

Efeitos da Corrida em Esteira em Músculos Sóleos de Ratos Encurtados por Imobilização



Effects of Running on Treadmill in Soleus Muscles of Rats Shortened by Immobilization

Luiz Henrique Natali¹
Taciane Stein da Silva¹
Adriano Policam Ciena¹
Maristela Jorge Padoin^{1,2}
Éder Paulo Belato Alves¹
Fernando Amâncio Aragão¹
Gladson Ricardo Flor Bertolini¹

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Cascavel, PR.
2. Faculdades Assis Gurgacs (FAG).

Endereço para correspondência:

Gladson Ricardo Flor Bertolini. Trav. Sebastião Pereira de Camargo, 69 – 85803-328 – Cascavel, PR.
E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Trabalho parcialmente apresentado durante o 2º Congresso SLARD, 2006, Foz do Iguaçu.

Submetido em 29/11/2007
Versão final recebida em 30/01/2008
Aceito em 04/04/2008

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar as adaptações de peso e comprimento do músculo sóleo de ratos Wistar machos, além da estimativa do total de sarcômeros em série e comprimento médio dos sarcômeros, quando submetidos a um processo de remobilização em esteira. Foram utilizados 18 ratos (Wistar), divididos em três grupos: GC – músculo sóleo esquerdo (MSE) imobilizado e remobilizado solto; G10 – MSE imobilizado e remobilizado em velocidade de 10m/min; e G12 (n = 6) – MSE imobilizado e remobilizado em velocidade de 12m/min. Os resultados mostraram as seguintes variações, peso muscular: GC -22,35% (p = 0,0089), G10 -12,52% (p = 0,0623), G12 -12,07% (p = 0,0004); comprimento muscular: GC -5,47% (p = 0,0120), G10 -3,31% (p = 0,2868), G12 0,41% (p = 0,8987); estimativa de sarcômeros em série: GC -15,42% (p = 0,0047), G10 -10,87% (p = 0,0193), G12 -4,97 (p = 0,2409); comprimento de sarcômeros GC 11,16% (p = 0,0142), G10 9,31% (p = 0,1270), G12 5,58% (p = 0,1327). Conclui-se que G12 obteve maior eficácia após o período de imobilização, pois apresentou maior semelhança com o membro não imobilizado.

Palavras-chave: reabilitação, músculo esquelético, sarcômeros.

ABSTRACT

The aim of this work was to compare weight and length adaptations of the soleus muscle of male Wistar rats as well as estimation of the total number of serial sarcomere and mean sarcomere length, when they are submitted to remobilization on treadmill. 18 Wistar male rats were used and divided in the three following groups: CG - left soleus (LS) muscle immobilized and remobilized free in the cage; G10 - LS muscle immobilized and remobilized in speed of 10 m/min on treadmill; and G12 - LS muscle immobilized and remobilized in speed of 12 m/min. The right muscles (RS) of each animal were used for comparison. The results showed the following variations, muscular weigh: CG -22.35% (p = 0.0089), G10 -12.52% (p = 0.0623), G12 -12.07% (p = 0.0004); muscle length: CG -5.47% (p = 0.0120), G10 -3.31% (p = 0.2868), G12 0.41% (p = 0.8987); estimation of number of serial sarcomere: CG -15.42% (p = 0.0047), G10 -10.87% (p = 0.0193), G12 -4.97 (p = 0.2409); sarcomere length: CG 11.16%, (p = 0.0142), G10 9.31% (p = 0.1270), G12 5.58% (p = 0.1327). It was concluded that G12 presented the best effectiveness after immobilization period since it presented greater similarity with the non-immobilized soleus.

Keywords: rehabilitation, skeletal muscle, sarcomere.

INTRODUÇÃO

A literatura científica comprova que os músculos esqueléticos possuem plasticidade muscular, ou seja, respondem a diferentes estímulos impostos, dentre eles: exercícios físicos, alterações hormonais, nutrição, denervação, eletroestimulação, imobilização, dentre outros⁽¹⁻⁴⁾.

