



ADAPTAÇÕES DO TECIDO MÚSCULO-ESQUELÉTICO DE RATOS E HUMANOS
SUBMETIDO A ESTÍMULO DE ALONGAMENTO: ACOMPANHAMENTO
LONGITUDINAL COM A TÉCNICA ULTRASSÔNICA

Carolina Carneiro Peixinho

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: João Carlos Machado

Rio de Janeiro

Julho de 2013

ADAPTAÇÕES DO TECIDO MÚSCULO-ESQUELÉTICO DE RATOS E HUMANOS
SUBMETIDO A ESTÍMULO DE ALONGAMENTO: ACOMPANHAMENTO
LONGITUDINAL COM A TÉCNICA ULTRASSÔNICA

Carolina Carneiro Peixinho

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Examinada por:

Prof. João Carlos Machado, Ph.D.

Prof. Liliam Fernandes de Oliveira, D.Sc.

Prof. Luciano Luporini Menegaldo, D.Sc.

Prof. Luiz Alberto Batista, Ph.D.

Prof. Tânia de Fátima Salvini, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2013

Peixinho, Carolina Carneiro

Adaptações do Tecido Músculo-esquelético de Ratos e Humanos Submetido a Estímulo de Alongamento: Acompanhamento Longitudinal com a Técnica Ultrassônica/ Carolina Carneiro Peixinho. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XI, 112 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: João Carlos Machado

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 96-112.

1. Biomicroscopia ultrassônica. 2. Ultrassonografia. 3. Alongamento. 4. Arquitetura muscular. I.Machado, João Carlos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

Dedicatória

À minha família, por toda a luz que me envolve.

Agradecimentos

Ao meu orientador João Carlos Machado, pela presença e atenção constantes e pela permanente prestreza na resolução das dificuldades encontradas.

À minha orientadora Liliam Fernandes de Oliveira, por percorrer comigo iluminando todo o caminho sempre.

À professora Célia Resende, que permitiu o uso do aparelho de Biomicroscopia Ultrassônica.

Aos responsáveis do Laboratório de Biomecânica da Escola de Educação Física do Exército pelo espaço, equipamentos e indivíduos utilizados no trabalho.

Aos colegas Natalia Martins, Guilherme Gerken, Gabriel Abreu, Marcelle Rodrigues e Monisa Vieira Porto (e mestre Yoda), pela enorme ajuda e companheirismo durante os testes.

Aos professores do PEB-COPPE pelos conhecimentos partilhados.

Aos colegas e amigos do PEB, e especialmente aos do LABMUSC, por todos os momentos compartilhados ao longo dos anos do mestrado.

Ao meu marido, por tudo.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

ADAPTAÇÕES DO TECIDO MÚSCULO-ESQUELÉTICO DE RATOS E HUMANOS
SUBMETIDO A ESTÍMULO DE ALONGAMENTO: ACOMPANHAMENTO
LONGITUDINAL COM A TÉCNICA ULTRASSÔNICA

Carolina Carneiro Peixinho

Julho/2013

Orientador: João Carlos Machado

Programa: Engenharia Biomédica

O alongamento é utilizado para aumentar a amplitude de movimento e a literatura apresenta evidências científicas inconclusivas sobre sua atuação nos componentesmiotendíneos. Foram conduzidos experimentos com ratos e humanos utilizando a biomicroscopia ultrassônica (BMU) e a ultrassonografia (US), respectivamente, para acompanhar modificações da arquitetura muscular decorrentes de protocolos de alongamento, e distinguir as respostas dos componentes do complexo músculo-tendão, discriminando suas contribuições para o aumento de flexibilidade. A BMU foi aplicada para quantificar o ângulo de penação (AP), espessura muscular e comprimento do tendão de ratos submetidos a: imobilização muscular na posição alongada e programa de alongamento estático. O monitoramento da variação do comprimento do fascículo (CF) e do tamanho e quantidade dos sarcômeros foi feito através de técnicas *in vitro*. A imobilização provocou alterações na arquitetura muscular corroborando com o aumento do CF e do comprimento ou da quantidade de sarcômeros. O protocolo de alongamento para ratos promoveu uma redução significativa do AP e aumento do CF e da densidade linear de sarcômeros. Em humanos foram monitoradas alterações da arquitetura muscular e propriedades mecânicas do músculo e tendão após 10 semanas de alongamento. Os resultados indicaram remodelação do tecido muscular (aumento significativo do CF máximo e redução significativa do AP mínimo). Foram encontradas adaptações diferenciadas dos tecidos muscular e tendíneo correlacionadas com o grau de flexibilidade individual, indicando que ganhos de amplitude para indivíduos flexíveis são menores e ocorrem prioritariamente por uma variação na contribuição do músculo e, para indivíduos rígidos, por uma variação na contribuição do tendão.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ADAPTATIONS OF SKELETAL MUSCLE TISSUE OF RATS AND HUMANS TO
LONG-TERM STRETCHING: LONGITUDINAL FOLLOW-UP WITH ULTRASONIC
TECHNIQUE

Carolina Carneiro Peixinho

July/2013

Advisors: João Carlos Machado

Department: Biomedical Engineering

Muscle stretching is used as a method to increase range of motion. Scientific literature presents inconclusive evidence about the real influence of stretching on myotendinous components. Experiments were conducted with animals and humans using ultrasound biomicroscopy (UBM) and ultrasound (US), respectively to track changes of muscle architecture due to stretching protocols, and to distinguish muscle-tendon complex components responses, detailing their contributions to increased joint flexibility. UBM was applied to quantify pennation angle (PA), muscle thickness and tendon length of rats subjected to: muscle immobilization in a stretched position and a static stretching program. Changes in fascicle length (FL) and in the length and number of sarcomeres were monitored by *in vitro* techniques. The immobilization caused changes in muscle architecture that are coherent with a possible FL increase and with alterations of sarcomere length or number. The stretching protocol for rats promoted significant increases of FL, PA and the sarcomeres linear density. In humans, changes in muscle architecture (PA, FL) and in muscle and tendon mechanical properties were monitored after a 10-week stretching program. The results indicated muscle tissue remodeling (significant increase in the maximum FL and significant reduction in the minimum PA). Different adaptations of muscle and tendon correlated with the individual degree of flexibility were detected. It seems that additional gains in the range of motion for flexible individuals are smaller and occur primarily by a change in muscle, whereas for non-flexible subjects, such gains are greater and occur by tendon adaptations.

SUMÁRIO

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	5
2.1 – OBJETIVO GERAL	5
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 -REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 – ALONGAMENTO: Efeitos Agudos	6
3.2 – ALONGAMENTO: Efeitos Crônicos	10
3.3 – BMU	13
4 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
4.1 – ALONGAMENTO	15
4.1.1 – <i>Tipos de Alongamento</i>	15
4.2 – TRÍCEPS SURAL	16
4.3 – UNIDADE MÚSCULO-TENDÃO	16
4.3.1 – <i>Músculo Esquelético</i>	16
4.3.2 – <i>Tecido Conjuntivo Intramuscular</i>	18
4.3.3 – <i>Tendão</i>	19
4.4 – ARQUITETURA MUSCULAR	20
4.4.1 - <i>Definição e Implicações Fisiológicas</i>	20
4.4.2 – <i>Ângulo de Penação</i>	22
4.4.3 – <i>Espessura Muscular</i>	22
4.4.4 – <i>Comprimento do Fascículo</i>	23
4.5 - CARACTERÍSTICAS BIOMECÂNICAS	24
4.6 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DO MÚSCULO	25

4.7 – TEORIAS PARA AUMENTO DA EXTENSIBILIDADE MUSCULAR	27
4.7.1 – <i>Deformação Viscoelástica</i>	27
4.7.2 – <i>Deformação Plástica do Tecido Conjuntivo</i>	28
4.7.3 – <i>Aumento dos Sarcômeros em Série</i>	28
4.7.4 – <i>Relaxamento Neuromuscular</i>	29
4.8 – ADAPTAÇÕES DA UMT A CONDIÇÕES DIFERENCIADAS DE USO	30
4.9 – IMAGEM POR ULTRASSOM	31
4.9.1 – <i>Imagem por Ultrassom de Baixa Frequência</i>	31
4.9.2 – <i>Biomicroscopia Ultrassônica</i>	34
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 – VISÃO GERAL DA METODOLOGIA DA PESQUISA	36
5.2 – METODOLOGIA – ANIMAIS	36
5.2.1 – <i>Instrumentação de BMU</i>	37
5.2.2 – <i>Quantificação dos Parâmetros de Arquitetura Muscular</i>	38
5.2.3 – <i>Separação das Fibras e Contagem dos Sarcômeros</i>	39
5.2.4 – <i>Animais</i>	40
5.2.5 – <i>Procedimentos Específicos do Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas</i>	40
5.2.6 – <i>Procedimentos Específicos do Grupo de Imobilização Muscular na Posição Alongada</i>	40
5.2.7 – <i>Procedimentos Específicos do Grupo de Alongamento</i>	42
5.3 – METODOLOGIA - HUMANOS	43
5.3.1 – <i>Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas</i>	43
5.3.1.1 – <i>Equipamentos</i>	44
5.3.1.2 – <i>Procedimentos</i>	44
5.3.1.3 – <i>Análise Estatística</i>	45
5.3.2 – <i>Grupo de Alongamento</i>	46
5.3.2.1 – <i>Protocolo Experimental de Alongamento</i>	46

5.3.2.2 – Testes	46
5.3.2.3 – Equipamentos	47
5.3.2.4 – Procedimentos	48
5.3.2.5 – Variáveis Monitoradas	50
5.3.2.5.1 – Variação do Comprimento do Fascículo e do Ângulo de Penação	51
5.3.2.5.2 – Deslocamento da Junção Miotendínea	52
5.3.2.5.3 – Deformação do Comprimento da UMT	53
5.3.2.5.4 – Contribuição do Músculo e do Tendão Para Variação de Comprimento da UMT	54
5.3.2.6 – Análise Estatística	54
6 - RESULTADOS	55
6.1 – RESULTADOS – ANIMAIS	55
6.1.1 – Resultados - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas	55
6.1.2 – Resultados - Grupo de Imobilização Muscular na Posição Alongada	57
6.1.3 – Resultados - Grupo de Alongamento	59
6.2 – RESULTADOS – HUMANOS	61
6.2.1 – Resultados - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas	61
6.2.2 – Resultados - Grupo de Treinamento de Alongamento	62
7 - DISCUSSÃO	65
7.1 – DISCUSSÃO – ANIMAIS	65
7.1.1 – Discussão - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas	65
7.1.2 – Discussão - Grupo de Imobilização	

<i>Muscular na Posição Alongada</i>	67
<i>7.1.3 – Discussão - Grupo de Alongamento</i>	70
7.2 – DISCUSSÃO – HUMANOS	74
<i>7.2.1 – Discussão - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas</i>	74
<i>7.2.2 – Discussão- Grupo de Treinamento de Alongamento</i>	77
8 - CONCLUSÃO	90
Referências Bibliográficas	91

LISTA DE SIGLAS

ADM – Amplitude de Movimento

AP – Ângulo de Penação

BMU – Biomicroscopia Ultrassônica

CCI – Coeficiente de Correlação Intraclasse

CF – Comprimento do Fascículo

CT – Comprimento do Tendão

CV – Coeficiente de Variação

CVM – Contração Voluntária Máxima

DF – Dorsiflexão

EM – Espessura Muscular

EMG – Eletromiografia

ETM – Erro Típico de Medida

GA – Grupo Alongamento

GC - Grupo Controle

GI – Grupo Imobilização

GL – Gastrocnêmio Lateral

GM – Gastrocnêmio Medial

JMT – Junção Miotendínea

SOL – Sóleo

TS – Tríceps Sural

UMT – Unidade Músculo-Tendão

US – Ultrassonografia

1 - INTRODUÇÃO

As características funcionais do músculo esquelético são altamente influenciadas pela arquitetura muscular, terminologia utilizada para definir características estruturais como o arranjo das fibras musculares relativas ao eixo de geração de força do músculo [1, 2], o comprimento do fascículo (CF) e a espessura muscular (EM). As relações das características mecânicas da arquitetura são utilizadas na estimativa da força muscular, e, conseqüentemente, da sua função. Demandas funcionais impostas ao músculo esquelético acarretam em um rearranjo da arquitetura muscular, refletindo nas relações da força com o comprimento e com a velocidade de contração da fibra muscular. Modelos experimentais de uso aumentado e desuso demonstram o alto grau de plasticidade dos parâmetros da arquitetura muscular. Estes, inicialmente medidos em cadáveres, têm sido quantificados através de técnicas não-invasivas de imagens, como a ultrassonografia (US) e a ressonância magnética [3, 4, 5, 6, 7].

A US se legitimou como uma técnica de alta aplicabilidade para monitorar, *in vivo*, alterações estruturais do tecido músculo-esquelético e tendíneo em tempo real, e em condições estáticas e dinâmicas. Sua utilização em larga escala para verificação das adaptações musculares em humanos se justifica por características como portabilidade, baixo custo relativo e ausência de risco para os indivíduos testados. A Biomicroscopia Ultrassônica (BMU) é uma técnica de geração de imagens ultrassônicas de alta resolução cuja importância e potencial têm sido evidenciados por muitas pesquisas nas áreas médica e biológica [8, 9, 10, 11, 12]. A BMU utiliza frequências que variam de 40 a 60MHz, o que possibilita uma resolução, em profundidade, na ordem de micrômetros ($\cong 30\mu\text{m}$ em 50MHz) [8, 13], obtendo para pequenos animais imagens similares àquelas dos equipamentos de US usados para diagnósticos de lesões musculares em humanos. A BMU confirmou seu potencial para produção de imagens de tecido muscular esquelético de ratos, que permitiram a quantificação e o acompanhamento das modificações dos parâmetros de arquitetura muscular em um processo de regeneração, desencadeado por protocolo de lesão [14]. O procedimento de aquisição e processamento de imagens para medição das características de arquitetura muscular mostrou alta confiabilidade e reprodutibilidade, o que sugere aplicações em pesquisas funcionais e aplicadas de acompanhamento longitudinal [15] ampliando o espectro de resultados com intervenções que não podem ser utilizadas com humanos.

Uma linha de pesquisa aplicada que tem despertado interesse geral da comunidade científica se refere à plasticidade muscular em condições de alteração aguda ou crônica do comprimento muscular, como a imobilização em posições alongadas ou o treinamento de alongamento. O alongamento muscular é utilizado como um método para aumentar ou recuperar a amplitude de movimento (ADM) articular e, assim, melhorar o desempenho muscular pelo aumento da flexibilidade [16, 17, 18]. Este tipo de treinamento tem sido justificado como meio para redução do risco de lesões e da dor associada à rigidez muscular, apesar de evidências científicas inconclusivas e controversas. Por algum tempo, os estudos avaliaram a flexibilidade através da amplitude articular, embora esta técnica de avaliação tenha algumas limitações. Por exemplo, a medição é realizada no ponto final do movimento o que pode ser influenciado por fatores como tolerância à dor durante o alongamento e à ativação reflexa dos músculos agonistas [19, 20]. A principal limitação desta avaliação, para fins científicos, é a impossibilidade em diferenciar as mudanças ocorridas nas propriedades das diferentes estruturas internas musculares.

O acompanhamento de mudanças agudas no tecido muscular esquelético de humanos referentes aos protocolos de estímulo de alongamento evidenciou alterações nas propriedades musculotendíneas relacionadas ao ganho de amplitude articular, melhora de desempenho físico e redução do risco de lesões, tais como: redução da viscoelasticidade; aumento da elasticidade e complacência dos tendões [16, 21–25]; redução da rigidez muscular e da força passiva. A tensão passiva reduzida em um determinado comprimento muscular é normalmente atribuída a alterações no tecido conjuntivo e nas miofibrilas, [22, 23, 24, 25, 26, 27].

O alongamento também promoveu, de forma aguda, um aumento do comprimento muscular [28] e redução da força durante contração voluntária máxima (CVM) [28, 29, 30, 31, 32, 33]. Ainda não foi determinado se estes dois fenômenos estão associados. Um deslocamento do pico de tensão muscular na relação comprimento-tensão tem sido sugerido como mecanismo para explicar a possível associação. O aumento do comprimento pode refletir em redução na amplitude de CVM, conforme relatado por alguns autores [28, 31], devido ao músculo se encontrar em uma porção diferente da ótima de sua curva comprimento-tensão. Este aumento foi atribuído, por alguns autores, a uma adição de sarcômeros em série, embora apenas um estudo de caso em humanos tenha evidenciado esta adaptação [34].

Foi demonstrado, em músculos isolados de animais, que um alongamento passivo prolongado induz mudanças na relação comprimento-tensão passiva, relacionadas às propriedades viscoelásticas da unidade músculo-tendão (UMT) [35]. Além disso, modelos animais que utilizaram a imobilização muscular em uma posição alongada, por dias ou semanas, demonstraram aumento do número de sarcômeros em série e do comprimento total da fibra [36, 37, 38, 39], e o alongamento moderado realizado durante 30 minutos por dia foi suficiente para reduzir ou reverter o encurtamento da fibra que acompanhou a imobilização em posições encurtadas em um músculo de rato [37].

Os mecanismos para as alterações agudas e crônicas decorrentes do alongamento ainda são questionados e a resposta aguda tem sido atribuída a fatores neurofisiológicos e mecânicos [40, 41]. A explicação neurofisiológica sugere que o fator limitante durante o alongamento seja a resistência muscular devida à atividade reflexa [40, 41], portanto a base neurofisiológica de algumas técnicas de alongamento é a inibição neural com decréscimo da atividade reflexa, reduzindo a resistência, e melhorando a amplitude de movimento. Paradoxalmente, as técnicas com maior eficiência no aumento agudo da amplitude de movimento articular estão associadas com uma elevada resposta eletromiográfica [18, 25, 31, 42]. Alternativamente, foi proposto que a adaptação aguda pode ser atribuída a um aumento da tolerância ao alongamento e não a uma mudança na atividade eletromiográfica [18, 23, 43]. Uma terceira explicação para os efeitos agudos é a alteração nas propriedades mecânicas do músculo, que pode ocorrer pela deformação viscosa ou através de adaptações estruturais dos componentes miotendíneos [18, 25, 43]. Tecidos biológicos sob tensão exibem um comportamento viscoelástico quando submetidos a uma força externa constante [24, 25, 44], e dados de modelos animais evidenciam que a UMT exibirá este tipo de comportamento durante as fases dinâmica e estática do alongamento [45, 46, 47].

No entanto, há poucos estudos na literatura que tenham monitorado as adaptações mecânicas e estruturais de músculos submetidos a um treinamento de alongamento por tempo prolongado. Modelos humanos mostraram que um regime crônico de treinamento de flexibilidade pode aumentar a amplitude articular [16, 26, 48–52], e o comprimento muscular [16, 23, 49] e sugerem que o mecanismo para este aumento seja uma mudança nas propriedades materiais do músculo [16, 49]. Existem dados discrepantes acerca dos efeitos do alongamento crônico na resistência muscular passiva e nas propriedades mecânicas da UMT [23, 35, 43, 50, 53].

Estudos clínicos com humanos têm focado a atividade eletromiográfica muscular, e a resistência passiva das estruturas da UMT, enquanto a análise microestrutural tem sido mais aplicada em investigações com modelos animais. Entretanto, existem ainda lacunas científicas, entre as quais Magnusson [16] propõe: em que porção da UMT o fenômeno de *stress-relaxation* (redução da tensão passiva após manutenção da estrutura sob a ação de uma força externa constante) ocorre (nos componentes elásticos em paralelo ou em série)? Existe um volume de alongamento crônico capaz de promover alterações teciduais viscoelásticas? O papel dos componentes neurofisiológicos e biomecânicos no alongamento do músculo esquelético continua não esclarecido e não foi possível encontrar na literatura estudos envolvendo análises conjuntas para distinção das adaptações dos componentes contráteis e não-contráteis da UMT ao estímulo agudo ou crônico de alongamento.

A análise das imagens de BMU (ratos) e de US convencional (humanos) do tecido muscular esquelético permitiu avaliar as características da arquitetura muscular *in vivo* e acompanhar suas modificações decorrentes de um protocolo de alongamento, para distinguir as respostas dos componentes contráteis (características arquitetônicas: ângulo de penação – AP- CF e EM) e não-contráteis (comprimento do tendão – CT) do complexo músculo-tendão, discriminando suas contribuições para o aumento de flexibilidade, resultados ainda não encontrados na literatura para intervenções de longa duração.

O acompanhamento longitudinal das mudanças morfológicas provocadas pelo alongamento *in vivo* é um grande passo na busca pelo esclarecimento dos mecanismos inerentes aos processos adaptativos do tecido, e a BMU se mostrou como uma ferramenta potencial para tal, associada a outras técnicas *in vitro* para contagem do número de sarcômeros em série. Paralelamente, um protocolo de alongamento similar foi realizado em humanos e avaliações similares da arquitetura muscular foram realizadas através de US [22, 27, 54], além da análise do comportamento da UMT durante mobilização articular passiva, provendo resultados das adaptações de propriedades mecânicas como a deformação relativa do músculo e do tendão, e resultados de resistência passiva e amplitude articular.

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é a caracterização da arquitetura muscular e das propriedades mecânicas da UMT do tríceps sural (TS) de ratos e humanos submetidos a protocolos de alongamento de longa duração, e o acompanhamento da plasticidade dos parâmetros no processo de adaptação destes tecidos (músculo e tendão), através de imagens ultrassônicas de alta e baixa frequências, e técnicas de contagem de sarcômeros (*in vitro*).

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar biomecanicamente o tecido muscular esquelético do gastrocnêmio de ratos e humanos, através de um estudo de variabilidade e confiabilidade das medidas realizadas em imagens de US;
- Definir um protocolo de alongamento com características metodológicas similares para ratos e humanos;
- Acompanhar e rastrear adaptações crônicas no tecido muscular esquelético de ratos e humanos durante o período de treinamento de alongamento, investigando o potencial adaptativo diferenciado do músculo e do tendão através da medição e estimativa dos seguintes parâmetros:
 - Características arquitetônicas (AP, EM, CF e CT) através das imagens de US (humanos) e BMU (ratos);
 - Número e comprimento de sarcômeros em série *in vivo* através da microscopia ótica (ratos);
 - Deslocamento da JMT durante mobilização articular nas imagens de US, correspondente à variação do comprimento muscular (humanos);
 - Variação do comprimento do tendão durante mobilização articular (humanos);
 - Variação do comprimento da UMT durante mobilização articular através de equações de regressão validadas na literatura [55].

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – ALONGAMENTO: Efeitos Agudos

Quando a unidade músculo tendão é submetida a uma força de alongamento e o comprimento alcançado é mantido constante, a força passiva gradualmente diminui. Esse fenômeno é conhecido como “*stress relaxation*” e ocorre porque a maioria dos tecidos biológicos possui propriedades viscoelásticas [26, 27]. Tanto os tecidos contráteis como os não-contráteis têm propriedades elásticas e plásticas. Quando submetidos a baixas cargas eles apresentam comportamento elástico, ou seja, a alteração no tecido é diretamente proporcional à tensão aplicada com efeitos reversíveis após a liberação da tensão [26, 27, 65]. Em cargas mais altas, apresentam resposta plástica, e neste caso o tecido deforma-se permanentemente quando é sobrecarregado além de sua amplitude elástica. Além disso, quando as cargas são aplicadas durante um tempo, o tecido exhibe deformação viscosa [25] que é uma adaptação aguda do componente elástico em paralelo aos componentes contráteis para diminuir a carga imposta na junção miotendínea [18, 24, 25]. O componente elástico em paralelo é encontrado no sarcolema e no tecido conjuntivo ao redor do músculo (endomísio, perimísio e epimísio). Quando um músculo está sendo alongado passivamente, o componente elástico em paralelo oferece uma força de oposição e previne que os elementos contráteis sejam tracionados por forças externas além da amplitude fisiológica. O comportamento viscoelástico implica a combinação de propriedades viscosas, em que a deformação é dependente da taxa de alongamento, e propriedades elásticas, em que a deformação é dependente da carga [18, 24, 25]. O fenômeno viscoelástico de *stress relaxation* muscular foi demonstrado *in vitro* [45, 47] e *in vivo* [66, 67] no músculo esquelético humano.

