor de redução de massa e comprimento muscular¹⁰, e mesmo um curto período de imobilização como sete dias já é suficiente para produzir diminuição da massa muscular, área das fibras e número de sarcômeros em série⁵.

CONCLUSÃO

O exercício físico realizado diariamente possui ação contra os efeitos deletérios causados pela imobilização, fato não observado para o exercício feito em dias alternados no que tange a massa muscular e diâmetros da fibra muscular. Tal efeito também foi observado com relação ao comprimento muscular dos músculos sóleos de ambos os grupos. Todavia, os achados do estudo em questão mostraram que o protocolo utilizado não surtiu efeito sobre a recuperação muscular a cerca dos parâmetros longitudinais relacionados à estimativa da quantidade de sarcômeros ao longo do músculo sóleo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pelo auxílio com bolsas de iniciação científica.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Tidball JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* 2005;98:1900-8.
2. Carmeli E, Haimovitch TG. The expression of MMP-2 following immobilization and high-intensity running in plantaris muscle fiber in rats. *Scientific World Journal* 2006;5:542-50.
3. Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Booth FW. Identification of differentially expressed genes between young and old rat sóleo muscle during recovery from immobilization induced atrophy. *J Appl Physiol* 2003;95:2171-9.
4. Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Ann Rheum Dis* 1988;47:1014-6.
5. Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, Guirro RRJ. Curto período de imobilização provoca alterações morfológicas e mecânicas do músculo de rato. *Rev Bras Fisioter* 2007;11:297-302.
6. Kasper CE, Talbot LA, Gaines JM. Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues* 2002;13:237-47.
7. Tanaka T, Kariya Y, Hoshino Y. Histochemical study the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. *J Orthop Sci* 2004;9:76-85.
8. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J Physiol* 1999;519:189-96.
9. De Deyne PG. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. *Phys Ther* 2001;81:819-27.
10. Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1329-32.
11. Rogatto GP, Oliveira CAM, Faria MC, Luciano E. Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. *Motriz* 2004;10:61-6.
12. Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol* 2009;106:2049-59.
13. Christensen B, Dyrberg E, Aagaard P, Kjaer M, Langberg H. Short-term immobilization and recovery affect skeletal muscle but not collagen tissue turnover in humans. *J Appl Physiol* 2008;105:1845-51.
14. Min K, Smuder AJ, Kwon OS, Kavazis AN, Szeto HH, Powers SK. Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol* 2011;111:1459-66.
15. HVID, L. G. Ørtenblad N, Aagaard P, Kjaer M, Suetta C. Effects of ageing on single muscle fibre contractile function following short-term immobilization. *J Physiol* 2011;589:4745-57.
16. Sato S, Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Casted-immobilization down-regulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. *Life Sci* 2011;89:962-7.
17. Ishihara A, Kawano F, Ishioka N, Oishi H, Higashibata A, Shimazy T, et al. Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rats. *Neurosci Res* 2004;48:119-27.
18. 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* 2008;18:453-61.
19. Konno EAB, Alves EPB, Bertolini GRF, Barbieri CH, Mazzer N. Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. *Rev Bras Med Esporte* 2008;14:122-5.
20. Natali LH, Silva TS, Ciena AP, Padoin MJ, Alves EPB, Aragão FA, et al. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. *Rev Bras Med Esporte* 2008;14:490-3.
21. Volpi FS, Casarolli LM, Pudell C, Menon T, Ciena AP, Alves EPB, et al. Efeitos da remobilização em duas semanas com natação sobre o músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização. *Rev Bras Med Esporte* 2008;14:168-70.
22. Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. *Bosn J Basic Med Sci* 2011;11:74-9.
23. Malysz T, Ilha J, Nascimento PS, Faccioni-Heuser MC, De Angelis K, Schaen BD, et al. Exercise training improves the soleus muscle morphology in experimental diabetic nerve regeneration. *Muscle Nerve* 2011;44:571-82.
24. Ju Y, Sone T, Okamoto T, Fukunaga M. Jump exercise during remobilization restores integrity of the trabecular architecture after tail suspension in young rats. *J Appl Physiol* 2008;104:1594-600.
25. 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* 1998;84:1418-24.
26. Sakakima H, Yoshida Y, Sakae K, Morimoto N. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand J Med Sci Sports* 2004;14:186-92.
27. Brito MKM, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Tarumoto MH, Pai VD, Giacometti JA. Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. *Rev Bras Med Esporte* 2006;12:103-7.
28. Butterfield TA, Leonard TR, Herzog W. Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. *J Appl Physiol* 2005;99:1352-8.
29. Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol* 1972;224:231-44.
30. Butterfield TA, Herzog W. The magnitude of muscle strain does not influence serial sarcomere number adaptations following eccentric exercise. *Pflügers Arch* 2006;451:688-700.