A inatividade causa ao músculo significativo remodelamento, incluindo a perda de proteínas miofibrilares, mudanças em atividades metabólicas, alterações vasculares e neurais⁽⁵⁾. Contudo, a imobilização, que gera desuso, ainda é uma opção de tratamento freqüentemente usada em distúrbios musculoesqueléticos, apesar da ocorrência da atrofia das células musculares e da perda da extensibilidade do músculo⁽⁶⁾.

O músculo esquelético exibe habilidade extraordinária de remodelar suas propriedades estruturais e metabólicas em resposta a ambiente alterado, adaptando-se prontamente. O número de sarcômeros em

série varia em resposta à perturbação crônica do comprimento, como em casos de imobilização em posição encurtada e/ou alongada, diminuindo e/ou aumentando sua quantidade, respectivamente⁽⁷⁾.

Tais alterações estruturais mudam a relação normal de comprimento-tensão, produzindo força máxima em um ponto anormal na amplitude de movimento fisiológica, comprometendo assim o desempenho muscular⁽⁸⁾. As ocorrências de atrofia muscular, durante a imobilização e sua reversão apresentam um desafio importante à reabilitação^(5,9).

Mesmo com a constatação de que os músculos se adaptam a diferentes formas de estímulos, permanece, porém, a incerteza de qual a melhor forma de aplicá-los, visando conduzir os músculos hipotrofiados e encurtados ao retorno de sua máxima eficácia, apresentando características morfológicas semelhantes às do período pré-imobilização.

O objetivo deste estudo consistiu em analisar o efeito da remobilização muscular em sóleos de ratos Wistar, após 15 dias de imobilização em plantiflexão, através de duas velocidades de marcha em esteira, sendo analisadas as seguintes variáveis: peso muscular, comprimento muscular, estimativa de sarcômeros em série ao longo do músculo e comprimento de sarcômero nas fibras musculares.

MÉTODOS

Foram utilizados no presente estudo 18 ratos machos Wistar, com peso corporal de $359,00 \pm 54,14$ gramas, obtidos no biotério central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e Faculdades Assis Gurgacz.

Os animais foram agrupados e reunidos em gaiolas plásticas, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de cada ciclo claro/escuro; temperatura: $24 \pm 1^\circ\text{C}$), com livre acesso a água e ração. O estudo foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal⁽¹⁰⁾.

Aleatoriamente, os animais foram divididos em três grupos: grupo 1 (GC, $n = 6$) – os animais permaneceram por 15 dias imobilizados e após esse período iniciaram remobilização soltos na gaiola, permitindo remobilização livre durante duas semanas; grupo 2 (G10, $n = 6$) – após os 15 dias de imobilização, os animais foram por duas semanas remobilizados em esteira com velocidade de 10m/min; grupo 3 (G12, $n = 6$) – os animais foram submetidos a procedimento semelhante ao do G10, porém a remobilização foi realizada com velocidade de 12m/min.

Procedimentos para imobilização

Visando obter o encurtamento do músculo sóleo, a articulação tibiotársica esquerda foi fixada em plantiflexão máxima através de algodão e fita adesiva. Em seguida, foi utilizado o dispositivo de imobilização criado por Coutinho *et al.*⁽¹¹⁾, o qual consistia de um tecido de algodão, envolvendo o tronco do animal (semelhante a uma camiseta), unido a uma malha de aço enrolando o membro posterior do animal.

Os animais permaneceram com a imobilização durante 15 dias; diariamente eram observados, devido à possibilidade de danos ao aparato de imobilização e perda da hipotrofia e encurtamento.

Procedimentos para remobilização

O procedimento de remobilização iniciou-se no dia da retirada do aparato de imobilização e consistiu de caminhada em esteira elétrica, adaptada para ratos, com velocidades constantes de 10 ou 12m/min, de acordo com o grupo ao qual pertenciam os animais. Os procedimentos tinham duração de 10 min. G10 e G12 realizaram tal procedimento por duas semanas, interrompidos ao final de semana, totalizando 10 dias de remobilização em esteira.