Na literatura, é frequentemente sugerido que o torque passivo produzido durante o alongamento passivo é o fator limitante para maiores amplitudes articulares [16, 40] e pode ser o resultado tanto de fatores neurais quanto mecânicos [20, 35, 68]. A explicação neurofisiológica sugere que o fator limitante do alongamento seria a atividade reflexa muscular. Sendo assim, o objetivo do alongamento seria inibir a atividade reflexa reduzindo a resistência muscular e, conseqüentemente proporcionando maior amplitude articular. Porém, Magnusson [16] mediu o torque passivo, a amplitude articular e a atividade eletromiográfica dos músculos isquiotibais de dez voluntários

após a realização de dois protocolos de alongamento destes músculos: estímulos repetidos (análise dinâmica) e um estímulo estático. O autor demonstrou que apesar de um aumento não-linear da resistência passiva (rigidez) durante a fase dinâmica não houve uma alteração associada da atividade eletromiográfica, enquanto na fase estática houve um declínio do torque passivo durante aproximadamente 40-45 segundos de aplicação do estímulo, significando 30% de *stress relaxation*. O autor sugere que o colágeno, principal componente do tecido conjuntivo muscular e responsável pela integridade estrutural e força mecânica, seja o responsável por tal resposta viscoelástica [16, 69]. A conclusão do estudo é de que a atividade contrátil reflexa não contribui para a resposta viscoelástica nas fases dinâmica e estática de um alongamento passivo estático e que a adaptação aguda deve ser atribuída às alterações viscoelásticas no tecido que tornariam a UMT mais complacente. Consequentemente, haveria a redução do torque passivo e o aumento da amplitude articular, apesar dos efeitos apresentados serem transientes e os valores de torque e energia retornarem aos níveis originais após uma hora. Outros estudos do mesmo grupo reproduzem estes resultados com metodologias distintas [23, 24, 25].

Osternig *et al.* [61] compartilharam da mesma opinião, pois verificaram que durante a utilização da facilitação neuromuscular proprioceptiva, cujo objetivo é a melhora aguda da amplitude articular, a resposta eletromiográfica dos isquiotibiais durante a extensão do joelho foi elevada, não havendo inibição reflexa dos músculos e não sendo possível afirmar que os fatores neurofisiológicos seriam limitantes para o alongamento.

Com relação aos efeitos imediatos de sessões únicas de alongamento, é reportado um aumento da extensibilidade do músculo (capacidade de se alongar sem ativação) que se reflete em uma maior amplitude articular [62, 63, 64, 65]. Várias teorias foram propostas para explicar este aumento como a deformação viscoelástica, deformação plástica, alterações nas propriedades mecânicas, relaxamento neuromuscular ou simplesmente uma modificação na sensação que acompanha o alongamento das estruturas [65].

Há na literatura um número crescente de estudos descrevendo a utilização do US convencional de imagem para avaliação do sistema músculo-esquelético humano em diferentes aplicações, como o alongamento [26, 27, 54, 75]. Estudos com alongamento em humanos utilizando a ultrassonografia demonstram alterações agudas das propriedades viscoelásticas da UMT, e mais especificamente nas propriedades

mecânicas do tendão e tecido conjuntivo, tais como redução da rigidez, aumento da complacência do tendão, redução da histerese e do módulo de Young [26, 27, 54, 76, 77].

Kubo *et al.* [22] avaliaram as propriedades mecânicas do tendão e aponeurose do gastrocnêmio medial (GM) de oito indivíduos do sexo masculino através da ultrassonografia após 5 minutos de alongamento. As medidas foram tomadas durante uma contração isométrica em rampa imediatamente após cada alongamento e o resultado foi a diminuição da rigidez (7,9%) e da histerese (29%), indicando aumento no alongamento das estruturas do tendão. Este resultado concorda com estudo anterior feito pelo mesmo autor em que foi demonstrada a ocorrência de diminuição significativa da rigidez e da histerese após alongamento de 10 minutos. Os autores sugerem que esses resultados podem ser atribuídos a uma mudança aguda na disposição das fibras de colágeno, o que também foi observado por outros autores em pesquisas realizadas *in vitro* [69]. Além disso, o alongamento estático diminuiu a viscosidade das estruturas do tendão assim como aumentou a elasticidade. Estes resultados são corroborados por outros como os de Burgess *et al.* [67] que compararam o efeito agudo do alongamento nas propriedades mecânicas do tendão do GM entre homens e mulheres. Após 5 minutos de alongamento passivo em flexão dorsal foram avaliados a rigidez, o comprimento e a área de secção transversa do tendão, com redução significativa apenas da rigidez e do módulo de Young para ambos os sexos, porém com maior alteração no sexo feminino. Morse *et al.* [63] demonstraram que a rigidez da UMT e do músculo, medidos pelo deslocamento da JMT do GM durante a dorsiflexão (DF) passiva do tornozelo, diminuíram após 5 minutos de alongamento estático, embora sem alterações nas propriedades do tendão. Kay e Blazeovich [70] reportam resultados similares após 3 minutos de alongamento estático, reforçando que a redução da rigidez da UMT imediatamente após um estímulo de alongamento é decorrente de mudanças na rigidez do músculo e não do tendão.

Outros estudos com US tentaram discriminar as deformações individuais do músculo e do tendão relativas à variação de comprimento da UMT durante um movimento de alongamento, reportando resultados controversos. Abellaneda *et al.* [66] descrevem uma menor contribuição do tendão (28%), enquanto Herbert *et al.* [71] apresentam valores inversos (27% de contribuição dos fascículos musculares), porém com metodologias distintas, evidenciando a importância da adoção de uma metodologia comum para comparação entre estes tipos de análise.

Morse *et al.* [63] utilizaram esta abordagem para analisar os resultados de cinco séries de 1 minuto de alongamento dos flexores plantares além de fornecer dados sobre características biomecânicas dos componentes contráteis (CF e AP). Eles concluíram que antes do alongamento, a extensão da UMT é igualmente distribuída pelas fibras e pelo tendão, mas após o alongamento, não há alteração na contribuição do músculo para o aumento total do comprimento da UMT observado, o que se explicaria por uma maior complacência da aponeurose interna. Os autores atribuem estes resultados a possíveis alterações nas propriedades dos elementos do tecido conjuntivo, porém sugerem novos estudos para entender melhor esses elementos e como eles são afetados pelo alongamento. Outros estudos [81, 82] corroboraram estes resultados utilizando a mesma metodologia para análise e o mesmo protocolo de alongamento.

Um dos efeitos agudos do alongamento mais relatados na literatura é a redução do potencial de produção de força. Schwane *et al.* [74] observaram uma redução de 61% na força após duas horas de alongamento do músculo sóleo (SOL) de ratos. O comprometimento da força máxima após alongamento passivo foi demonstrado em estudos com modelos animais [75] e em estudos com humanos [76]. Diversos estudos mostram que este déficit de força induzido pelo alongamento afeta a produção de força isométrica [28, 33], o pico de torque concêntrico isocinético [33, 42], a performance em saltos verticais [33, 78] e o equilíbrio [33, 79]. Duas hipóteses principais são propostas para explicar este déficit: fatores mecânicos, como a redução na rigidez miotendínea, que podem afetar a relação comprimento-tensão e/ou a velocidade de encurtamento dos sarcômeros [28, 85–87]; e fatores neurais, como reduções na excitabilidade dos motoneurônios, que podem reduzir a ativação muscular periférica [28, 42, 68].

Mais especificamente, Fowles *et al.* [28] relatam uma redução de 28% na contração isométrica voluntária máxima após 30 minutos de alongamento dos flexores plantares, resultado corroborado por Avela *et al.* [59] que encontraram redução de 23% para uma intervenção de 60 minutos. Este decréscimo é explicado pela redução da atividade neural muscular e da capacidade mecânica de geração de força e os autores sugerem que o comprimento aumentado dos fascículos corresponderia a um deslocamento da curva comprimento-tensão de forma que o músculo se encontrasse em uma porção da curva diferente da ótima para o ângulo testado. Nelson *et al.* [77] propõem que se ocorrem aumentos no comprimentos dos fascículos ou dos sarcômeros induzidos pelo alongamento, este fato iria requerer que os sarcômeros se encurtassem uma distância maior no mesmo tempo, aumentando a velocidade de encurtamento dos

sarcômeros. E, pelo menos, durante uma ação isocinética em que a amplitude de movimento e a velocidade se mantêm constantes, este aumento de velocidade de encurtamento poderia diminuir o número de sarcômeros capazes de contribuir para a produção de força devido à relação velocidade-comprimento.

3.2 – ALONGAMENTO: Efeitos Crônicos

Apesar de afirmações constantes na literatura de que programas de alongamento melhoram a flexibilidade, há poucos estudos que investigaram os mecanismos de adaptação ao alongamento muscular crônico, não sendo possível afirmar se a melhora de flexibilidade a longo prazo ocorre primordialmente por adaptações neurais ou mecânicas. Três mecanismos têm sido descritos como responsáveis pelo aumento duradouro na amplitude de movimento após um programa de exercícios de alongamento sem, porém, um consenso na literatura: as alterações nas propriedades viscoelásticas do tecido muscular [30, 31, 37, 89]; o efeito neurofisiológico através do aumento na tolerância ao alongamento [17, 40]; e a remodelação tecidual [81]. Gajdosik *et al.* [50] suportam a justificativa de que o efeito crônico no ganho da amplitude de movimento, em resposta ao alongamento, decorre de alterações nas propriedades viscoelásticas dos tecidos envolvidos. Esse mecanismo determina que ocorra redução da tensão passiva ao longo do tempo, levando a modificações no comprimento muscular quando uma UMT é alongada e mantida a um comprimento fixo por um determinado período. Toft *et al.* [82] relataram aumento do torque passivo no ângulo de dorsiflexão máximo dos flexores plantares após 3 semanas de programa de alongamento, enquanto Magnusson [16] demonstrou que propriedades mecânicas são afetadas por exercícios de alongamento, mas retornam aos valores iniciais dentro de 1 hora, não observando mudanças crônicas na rigidez dos isquiotibiais após treinamento embora tenha ocorrido aumento na amplitude articular do joelho[35]. Concluem, portanto, que este aumento é decorrente de uma maior tolerância ao alongamento, associada a capacidade de tolerar um maior pico de torque passivo atingido devido a uma maior amplitude articular, e não de mudanças nas propriedades viscoelásticas ou mecânicas da UMT. O autor explica que, se as adaptações viscoelásticas do tecido fossem o mecanismo pelo qual há o aumento na amplitude de movimento após um programa de alongamento, a resposta esperada seria a redução na rigidez muscular e na energia. Porém, em seu estudo estes dois parâmetros permaneceram inalterados, denotando não haver mudanças duradouras

nas propriedades viscoelásticas do tecido muscular após um programa de alongamento composto por duas sessões diárias e com duração de 20 dias [16], atribuindo, portanto o incremento na amplitude de movimento ao aumento na tolerância ao alongamento.

Resultados de aumento da amplitude máxima de movimento sem mudanças na curva torque-ângulo foram repetidamente reportados por diversos autores com vários tipos de alongamento e através de diferentes metodologias [65]. A modificação da resposta sensorial após programas de alongamento de 3 a 8 semanas dos flexores plantares e do reto femoral também foi demonstrada. O mecanismo que explica a alteração na tolerância e sensação de dor não é conhecido, entretanto, sugere-se que os mecanismos periféricos, através dos receptores dos músculos, tendões e articulações possam estar envolvidos. Guissard *et al.* [35], em um dos poucos estudos de longo prazo, demonstraram que 30 sessões de alongamento estático dos músculos flexores plantares aumentaram a amplitude da DF sugerindo como mecanismos para este fenômeno a redução da rigidez passiva e a alteração da atividade reflexa muscular, com respostas temporais diferentes. Segundo os autores, o torque passivo máximo só apresentou um pequeno aumento significativo após as 10 primeiras sessões, retornando aos valores pré-treinamento com a sequência do programa, embora a amplitude articular tenha aumentado progressivamente até o término do treinamento. Estes autores concluem que o aumento da tolerância ao alongamento, indicado por valores maiores de torque máximo, é um efeito transiente e que mudanças plásticas dos elementos elásticos em paralelo devem ter ocorrido com a progressão do treinamento. Outros autores defendem que para ocorrer alterações duradouras no comprimento muscular são necessárias modificações na estrutura do músculo, ou seja, remodelação tecidual, fenômeno que foi primeiramente observado em estudos com animais [36, 37].

Pesquisas iniciais para avaliação de estímulo de alongamento crônico realizadas em animais utilizavam a imobilização articular em uma posição alongada para observar os efeitos na mudança de comprimento do músculo. Williams *et al.* [37] e Goldspink *et al.* [36] imobilizaram o tornozelo de camundongos em DF para alongamento do músculo SOL e após apenas 4 semanas observaram um aumento de 20% do número de sarcômeros em série. Os mesmos autores conduziram outros estudos em que o tornozelo era imobilizado em flexão plantar, encurtando o SOL, que tinha então seu número de sarcômeros em série reduzido em 40%. Protocolos similares de imobilização na posição alongada e técnicas de distração osteogênica para aumento do comprimento de membros foram utilizados por vários pesquisadores em ratos, coelhos e bodes de

diferentes idades e em diferentes músculos, apresentando resultados de aumento do número e/ou comprimento de sarcômeros em série, embora com distinções entre músculos e faixas etárias [83, 84, 85, 86]. A explicação para tais alterações está no fato que o músculo mudaria seu número ou o comprimento de sarcômeros em série após uma mudança crônica de comprimento muscular de forma que o comprimento ótimo do sarcômero para produção de força seja atingido na nova posição articular em que ele se encontra. Ou seja, o CF muscular é alterado, embora não se saiba a extensão de tal alteração, e estas mudanças podem ter importantes consequências funcionais [87]. Outros estudos recentes que aplicaram o alongamento em músculos imobilizados de animais, embora com protocolos menos radicais do que os citados acima, demonstraram resultados semelhantes, com alterações no comprimento número de sarcômeros em série e aumento da área de seção transversa das fibras musculares [97, 98]. Os autores demonstraram o aumento significativo no comprimento ($5\pm 2\%$), no número de sarcômeros em série ($4\pm 4\%$) e na área de secção transversa do músculo no grupo de ratos submetidos a um programa de três semanas de alongamento estático, aplicado três vezes por semana, com duração de 40 minutos cada sessão. O aumento na área de seção transversa e a adição de sarcômeros em série no músculo SOL de ratos também foi observado no estudo de Secchi *et al.* [90]. O protocolo utilizado foi aplicado por oito semanas de exercícios de alongamento estático, realizado 2 vezes por semana, com duração de 40 minutos e demonstrou que o alongamento estático estimula a síntese de proteínas e adição de sarcômeros em série ao longo da fibra muscular através da liberação de fatores de transcrição e de fatores de crescimento, como o IGF e o HGF, além de ativação de células satélites e aumento da síntese protéica e da expressão gênica como um todo. Todos estes fatores parecem estar envolvidos no processo de remodelação tecidual que resulta no aumento da flexibilidade.

Em humanos há evidências controversas em relação a adaptação do número de sarcômeros devido a um estímulo de alongamento, sendo todas as medições realizadas através de estimativas indiretas [34]. No entanto, em um estudo de caso, Lieber [34] acompanhou as mudanças no CF (através de US) e no número de sarcômeros em série (através de difração a laser) de um indivíduo submetido a aumento de 4 centímetros do comprimento do fêmur para redução de assimetria entre as pernas provocada por um acidente. O autor demonstrou que um ano após a cirurgia o CF estava aumentado em 100% enquanto o comprimento do sarcômero estava um pouco reduzido, o que comprova que o aumento do comprimento muscular deste indivíduo foi devido a um

aumento do número de sarcômeros em série. Com isto, o autor sugere que o número de sarcômeros em humanos pode variar em resposta ao alongamento.

A impossibilidade de medição do número de sarcômeros de forma não-invasiva em tempo real em humanos direcionou para o aparecimento de pesquisas que avaliem parâmetros da arquitetura muscular, como o comprimento do fascículo e o ângulo de penação, que permitam inferências sobre a remodelação estrutural do tecido músculo-esquelético submetido a intervenções de alongamento de longo prazo. Complementar à esta análise, a investigação de propriedades mecânicas dos tecidos muscular e tendíneo e suas respostas diferenciadas também é importante para avaliar as variações atribuíveis aos diferentes componentes músculo-tendíneos e neurais.

No entanto, poucos autores tentaram esta abordagem após um programa de alongamento de algumas semanas. Nakamura *et al.* [51] relataram um aumento significativo da amplitude máxima de movimento e do deslocamento da JMT do GM (de 0 a -30° de DF), representativo da deformação do músculo, além de uma redução significativa do torque passivo a -30° de DF e nenhuma alteração no comprimento do fascículo após 4 semanas de treinamento de alongamento estático do tríceps sural. Seus resultados sugerem que o programa de alongamento foi suficiente para reduzir a rigidez da UMT, especialmente a rigidez do músculo, sem, no entanto, apresentar modificações estruturais no comprimento do fascículo.

Fica evidente a escassez de estudos envolvendo a avaliação da plasticidade do tecido muscular sob condições diferenciadas de estímulo de alongamento de longo prazo e ainda permanecem muitos questionamentos sobre seus efeitos, especialmente no que diz respeito a adaptações diferenciadas de componentes contráteis (músculo) quanto não-contráteis (tecido conjuntivo e tendão) do músculo esquelético.

3.3 – BMU

O ultrassom de alta frequência para a imagem de microestruturas já existe desde os anos 30, quando Sokolov foi o primeiro a propor o microscópio acústico [91]. Nos anos 70 houve uma grande esperança com a aplicabilidade da microscopia ultrassônica, através do desenvolvimento do microscópio acústico de varredura laser [92] e do microscópio acústico de varredura [93]. Esperava-se que o contraste inerente à microscopia acústica (maior cerca de 2 ordens de magnitude se comparado com o contraste óptico de tecidos) complementasse os resultados obtidos com a microscopia

óptica. Entretanto, isto não se verificou pelo fato da microscopia óptica já estar estabelecida como uma ferramenta de rotina, e assim, a microscopia acústica não teve seus períodos de glória. Somente a partir do final da década de 80 a utilização do US em alta frequência voltou a ser considerada. Tal situação ocorreu na medicina, pela possibilidade de se utilizar a microscopia acústica na obtenção de imagens de tecidos vivos. As aplicações clínicas logo se sucederam na oftalmologia [94], na dermatologia [13], e ultrassonografia intravascular [9].

A BMU legitimou sua importância em diversas áreas da medicina, embora não existam muitos relatos da obtenção de imagens em tempo real e *in vivo* do músculo esquelético do rato. No entanto, outros trabalhos indicam a possibilidade de se obter êxito na obtenção dessas imagens, usando US de alta resolução, o qual já foi empregado para determinar lesões musculares em coelhos [95] e para descrever a coordenação de fibras musculares individuais de um rato e um camundongo, durante contração isométrica [96]. Recentemente, a BMU foi utilizada para caracterização da arquitetura muscular do tríceps sural saudável e lesionado de ratos, através da quantificação do AP e da EM em diferentes intervalos após uma lesão por laceração [14].

4 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 - ALONGAMENTO

O alongamento pode ser definido como uma forma de trabalho físico que visa obter uma melhora de flexibilidade através da viabilização de amplitudes de arcos de movimento superiores às originais. Apesar de limitadas evidências científicas, o alongamento é proposto como parte integrante de programas de condicionamento físico objetivando principalmente a redução do risco de lesões, o alívio da dor associada à rigidez muscular e a melhora do desempenho atlético [97].

Os mecanismos propostos para explicar estes benefícios são: uma redução direta na rigidez (definida como a força necessário para produzir uma determinada alteração no comprimento do músculo) através de mudanças nas propriedades passivas viscoelásticas; ou uma redução indireta devido à inibição reflexa e consequentes alterações viscoelásticas decorrentes da redução do número de pontes cruzadas actinmiosina.

4.1.1 – Tipos de Alongamento

Existem algumas metodologias distintas de alongamento utilizadas atualmente, com justificativas de melhora da flexibilidade. O alongamento estático, método com menor risco de lesão e o mais empregado hoje em dia, consiste em alongar a musculatura até um ponto tolerável, com mínimo desconforto e sustentar a posição por um período de tempo.

O alongamento balístico utiliza o balanço de um segmento corporal de maneira rítmica para alongar os músculos vigorosamente, provocando um rápido aumento de tensão através do reflexo miostático, podendo causar rupturas e estiramentos. Por causa desses argumentos, o uso do alongamento balístico é baixo.

A contração muscular excêntrica pode ser definida como o afastamento da origem e da inserção muscular concomitantemente a uma contração. Gomes *et al.* [89] afirma que quando as contrações excêntricas são realizadas sem exagero, levam a um aumento no número de sarcômeros em série e em paralelo, o que produziria um aumento na flexibilidade muscular, amplitude de movimento articular e hipertrofia. No entanto, a contração muscular excêntrica não é comumente utilizada como método de alongamento para ganho de flexibilidade.

Outro método que ganhou evidência é a facilitação neuromuscular proprioceptiva cujo princípio é a utilização de contrações isométricas breves do músculo a ser alongado antes do alongamento estático. Este método procura facilitar o órgão tendinoso de Golgi a inibir os músculos nos quais se situa e usa o princípio da inibição recíproca para obter o relaxamento muscular [49, 53]. Isto é, ao promover a contração muscular pré-alongamento há um aumento da tensão tendínea, que estimula os órgãos tendinosos de Golgi a provocar a inibição da contração muscular. Esta inibição, teoricamente, diminui a atividade muscular reflexa, provoca o relaxamento do músculo e, subseqüentemente, aumenta a ADM articular.

4.2 - TRÍCEPS SURAL

O Tríceps Sural constitui um conjunto de músculos posteriores da perna formado pelo gastrocnêmio e o SOL. Possui diversas características específicas determinando padrões fundamentais da marcha, equilíbrio, entre outros. O gastrocnêmio é dividido em duas porções: lateral (GL) e medial. Ambas compõem as partes mais superficiais do tríceps sural e encontram-se bem próximas à pele. O SOL, por sua vez, é mais profundo.

4.3 – UNIDADE MÚSCULO-TENDÃO

A unidade músculo-tendão pode ser dividida em componentes contráteis, que são as fibras musculares, e componentes elásticos. O componente elástico é formado pelo tecido tendinoso (tendão e aponeurose), epimísio, perimísio e endomísio, sarcolema e estruturas endosarcoméricas. A interação entre os componentes contráteis e elásticos é importante no desempenho de atividades físicas humanas, pois sua relação interfere diretamente na produção de força muscular.

4.3.1 - Músculo Esquelético

Os sarcômeros são considerados as unidades funcionais do músculo esquelético responsáveis pela contração. Cada sarcômero é formado por um complexo de proteínas, entre as quais a actina e a miosina possuem papéis primordiais, e seu alinhamento em série forma as estruturas cilíndricas designadas como miofibrilas ou fibras musculares, as quais são individualmente circundadas por uma camada de tecido conjuntivo

(endomísio) e agrupadas em feixes para formar o músculo, como se pode observar na Figura 4.1. O tecido conjuntivo fibroadiposo, que circunda um feixe muscular, é denominado perimísio e sua junção nas extremidades musculares forma os tendões, cuja principal função é a de inserção do músculo no osso.

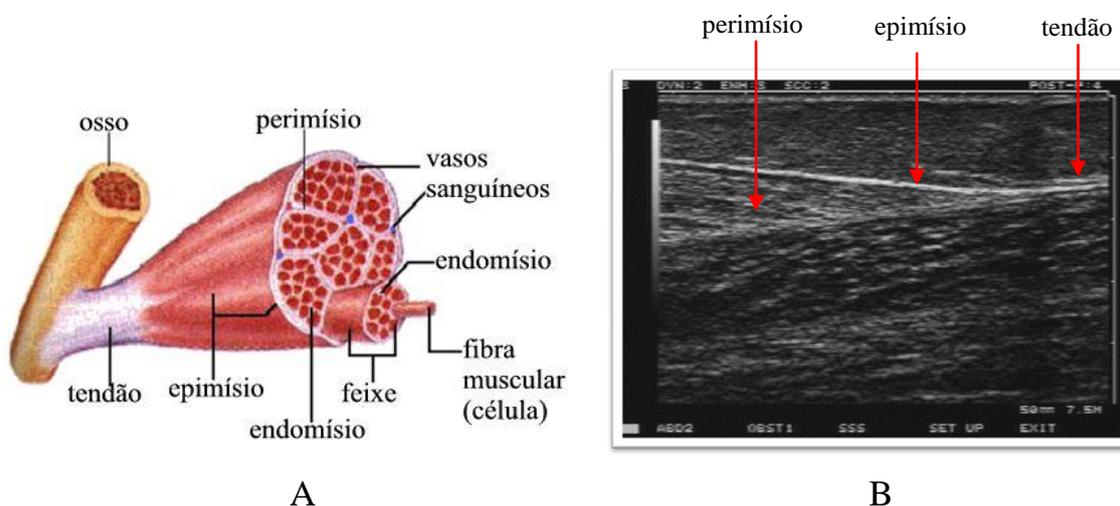


Figura 4.1 – (A) Músculo esquelético, osso e tecidos conjuntivos; (B) imagem ultrassônica (7,5MHz) de tecido muscular esquelético do tríceps sural de humano.

As fibras musculares são visualizadas em imagens ultrassônicas, nas quais os feixes de fibras são visualizados em zonas hipocóicas e o perimísio como linhas hiperecóicas separando os fascículos (Figura 4.1). O epimísio (tecido conjuntivo que circunda o músculo todo), fásCIAS, nervos e tendões também aparecem hiperecóicos em relação ao músculo [22, 26, 52].

Quando músculos esqueléticos são passivamente alongados, eles exibem uma resistência mensurável mesmo quando seus motoneurônios estão quiescentes e as miofibrilas não estão contraindo ativamente. Este comportamento é chamado de rigidez muscular passiva e também é referido como elasticidade passiva, complacência muscular passiva, extensibilidade passiva, ou tensão passiva [99]. Desde a descoberta dos filamentos de titina com suas propriedades altamente elásticas, assumiu-se que a rigidez muscular era dependente primariamente desta estrutura de miofilamentos intramusculares. No entanto, estudos posteriores sugerem que os tecidos conjuntivos intramusculares têm grande responsabilidade nesta propriedade muscular [99, 100, 101].

4.3.2 - Tecido Conjuntivo Intramuscular

O tecido conjuntivo intramuscular possui múltiplas funções, servindo como suporte mecânico básico para vasos e nervos, assegurando as respostas passivas elásticas do músculo e funcionando como uma rede de transmissão de forças laterais dentro do músculo entre fibras e fascículos vizinhos [101]. Foi mostrado que a tensão desenvolvida em uma região do músculo pode ser transmitida para outras partes mesmo que a aponeurose não esteja íntegra.

Este tecido, que contribui para a elasticidade da UMT e contabiliza de 1-10% do volume muscular, consiste de componentes elásticos em série e em paralelo (o endomísio, o perimísio e epimísio) [16, 50]. O endomísio, relevante entre os componentes elásticos em série, envolve cada fibra individualmente com um arranjo aleatório de fibrilas de colágeno para permitir o movimento durante uma contração, tendo como função a transferência da força do componente contrátil para o tendão e o osso posicionados em série [101]. O perimísio, organizado em multicamadas, atravessa as estruturas, mantendo grupos de fibras em seu devido lugar. É considerado o principal componente elástico em paralelo e tem como principal função distribuir a tensão equitativamente além de prevenir o alongamento além da amplitude fisiológica. O epimísio é formado por duas camadas de fibrilas onduladas de colágeno formando uma estrutura em firma de lençol na superfície do tendão.

A estrutura anatômica do tecido conjuntivo em cada nível de organização influencia a função muscular [102]. Parte da função deste tecido é formar um sistema elástico, tolerante ao *stress* que pode ocorrer em contrações ativas ou durante alongamento passivo. O *stress* em contrações ativas produz uma força que é transmitida diretamente pelo tecido conjuntivo, enquanto a distribuição de forças deste tecido durante o alongamento passivo é principalmente posicional, para manutenção do alinhamento do músculo e distribuição equitativa da força. O *stress* em cada músculo irá variar de acordo com sua função, como mostrado por Borg *et al.* [102] através da análise de características do tecido conjuntivo para 6 diferentes músculos. Estes autores sugerem, devido a quantidade e organização do perimísio que este é provavelmente mais importante do que o endomísio durante o alongamento passivo, embora a relação das diferenças anatômicas para a função muscular não seja clara. O perimísio é especialmente capaz de transmitir força, e embora estudos tenham demonstrado o potencial do endomísio neste sentido, a orientação e curvatura das fibras de colágeno conferem alta elasticidade reduzindo o potencial de transferência de força [101].

4.3.3 - Tendão

Os tendões consistem de uma organização sistemática e densa de tecido conjuntivo, formado por colágeno e organizado em fibrilas, fibras, feixes de fibras e fascículos, assim como pela presença de proteínas da matriz extracelular. Os componentes individuais do tendão são estruturados para suportar altas forças tensivas e sua divisão em fibrilas assegura que danos pequenos não se espalhem necessariamente por todo o tendão, além de garantir alta força estrutural. Sua composição é de 55 a 70% de água (grande parte associada a proteoglicanos), além de colágeno, fibras de elastina e outras diferentes proteínas.

Os tendões apresentam designs variados de acordo com sua função, podendo ser curtos e espessos, como o do quadríceps ou longos e finos, como os dos dedos. Eles podem ter espessura variada ao longo do seu comprimento e com frequência estão envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, denominado paratendão, que permite grandes movimentos do tendão.

De acordo com Kjaer *et al.* [101], a capacidade de alongamento dos tendões é extremamente variável, podendo ir de 1 a 16% para diferentes músculos de animais. Dados de cadáveres humanos reportam 5 a 6% de capacidade máxima de deformação dos tendões quando passivamente alongados e de 10 a 12% para a aponeurose do músculo adjacente. Embora estes dados possam indicar o potencial viscoelástico do tecido quando submetido à tensão passiva, não são levadas em consideração características *in vivo* destas estruturas que podem ter diferenças substanciais. Muitos estudos investigaram as propriedades mecânicas individuais do tendão livre e da aponeurose, como sua deformação em condições ativas e passivas, no entanto os resultados são variados [75, 110, 111]. Foi mostrado que a deformação relativa da porção livre do tendão calcâneo era de 6 a 7 vezes maior do que o da aponeurose durante uma ativação isométrica intensa dos flexores plantares [105]. Esta discrepância sugere que o papel funcional destas estruturas durante a transmissão de força é diferente, sendo o tendão livre responsável pelo armazenamento e liberação de energia enquanto a aponeurose interna assegura a transmissão efetiva das forças contráteis. Diferenças entre os estudos podem decorrer de limitações como a atividade antagonista, rotação articular e capacidade limitada da metodologia de observar fenômenos tridimensionais.

É importante ressaltar que tanto o tendão quanto o tecido conjuntivo intramuscular apresentam uma forte interação com os elementos contráteis do tecido

muscular para a transmissão de força. A dimensão dos tendões pode influenciar a capacidade de alongamento, e a habilidade destas estruturas de armazenar e liberar energia elástica durante o movimento reduz a energia total necessária durante a caminhada ou a corrida e outras atividades funcionais.

4.4 - ARQUITETURA MUSCULAR

4.4.1 - Definição e Implicações Fisiológicas

A terminologia arquitetura muscular é utilizada para referenciar o arranjo das fibras musculares relativas ao eixo de geração de força do músculo [34], e possui um papel primordial na determinação de suas características funcionais. As relações geométricas formadas pelo arranjo das fibras são importantes no que diz respeito à estimativa de produção de torque por qualquer músculo, e, conseqüentemente, na descrição de sua função.

Músculos esqueléticos podem ser constituídos de fibras paralelas ou penadas. No primeiro caso, as fibras correm paralelamente à linha de ação muscular, enquanto no segundo as fibras estão dispostas obliquamente à linha de ação e se inserem no tecido conjuntivo (aponeurose interna) formando um ângulo, chamado ângulo de penação [2, 34].

As relações força-comprimento e força-velocidade de encurtamento do músculo esquelético dependem deste arranjo especial das fibras. O AP relaciona-se diretamente com a quantidade de tecido contrátil por unidade de área muscular e juntamente com o CF, influencia na capacidade de produção de força, na velocidade de encurtamento do músculo e nas propriedades elásticas do complexo músculo-tendão.

Normalmente, um músculo penado possui fibras com menores comprimentos o que significa uma menor quantidade de sarcômeros em série se comparada com a de uma fibra longa de um músculo paralelo ou fusiforme (Figura 4.2). Logo, para o mesmo valor absoluto de redução do CF, o encurtamento relativo por sarcômero será maior para uma fibra curta. Conseqüentemente, uma pequena alteração no comprimento de um músculo penado pode significar que o mesmo deslocou-se o suficiente para encontrar-se em uma posição desvantajosa para geração de força (encurtamento), de acordo com a curva comprimento-tensão. No entanto, como vantagem, estes músculos possuem mais fibras dispostas em paralelo e o número de sarcômeros é expressivamente aumentado, apresentando uma área de seção transversa fisiológica normalmente maior do que a dos

músculos fusiformes (Figura 4.2). Este fato permite uma maior produção de força normalizada pela massa muscular [7, 34, 113].

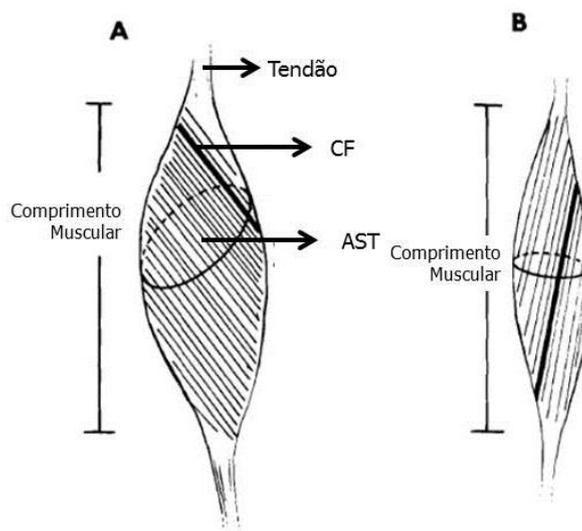


Figura 4.2 - Representação esquemática de dois músculos com diferentes arquiteturas musculares. A: músculo com fibras curtas e grande área de secção transversa fisiológica e (B) músculo com fibras longas e pequena área de secção transversa fisiológica. CF = comprimento do fascículo; AST = área de secção transversa fisiológica. Imagem adaptada de [2] com autorização da editora.

Os efeitos da arquitetura muscular sobre as características de força-velocidade foram estudados por Spector *et al.* [87] nos músculos SOL e GM de gatos. Estes músculos diferem significativamente na composição de fibras (o SOL é composto totalmente por fibras lentas e o GM tem alta proporção de fibras rápidas), no AP (GM: 21° e SOL: 6°), e no CF (GM: 20mm e SOL: 37mm). Estes autores encontraram para o GM uma velocidade máxima de encurtamento dos sarcômeros três vezes maior relativamente ao SOL, provavelmente devido à atividade da miosina ATPase ser 2,6 vezes mais intensa nas fibras do GM. No entanto, devido às diferenças no AP e CF, a velocidade máxima desenvolvida pelo GM no tendão calcâneo foi somente 1,5 vezes maior do que a do SOL. Similarmente, o pico de tensão isométrica do GM no tendão foi quase cinco vezes maior que o do SOL. Entretanto, depois de normalizadas as diferenças do volume muscular, CF e AP, os índices de tensão específica (força por área de seção transversa muscular) destes dois músculos foram similares. Ao analisar tais resultados, fica evidente a influência da arquitetura muscular nas características de força-velocidade de músculos esqueléticos em mamíferos e a indicação de que os

parâmetros arquitetônicos devem ser considerados, isolada ou conjuntamente, para relacionar a estrutura muscular com suas características funcionais, como a EM, o AP, o CF e a distância entre as aponeuroses.

4.4.2 - Ângulo de Penação

O AP refere-se à organização das fibras musculares, e é definido como o ângulo agudo formado entre a aponeurose principal do músculo (aponeurose interna), que possui a mesma direção da linha de tração, e as fibras musculares. É facilmente identificável nas imagens de US, como pode ser visto na Figura 4.3.

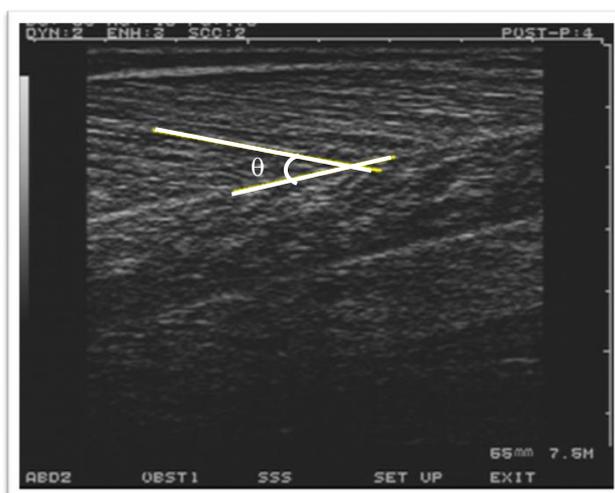


Figura 4.3 - Ângulo de penação (θ) do gastrocnêmio medial de humanos identificado em imagens de US (7,5MHz).

4.4.3 - Espessura Muscular

A EM é a distância perpendicular entre as aponeuroses interna e externa, medida em local de maior diâmetro muscular, descrito na literatura a partir de trabalhos de validação com peças anatômicas ou ressonância magnética. É visualizada em imagens transversais ou longitudinais à linha de ação muscular (Figura 4.4).

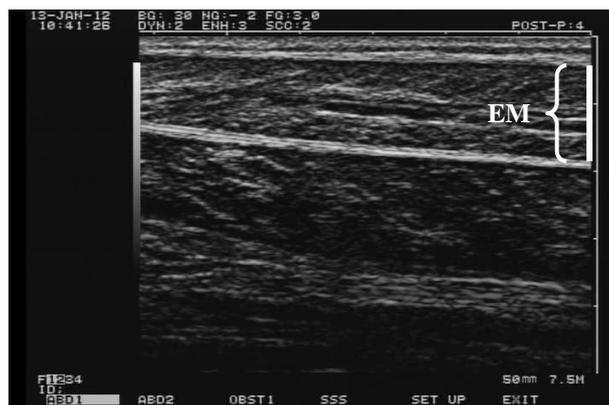


Figura 4.4 - Espessura muscular (EM) do gastrocnêmio medial de humanos identificado em imagem longitudinal de US (7,5MHz). O segmento de reta branca corresponde à distância entre as aponeuroses externa e interna e seu comprimento corresponde à EM.

4.4.4 - Comprimento do Fascículo

O comprimento do fascículo é definido como a distância que ele percorre da aponeurose interna até a aponeurose externa do músculo, o epimísio (Figura 4.5). Nos músculos fusiformes, em que a direção de seus fascículos situa-se na mesma linha de ação do músculo, o comprimento do fascículo tende a ser maior que o CT, proporcionando a este músculo uma maior capacidade de alongamento e velocidade de contração.

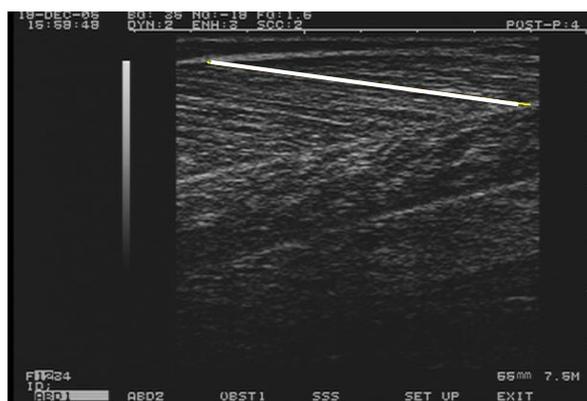


Figura 4.5: Comprimento do fascículo do gastrocnêmio medial de humanos identificado pelo segmento de reta branca que percorre o trajeto da aponeurose profunda para a superficial em imagem de US (7,5MHz).

Há alguns estudos que descrevem os parâmetros da arquitetura muscular em ratos *in vitro* [96, 114]. Mais recentemente, Eng *et al.* [108] realizaram uma pesquisa

abrangente inter-relacionando as características biomecânicas dos músculos da parte posterior do membro inferior de ratos, e analisando a especialização funcional de cada grupamento. Os autores demonstraram grande variabilidade destes parâmetros entre os músculos, indicando alto grau de especialização dos músculos coerente com as demandas funcionais de cada um. Recentemente, o AP e a EM do tríceps sural saudável e lesionado de ratos foram quantificados em diferentes momentos após lesão por laceração, evidenciando uma resposta hipertrófica compensatória do membro contralateral saudável. Já para humanos, há na literatura muitos estudos, baseados especialmente na técnica de imagem ultrassônica, descrevendo estes parâmetros, assim como as adaptações dos mesmos a diferentes tipos de estímulo [3, 61, 116–118].

4.5 - CARACTERÍSTICAS BIOMECÂNICAS

As características biomecânicas do músculo esquelético são ferramentas importantes para categorizá-lo e para estimar sua função, servindo como parâmetros de entrada para diversos modelos matemáticos de avaliação funcional, principalmente da força muscular [7, 34, 128, 129]. Destas, destacam-se as características arquitetônicas, tais como o AP, comprimento do fascículo, EM, área de secção transversa anatômica e fisiológica, e volume muscular, muito pesquisadas na atualidade com variados objetivos, já que influenciam a contratilidade muscular e as propriedades mecânicas do complexo músculo-tendão. Maganaris *et al.* [115], por exemplo, apresentaram um modelo geral para avaliar as características torque-ângulo em músculos esqueléticos humanos e suas contribuições individuais para a produção de força de um grupamento muscular em contração isométrica máxima, utilizando parâmetros como volume muscular, braço de força, e AP. Os mesmo autores [116] ressaltam a importância de informações precisas sobre o AP, importante em dois tipos de análise: quando o torque que um músculo pode produzir é calculado a partir da predição da força do mesmo na direção de suas fibras e, inversamente, quando a produção de força na direção das fibras é calculada a partir da capacidade de geração de torque do músculo. Fukunaga *et al.* [117] investigaram mudanças no comprimento dos fascículos e tendão para avaliar o comportamento elástico e armazenamento de energia do tendão durante a marcha, dados que são utilizados para estimativa da força muscular durante atividades funcionais e que também foram avaliados por outros autores para condições distintas de corrida [118], treinamento isométrico [119] e saltos verticais [120].

A principal relação entre arquitetura e função muscular é a de que a velocidade de encurtamento e a amplitude de excursão são proporcionais ao número de sarcômeros em série, ou simplificada ao comprimento das fibras, enquanto a força muscular é proporcional à área de seção transversa total de sarcômeros, que corresponde à área de seção transversa fisiológica (estimativa da área de seção transversa total das fibras) [2]. Músculos com fibras longas geram maiores velocidades e mantém níveis médios de força durante grande parte da amplitude de movimento, mas com custo metabólico maior do que aqueles com fibras curtas [40, 61]. Músculos que se inserem no tendão ou na aponeurose com uma dada angulação possuem uma maior área de seção transversa fisiológica pois contém mais fibras dispostas paralelamente e, conseqüentemente, são capazes de gerar picos de força relativamente maiores do que os gerados pelos fusiformes [121].

O uso de técnicas não-invasivas de aquisição de imagens, como o US, parece promissor para o estudo de adaptações do músculo esquelético a condições de uso aumentado ou desuso na saúde e na doença [5, 82, 116, 136].

4.6 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DO MÚSCULO

A força e a deformação são duas propriedades mecânicas normalmente medidas para testar um material. A aplicação de uma força de tração externa terá a oposição das estruturas internas e suas ligações e a razão entre esta força e a área de seção transversa do material define a tensão. No entanto, devido à dificuldade de quantificação da área, especialmente em humanos, a tensão é ocasionalmente substituída pela força. Sua atuação fará com que o corpo submetido ao estímulo mude seu formato ou se deforme, o que é chamado de deformação relativa, e calculado pela razão entre a variação de comprimento e o comprimento original da estrutura deformada, sendo uma grandeza adimensional normalmente expressa em termos percentuais. O módulo de elasticidade do material é a relação entre a tensão e a deformação (expresso como a inclinação da curva que relaciona estes dois parâmetros). Ou seja, o aumento na deformação é proporcional a tensão aplicado (de acordo com a Lei de Hooke), de forma que um material mais rígido se deformará menos pela atuação de uma mesma força externa.

Materiais biológicos são complexos e suas respostas a forças externas não podem ser descritas de forma mecânica simples. O comportamento elástico e viscoso, inerente a materiais biológicos, foi descrito em modelos que descrevem a relação entre

força, deformação e tempo contendo molas (elementos elásticos), e componentes friccionais e amortecedores [21, 23, 119]. A elasticidade é uma resposta carga-dependente, enquanto a viscosidade é taxa-dependente.

Os músculos não são puramente elásticos nem viscosos, mas viscoelásticos durante a imposição de cargas externas. No músculo, o componente elástico da curva comprimento-tensão é representado pelas estruturas envolvidas no armazenamento e liberação de energia mecânica do músculo ativo. Estas estruturas são os tendões e parte da estrutura das pontes que unem os filamentos de actina e miosina. Por outro lado, a deformação de uma substância viscoelástica é dependente do tempo. A exemplo do que acontece com uma substância viscoelástica, se uma força constante for aplicada ao músculo, seu comprimento aumentará ao longo do tempo, ou se um músculo for alongado e mantido em comprimento constante, a força necessária para tal manutenção de comprimento diminuirá gradativamente. Quando a força é removida, ele retorna vagarosamente ao seu comprimento original, o que é diferente de uma deformação plástica, em que o material fica permanentemente alongado mesmo após a força ter sido removida. Tipicamente, o músculo responderá de forma não-linear com uma fase inicial de maior deformação denominada de *toe region*, e ao ser mantido em uma posição alongada estaticamente, a tensão passiva do músculo diminuirá também de forma não-linear, o que é referido como o *stress relaxation* viscoelástico [24, 65].