Sacrifício dos animais e retirada dos músculos

Após 15 dias de remobilização livre para GC e dois dias do término do período de remobilização em esteira para G10 e G12, todos os animais foram sacrificados em guilhotina e os músculos sóleos direitos (MSD) e esquerdos (MSE) dissecados.

Durante o processo de retirada os músculos eram gotejados com solução fisiológica de NaCl (0,9%), visando evitar o ressecamento tecidual. Após sua retirada, os músculos foram pesados em balança analítica, posicionados em comprimento de repouso sobre placa de isopor e imersos em solução de formol (10%) por três horas. Posteriormente, foi mensurado o comprimento do músculo com auxílio de paquímetro (Mitutoyo/Stainless-Hardened® – Brasil).

Montagem das lâminas histológicas

Após o período em formol, os músculos foram imersos em ácido nítrico a 30%, onde permaneceram por 48 horas, visando quebra do tecido conjuntivo e, em seguida, foram armazenados em solução de glicerol a 50%.

Para o procedimento de montagem das lâminas histológicas, foram retiradas oito fibras de cada músculo, as quais foram fixadas em lâminas com uso de verniz. O isolamento das fibras foi realizado colocando-se o músculo em placa de Petri e, com o auxílio de lupa (*Micronal*), as fibras foram isoladas através de pinças.

Em todas as lâminas foram analisadas cinco das oito fibras fixadas, através da contagem de sarcômeros em seis campos distintos de $50\mu\text{m}$, totalizando $300\mu\text{m}$ por fibra. Para realizar a análise utilizou-se um microscópio de luz (*Olympus*® – EUA), com objetiva de 60 vezes em imersão, acoplado a um aparelho de televisão de 29 polegadas, o qual teve seu tubo de imagem previamente aferido para a distância correspondente a $50\mu\text{m}$. Posteriormente, por regra de três simples, foi estimada a quantidade de sarcômeros em série no músculo e também analisado o comprimento médio dos sarcômeros.

Análise estatística

As variáveis foram avaliadas pela comparação entre os resultados obtidos nos músculos das patas esquerdas com as direitas, em cada grupo experimental. A análise dos dados foi realizada através da estatística descritiva (média, desvio-padrão e percentagem) e inferencial, através do teste *t* de Student pareado (análise intragrupos), ANOVA e Tukey (análise intergrupos), tendo como significância $\alpha = 5\%$, com uso prévio de teste de normalidade dos dados.

RESULTADOS

Os resultados das variáveis analisadas são apresentados individualmente por parâmetro.

Peso muscular

O grupo GC apresentou $0,1611 \pm 0,0089\text{g}$ para peso do músculo sóleo direito (MSD) e $0,1251 \pm 0,0130\text{g}$ para músculo sóleo esquerdo (MSE), havendo variação significativa de -22,35%, ao comparar o MSE com o MSD ($p = 0,0089$). No G10 os valores apresentados foram de $0,2028 \pm 0,0392\text{g}$ para MSD e $0,1774 \pm 0,0333\text{g}$ para MSE; a variação de -12,52% não foi significativa ($p = 0,0623$); contudo, G12 apresentou variação semelhante de -12,07%, mas significativa ($p = 0,0004$); os valores foram de $0,1996 \pm 0,0225\text{g}$ para MSD e $0,1755 \pm 0,0271\text{g}$ para MSE.

A comparação entre os grupos não apontou diferenças significativas ($p > 0,05$) para o MSD, mas houve diferenças significativas ($p < 0,05$) ao comparar GC com G10 e G12, com relação ao MSE.

Comprimento muscular

Com relação ao comprimento muscular, GC apresentou $2,01 \pm 0,09\text{cm}$ para MSD e $1,90 \pm 0,11\text{cm}$ para MSE, com variação significativa de -5,47% ($p = 0,0120$); para G10 os valores foram de $2,42 \pm 0,17\text{cm}$ para MSD e de $2,34 \pm 0,17\text{cm}$ para MSE, com variação não significativa de -3,31% ($p = 0,2868$); e G12 apresentou $2,46 \pm 0,13\text{cm}$ para MSD e $2,47 \pm 0,17\text{cm}$ para MSE, com variação não significativa de 0,41% ($p = 0,8987$).

A comparação entre grupos apresentou variações significativas de GC com relação a G10 e G12, tanto para MSD quanto para MSE ($p < 0,001$), mas ao comparar G10 com G12, não houve variação significativa ($p > 0,05$).

Estimativa de sarcômeros em série

A estimativa de sarcômeros em série apontou para GC os valores de $11.050,00 \pm 769,70$ para MSD e $9.346,00 \pm 499,00$ para MSE, com variação significativa de $-15,42\%$ ($p = 0,0047$); G10 apresentou $13.800,00 \pm 841,90$ para MSD e $1.2300,00 \pm 1292,00$ para MSE, variação também significativa de $-10,87\%$ ($p = 0,0193$); finalmente, para G12 os valores foram de $13.880,00 \pm 768,80$ para MSD e $13.190,00 \pm 694,70$ para MSE, não sendo a variação de $-4,97\%$ significativa ($p = 0,2409$).

A comparação entre grupos apresentou variações significativas de GC com relação a G10 e G12, tanto para MSD quanto para MSE ($p < 0,001$), mas ao comparar G10 com G12, não houve variação significativa ($p > 0,05$).

Comprimento médio dos sarcômeros

O comprimento médio dos sarcômeros em GC foi de $1,83 \pm 0,10\mu\text{m}$ para MSD e $2,03 \pm 0,07\mu\text{m}$ para MSE, com variação significativa de $11,16\%$ ($p = 0,0142$); G10 apresentou $1,75 \pm 0,09\mu\text{m}$ para MSD e $1,91 \pm 0,19\mu\text{m}$ para MSE, variação não significativa de $9,31\%$ ($p = 0,1270$); finalmente, para G12 os valores foram de $1,77 \pm 0,07\mu\text{m}$ para MSD e $1,87 \pm 0,14\mu\text{m}$ para MSE, não sendo a variação de $5,58\%$ significativa ($p = 0,1327$).

A comparação entre grupos não apresentou variações significativas de GC com relação a G10 e G12, tanto para MSD quanto para MSE ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Estudos em animais demonstram a capacidade de adaptação muscular para diferentes estímulos, ocorrendo alterações na quantidade de tecido conjuntivo, no comprimento, tamanho e peso das fibras musculares^(7,12,13).

Para Kannus *et al.*⁽¹⁴⁾, o acúmulo de tecido conjuntivo intramuscular, induzido pela imobilização, não é somente absoluto, mas também aparente (por causa da diminuição simultânea no tamanho da fibra). Järvinen *et al.*⁽¹⁵⁾ mostraram que a imobilização resulta em marcado aumento no tecido conectivo do endo e perimísio; a maioria do colágeno do endomísio é depositado diretamente no sarcolema das células musculares; a imobilização também resulta em aumento substancial no número de fibras de colágeno orientadas perpendicularmente, com contatos de duas fibras musculares adjacentes no endomísio. Durigan *et al.*⁽¹³⁾ observaram, em sóleos de ratos imobilizados três dias, aumento significativo na densidade de tecido conectivo intramuscular e redução na área das fibras musculares. Porém, Ahtikoski *et al.*⁽¹⁶⁾ afirmam que a imobilização resulta em rápida regulação para baixo da síntese de colágeno muscular total e que o tempo e grau são similares nos colágenos tipos I e III. Goldspink⁽¹⁷⁾ relata que a diminuição de geração de força e a imobilização em posição encurtada, do músculo direcionam ao estado de atrofia. Dessa forma, a diminuição observada no peso muscular, dos animais imobilizados poderia ser influenciada tanto pela diminuição no conteúdo citoplasmático, quanto pelo conteúdo do conjuntivo.