Sob o ponto de vista biomecânico, o comprimento do músculo é multidimensional. As medidas de comprimento do músculo devem incluir outras dimensões, ou propriedades biomecânicas importantes, como a tensão, a área de secção transversa e o tempo. A partir da inclusão destes parâmetros nas medidas, é possível a estimativa de características biomecânicas como a rigidez, complacência, energia, histerese, *stress* e *stress-relaxation* viscoelástico. Como o músculo é um material deformável, a medida de seu comprimento em um dado instante de tempo é sempre dependente da quantidade de força tensiva aplicada e, conseqüentemente, da resistência passiva oferecida pelo músculo ao estímulo de alongamento. A relação ente comprimento e tensão pode ser descrita por uma curva comprimento-tensão passiva na qual múltiplas medidas individuais são relacionadas com a magnitude de tensão passiva requerida para atingir cada medida. As medidas de comprimento muscular em humanos são geralmente ângulos articulares, e a força tensiva é dada pelo torque em uma articulação, portanto, as curvas comprimento-tensão são apresentadas sob a forma de curvas torque-ângulo (Figura 4.6).

Aumentos na extensibilidade muscular humana são comumente demonstrados por aumentos da amplitude máxima de movimento articular, e suas possíveis causas são uma simples redução na rigidez muscular ou um aumento no comprimento do músculo [65]. A redução da rigidez muscular é, em vários estudos, demonstrada por um decréscimo na inclinação da curva torque-ângulo. Aumentos no comprimento muscular se refletem nesta curva por um deslocamento para direita da mesma [74, 107], que resulta em rigidez reduzida e medidas de comprimento maiores (ângulo articular) para qualquer valor de força (Figura 4.6). As teorias mecânicas para o aumento da extensibilidade muscular incluem deformação viscoelástica, deformação plástica, aumento do número de sarcômeros em série e relaxamento neuromuscular.

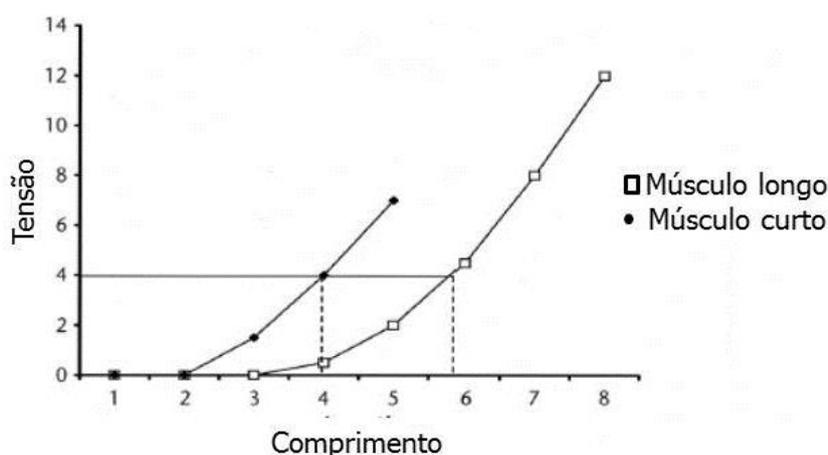


Figura 4.6 – Exemplo de deslocamento da curva torque-ângulo devido ao aumento do comprimento do músculo. Imagem adaptada de [65] com autorização da editora.

4.7 – TEORIAS PARA AUMENTO DA EXTENSIBILIDADE MUSCULAR

4.7.1 - Deformação viscoelástica

Como explicado anteriormente, músculos esqueléticos são considerados viscoelásticos, pois demonstram elasticidade (como sólidos), retornando ao seu comprimento original quando a força de deformação cessa, e viscosidade (como líquidos), pois sua resposta a forças tensivas é dependente da taxa e do tempo de aplicação desta força. Um aumento imediato do comprimento do músculo pode ocorrer sempre que este for submetido a um alongamento de duração e magnitude suficientes. Este comprimento aumentado é definido como uma deformação viscoelástica porque sua magnitude e duração são limitadas pela elasticidade inerente ao músculo. Este tipo

de deformação já foi testada em pesquisas que usaram protocolos diferentes de alongamento (estático, ciclos repetidos, contração-relaxamento) [65].

4.7.2 - Deformação plástica do tecido conjuntivo

Outra teoria popular sugere que aumentos na extensibilidade muscular observados imediatamente após o alongamento são devidos à deformações plásticas ou permanentes do tecido conjuntivo [74, 120]. O modelo clássico de deformação plástica requer uma intensidade de alongamento suficiente para levar o tecido conjuntivo intramuscular além do limite elástico, entrando na região plástica da curva torque-ângulo, de forma que quando a força de alongamento é removida, o músculo não é capaz de retornar ao seu comprimento original e permanece permanentemente em um estado alongado. Entre os vários estudos [123, 124, 125] que sugeriram deformação plástica, permanente ou duradoura do tecido conjuntivo como um fator para a extensibilidade muscular aumentada, nenhum citou evidências que legitimassem este modelo clássico de deformação plástica.

4.7.3 - Aumento dos sarcômeros em série

Estudos com animais [36, 39, 123, 124] demonstraram que o número de sarcômeros em série pode ser modificado através de uma imobilização em posição alongada por tempo prolongado. É questionado se houve mudança geral no comprimento do músculo já que o aumento da quantidade de sarcômeros pode ter sido contrabalançado por uma redução concorrente no comprimento dos sarcômeros. Em situações inversas, quando um músculo é imobilizado em posição encurtada, ocorre uma redução no número de sarcômeros em série e no comprimento do músculo, situação que se reverte e volta aos valores normais após a recuperação da imobilização. Estes estudos com modelos animais sugerem que o músculo se adapta a novos comprimentos funcionais através da alteração do número e comprimento dos sarcômeros em série com o objetivo de otimizar a produção de força no novo comprimento ótimo de funcionamento. Apesar de diferenças substanciais entre a imobilização muscular e estímulos intermitentes de alongamento, estes resultados foram generalizados para sugerir que regimes de treinamento de alongamento de curto e médio prazos (3 a 8 semanas) para humanos podem causar aumentos similares no número de sarcômeros em série e um aumento concomitante no comprimento dos músculos alongados [48, 107, 120, 125]. No entanto, por razões práticas e éticas, não existem

técnicas que permitam uma avaliação no nível histológico para identificar a variação no número de sarcômeros advinda de treinamentos de alongamento comumente utilizados para reabilitação ou prática esportiva.

4.7.4 - Relaxamento neuromuscular

A literatura sugere que a contração involuntária dos músculos devida a um reflexo de alongamento neuromuscular pode limitar o estiramento do músculo durante procedimentos de alongamento estático [17, 74]. Objetivando o aumento da extensibilidade muscular, é proposto que o alongamento estático seja realizado de forma lenta, já que isto estimularia reflexos neuromusculares que induzem o relaxamento dos músculos sendo submetidos ao alongamento [74, 120]. Alguns autores sugerem, além disso, que os reflexos neuromusculares se adaptem a estímulos repetidos de alongamento, o que melhoraria a capacidade do músculo de relaxar e levaria a uma melhora da extensibilidade. No entanto, não foram encontradas evidências experimentais que confirmem estas teorias. Foi demonstrado que alongamentos rápidos e curtos de músculos em seu comprimento médio ativam reflexos de alongamento, produzindo uma contração muscular de curta duração, enquanto músculos submetidos a uma manobra de alongamento passiva longa e lenta não demonstraram ativação significativa [20, 74]. Estudos de efeitos agudos e de programas de alongamento com duração de 3 e 6 semanas demonstraram não haver atividade eletromiográfica significativa e nem deslocamento da curva torque-ângulo passiva, concluindo que os aumentos na amplitude articular não poderiam ser atribuídos ao relaxamento neuromuscular [24, 43].

Atualmente, muitos estudos têm observado alterações nas propriedades mecânicas da UMT decorrentes de programas de treinamento para ganho de flexibilidade através da ultrassonografia [16, 22, 27, 54]. As propriedades da UMT normalmente avaliadas através da ultrassonografia são: deformação relativa (*strain*), rigidez, *stress* e histerese. A deformação relativa do músculo é estimada através da quantificação do deslocamento da junção miotendínea durante o movimento articular, que permite o cálculo da variação do seu comprimento [129]. A tensão é indicada pela variação da razão entre a força aplicada e área de seção transversa da estrutura e a rigidez pode ser representada pela inclinação da curva carga-deformação. A histerese, fenômeno associado à perda da energia exibida por materiais viscoelásticos quando submetidos a ciclos de carga e descarga, pode ser avaliada através da análise de ciclos

de contração e relaxamento [130]. A rigidez do tendão, ou módulo de Young, é estimada indiretamente pela variação da relação torque-ângulo, sendo dada pela inclinação da mesma.

4.8 - ADAPTAÇÕES DA UMT A CONDIÇÕES DIFERENCIADAS DE USO

A utilização do US e da ressonância magnética para medir parâmetros da arquitetura muscular *in vivo* permitiu que pesquisadores relatassem resultados de aumento da amplitude articular e alterações nas propriedades mecânicas da UMT. Portanto, a arquitetura muscular parece ser altamente plástica, e essas mudanças parecem contribuir para as alterações na expressão de força. Em animais, a imobilização muscular em uma posição alongada, por dias ou semanas, resultou em aumento do número de sarcômeros em série e do comprimento total da fibra [36, 39, 137], enquanto o alongamento moderado realizado durante 30 minutos por dia foi suficiente para reduzir ou reverter o encurtamento da fibra que acompanhou a imobilização em posições encurtadas em um músculo de rato [37]. Estes resultados mostram que o músculo é aparentemente capaz de ajustar seu comprimento de fibra através da adição ou remoção de sarcômeros, ajustando a quantidade de sarcômeros de forma a conferir a máxima sobreposição das pontes cruzadas de actina e miosina em seu comprimento funcional, deslocando a curva comprimento-tensão.

Fica evidente que qualquer alteração no CF provocada por estímulos de alongamento pode influenciar as relações força/velocidade e comprimento-tensão, assim como alterações nas propriedades do tendão afetarão as demais estruturas do músculo e a expressão da força.

Investigações clínicas da flexibilidade em humanos utilizaram quase que exclusivamente a amplitude máxima de movimento como a variável dependente [17, 104, 121, 138]. No entanto, a amplitude articular não fornece informações sobre as propriedades da UMT e, além disso, não se sabe o que determina o ponto final da amplitude utilizada na goniometria. Sugere-se que a flexibilidade muscular passiva possa ser descrita como a curva comprimento-tensão do músculo quando o mesmo é passivamente alongado [28, 31, 139]. No entanto, ainda não foi estabelecida a relação entre as propriedades passivas de tal curva com a flexibilidade determinada pela goniometria, não sendo possível afirmar que os ângulos articulares máximos fornecem informações sobre a rigidez muscular.

Modelos animais descreveram o alongamento da UMT em termos biomecânicos através da análise de variáveis como carga máxima, energia absorvida, e rigidez, além de terem sido usados para descrever seu comportamento viscoelástico. No entanto, até recentemente, poucas informações sobre as propriedades passivas do músculo esquelético humano estavam disponíveis na literatura, surgindo gradativamente estudos sobre o efeito do alongamento na UMT utilizando a ultrassonografia. Tais pesquisas demonstraram alterações agudas das propriedades viscoelásticas da UMT, e mais especificamente nas propriedades mecânicas do tendão e tecido conjuntivo, tais como redução da rigidez, aumento da complacência do tendão, redução da histerese e do módulo de Young [87, 140].

Estas evidências indicam a possibilidade de adaptação das características da arquitetura muscular e das propriedades mecânicas do tendão e tecido conjuntivo de ratos e humanos quando submetidos a um protocolo de alongamento.

4.9 – IMAGEM POR ULTRASSOM

4.9.1 – Imagem por ultrassom de baixa frequência

A geração de imagem por ultrassom é uma técnica difundida e muito aplicada na análise dos mais diversos aspectos biológicos do corpo humano por apresentar características vantajosas como a portabilidade e a não-invasividade. É por isto um método com grande aplicabilidade em rotina clínica e também em pesquisas científicas em diversas áreas, como é o caso da Biomecânica, Medicina Neonatal, Oncologia, Obstetrícia, entre outras.

O aparelho de imagem de US funciona no modo pulso-eco enviando ondas ultrassônicas através de transdutores piezoelétricos, que se propagam por um meio e retornam ao transdutor após serem refletidas e espalhadas pelos obstáculos presentes no tecido (Figura 4.7). A propagação da onda decorre da vibração conduzida de molécula em molécula, transmitindo a energia sem, contudo, produzir deslocamento resultante, uma vez que as moléculas voltam ao repouso logo após o processo de condução energética [135].

Os elementos piezoelétricos, que formam o transdutor, são responsáveis por esse processo de conversão de energia elétrica em mecânica e vice-versa, que pode ser classificado como direto ou reverso; é direto se o material se deforma quando uma tensão elétrica é aplicada em sua superfície, ou seja, transforma energia elétrica em

mecânica, o que acontece durante a geração de pulsos ultrassônicos. O efeito reverso acontece quando o material é submetido a tensões mecânicas e gera um campo elétrico em seu interior, transformando energia mecânica em elétrica, como na recepção dos pulsos ultrassônicos pelo transdutor [101, 102].

Os materiais piezoelétricos mais comuns em aparelhos ultrassônicos são cerâmicas artificialmente produzidas de Titanato de Bário ou Titanato Zirconato de Chumbo (PZT), que possuem uma grande vantagem: o preparo de acordo com a sua utilização, pois podem ser cortados em infinitos tamanhos e formatos, possibilitando a construção de transdutores que vibrem em uma faixa de frequência desejada.

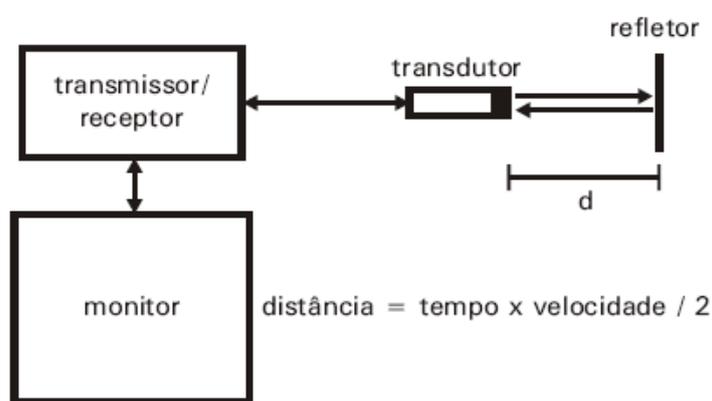


Figura 4.7: Esquema de funcionamento do aparelho de ultrassom modo-B. Transmissão e recepção do pulso ultrassônico para formação de imagem e cálculo da distância (d) entre o transdutor e o refletor através do tempo de eco e velocidade de propagação da onda ultrassônica.

Algumas características importantes da propagação do pulso ultrassônico em um meio são a velocidade de propagação, o coeficiente de atenuação e o coeficiente de retroespalhamento. Destes, a velocidade de propagação é um parâmetro importante na formação de imagens pois podem gerar distorções nas imagens devido à perda de calibração em distância que afetarão as medidas de arquitetura muscular extraídas da mesma. A velocidade de propagação do som no meio é inversamente proporcional à raiz quadrada da densidade e da compressibilidade do meio o qual ela atravessa. Uma vez que meios mais rígidos apresentam forças atrativas maiores, a velocidade de propagação das ondas nos mesmos é maior. Por outro lado, meios mais densos reduzem a velocidade de propagação. Os aparelhos de ultrassom assumem a velocidade média nos

tecidos moles (1540 m/s) e a velocidade de propagação no músculo humano varia entre 1542 e 1626 m/s [135].

A formação de imagens de ultrassom bidimensionais ocorre pelo mapeamento espacial das amplitudes dos ecos refletidos por interfaces entre tecidos como músculos, ossos, gordura, tecido conjuntivo e órgãos, permitindo a aquisição de dados qualitativos e a medição de dados quantitativos da anatomia e estruturas pesquisadas. A localização dos pontos na imagem se refere à posição em que os objetos mapeados se encontram em relação ao transdutor, sendo determinada pela orientação do feixe e tempo de chegada dos ecos. Já o brilho (escala de cinza) se refere à amplitude do eco recebido [135]. A imagem é construída a partir de um conjunto de linhas orientadas na direção do feixe de ultrassom emitido pelo transdutor, à medida que o feixe varre o meio. Cada uma dessas linhas contém os sinais de ecos refletidos nas grandes interfaces (representados por traços mais intensos nas imagens) e os espalhados nas partículas de tamanho da ordem de grandeza do comprimento de onda (gerando o aspecto granuloso na textura da imagem).

A resolução de um sistema de imagem de US é definida pela largura do feixe ultrassônico (resolução lateral) e pela duração ou largura de banda do pulso de onda emitido no meio de propagação (resolução axial).

A resolução lateral, R_{lat} , que normalmente é a resolução limitante, pode ser estimada pela geometria do transdutor e pela frequência central do pulso característico do mesmo. Para transdutores com focalização esférica, é calculada por [8]:

$$R_{lat} = \bar{\lambda} \frac{\text{distância focal}}{\text{abertura do transdutor}} = \bar{\lambda} \cdot f_{\text{número}}, \quad (1)$$

onde $\bar{\lambda}$ é o comprimento de onda relativo à frequência central do espectro do pulso de onda emitido no meio e $f_{\text{número}}$ é a razão entre a distância focal e a abertura do transdutor (aproximadamente o diâmetro do transdutor). Em um US convencional de frequências de 3,5MHz, um transdutor típico de $f_{\text{número}} = 2,5$ possui uma resolução lateral da ordem de 1mm. Se a frequência for aumentada para 50MHz, a resolução lateral melhora para 75 μ m. O custo de uma resolução melhorada é a redução na profundidade de penetração que, por exemplo, passa de 10 a 20cm para 1cm nas frequências de 3,5 e 50MHz, respectivamente [8, 101].

A resolução axial, R_{ax} , é, na maioria dos casos, significativamente melhor do que a resolução lateral e proporcional ao inverso da largura de banda do pulso de onda emitido no meio. Um transdutor típico de alta frequência com uma largura de banda de 40% e uma frequência central de 30MHz permite uma resolução axial de 63 μ m, quando o meio de propagação é a água. Em termos teóricos, R_{ax} é determinada como segue [8]:

$$R_{ax} = \frac{c}{2BW}, \quad (2)$$

onde c é a velocidade de propagação da onda no meio e BW é a largura de banda do pulso de onda transmitido ao meio.

A profundidade de campo, DOF , a qual representa a região útil ao longo do feixe emitido pelo transdutor para a obtenção de imagens, para transdutores com focalização esférica é determinada por [8]:

$$DOF = 7.0 \cdot \bar{\lambda} \cdot f_{\text{número}}^2. \quad (3)$$

4.9.2 - *Biomicroscopia Ultrassônica*

Um equipamento de BMU se assemelha a um instrumento de US convencional que opera no modo B (modo brilho). A diferença fundamental reside na alta frequência usada para a biomicroscopia, o que lhe confere maior poder de resolução. Em contrapartida, a profundidade de penetração do US em tecidos biológicos diminui drasticamente, já que o coeficiente de atenuação aumenta com a frequência de uma forma exponencial. Há também uma dependência do coeficiente de atenuação com o tipo de tecido biológico. Tecidos estruturais, como a pele e paredes arteriais, tendem a ter coeficientes de atenuação maiores, enquanto a íris e a córnea têm perdas mínimas de sinal, aproximando-se do comportamento da água. O mecanismo físico exato para tais diferenças não é completamente entendido, mas a concentração e organização de colágeno e outras proteínas estruturais são fatores importantes [8, 103].

A utilização da ultrassonografia de alta resolução em medicina se estende de frequências inferiores, da ordem de 20MHz, como é o caso da caracterização da pele e da parede arterial, até 60MHz para as aplicações em oftalmologia. Para a frequência de 30MHz e usando um transdutor com foco natural e abertura de 0,5mm, operando na

água, consegue-se profundidade de campo de 2,5mm e resoluções lateral e axial de 250 e 62 μ m, respectivamente. Essas resoluções são comparáveis com as obtidas pela ressonância magnética, com a qual se consegue resoluções da ordem de 75 μ m. Para um transdutor operando em 100MHz, focalizado, estes valores se reduzem para 1,6mm, 60 μ m e 19 μ m, respectivamente [8]. Portanto, para frequências mais elevadas a resolução do US se aproxima daquela oferecida por microscopia óptica panorâmica. Daí denominar ultrassonografia de alta frequência, aplicada na visualização de tecidos vivos por: BMU, microscopia ultrassônica por retroespalhamento, US de alta frequência ou então US de frequência muito elevada.

A escolha das especificações do sistema de BMU depende da natureza da aplicação e das propriedades acústicas dos tecidos específicos que serão estudados. A melhor imagem possível de qualquer equipamento de US é determinada pela frequência, geometria do transdutor e pelas propriedades do tecido em acordo com as leis da difração [8, 101]. Embora possa parecer que mudanças simples no transdutor permitirão aumentos significativos na magnitude da resolução, outros fatores importantes devem ser considerados em frequências altas, como a perda de penetração e de profundidade do campo, e questões acerca da confecção dos transdutores. Tipicamente, sistemas de BMU que utilizam transdutores com focalização esférica operam limitados a profundidades de penetração e de campo da ordem de 10 e 1,5mm, respectivamente.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – VISÃO GERAL DA METODOLOGIA DA PESQUISA

O presente estudo pode ser subdividido em experimentos com animais e humanos e uma visão geral é demonstrada na Figura 5.1.

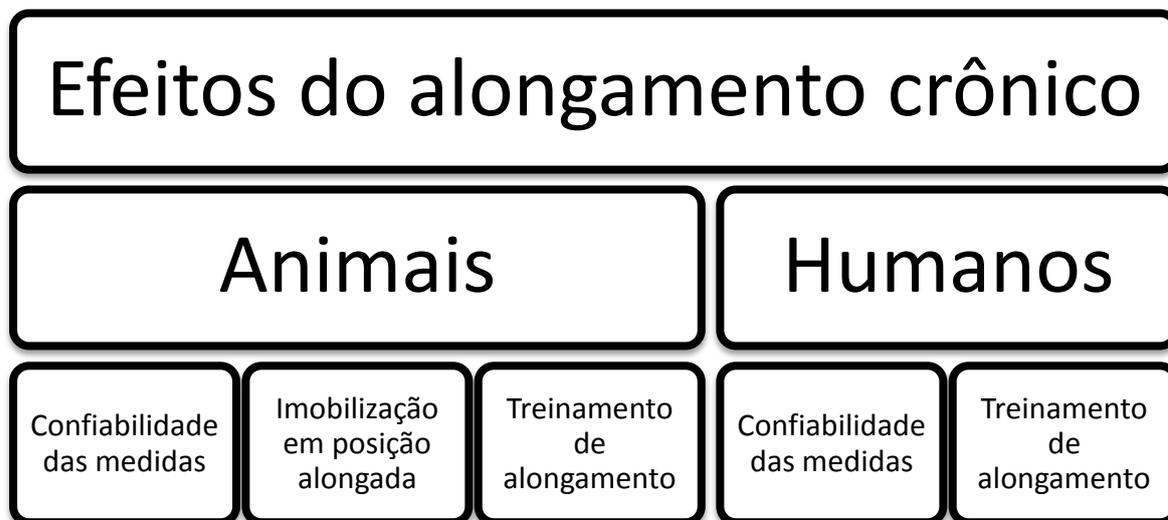


Figura 5.1 – Organograma do desenho experimental da tese.

A parte experimental em animais consistiu de três linhas: uma pesquisa de variabilidade e confiabilidade das medidas; um experimento de intervenção de imobilização muscular em posição alongada; e um experimento de treinamento de alongamento de longa duração com estímulo de alongamento estático (protocolo com características similares ao de humanos).

A parte experimental em humanos iniciou com um estudo prévio de variabilidade e confiabilidade das medidas de arquitetura muscular com US. Posteriormente, o estudo aplicado contou com as etapas de: pré-teste, 10 semanas de treinamento de alongamento com estímulo de alongamento estático e pós-teste.

5.2 – METODOLOGIA - ANIMAIS

As três linhas de experimentos com ratos utilizaram protocolos de aquisição de imagens e quantificação de variáveis similares, que são descritas a seguir.

5.2.1 – Instrumentação de BMU

O diagrama de blocos básico da instrumentação de BMU pode ser visto no esquema a seguir (Figura 5.2). A instrumentação de imagem por US é similar aos sistemas convencionais de imagem modo-B, com exceção do fato da frequência ser aproximadamente uma ordem de grandeza maior.

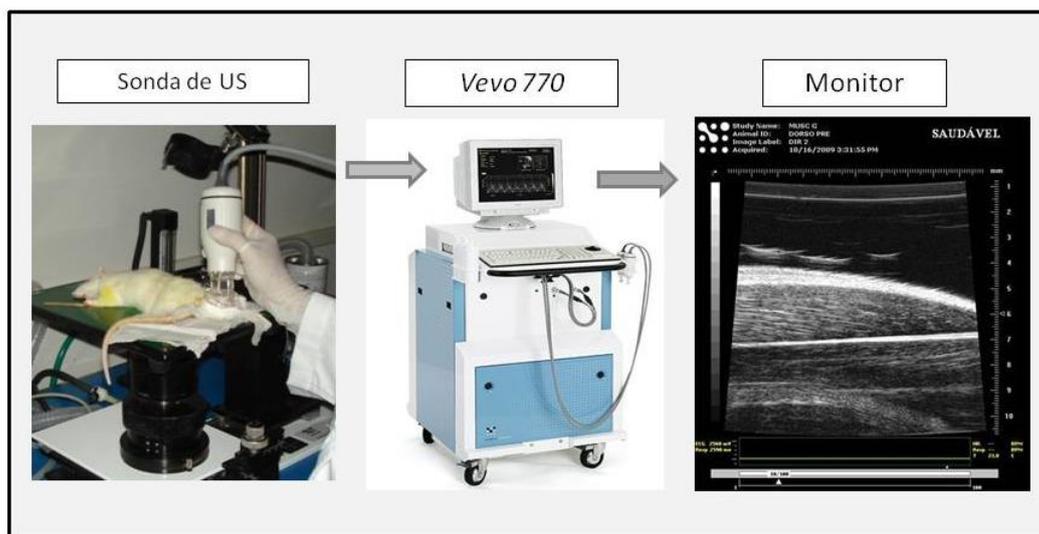


Figura 5.2 - Diagrama de blocos simplificado do equipamento de BMU Vevo 770.

O equipamento de US de alta frequência utilizado foi o Vevo 770 (VisualSonics, Toronto, Canadá) pertencente ao Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO/UFRJ, Rio de Janeiro). Este equipamento opera com um transdutor monoelemento e permite a visualização e quantificação de estruturas anatômicas, da hemodinâmica, e de intervenções terapêuticas de pequenos animais através de imagens com resolução de até 30 μm . No presente trabalho foi utilizada a sonda RMV704 (VisualSonics, Toronto, Canadá) a qual possui um transdutor que funciona na frequência central de 40MHz. Este transdutor é composto de um copolímero piezoelétrico com foco fixo. A sonda permite a obtenção de um campo de imagem com 10 x 10mm e a uma taxa de 34 quadros/segundo. Outras especificações técnicas da sonda são apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Especificações técnicas da sonda RMV-704

SONDA DE ULTRASSOM MODELO: RMV-704	
Faixa de Frequência (MHz)	Até 60
Frequência (MHz)	40
Resolução axial (μm)	40
Resolução lateral (μm)	80
Distância focal (mm)	6
Profundidade do campo (mm)	1,5

5.2.2 – Quantificação dos Parâmetros Biomecânicos de Arquitetura Muscular

A EM, o AP e o CT foram determinados nas imagens de BMU obtidas no plano longitudinal à linha de ação muscular, em pontos anatômicos identificáveis e determinados pelos testes piloto (EM e CT), ou em fibras bem visualizadas (AP) (Figura 5.3). Todas as medições foram realizadas através de um programa de análise de imagens (*ImageJ - National Institute of Health, Maryland, EUA*) em quadros selecionados de acordo com a melhor visualização das estruturas. Foram capturados vídeos com 100 quadros (para as 3 linhas de pesquisa), selecionados de acordo com a possibilidade de visualização e quantificação dos parâmetros. As medições foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador sem ordem pré-determinada de quadro e variável analisada.

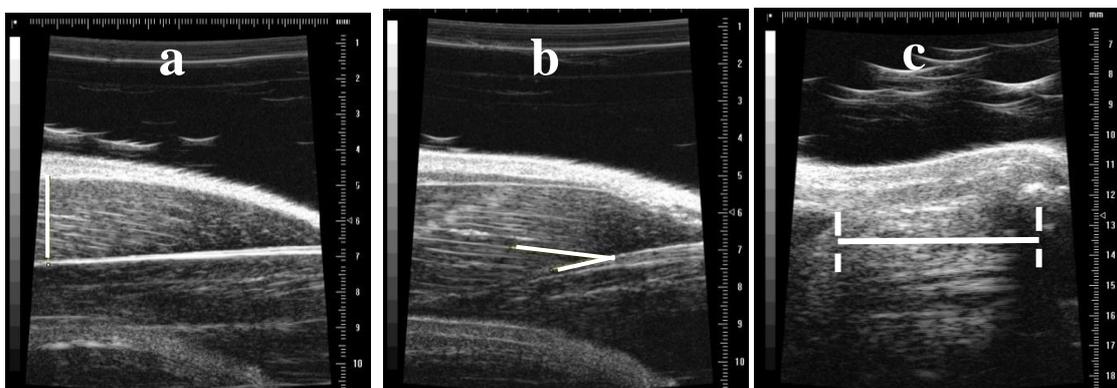


Figura 5.3 – (a) Medição da espessura muscular (comprimento do segmento de reta amarelo), (b) do ângulo de penação (ângulo formado entre os segmentos de retas amarelos), e (c) do comprimento do tendão (comprimento do segmento de reta amarelo traçado entre a junção miotendínea e o calcâneo) do gastrocnêmio lateral em imagem de biomicroscopia ultrassônica em ratos.

5.2.3 – Separação das fibras e contagem dos sarcômeros

Para o modelo experimental de alongamento todos os animais foram eutanizados por overdose anestésica após o período de intervenção e os músculos GL e SOL de ambas as pernas foram dissecados e submetidos a um protocolo para separação das fibras individuais, seguido da quantificação do comprimento e do número de sarcômeros através do método de Williams e Goldspink [127]. Logo após a dissecação, o tecido muscular ficou submerso em glutaraldeído 2,5% por 3 horas, e depois foi removido, separado em feixes de fibras menores e imerso em ácido nítrico 30% por 2 dias. A etapa final antes da separação das fibras consistiu na lavagem do tecido, separação em feixes com menor quantidade de fibras e armazenamento em glicerol 50%. Por fim, de 3 a 5 fibras individuais foram separadas desde sua origem até sua inserção nas aponeuroses, através de pinça e com auxílio de microscópio (aumento 10x, Olympus, Tóquio, Japão), e o comprimento de cada uma foi medido com paquímetro digital antes da montagem da lâmina. Utilizando outro microscópio (Nikon Eclipse TE3000 - Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera (CoolSnap Pro CF - Roper Scientific, Tucson, AZ, EUA), foram adquiridas fotografias com aumento de 40 vezes das fibras individualizadas para quantificação do número de sarcômeros em 100 μ m através do software *ImageJ* (Figura 5.4).

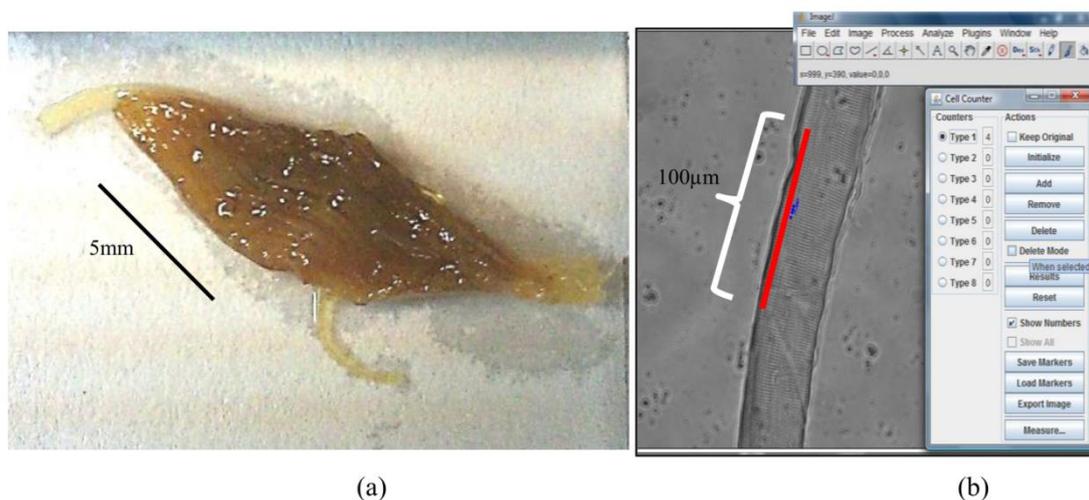


Figura 5.4 – (a) Feixes de fibras e aponeuroses do músculo gastrocnêmio lateral após procedimentos para isolamento das fibras e imagem microscópica de uma fibra processada para contagem do número de sarcômeros em uma região de 100 μ m (segmento de linha vermelho) com ferramenta do software *ImageJ*.

5.2.4 - Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, de 2-4 meses de idade, para o grupo de variabilidade e para indução dos modelos de imobilização e alongamento. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Animais da Instituição (nº: 01/11).

Durante a aquisição das imagens, os animais foram anestesiados com xilazina (10 a 15mg/kg) e ketamina (50 a 75mg/kg) e, tiveram suas patas direita e esquerda tricotomizadas para evitar interferências nas imagens. Os animais foram posicionados em decúbito ventral na plataforma do equipamento, com a pata imobilizada nos ângulos articulares de 90 ou 150° (de acordo com o experimento) através de uma tala de forma a manter a parte posterior livre para o exame com o transdutor de US. Utilizou-se um gel (Ultrax-gel; Farmativa Indústria e Comércio Ltda, RJ, Brasil) para o acoplamento acústico, entre a sonda e o tecido, e para manutenção do foco do feixe ultrassônico na profundidade desejada.

5.2.5 – Procedimentos específicos do grupo de variabilidade e confiabilidade das medidas

Foram utilizados 10 animais, que tiveram a pata direita testada com o tornozelo em duas posições (90 e 150°) de forma aleatória com o auxílio de uma tala. As imagens foram adquiridas em dois dias diferentes com pelo menos uma semana de intervalo e foram realizadas duas medições de AP e EM em três quadros de imagem diferentes para cada uma das posições de tornozelo em cada dia, totalizando 480 medidas. A análise estatística, realizada no programa *STATISTIC 7.0* (Statsoft; Oakland, EUA), incluiu valores de coeficiente de variação, erro médio quadrático e coeficiente de correlação intraclasse.

5.2.6 – Procedimentos específicos do grupo de imobilização muscular na posição alongada

Foram utilizados 9 animais distribuídos em 2 grupos: um grupo submetido ao protocolo de imobilização em posição alongada dos músculos do TS (GI: n=4) e um grupo controle (GC: n=5). O acompanhamento do tecido muscular esquelético de ambas as patas foi realizado antes, após 7 dias de imobilização, e após 7, 14 e 28 dias de retirada a imobilização para o GI e nos intervalos de 0, 14, 21 e 35 dias para o GC.

O protocolo de imobilização empregado foi o proposto por Coutinho *et al.* [137], substituindo a utilização de gesso e resina por um dispositivo fabricado de malha de aço e tecidos em algodão. Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento anestésico descrito na seção de aquisição de imagens para colocação da estrutura que incluía a blusa e malha de fio de aço moldadas para cada rato, de forma a manter o tornozelo esquerdo em dorsiflexão máxima (Figura 5.5). Durante todo o período, os animais receberam medicamento analgésico (20 gotas de dipirona sódica diluída em 400ml de água).

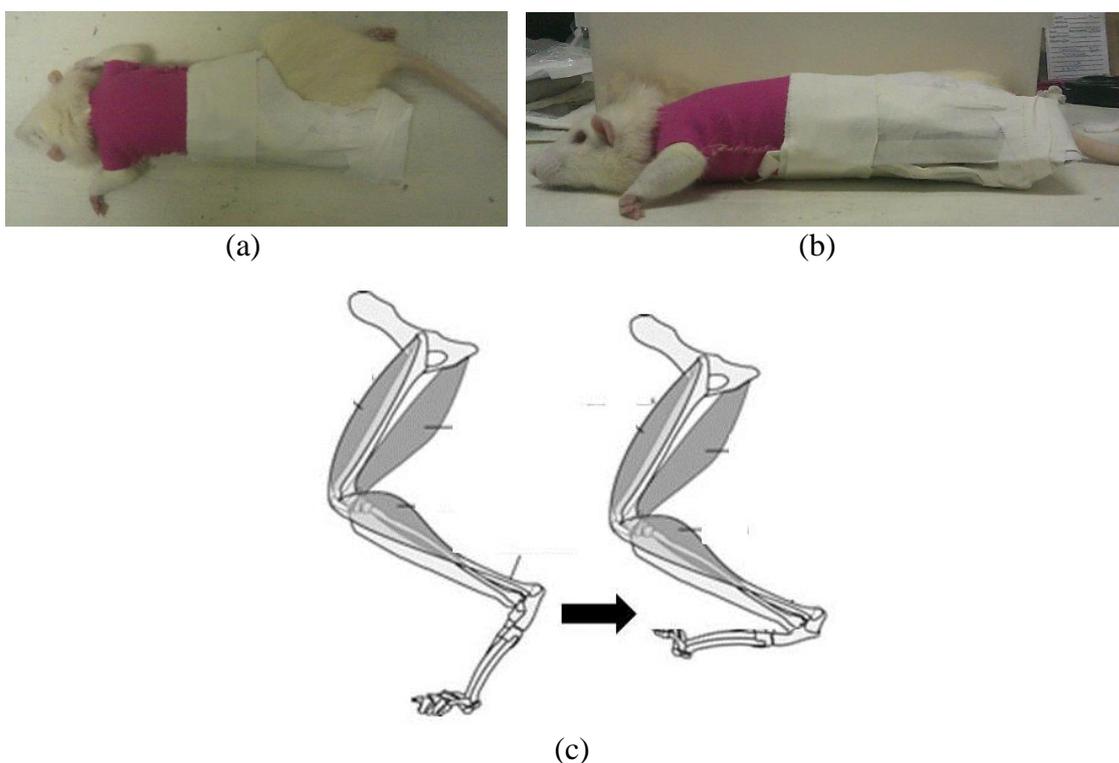


Figura 5.5: Animal anestesiado com a articulação talocrural imobilizada em dorsiflexão máxima em visão superior (a) e lateral (b) e esquema do posicionamento da articulação para imobilização (c).

Tanto para o GI como para o GC, foram realizadas as medições de AP e EM do GL das duas patas para todos os intervalos de aquisição de imagens dos grupos controle e intervenção. A estatística utilizada na análise destes dados foi realizada no programa *STATISTIC 7.0* (Statsoft; Oakland, EUA). A distribuição normal dos dados foi verificada através do teste Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Foi realizada uma ANOVA *one-way* com subsequente teste *post-hoc* Tukey para comparar os parâmetros biomecânicos (EM

e AP) do tecido muscular em cada pata antes da imobilização, após 1 semana de imobilização e 1, 2 e 4 semanas após a retirada da imobilização ($p < 0,05$) para o GI. Outra ANOVA multi-fatorial e *post-hoc* Tukey foram realizados para verificação de diferenças entre as pernas (direita e esquerda) e os momentos antes e após a imobilização. Os mesmos testes foram aplicados ao grupo controle nos devidos intervalos de aquisição de imagem.

5.2.7 - Procedimentos específicos do grupo de alongamento

Foram utilizados 11 animais distribuídos em 2 grupos: um grupo submetido ao protocolo de alongamento estático do TS (GA: $n=6$) e um grupo controle (GC: $n=5$). As medições foram realizadas em imagens adquiridas antes, após 6, 12, 18 e 24 sessões de alongamento para o GA e 5 vezes com intervalos de 3 semanas para o GC.

O protocolo de alongamento foi delineado para assemelhar-se a treinamentos de flexibilidade empregados com humanos, e baseado em estudos realizados com animais [98, 142, 143]. Durante todo o procedimento, os ratos eram anestesiados, com isoflurano (Isofrine; Cristália, São Paulo, Brasil) a 1,5% em 1,5 l/minuto de O_2 , através do uso de um sistema de anestesia animal (EZ-7000, Euthanex, EUA) e imobilizados em cama aquecida a $37^\circ C$ (T/Pump system, Gaymar, EUA) em decúbito dorsal com os membros superiores e o membro inferior esquerdo fixos por fita adesiva. O protocolo consistia de 10 repetições com duração de 1 minuto e intervalo de descanso de 30 segundos de manutenção de posição estática de flexão de quadril a 90 graus, com extensão total de joelho e dorsiflexão máxima do tornozelo direito (Figura 5.6). Tal procedimento foi realizado 3 vezes por semana, durante 8 semanas, totalizando 24 sessões de alongamento.



Figura 5.6: Protocolo de alongamento estático dos músculos do tríceps sural que consistia na manutenção por 60 segundos da posição de flexão de quadril, extensão total de joelho e DF máxima.

O tratamento estatístico foi realizado no programa *STATISTIC 7.0*. A distribuição normal dos dados foi verificada através do teste Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Foi realizada uma ANOVA *one-way* com subsequente teste *post-hoc* Tukey para comparar os parâmetros biomecânicos (EM, AP) do tecido muscular em cada perna antes do treinamento de alongamento com os correspondentes encontrados após 6, 12, 18 e 24 sessões de alongamento ($p < 0,05$). ANOVA multi-fatorial e teste *post-hoc* Tukey foram realizados para verificação de diferenças entre as pernas (alongada e não-alongada) e os momentos após as sessões de alongamento. Testes-t para amostras dependentes (nível de significância, $p < 0,05$) foram realizados para verificar diferenças do CF e número de sarcômeros/100 μ m entre as duas patas de cada rato. Os mesmos testes foram aplicados ao grupo controle.

5.3 – METODOLOGIA - HUMANOS

5.3.1 – Grupo de variabilidade e confiabilidade das medidas

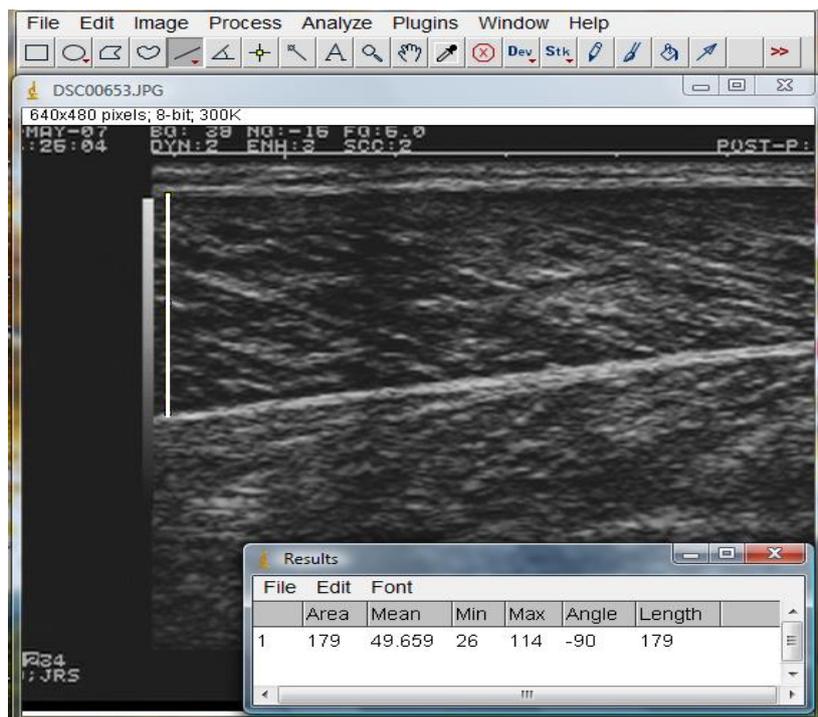
Participaram do estudo 19 voluntários (13 mulheres: $22,1 \pm 2,5$ anos $60,4 \pm 8,2$ kg e 162 ± 2 cm e 6 homens $23,3 \pm 7,2$ anos $72,7 \pm 7,8$ kg e 169 ± 2 cm), fisicamente ativos, não participantes de um programa de treinamento regular e sem histórico de lesões ósteomioarticulares de membros inferiores. Os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da realização das medidas. O protocolo experimental foi aprovado pelo CEP da Instituição (número 03107).

5.3.1.1 - Equipamentos

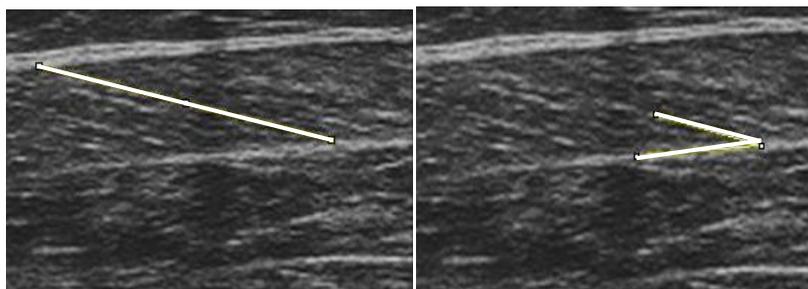
Para aquisição das imagens, foi utilizado um aparelho de US (modelo EUB-405, Hitachi Medical Corporation, Tóquio, Japão), com um transdutor linear de 80 mm (frequência central de 7,5MHz). O transdutor, de tamanho relativamente grande (80mm) quando comparado aos de outros estudos, permitia um campo de imagem de 65,0 mm e, conseqüentemente, a medição do CF em uma única imagem sem necessidade de extrapolações. Foi utilizado um gel (Ultrax-gel, Farmativa Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para o acoplamento acústico e para evitar a depressão da superfície da pele e a interferência nas medidas. Para capturar as imagens de US foi utilizada uma filmadora *handcam* Sony (AC-L25A, 50 a 60Hz) que captava e gravava as fotografias das imagens congeladas no equipamento de US. Para as medições foi utilizado o software *ImageJ* (figura 5.7).

5.3.1.2 - Procedimentos

A aquisição das imagens do GM e do GL da perna direita foi feita pelo mesmo avaliador em duas visitas, com um mínimo de 48 horas de intervalo, para verificação da confiabilidade de estabilidade [140]. Com o indivíduo em pé, marcava-se o local correspondente a 30% proximal do comprimento da perna (distância entre o maléolo medial e a interlinha articular do joelho), conforme protocolo de Miyatani *et al.*[114] Com o indivíduo em decúbito ventral, era identificada a junção dos gastrocnêmios medial e lateral e suas bordas para localização da linha média dos músculos. Em seguida, o transdutor era posicionado longitudinalmente em relação ao segmento na região marcada na perna aonde eram escolhidas as imagens de melhor visualização do CF e do AP para cada músculo. Gravou-se uma imagem de cada músculo nos dois dias de visita para pós-processamento. Cada imagem (dia 1 e dia 2) foi analisada pelo mesmo avaliador cinco vezes através do software supracitado, totalizando dez medidas para cada parâmetro (CF e AP) e 20 medidas por músculo (GM e GL), contabilizando 760 medidas, 380 para cada parâmetro, em 19 indivíduos. Para medir o CF, selecionava-se na imagem a fibra de melhor resolução e com ferramenta do software para medida do comprimento de segmentos de reta eram determinados dois pontos cuja ligação correspondia à distância percorrida pela fibra da aponeurose superficial à profunda (Figura 5.7B). Para o AP, foi utilizado o mesmo procedimento das imagens dos animais, demonstrado na figura 5.7C.