A questão-chave é se as mudanças degenerativas induzidas pela imobilização são provisórias e reparáveis, ou permanentes. Booth⁽¹⁸⁾, em trabalho experimental, avaliou a recuperação do trofismo muscular, após 28 dias, em ratos imobilizados com aparelho gessado. O peso do músculo sóleo foi rapidamente restabelecido após a retirada da imobilização, não sendo consideradas significativas as diferenças encontradas em relação ao grupo controle. Na presente pesquisa, os

resultados apresentados por GC e G12 demonstram o oposto, pois os pesos musculares permaneceram significativamente diferentes após o período de remobilização; apenas para G10 a variação não foi significativa, o que poderia sinalizar um possível efeito reparador da marcha sobre a massa muscular. Adams e Mccue⁽¹⁹⁾ e Adams⁽²⁰⁾ relatam que a sobrecarga funcional eleva os níveis de IGF-1, o que produz hipertrofia do músculo sobrecarregado. Dias *et al.*⁽⁹⁾ observaram que a eletroestimulação durante o período de imobilização ou posterior a este minimiza as alterações metabólicas do desuso, com aumento nos conteúdos de glicogênio.

Ishihara *et al.*⁽²¹⁾ mostraram os efeitos da falta de carga em membros posteriores e a recuperação com corrida sobre propriedades metabólicas e morfológicas das fibras musculares do sóleo e motoneurônios de ratos. Os resultados indicaram que a corrida é benéfica para a recuperação da atrofia e diminuição na percentagem de fibras tipo I, além da diminuição da atividade de enzimas oxidativas, induzida pela falta de carga; não havia alterações nas propriedades metabólicas e morfológicas de motoneurônios, que inervavam os sóleos, após diminuição ou aumento da atividade neuromuscular.

Kannus *et al.*⁽¹⁴⁾, com o propósito de investigar se seria possível a recuperação total do tecido muscular, após a imobilização, e quais os melhores métodos para a recuperação dos tecidos, analisaram os efeitos de três semanas de imobilização, seguidas de atividades livres na gaiola e exercícios de alta e baixa intensidade em uma esteira, durante oito semanas. Com o treinamento físico houve melhor restabelecimento das variáveis musculares analisadas. Os autores concluíram que as alterações patológicas oriundas do processo de imobilização são em grande parte reversíveis se a remobilização for intensificada por treinamento físico, sendo mais benéficos os exercícios de alta intensidade.

De forma concordante, os dados apresentados no presente estudo, com relação ao comprimento muscular e estimativa de sarcômeros em série, mostraram que para os animais de GC não houve recuperação completa de seu estado de hipotrofia sarcomeral em série; para G10, os dados apontaram para recuperação do comprimento muscular, mas o estímulo não foi suficiente para recuperação do total de sarcômeros em série, fato ocorrido em G12, no qual os animais foram submetidos à marcha rápida em esteira, indicando efeito benéfico do exercício sobre essas variáveis.

Gomes *et al.*⁽²²⁾ observaram aumento significativo no comprimento dos sarcômeros de sóleos, em animais imobilizados em plantiflexão, sugerindo um ajuste para melhor produção de força muscular. No presente estudo, também foi observado aumento significativo no comprimento médio dos sarcômeros, porém, apenas para o grupo imobilizado e solto, visto que para os grupos imobilizados e remobilizados em esteira não houve diferenças significativas. Tal fato pode ter ocorrido como consequência benéfica da remobilização com exercício físico produzindo adaptação mais rápida ao comprimento funcional do sarcômero.

Os resultados de Sakakima⁽⁶⁾ indicaram que o exercício, em marcha na esteira, melhorou as alterações histoquímicas nos músculos, além de melhorar a escala de movimento do tornozelo nos ratos. Animais que correram três vezes e seis vezes por semana foram mais beneficiados na recuperação da atrofia induzida pela imobilização do músculo, quando comparados com ratos que não correram ou correram apenas uma vez na semana.