(A)



(B)

(C)

Figura 5.7 - Barra de tarefas do software *ImageJ* com a ferramenta para medição de CF selecionada e a janela com o resultado da medição (A). Detalhe das imagens ultrassônicas dos segmentos das retas traçadas para medição do CF (B) e do AP (C) do GL na região de 30% proximal do comprimento da perna.

5.3.1.3 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software *Statistica 7.0* (Statsoft, Inc. Tulsa, OK - EUA). A distribuição normal das medidas foi avaliada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para verificar as diferenças das medidas dos dias e das cinco medições em cada imagem aplicou-se o teste paramétrico ANOVA *one-way* para medidas repetidas em resposta a variáveis dependentes, com correção de Bonferroni. Verificou-se a confiabilidade e variabilidade das medidas pelo coeficiente de variação (CV), do ICC e

para a estimativa de erro, calculou-se o erro ETM, sugerido por Hopkins [140]. O limite de significância estatística de todos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

5.3.2 - Grupo de Alongamento

Os testes de alongamento com humanos consistiram da avaliação da arquitetura muscular e propriedades mecânicas da UMT do GM antes e depois de 10 semanas de treinamento de alongamento do TS de 25 soldados da Escola de Educação Física do Exército (EsEFEx – Rio de Janeiro, RJ) com características similares de antropometria, idade, histórico de atividade física progressiva e ausência de lesões óstêmioarticulares (massa: $71,69 \pm 12,58$ kg; estatura: $174,16 \pm 7,02$ cm). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (nº: 023/11).

5.3.2.1 – Protocolo Experimental de Alongamento

Os soldados foram distribuídos aleatoriamente em um grupo controle ($n=12$) e um grupo de treinamento de flexibilidade ($n=13$). O treinamento foi realizado de quatro a cinco vezes por semana e consistia de duas séries de trinta segundos para cada perna, com intervalos de igual duração, de duas posições de alongamento estático do TS (Figura 5.8), em que o indivíduo posicionava a articulação na posição de maior amplitude alcançada até seu limite de desconforto máximo.



Figura 5.8 - Posições de alongamento estático do tríceps sural aplicadas no treinamento de flexibilidade.

5.3.2.2 - Testes

Os testes objetivaram a avaliação da adaptação muscular através da quantificação de parâmetros da arquitetura muscular (AP e CF) estaticamente (similar à

metodologia aplicada nos animais) e de propriedades mecânicas da UMT (deslocamento da JMT, variação de comprimento do músculo e do tendão, curva torque-ângulo) durante mobilização passiva da articulação do tornozelo.

5.3.2.3 - Equipamentos

Os testes com humanos utilizaram dois equipamentos de US (EUB-405 - *Hitachi Medical Corporation*, Tóquio, Japão e T2000 - *Terason Ultrasound, Teratech Corporation*, Burlington, EUA) para monitoramento das estruturas do músculo e do tendão durante a mobilização articular, um eletromiógrafo de superfície de quatro canais e frequência de amostragem de 2kHz (Miotec Equipamentos Biomedicos, Porto Alegre (RS), Brasil) com eletrodos de superfície (Ag-AgCl, Meditrace, Kendall, EUA) para certificar o silêncio mioelétrico durante o movimento e um dinamômetro isocinético (*Biodex System 4 Pro* - Nova Iorque, EUA). Os sinais de torque e de eletromiografia foram sincronizados através de um sistema de aquisição de dados (EMG System, Brazil) com 106 dB CMRR, filtro passa-banda analógico com frequências de corte de 10 e 500 Hz, frequência de amostragem de 1 kHz e um conversor A/D de 16 bits. Os equipamentos utilizados são mostrados na Figura 5.9.

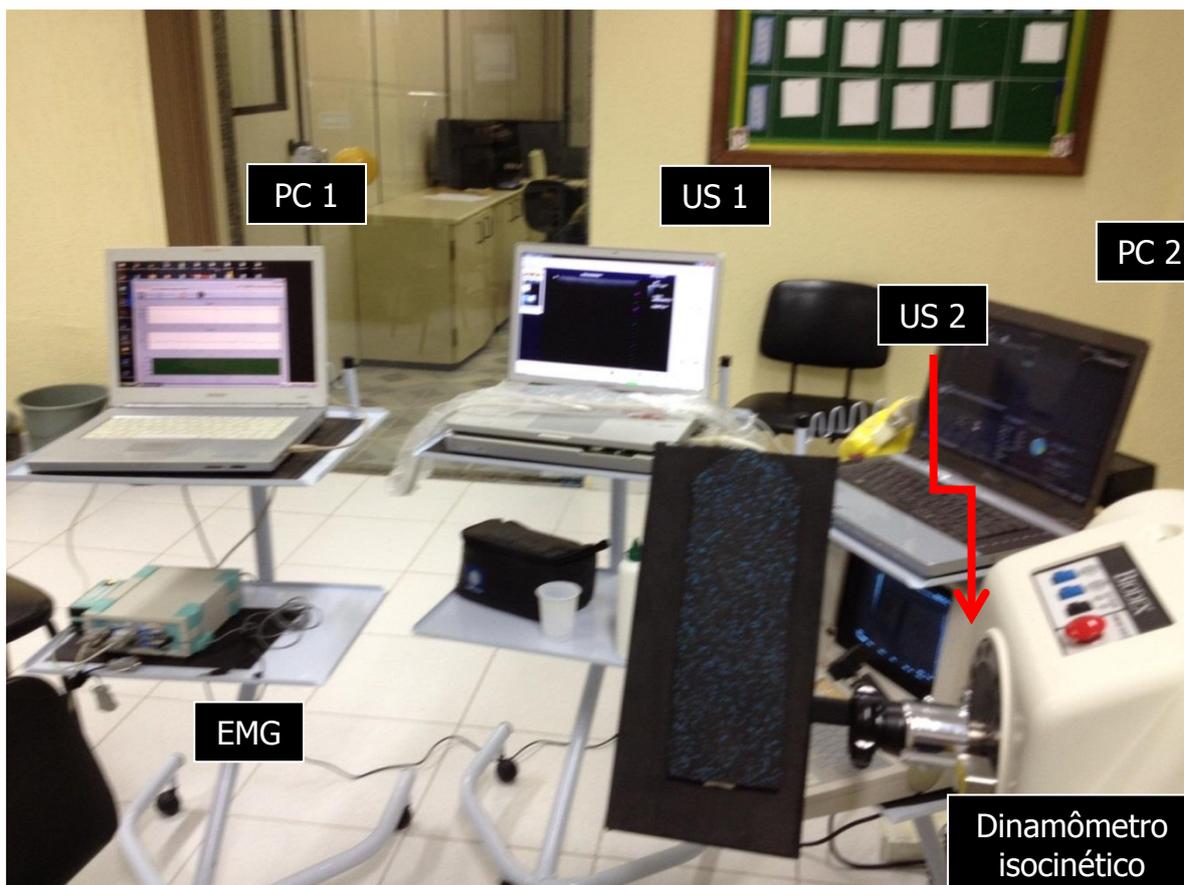


Figura 5.9 - Equipamentos utilizados para aquisição dos dados nos testes com humanos. PC1 = computador para aquisição dos sinais eletromiográficos; US1= equipamento de ultrassom 1; US2 = equipamento de ultrassom 2; PC2 = computador utilizado para captura dos vídeos do US2; EMG = equipamento de eletromiografia de superfície; dinamômetro isocinético.

5.3.2.4 – Procedimentos

Os indivíduos eram posicionados em decúbito ventral na maca do dinamômetro e então era medido o comprimento da perna (distância entre a interlinha articular do joelho e o maléolo lateral) e marcado na perna o equivalente a 30% proximal deste comprimento, altura em que se posicionava o transdutor para identificação das bordas medial e lateral do GM e posteriormente, para aquisição das imagens do ventre muscular do GM e posicionamento dos eletrodos do EMG no GL. O eixo médio longitudinal da UMT do GM, determinado pela metodologia descrita por Narici *et al.* [141], e Maganaris *et al.* [129], foi assumido como a reta entre os pontos médios dos músculos marcados na pele ao ponto de inserção distal do tendão calcanear, identificado também através das imagens de US. O transdutor era então posicionado

longitudinalmente ao longo deste eixo de forma a localizar a JMT. O comprimento do tendão do calcâneo foi definido como a distância entre seu ponto de inserção mais distal e a JMT do GM (porção extramuscular), identificados com US. O CT calcanear em repouso era medido com o tornozelo em posição relaxada, cujo ângulo articular era registrado através de fotografias para posterior medição. Os eletrodos de EMG eram colocados no ventre do GL, de acordo com recomendações do SENIAM e preparação da pele.

O indivíduo era então posicionado sentado na cadeira do equipamento isocinético ajustada para que se mantivessem as seguintes posições articulares: inclinação de tronco de 85°, flexão de quadril de aproximadamente 90°, extensão completa de joelho e pé apoiado na plataforma do dinamômetro com o maléolo lateral alinhado ao eixo de rotação. A inclinação do tronco foi usada para minimizar a tensão na parte posterior do joelho, que poderia limitar a DF máxima, de acordo com Blazevich *et al.* [64]. O pé era fixado à plataforma através de faixas de velcro e esta era movimentada de 30° de flexão plantar até o limite de DF em que o indivíduo relatasse o maior alongamento tolerável. Como o ângulo inicial era sempre o mesmo, o ângulo de DF máximo foi considerado como a amplitude máxima de movimento e utilizada para os testes posteriores. Um dos transdutores era posicionado em um molde fixado à perna sobre o eixo médio longitudinal do GM e em seu ventre através de faixas de velcro (Figura 5.10), de forma que as imagens obtidas mostrassem fascículos musculares claros e possíveis de serem rastreados em todo o seu comprimento da aponeurose superficial à profunda.

Os indivíduos eram orientados a relaxar completamente a musculatura e não apresentar resistência ao movimento, e era então realizada uma série de 3 repetições de mobilização passiva do tornozelo (de 30° de flexão plantar ao máximo de DF) com velocidade de 5°/s, em que eram gravados sinais de EMG do GL, dados de torque passivo, velocidade e amplitude pelo dinamômetro e vídeos do GM e do tendão calcanear dos dois equipamentos de US, um vídeo do ventre muscular (cujo transdutor estava fixo através do molde) e um vídeo do transdutor de US que era posicionado de forma manual longitudinalmente sobre a JMT. O sinal de EMG foi monitorado e os testes em que foi observada uma alteração do sinal foram descartados. Para análise das imagens, os vídeos adquiridos foram fragmentados em quadros a cada 0,5s através do software DVDVideoSoft (DVDVideoSoft Limited, Chicago, USA). A Figura 5.11

ilustra o desenho experimental do estudo e os dados coletados por cada equipamento durante os testes.

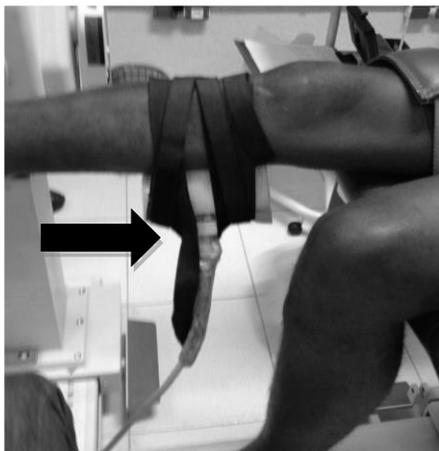


Figura 5.10 – Transdutor de ultrassom posicionado dentro do molde (seta) e fixo através de fitas de velcro sobre o ventre muscular do gastrocnêmio medial.

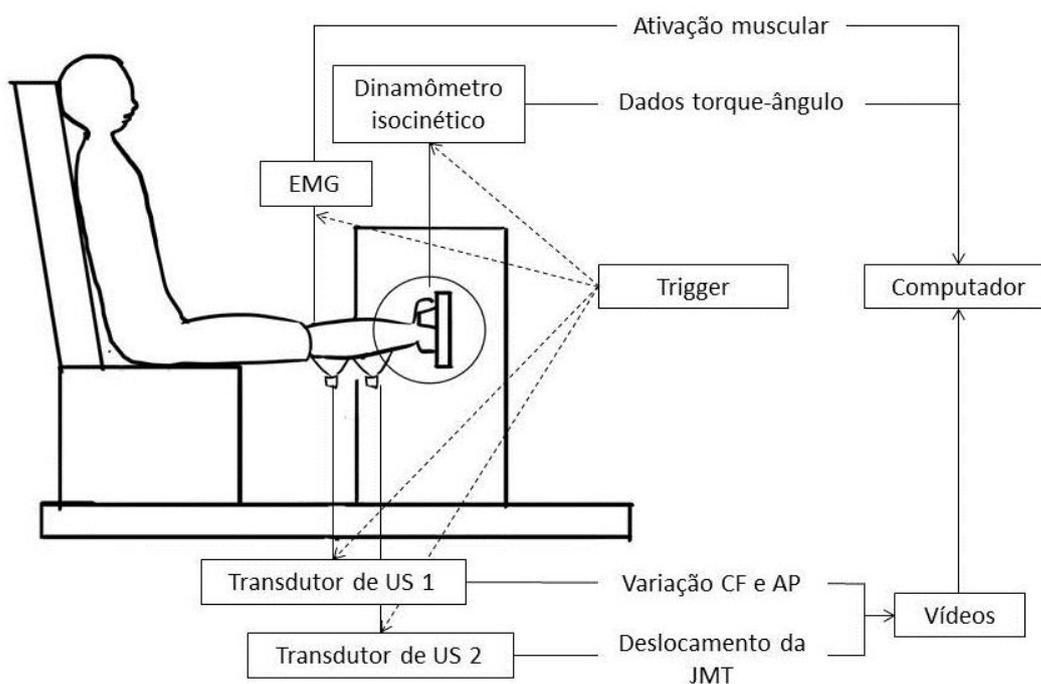


Figura 5.11 - Esquema do desenho experimental dos testes com humanos.

5.3.2.5- Variáveis monitoradas

As variáveis quantificadas nos testes antes e depois do treinamento de alongamento foram: sinais eletromiográficos do GL; torque passivo e amplitude articular; CT e comprimento da UMT em repouso; deslocamento da JMT, CF e AP

durante mobilização do tornozelo. Outras variáveis estimadas e calculadas por métodos descritos posteriormente foram:

- comprimento do músculo em repouso, estimado como a diferença entre os comprimentos da UMT e do tendão;
- deformação da UMT em função do ângulo articular, através de equações de regressões publicadas na literatura [55] (Figura 5.12);
- deformação relativa do músculo, calculada pelo deslocamento da JMT (Figura 5.12).
- deformação relativa do tendão, calculada como a diferença entre a variação do comprimento da UMT e do músculo (Figura 5.12);

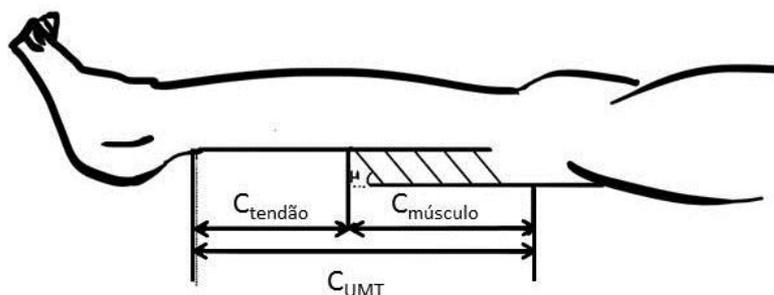


Figura 5.12 - Esquema representando os comprimentos das estruturas analisadas, C_{UMT} = comprimento da unidade músculo-tendão estimado por equações de regressão; $C_{músculo}$ = comprimento do músculo dado pela posição e deslocamento da junção miotendínea; e $C_{tendão}$ = comprimento do tendão, estimado pela diferença $C_{UMT} - C_{músculo}$.

5.3.2.5.1 - Variação do comprimento do fascículo e do ângulo de penação

O CF máximo e o AP mínimo foram medidos nas imagens de US correspondentes à DF máxima através de uma rotina em LabVIEW (*National Instruments Corp.*, Austin, EUA) desenvolvida com este propósito, que localizava a interseção entre os segmentos de retas correspondentes a uma fibra e à aponeurose interna para determinação do AP e entre estas duas retas e outra na aponeurose superficial para determinar o CF, conforme ilustrado na Figura 5.13. O CF e o AP na posição de DF máxima foram considerados para análise da adaptação plástica destas estruturas.

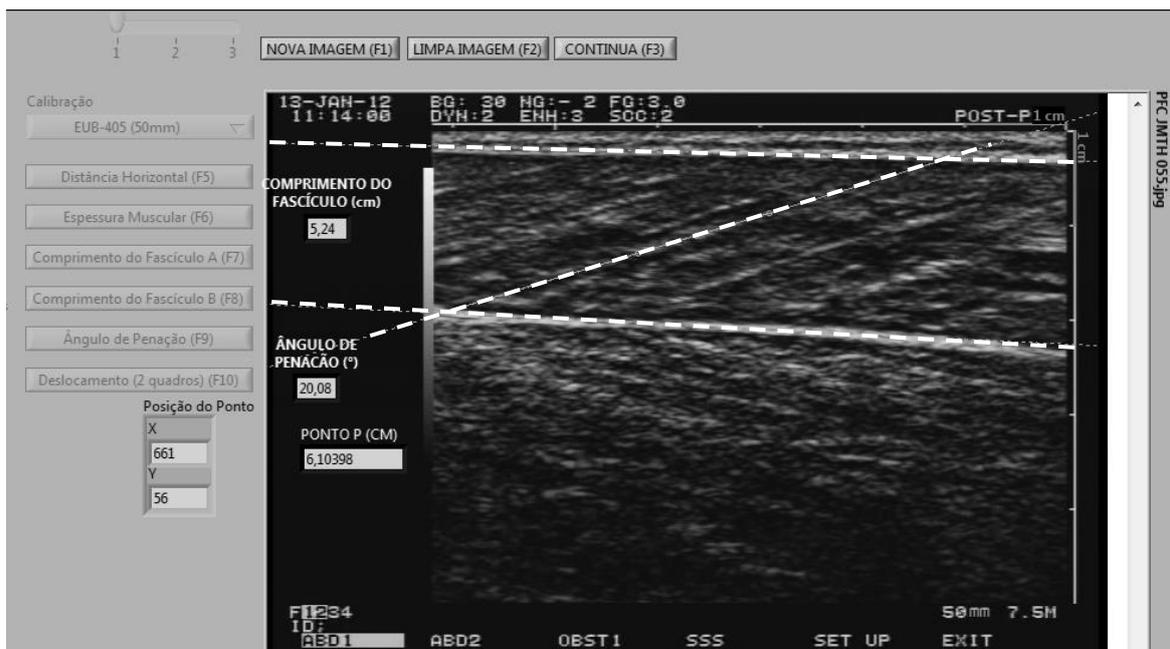


Figura 5.13 – Procedimento utilizado para medição do comprimento do fascículo (comprimento do segmento de reta diagonal branca delimitado pelas aponeuroses superficial e profunda) e do ângulo de penação (ângulo agudo entre o segmento de reta branca delimitado pelas aponeuroses e o segmento de reta tracejada branca sobre a aponeurose profunda) nas imagens de US.

5.3.2.5.2 - Deslocamento da Junção Miotendínea

As medidas de deslocamento da JMT foram feitas através do software de análise de imagens *ImageJ* nas imagens de US. Era quantificado o deslocamento da estrutura em intervalos de 1 segundo em uma amplitude pré-selecionada da flexão plantar inicial até a DF máxima. O deslocamento a cada intervalo foi calculado como o comprimento do segmento de reta que conectava a JMT e a borda lateral da imagem. O deslocamento total foi considerado como a variação máxima desta distância (Figura 5.14). Com estes valores e os ângulos articulares correspondentes, foram gerados um gráfico deslocamento x ângulo e uma reta de regressão para estimativa dos valores de deslocamento da JMT em todos os ângulos. Os deslocamentos foram adicionados ao comprimento do músculo em repouso para estimativa da variação deste parâmetro durante a mobilização articular passiva.

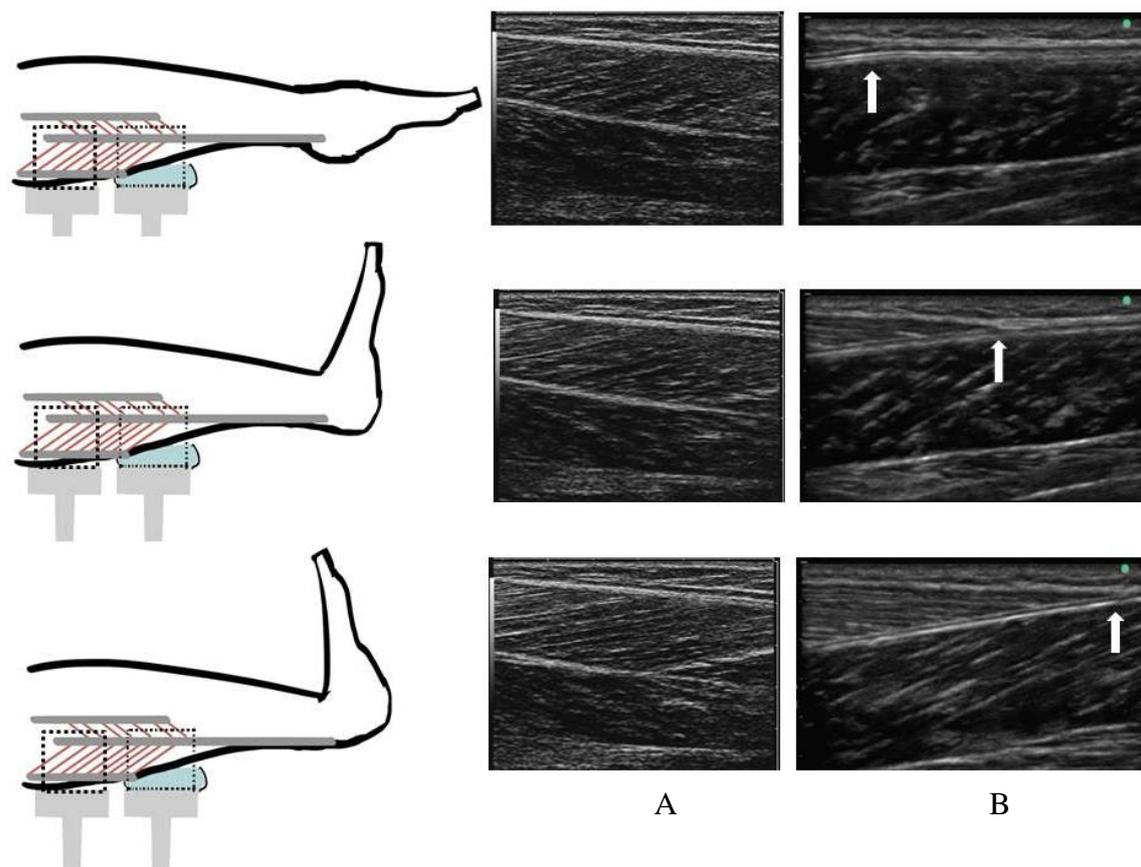


Figura 5.14 - Imagens de ultrassonografia adquiridas simultaneamente com dois transdutores (A e B) nas diferentes posições de tornozelo e usadas para: verificação da variação do comprimento do fascículo e ângulo de penação (A) e medição do deslocamento da junção miotendínea (B). A seta branca indica a junção miotendínea, sendo possível observar o seu deslocamento durante o movimento do tornozelo da flexão plantar para DF.