No presente estudo não foram avaliadas alterações histoquímicas e os protocolos de G10 e G12 foram semelhantes com respeito

à frequência de atividades, mas a atividade física de maior impacto apresentou melhores resultados como os apontados por Sakakima⁽⁶⁾. Além disso, segundo Knight *et al.*⁽²³⁾, o exercício ativo pode produzir aumento na temperatura intramuscular e tal elevação, associada aos estímulos tensionais como os de alongamento, podem conduzir a deformação plástica do tecido conjuntivo muscular. Sharma *et al.*⁽²⁴⁾ também afirmam que o aquecimento associado com o estímulo de alongamento produz aumento na extensibilidade muscular. Porém, no presente estudo, não foram analisadas alterações de temperatura intramuscular e, dessa forma, não é possível inferir que tal fato possa ter tido influência sobre os resultados atingidos nos grupos submetidos ao exercício. Salienta-se, então, a necessidade de futuros estudos em que tais parâmetros (histoquímicos e alterações de temperatura) sejam utilizados sobre as variáveis sarcoméricas estudadas (número de sarcômeros em série e comprimento do sarcômero).

CONCLUSÃO

Foi possível concluir, na presente pesquisa, que o exercício foi eficaz na remobilização de músculos sóleos de ratos Wistar e, quando realizado de maneira mais intensa, proporcionou melhores resultados com relação ao número de sarcômeros em série; contudo, com relação ao peso muscular, apenas a marcha em 10m/min foi suficiente para reverter os malefícios da imobilização.

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi financiado parcialmente pelas instituições Unioeste e FAG.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burkholder TJ, Lieber RL. Sarcomere number adaptation after retinaculum transection in adult mice. *J Exp Biol* 1998;201:309-16.
- Aoki MS, Miyabara EH, Soares AG, Salvini TF, Moriscot AS. Cyclosporin-A does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:243-51.
- Decoster LC, Scanlon RL, Horn KD, Cleland J. Standing and supine hamstring stretching are equally effective. *J Athl Train* 2004;39:330-4.
- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Horinouchi K, Tanaka N. Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive repetitive stretching. *Arch Phys Med Rehabil* 2004;85:166-7.
- Stevens AE, Walter GA, Okereke E, Scarborough MT, Esterhai JL, George SZ, et al. Muscle adaptations with immobilization and rehabilitation after ankle fracture. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:1695-701.
- Sakakima H. Effects of immobilization and subsequent low and high frequency treadmill running on rat soleus muscle and ankle joint movement. *J Phys Ther Sci* 2004;16:43-8.
- Shah SB, Peters D, Jordan KA, Fridén J, Capetanaki Y, Lieber RL. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol* 2001;204:1703-10.
- Frontera WR, Dawson DM, Slovick DM. Exercício Físico e Reabilitação. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- Dias CNK, Cancelliero KM, Durigan JLO, Silva CA, Guirro RRJ. Estimulação elétrica minimiza alterações metabólicas musculares durante e após a imobilização de membro posterior de ratos. *Fisioterapia e Pesquisa* 2006;13:6-13.
- Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004.
- Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1329-32.
- 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.
- Durigan JLO, Cancelliero KM, Dias CNK, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfológica. *Fisioterapia e Pesquisa* 2006;13:38-45.
- Kannus P, Jozsa L, Järvinen TLN, Kvist M, Vieno T, Järvinen TAH, et al. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol* 1998;84:1418-24.
- Järvinen TAH, Józsa L, Kannus P, Järvinen TLN, 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 Motility* 2002;23:245-54.
- Ahtikoski AM, Koskinen SOA, Virtanen P, Kovanen V, Takala TES. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand* 2001;172:131-40.
- Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 1999;194:323-34.
- Booth FW. Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. *J Appl Physiol* 1978;44:225-30.
- Adams GR, McCue SA. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 1998;81:1716-22.
- Adams GR. Exercise effect on muscle insulin signaling and action. Invited review: autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J Appl Physiol* 2002;93:1159-67.
- Ishihara A, Kawano F, Ishioka N, Oishi H, Higashibata A, Shimazu 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.
- 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.
- Knight CA, Rutledge CR, Cox ME, Acosta M, Hall SJ. Effect of superficial heat, deep heat, and active exercise warm-up on the extensibility of the to plant flexors. *Phys Ther* 2001;81:1206-14.
- Sharma J, White C, Senjyu H. A description of single case design – as an example to evaluate the effect of warm-up and stretching on hamstring flexibility in a clinical setting. *J Phys Ther Sci* 2004;16:21-6.