5.3.2.5.3 - Deformação do comprimento da UMT

O comprimento total da UMT foi considerado como equivalente ao comprimento da perna, aproximação considerada consistente por outros autores [72, 82], sendo este igual à distância entre o centro do maléolo lateral e a linha poplítea determinada com o indivíduo em decúbito ventral em repouso. A variação no comprimento da UMT a cada intervalo angular de mobilização passiva da articulação foi estimado através de um modelo de regressão gerado com cadáveres [55] e utilizado por diversos autores para este fim [51, 72, 81, 82]. A mudança percentual no comprimento da UMT (ΔC_{UMT}) foi calculada da seguinte forma:

$$\Delta C_{UMT} = -22,185 + 0,30141(90 + \theta A) + 0,00061(90 + \theta A)^2 \quad (4)$$

em que θA é o ângulo articular em comparação à posição neutra do pé, considerada como 0° . O valor de variação percentual foi convertido em valores absolutos de acordo com o comprimento da UMT medido como o comprimento da perna em repouso e calculada para os ângulos articulares de interesse para as análises.

5.3.2.5.4 - Contribuição do músculo e do tendão para variação de comprimento da UMT

Para investigar as possíveis diferentes adaptações dos tecidos muscular e conjuntivo ao treinamento de alongamento crônico, foram estimados os percentuais de contribuição de variação dos comprimentos do músculo e do tendão para a variação total do comprimento da UMT no ângulo máximo de DF antes e após as 10 semanas de alongamento.

5.3.2.6 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software *Statistica 7.0*. A distribuição normal das medidas foi avaliada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para verificar as diferenças de todos os parâmetros entre os momentos antes e depois das 10 semanas de cada grupo, foram realizados teste-t para amostras dependentes. A comparação entre os grupos antes da intervenção foi realizada por testes-t para amostras independentes. Foram realizadas análises de correlação, com cálculo de significância estatística para o coeficiente de correlação entre variáveis que representavam a adaptação ao treinamento (percentual de contribuição do músculo e do tendão) e aquelas indicativas da condição inicial de flexibilidade dos indivíduos (ângulo máximo articular, percentual de aumento da amplitude máxima). O limite de significância estatística de todos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

6 - RESULTADOS

6.1 - RESULTADOS - ANIMAIS

6.1.1 – Resultados - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas

Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas medidas de AP e EM realizadas em cada um dos três quadros de imagem e, portanto, os valores médios foram adotados para testes subsequentes. O mesmo ocorreu para as medidas determinadas em imagens de dois dias diferentes.

Valores de média, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro típico da medida (ETM) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI) para o AP e EM determinadas em cada dia e posição de tornozelo são apresentados nas tabelas 6.1 e 6.2, respectivamente. As tabelas 6.3 e 6.4 listam o ETM e ICC para as diferenças entre as medidas feitas em cada quadro de imagem e entre quadros de imagem para cada posição de tornozelo.

As medidas de AP com o tornozelo a 90° foram significativamente diferentes de 150° ($p=0,00013$).

O coeficiente de variação da EM foi sempre inferior ao do AP devido à complexidade relativa das medições destes parâmetros.

Tabela 6.1: Média, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro típico da medida (ETM) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI) para o ângulo de penação medido nas imagens adquiridas em dois dias separadamente (Dia 1, Dia 2) e considerando os dois dias nas posições de tornozelo de 90° e 150°

	90°			150°		
	Dia 1	Dia 2	Dias 1 e 2	Dia 1	Dia 2	Dias 1 e 2
Média±DP (°)	10,56±1,00	10,07±0,93	10,35±1,08	13,42±1,04	12,69±0,87	13,08±1,21
CV (%)	9,47	9,27	10,47	7,78	6,87	9,24
ETM (°)			0,81			1,20
CCI			0,81			0,75

Tabela 6.2: Média, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), erro típico da medida (ETM) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI) para a espessura muscular medida nas imagens adquiridas em dois dias separadamente (Dia 1, Dia 2) e considerando os dois dias nas posições de tornozelo de 90° e 150°.

	90°			150°		
	Dia 1	Dia 2	Dias 1 e 2	Dia 1	Dia 2	Dias 1 e 2
Média±DP(mm)	3,661±0,10	3,65±0,13	3,66±0,18	3,89±0,12	3,87±0,14	3,88±0,23
CV(%)	2,90	3,67	4,82	3,04	3,55	5,98
ETM(mm)			0,19			0,27
CCI			0,58			0,67

Tabela 6.3: Erro típico da medida (ETM) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI) com o tornozelo a 90 e 150° considerando as duas medidas de ângulo de penação determinadas em cada um dos três quadros e para os três quadros comparados par-a-par.

Quadro	90°		150°	
	ETM (°)	CCI	ETM (°)	CCI
1	0,64	0,91	0,83	0,92
2	0,69	0,90	0,97	0,95
3	0,75	0,91	0,68	0,91
Média - 3 quadros	0,69	0,91	0,83	0,93
1 x 2	0,85	0,85	0,99	0,82
1 x 3	1,21	0,59	0,91	0,78
2 x 3	0,85	0,84	1,02	0,79
Média - 3 pares de quadros	0,97	0,76	0,97	0,80

Tabela 6.4: Erro típico da medida (ETM) e coeficiente de correlação intraclasse (CCI) com o tornozelo a 90 e 150° considerando as duas medidas de espessura muscular determinadas em cada um dos três quadros e para os três quadros comparados par-a-par.

Quadro	90°		150°	
	ETM (mm)	CCI	ETM (mm)	CCI
1	0,038	0,976	0,030	0,997
2	0,044	0,968	0,054	0,983
3	0,100	0,858	0,065	0,986
Média - 3 quadros	0,061	0,934	0,050	0,989
1 x 2	0,100	0,804	0,157	0,895
1 x 3	0,145	0,771	0,169	0,901
2 x 3	0,113	0,787	0,144	0,917
Média - 3 pares de quadros	0,119	0,787	0,156	0,904

6.1.2 – Resultados - Grupo de Imobilização Muscular na Posição Alongada

Os valores de média e desvio-padrão do AP e EM dos grupos GC e GI estão apresentados nas Tabelas 6.5 e 6.6.

Tabela 6.5: Média e desvio-padrão da EM e AP das patas imobilizada e não-imobilizada dos ratos do GI antes (Pré), após 1 semana de imobilização (R0), e 1 (R7), 2 (R14) e 4 (R28) semanas após a retirada da imobilização.

	EM (mm)		AP (°)	
	Não-imobilizada	Imobilizada	Não-imobilizada	Imobilizada
Pré	3,64±0,23	3,55±0,13	10,78±1,22	10,55±1,71
R0	3,25±0,50	2,83±0,34	9,87±0,72	6,80±0,14
R7	3,52±0,26	2,60±0,31	9,01±1,06	7,87±0,68
R14	3,51±0,19	3,00±0,48	10,38±0,84	7,66±0,69
R28	3,69±0,02	3,12±0,09	10,40±0,95	7,54±0,44

Tabela 6.6: Média e desvio-padrão da EM e do AP da pata avaliada no grupo controle antes, após 2, 3 e 5 semanas.

Semana	EM (mm)	AP (°)
0	4,01±0,31	11,71±0,69
2	3,92±0,28	11,52±0,84
3	3,91±0,35	11,21±0,37
5	4,04±0,26	11,24±0,10

O GI demonstrou uma redução progressiva dos valores de AP para a perna imobilizada com diferença estatística significativa para o valor antes da imobilização e mesmo 28 dias depois de retirada a imobilização, e uma tendência de redução dos valores nas duas primeiras semanas para a pata traseira não imobilizada, embora sem diferença significativa (Figura 6.1).

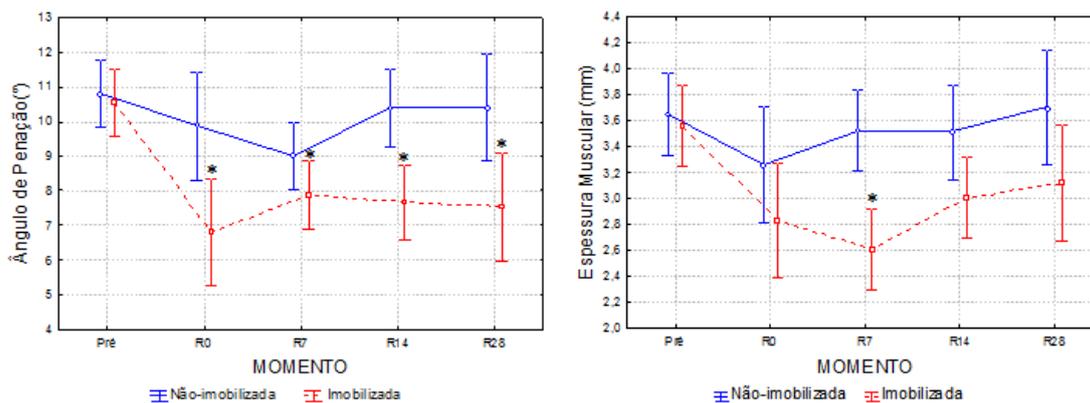
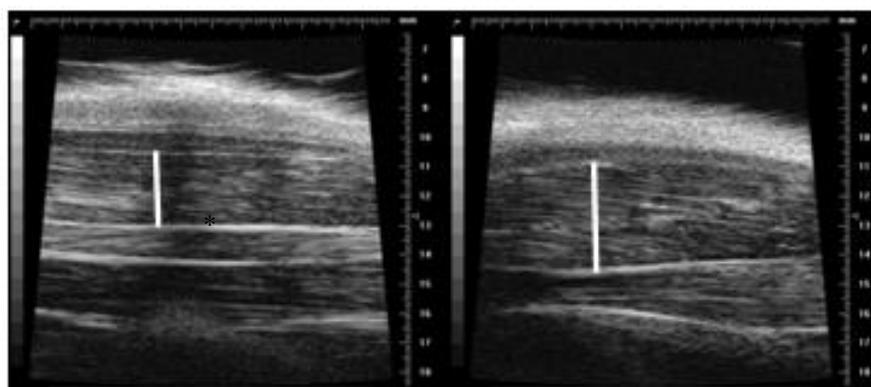


Figura 6.1: AP e EM das patas imobilizada e não-imobilizada do GI antes (Pré), após 1 semana de imobilização (R0), e 1 (R7), 2 (R14) e 4 (R28) semanas após a retirada da imobilização. (*)diferença significativa para a condição pré da pata imobilizada.

Para a EM, também se evidenciou uma redução significativa na medida da pata imobilizada (Figura 6.2), com diferença estatística entre a condição pré-imobilização e 1 semana após a retirada da imobilização (Figura 6.1). Diferentemente do observado para o AP, é possível notar um aumento nos valores de EM depois de 2 e 4 semanas de recuperação, se aproximando dos valores pré-imobilização. Não foi encontrada diferença significativa para nenhum dos parâmetros no GC.



(a)

(b)

Figura 6.2: Imagens de BMU da pata de rato imobilizada imediatamente após a retirada da imobilização (a) e da pata não imobilizada (b). O segmento de reta branco indica a espessura muscular do gastrocnêmio lateral das duas patas.

6.1.3 – Resultados - Grupo de Alongamento

Os valores de média e desvio-padrão de todos os parâmetros do grupo alongamento estão apresentados nas Tabelas 6.7 e 6.8.

Tabela 6.7: Média e desvio-padrão do ângulo de penação (AP), espessura muscular (EM) e comprimento do tendão (CT) das patas alongada (A) e não-alongada (NA)

		AP (°)	EM (mm)	CT (mm)
Antes	A	13,76(1,22)	3,40(0,22)	6,45(0,30)
	NA	13,16(1,70)	3,23(0,21)	6,57(0,53)
6 sessões	A	12,18(1,18)	3,13(0,26)	6,53(0,43)
	NA	12,74(1,16)	3,26(0,39)	6,55(0,48)
12 sessões	A	10,98(1,79)*	3,16(0,23)	6,44(0,40)
	NA	13,02(1,13)	3,43(0,22)	6,59 (0,55)
18 sessões	A	10,62(0,96)*	3,43(0,16)	6,49 (0,47)
	NA	12,67(0,54)	3,31(0,11)	6,62 (0,35)
24 sessões	A	10,34(1,67)*	3,41(0,36)	6,45 (0,52)
	NA	12,66(1,76)	3,39(0,25)	6,74 (0,58)

Tabela 6.8: Média e desvio-padrão do ângulo de penação (AP), espessura muscular (EM) e comprimento do tendão (CT) da pata examinada do grupo controle

Grupo Controle			
Dias	AP	EM	CT
0	10,28±1,18	3,55±0,17	6,94±0,50
14	10,40±1,16	3,49±0,18	7,16±0,50
28	10,27±0,47	3,56±0,23	7,31±0,56
42	9,94±0,97	3,41±0,20	7,07±0,45
66	10,52±0,79	3,64±0,20	7,15±0,34

O GA demonstrou uma redução progressiva dos valores de AP para a perna alongada (de 13,76 para 10,34°, aproximadamente 25%) com diferença estatística significativa entre as médias, e manutenção dos valores para a perna não alongada (Figura 6.3). No entanto, os valores de EM não apresentaram diferença significativa, entre as médias, antes e após as sessões de alongamento para nenhuma das pernas, apresentando apenas uma tendência de redução após as 12 sessões iniciais, com retorno aos valores iniciais após as 24 sessões de alongamento. Não foi encontrada diferença

significativa para nenhum dos parâmetros no GC. Os valores de coeficiente de variação para as medidas de EM e AP encontrados neste estudo são de 5 e 8%, respectivamente.

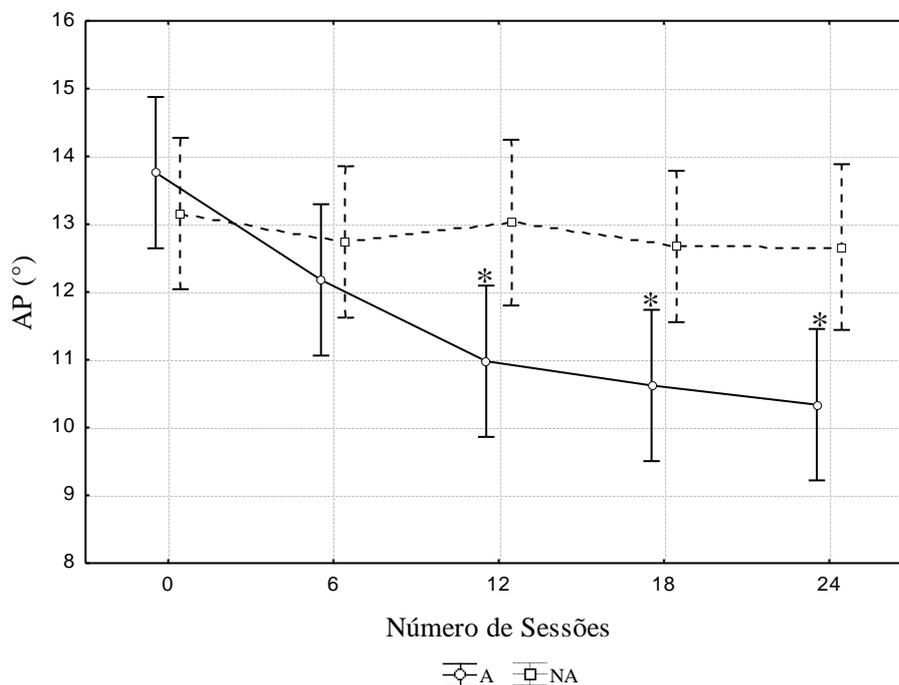


Figura 6.3: Ângulo de penção das patas alongada (A) e não-alongada (NA) do grupo alongamento antes e após 6, 12, 18 e 24 sessões de alongamento. (*) diferença estatisticamente significativa.

Para os animais do GA, o CF e razão do número de sarcômeros/100 μ m de fibra, medidos *ex vivo* e *in vitro* respectivamente, resultaram em $12,04 \pm 0,78$ mm e 0,53 sarcômeros/ μ m para o músculo da pata alongada, enquanto o músculo não-alongado apresentou resultados correspondentes de $11,10 \pm 0,71$ mm e 0,56 sarcômeros/ μ m, respectivamente (Figura 6.4). O CF foi significativamente maior ($p=0,000006$) e a densidade linear de sarcômeros significativamente menor ($p=0,041$) para a pata alongada comparada à contralateral (não alongada). Não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros do GC.

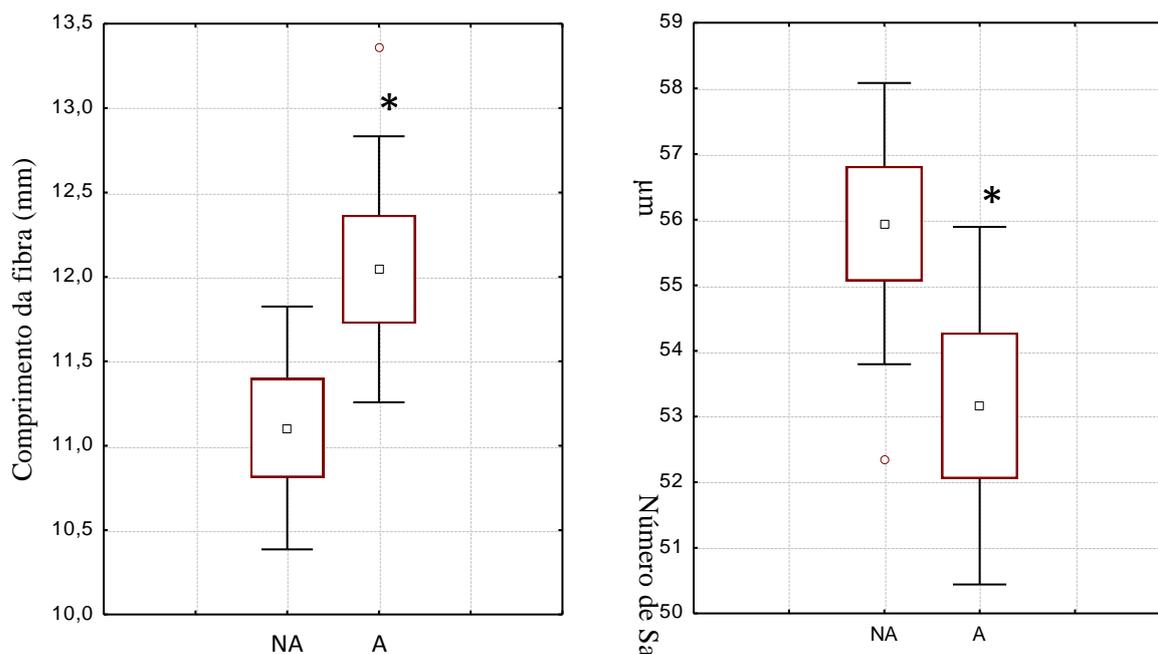


Figura 6.4 – Box-plots do comprimento da fibra *in vitro* e da densidade linear de sarcômeros para as patas não-alongada (NA) e alongada (NA). *diferença para a pata não-alongada.

6.2 – RESULTADOS - HUMANOS

6.2.1 - Resultados - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas

Os valores das medidas apresentaram distribuição normal e os dados referentes à média, desvio padrão, CV, ICC, ETM de CF e AP dos dois dias encontram-se nas tabelas 6.9 e 6.10.

O ANOVA com medidas repetidas não identificou diferenças significativas entre as imagens e dias para nenhum dos parâmetros. O CV das medidas do CF variou de 1,67 a 4,44% e do AP de 3,8 a 11,62%.

Em relação ao ICC, com exceção do valor referente aos dois dias do AP do GM (0,67), todos se encontram no intervalo de grande confiabilidade. Os dois valores mais altos de ETM (3,1° e 3,7°) correspondem aos dois valores inferiores do ICC (0,67 e 0,83, respectivamente), referente às medidas repetidas inter-dias, do GM e do GL. Já as medidas de CF de GM e GL apresentaram ETM de 2,17 e 2,25 mm, respectivamente.

Tabela 6.9 - Valores de média, CV, ICC e ETM do comprimento do fascículo (CF) dos músculos gastrocnêmios medial (GM) e lateral (GL).

		média ± dp (mm)	CV (%)	ICC	ETM (mm)
GM	Dia 1	38,54 (0,88)	2,33	0,99	
	Dia 2	37,85 (0,62)	1,67	0,99	
	Dois dias	38,19 (1,61)	4,22	0,99	2,17
GL	Dia 1	36,20(0,86)	2,41	1,0	
	Dia 2	36,12(0,84)	2,38	0,99	
	Dois dias	36,16(1,55)	4,44	0,98	2,25

Tabela 6.10 - Valores de média, CV, ICC e ETM do ângulo de penação (AP) dos músculos gastrocnêmios medial (GM) e lateral (GL).

		média± dp (°)	CV (%)	ICC	ETM (°)
GM	Dia 1	22,88 (0,90)	3,85	0,96	
	Dia 2	24,06 (0,92)	3,93	0,99	
	Dois dias	23,47(2,64)	11,62	0,67	3,1
GL	Dia 1	20,58(0,78)	3,80	0,98	
	Dia 2	20,49(0,91)	4,44	0,98	
	Dois dias	20,54(2,19)	10,69	0,83	3,7

6.2.2 – Resultados - Grupo de Treinamento de Alongamento

Os valores de média e desvio-padrão do ângulo de repouso, braço de força, comprimento da perna e do tendão em repouso, ângulo de DF máxima, torque passivo máximo, CF máximo e AP mínimo para os dois grupos nas condições pré e pós-treinamento de alongamento são apresentadas na Tabela 6.11 assim como as diferenças estatísticas. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos para nenhum dos parâmetros medidos antes do treinamento de flexibilidade. Foi observado um aumento significativo do ângulo de DF máxima, do CF máximo, assim como uma redução significativa do AP mínimo, resultados coerentes com os encontrados para o estudo de alongamento com animais, conforme mostrado na Tabela 6.11.

A tabela 6.12 reporta os valores de comprimentos da UMT, do músculo e do tendão nas posições de repouso e de DF máxima antes e depois do treinamento de alongamento para o GA e o GC, respectivamente. Os percentuais do comprimento máximo da UMT referentes ao músculo e ao tendão, representativos da contribuição destas estruturas para variação do comprimento da UMT, também são relatados.

Tabela 6.11 – Valores de média \pm desvio-padrão e valor-p (p) das características gerais dos grupos alongamento e controle antes e depois das 10 semanas de intervenção.

	Grupo Alongamento			Grupo Controle		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	P
Ângulo de repouso (°)	23,31 \pm 6,40	24,86 \pm 7,09	ns	23,97 \pm 6,95	25,64 \pm 5,77	ns
Comprimento da perna (mm)	41,97 \pm 2,50			42,55 \pm 2,40		
Comprimento do tendão em repouso (mm)	19,57 \pm 1,59	19,30 \pm 1,42	ns	20,05 \pm 2,14	19,90 \pm 2,28	ns
Dorsiflexão máxima (°)	-24,25 \pm 7,53	-29,08 \pm 7,10*	0,015	24,66 \pm 8,09	28,83 \pm 10,47	ns
Torque passivo máximo (Nm)	30,38 \pm 8,91	35,00 \pm 8,46	ns	32,24 \pm 10,19	40,70 \pm 15,73	ns
Comprimento do fascículo máximo (mm)	7,24 \pm 0,86	7,65 \pm 1,65*	0,002	6,78 \pm 0,58	6,74 \pm 0,72	ns
Ângulo de penação mínimo (°)	16,53 \pm 1,59	15,68 \pm 2,48*	0,041	17,52 \pm 1,94	17,61 \pm 2,64	ns
Comprimento do fascículo em 30° flexão plantar (mm)	4,48 \pm 0,72	4,56 \pm 0,77	ns	4,10 \pm 0,62	4,27 \pm 0,69	ns
Ângulo de penação em 30° flexão plantar (°)	26,73 \pm 4,35	25,79 \pm 3,58	ns	28,68 \pm 5,03	25,81 \pm 3,86	ns

*diferença significativa para o pré do mesmo grupo. ns= não significativo.

Tabela 6.12 – Comprimentos da UMT, do músculo e do tendão em repouso e em dorsiflexão máxima para os grupos alongamento e controle antes e depois das 10 semanas de intervenção.

	Grupo Alongamento		Grupo Controle	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Comprimento UMT em repouso (mm)	411,22 \pm 28,71	409,30 \pm 29,60	416,00 \pm 23,97	415,68 \pm 19,90
Comprimento do tendão em repouso (mm)	195,77 \pm 15,99	193,00 \pm 14,22	200,50 \pm 21,46	199,00 \pm 21,79
Comprimento do músculo em repouso (mm)	215,45 \pm 22,34	216,30 \pm 21,71	215,50 \pm 15,40	216,68 \pm 14,54
Comprimento máximo UMT (mm)	469,91 \pm 28,30	477,53 \pm 28,71	478,00 \pm 23,30	483,49 \pm 27,47
Comprimento máximo do músculo (mm)	243,22 \pm 22,36	245,10 \pm 20,92	244,17 \pm 16,20	259,36 \pm 59,77
Comprimento máximo do tendão (mm)	226,69 \pm 20,81	232,43 \pm 17,21	233,83 \pm 26,76	224,12 \pm 60,48
Contribuição do músculo para comprimento máximo UMT (%)	51,75 \pm 3,56	51,30 \pm 2,72	51,17 \pm 3,90	50,38 \pm 4,51
Contribuição do tendão para comprimento máximo UMT (%)	48,25 \pm 3,56	48,70 \pm 2,72	48,83 \pm 3,90	49,62 \pm 4,51

A análise de correlação entre as variáveis demonstrou uma correlação negativa moderada, embora significativa ($r=-0,59$, $p=0,03$) entre o ângulo máximo articular prévio ao programa de alongamento e o aumento percentual do ângulo de dorsiflexão

devido ao treinamento, o que indica que indivíduos mais rígidos tiveram um maior ganho de amplitude.

Além disso, foi encontrada correlação negativa significativa ($r=-0,72$, $p=0,008$) entre o aumento do ângulo de DF máximo e a variação da contribuição do músculo para a variação do comprimento da UMT, enquanto para a variação da contribuição do tendão o coeficiente de correlação foi positivo e também estatisticamente significativo ($r=0,73$, $p=0,006$). Estes dados demonstram que o ganho de amplitude articular devido ao treinamento de flexibilidade está associado às variações das contribuições do músculo e do tendão para o aumento de comprimento da UMT. Ou seja, para um maior ganho de amplitude articular estão associadas uma maior variação da contribuição do tendão para a variação de comprimento da UMT e uma menor variação da contribuição do músculo. Resultados similares que reforçam os anteriores foram observados como a correlação linear significativa entre o ângulo de DF máxima pré-alongamento e a variação da contribuição do músculo ($r = 0,7073$; $p = 0,0101$) e do tendão ($r = -0,7039$; $p = 0,0106$) para o aumento do comprimento da UMT, significando que o ângulo articular inicial de cada indivíduo é capaz de prever a variação da contribuição de cada estrutura. Isto pode ser possivelmente associado com as adaptações estruturais que os diferentes tecidos apresentam ao alongamento crônico e à forma como diferenças individuais de mobilidade articular afetam as respostas ao treinamento.

7 – DISCUSSÃO

7.1 – DISCUSSÃO - ANIMAIS

7.1.1 - Discussão - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas

Eng *et al.* [108] examinaram propriedades da arquitetura muscular da pata de ratos através de técnicas *in vitro* para correlacioná-las com a especialização funcional do músculo. Os autores mediram o AP com um goniômetro sobre o tecido dissecado em ângulos de quadril e joelho de 90° e encontraram valores de $14,2 \pm 3,6^\circ$ para o GL. As diferenças para o presente estudo ($10,35 \pm 1,08^\circ$ e $13,08 \pm 1,21^\circ$ para o tornozelo a 90 e 150°, respectivamente) podem ser devidas: ao estado de *rigor mortis* que provoca uma contração lenta das fibras; à contração das fibras musculares e/ou redução do comprimento muscular devido ao processo de fixação; e à posição em que os músculos foram fixados. Eng *et al.* [108] retiraram e fixaram os músculos da perna com o tornozelo na posição neutra e em diferentes posições de quadril e joelho, e é reportado que o posicionamento das articulações modifica o AP [5, 75, 136].

Metodologias rígidas foram utilizadas no presente estudo para minimizar erros de medição, incluindo a dupla medição em todas as imagens, a execução das medições e o manuseio do equipamento de BMU realizados sempre pelo mesmo pesquisador para remover a variabilidade interavaliador. Não houve diferenças estatísticas entre medidas independentes realizadas na mesma imagem, entre diferentes imagens e nem entre dias diferentes de teste. O CV foi de 10,47 e 4,81% para o AP e a EM, respectivamente, com o tornozelo a 90°, e de 9,24 e 5,98% para o tornozelo a 150°, considerando conjuntamente imagens dos dois dias de teste. Estes resultados são similares aos relatados por Peixinho *et al.* [14], que utilizaram a BMU para a caracterização biomecânica do TS saudável e lesionado de ratos. Os autores usaram um grupo de animais para realizar uma análise da variabilidade das medidas e encontraram CVs de 9,27 e 3,97% para o AP e a EM, respectivamente, para o tornozelo em extensão completa e de 15,41 e 4,99% para o tornozelo em posição neutra. Os resultados e a metodologia aplicada são similares ao do presente estudo, com uma diferença pequena nos valores de CV do AP na posição neutra, o que pode ser explicado pelo fato de que os autores não utilizaram uma tala para imobilização da pata na posição desejada aumentando a variabilidade decorrente de ângulos articulares diferentes.

Um estudo recente relatando medidas de EM do tecido músculo-esquelético de ratos submetidos à deinervação obtidas de imagens de US calculou o CCI para diferentes avaliadores sem, contudo, analisar a reprodutibilidade em diferentes imagens ou dias de aquisição das mesmas. Além disso, os autores não garantiram a posição da perna, o que pode ter influenciado nos resultados já que as posições do tornozelo e do joelho não foram controladas. Mesmo assim, seus resultados mostraram excelentes valores de CCI (0,84 a 0,99) e os autores enfatizaram a importância do treinamento dos avaliadores para a obtenção de medidas confiáveis, o que pode ser corroborado pela experiência do presente estudo. Além do treinamento, sugere-se que o correto posicionamento do animal e do transdutor de ultrassom são fatores importantes para garantir a alta qualidade de aquisição das imagens ultrassônicas.

Estudos com humanos relatam CVs maiores, como o de Blazeovich *et al.* [121] que apresentou CVs de aproximadamente 15-20% e 20-40% para procedimentos de medição de AP e EM (respectivamente) do vasto lateral de humanos com US convencional. Ito *et al.* [103] relataram CV de 7% para o AP do tibial anterior de humanos. No entanto, um estudo de Legerlotz *et al.* [142] apresentou valores na faixa de 4,6 a 6% para o AP do GM de crianças de 4 a 10 anos de idade em duas posições articulares e com dois equipamentos de US.

É importante ressaltar que embora os resultados de CCI dos dois dias tenham sido baixos para a EM, os CCIs do mesmo dia foram altos ($>0,90$), ou seja, o erro da medição não deve ser atribuído unicamente ao procedimento de medição no software, mas ao posicionamento relativo entre a pata e o transdutor durante a aquisição das imagens, que pode ser diferente entre os dias de teste, aumentando as chances de erro. Este erro metodológico, inerente a testes em dias distintos, deve ser considerado em estudos com animais de pequeno porte, já que não é possível a preparação de um molde na primeira visita com marcações de pontos anatômicos que garantam a mesma posição do transdutor de ultrassom em testes posteriores. Esta é uma prática comum em estudos com humanos, mas impossível em estudos com animais devido ao tamanho da sonda de BMU comparada ao tamanho da perna do rato. Martins *et al.* [143] relataram a mesma tendência de valores menores de CCI na análise de dois dias de teste em um estudo de confiabilidade de medidas com US de arquitetura muscular do GM e do GL, corroborando com os resultados aqui apresentados.

Contudo, os valores de ETM e CV para o AP e EM dos dois dias são baixos (menos de 6% para EM e de 10% para AP) e devem ser considerados quando da avaliação de adaptações musculares induzidas por uso aumentado ou reduzido.

Estudos em humanos demonstram que parâmetros de arquitetura muscular e a posição articular possuem uma alta correlação. Maganaris *et al.* [5] demonstraram que uma variação do ângulo do tornozelo de 75 a 120° estava associada a uma de 6 a 12° do AP do GM em repouso e de 9 a 16° durante CVM, enquanto a EM não apresentou diferença significativa entre as posições do tornozelo. Narici *et al.* [141] reportaram um aumento de 15,8° para 27,7° para o AP de GM enquanto o tornozelo era mobilizado passivamente de 90 a 150°. Os autores concluíram que a arquitetura do GM é altamente afetada por mudanças na posição articular com os músculos em repouso. No presente trabalho, esta relação foi estudada e revelou um aumento do AP de $10,36 \pm 1,36$ para $12,43 \pm 1,32^\circ$ ($p < 0,05$) e da EM de $3,64 \pm 0,08$ para $3,84 \pm 0,12$ mm (sem diferença estatística) para o ângulo articular variando de 90 a 150°, respectivamente. Estes resultados são similares aos de outro estudo com BMU e músculo esquelético de ratos: aumento do AP de $9,69 \pm 1,49$ para $16,17 \pm 1,52^\circ$ ($p < 0,05$) e da EM de $2,79 \pm 0,14$ para $3,13 \pm 0,12$ mm ($p < 0,05$) para o tornozelo variando de $104,86 \pm 3,13$ a $151,8 \pm 2,60^\circ$ [14].

A confiabilidade das medidas de AP e EM com BMU foi alta para aquisição e medição repetidas com a metodologia proposta, como indicado por valores altos de CCI ($>0,90$) e baixos de ETM intra-dias. Este trabalho indica o potencial de utilização da BMU para caracterização qualitativa e quantitativa de músculo esquelético de pequenos animais, inclusive quando submetido a diferentes intervenções e treinamentos. Trabalhos adicionais devem ser feitos para averiguar a variabilidade interavaliador. Além disso, a validação do método através de comparações com medidas anatômicas diretas ou *phantoms* calibrados deve ser considerada.

7.1.2 - Discussão - Grupo de Imobilização Muscular na Posição Alongada

Ao avaliar tanto o AP quanto a EM do GI, foi possível observar a hipótese esperada de redução dessas medidas, com uma variação percentual de até 36 e 27%, respectivamente. Como é descrito na literatura, após a imobilização de uma articulação, ocorre a diminuição da massa muscular do membro imobilizado por desuso [34] enquanto em músculos hipertrofiados a EM e o AP aumentam [5, 147]. A força muscular é afetada pela redução da massa e da área do músculo, assim como o AP está

diretamente relacionado com a quantidade de tecido contrátil por unidade de área do músculo[34]. Valores reduzidos, como os demonstrados no presente estudo, refletem imediatamente na produção de força e nas propriedades da UMT.

Os valores de EM reduziram nas duas primeiras semanas após a retirada da imobilização, e na última semana, a EM assumiu valores próximos aos das condições iniciais (pré-imobilização), o que possivelmente indica recuperação da função muscular. Já o AP se comportou de modo diferente e não demonstrou recuperação ao estado anterior na mesma velocidade que a EM. Um estudo longitudinal de maior duração permitirá esclarecer se tal modificação é permanente ou se o retorno aos níveis iniciais para este parâmetro é mais lento. O GC controle não apresentou alterações para nenhum dos parâmetros confirmando a adaptação devido à imobilização.

Estas adaptações da arquitetura muscular estão de acordo com um possível aumento do CF, resposta esperada para um músculo mantido em posição alongada. O CF não pôde ser medido através das imagens de BMU devido à acentuada curvatura dos fascículos na região próxima à origem, limitação que pode ser superada pela criação de rotinas de análise de imagem específicas para este fim, e pela análise *in vitro* deste parâmetro.

Não foi possível encontrar outros trabalhos que realizaram protocolo similar com acompanhamento do comportamento dos parâmetros de arquitetura muscular *in vivo*. A maioria dos estudos com protocolo de imobilização opta pela análise do músculo imobilizado em posição encurtada, com a aplicação ou não de sessões de alongamentos concomitantes, realizando análises *in vitro* que não permitem o acompanhamento longitudinal após retirada a imobilização, diferente do presente estudo. Talvez a escolha por esse tipo de protocolo na posição encurtada seja motivada pelo fato de que alongar um músculo enquanto este encontra-se em período de imobilização minimiza a redução dos sarcômeros em série [39, 142]. O presente trabalho aponta alterações da arquitetura muscular, de modo a corroborar com o aumento do CF muscular e, possivelmente com o comprimento ou quantidade de sarcômeros.

Carvalho *et al.* [145] avaliaram, *in vitro*, o diâmetro do ventre muscular do gastrocnêmio de ratos utilizando um protocolo de imobilização com gesso, em posição encurtada, durante três semanas. Tanto o diâmetro do músculo quanto o peso da peça, quando comparados ao grupo controle, diminuiram ao término da pesquisa (de $32,82 \pm 1,64$ para $25,38 \pm 1,67$ mm e de $4,67 \pm 0,40$ para $3,69 \pm 0,41$ g, respectivamente).

Estes resultados sugerem uma concordância em relação à diminuição das medidas dos parâmetros reportados pelo presente trabalho, mesmo tendo sido realizada uma imobilização na posição alongada.

Fournier *et al.* [146] imobilizaram o SOL e o gastrocnêmio de ratos nas posições neutra, encurtada e alongada. O gastrocnêmio teve seu peso reduzido em 77, 54 e 53% nas posições encurtada, neutra e alongada, respectivamente, ou seja, houve redução da massa muscular independente do estilo da imobilização. Coutinho *et al.* [138] realizaram um protocolo de imobilização do SOL de ratos, mantendo a posição encurtada por 3 semanas. A área de secção transversa do SOL, quantificada *in vitro*, reduziu de 20,84 para 11,79 μm^2 .

Foi possível, portanto, confirmar a hipótese de que a imobilização, por diferentes períodos de tempo, promove a hipotrofia muscular variando de 15 a 70%, dependendo da espécie dos animais e da musculatura analisada. O comportamento de variáveis como o peso, volume e diâmetro de um determinado músculo, resultantes de um período de imobilização, estão diretamente relacionados ao comportamento dos parâmetros de arquitetura muscular, e o retorno ao estado “pré-imobilização” deve variar de acordo com o protocolo aplicado, e com o parâmetro analisado.

7.1.3 – Discussão - Grupo de Alongamento

Estudos prévios com animais empregando estímulos de alongamento de alta intensidade, como a imobilização em posição alongada por período prolongado, demonstraram alterações estruturais, como o aumento do CF e do número de sarcômeros em série [39, 98, 150].

Um protocolo de alongamento com características mais próximas às daqueles aplicados como intervenções para aumento de amplitude articular em humanos foi proposto neste trabalho de Tese e mostrou ser suficiente para alterar a arquitetura muscular de ratos. Isto foi evidenciado por uma redução de aproximadamente 25% dos valores de AP apenas 12 sessões após o início do treinamento. Esta redução percentual é bem superior ao coeficiente de variação de 8% encontrado no estudo para esta medida, o que indica uma variação real. Não há relatos na literatura do acompanhamento dos parâmetros estudados a um estímulo crônico de alongamento, no entanto, tal diminuição do AP confirma a hipótese inicial, dado que a resposta é coerente com a carga de deformação imposta ao músculo (somente tração). A alteração observada em tempo real quando um músculo é alongado é uma redução do ângulo de inserção das fibras na

aponeurose profunda à medida que o tendão traciona o mesmo, assim como uma contração isométrica voluntária máxima provoca o aumento do AP [4]. Diferentes autores demonstraram uma redução do AP do músculo gastrocnêmio durante manobras de alongamento e mobilização passiva do tornozelo [72, 75].

Os valores reduzidos deste parâmetro mantiveram-se pelo restante do período de treinamento sem mais reduções significativas, o que sugere um limite adaptativo deste parâmetro ou da velocidade de adaptação do mesmo ao treinamento de alongamento empregado, indicando que a tensão imposta provocou alterações estruturais coerentes e manteve estas adaptações (com uma tendência em continuar a redução), resultado normalmente almejado em treinamentos de alongamento. É esperado que a interrupção da intervenção promova um retorno aos valores anteriores, o que deve ser investigado em estudos sobre destreino, assim como sugere-se que um aumento do volume ou da intensidade do treinamento promovesse alterações de maior magnitude ou mais rápidas, o que poderia ser investigado em estudos comparando diferentes protocolos. Elsalanty *et al.* [148] encontraram uma redução do AP (37,2%) do músculo tibial caudal de bodes submetidos a um aumento do comprimento do membro durante 59-62 dias. Os autores relataram também um aumento considerável no comprimento do músculo, majoritariamente devido ao aumento do ventre muscular e não do tendão que não apresentou uma variação de comprimento significativa. Estes resultados demonstram um padrão consistente das medidas de comprimento do tendão do presente estudo e de outros autores [151, 152].

Alterações nas propriedades mecânicas do tendão tem sido normalmente consideradas menos importantes do que as mudanças musculares para a variação de comprimento do músculo adulto [151]. Por exemplo, foi mostrado que o tendão do músculo SOL de gatos e coelhos não muda seu comprimento se o músculo for imobilizado nas posições encurtada ou alongada [36, 152].

A impossibilidade de medição do CF nas imagens de BMU devida ao fato das fibras extrapolarem o campo de imagem, foi superada pela análise *ex vivo* de imagens de microscopia óptica convencionais dos músculos GL de ambas as pernas. Os resultados indicaram um aumento concomitante de 8,5% para o CF ($p=0,000006$) e de 5% para o comprimento do sarcômero ($p=0,041$), já que as fibras do GL apresentaram menos sarcômeros em $100\mu\text{m}$ para a pata alongada. Esta diferença entre a magnitude das variações do CF e do sarcômero pode ser explicada pelo fato de que a distribuição

de sarcômeros não é homogênea ao longo da fibra, podendo existir diferentes comprimentos na região média e nas extremidades [34, 156].

A aplicação de um modelo geométrico para estimar a EM, de acordo com a equação 5, confirma uma redução de aproximadamente 13% da EM da pata alongada em comparação à contralateral após as sessões de treinamento.

$$EM = CF \cdot \text{sen}(AP) \quad (5)$$

Este comportamento não foi observado para a EM obtida *in vivo* das imagens de BMU, o que resultou numa diferença não-significativa de apenas 0,5% entre as patas após o treinamento de alongamento. Esta discrepância pode ser justificada pelo fato de que o CF foi medido *ex vivo* enquanto o AP e a EM foram obtidos *in vivo*, já que o arranjo tridimensional das fibras e a curvatura dos fascículos, claramente observada nas imagens de BMU, não foram considerados nas medições *ex vivo* do CF que foram realizadas nas fibras retas.

Estudos *ex vivo* com animais [39, 124, 157, 158] e um estudo de caso com humanos descreveram fibras mais longas após intervenção de alongamento de alta intensidade devido ao aumento do número de sarcômeros em série, enquanto outros apontam o aumento do comprimento do sarcômero em vez da sarcomerogênese [95, 153].

Modelos animais utilizaram a técnica de distração osteogênica da tíbia para verificar mudanças nos músculos de ratos, coelhos e bodes [38, 85, 148]. Outros estudos clássicos utilizaram técnicas de imobilização muscular com gesso ou outros dispositivos para manter os músculos do compartimento anterior ou posterior da perna em posição alongada ou encurtada durante um período prolongado de tempo (dias ou semanas), encontrando que o alongamento crônico não afetou a relação entre tensão passiva e deslocamento angular. Este achado sugere que as fibras musculares dos flexores plantares tiveram o número de sarcômeros em série aumentado para manter a mesma relação comprimento-tensão, e este aumento foi evidenciado por alguns pesquisadores que realizaram análises adicionais para contagem dos sarcômeros, como técnicas *in vitro* e difração a laser [154, 155, 156, 157]. Em uma revisão destes estudos, Caiozzo *et al.* [85] propôs três mecanismos para adaptação das fibras musculares ao alongamento: aumento do comprimento do sarcômero, aumento do número de sarcômeros em série, ou ambos. De acordo com os autores, existe a possibilidade de que a neogênese

sarcomérica só ocorreria quando o comprimento do sarcômero excedesse um limiar durante a distração ou alongamento. Acima deste limiar, a adição de sarcômeros em série nas fibras começaria a ocorrer devido a eventos celulares ou moleculares, promovendo o retorno da estrutura ao comprimento ótimo. A sequência temporal destes eventos, o limite do comprimento do sarcômero a partir do qual a sarcomerogênese se iniciaria e a magnitude do estímulo de alongamento ainda são questões a serem investigadas.

Em relação a estudos envolvendo a imobilização muscular em posição alongada, Williams *et al.* [39] conduziram experimentos para testar a hipótese de que mudanças na densidade linear de sarcômeros resultavam em um ajuste do comprimento desta estrutura com o objetivo de conferir sobreposição ideal dos filamentos de actina e miosina e assim permitir que o músculo produza tensão máxima na posição imobilizada. Para um grupo de ratos adultos com músculos imobilizados na posição alongada durante 3 semanas, os autores detectaram que os sarcômeros eram inicialmente muito longos para desenvolver força máxima e uma adição de sarcômeros com redução simultânea de seu comprimento permitiu a produção de força máxima aproximadamente na posição alongada. Tabary *et al.* [36] apoiaram esta hipótese com resultados similares de aumento de 19% do número de sarcômeros do SOL de gatos imobilizados em posição alongada durante 4 semanas. Os autores sugerem que tal variação parece ser o caminho pelo qual o sarcômero se ajusta ao seu novo comprimento funcional. Em uma intervenção de alongamento de menor intensidade, Coutinho *et al.* [138] imobilizaram o músculo SOL de ratos em posição de alongamento máximo durante 40 minutos, uma vez por semana durante 3 semanas, demonstrando um aumento significativo do comprimento do músculo ($5 \pm 2\%$), do número de sarcômeros em série ($4 \pm 4\%$) e área de secção transversa das fibras ($16 \pm 44\%$) em comparação à perna contralateral.

Caiozzo *et al.* [85] tentaram esclarecer a sequência temporal da mudança no número e comprimento dos sarcômeros. Assim, os autores descreveram um experimento de distração da tíbia de ratos a diferentes taxas (0,25 e 0,55mm por dia) em que foi observada uma adição de aproximadamente 2700 sarcômeros em série no músculo SOL durante um intervalo de 4 semanas, indicando alta capacidade deste músculo para crescimento longitudinal. No entanto, os comprimentos médios dos sarcômeros dos dois grupos foram similares, sugerindo a presença de um sensor de comprimento com um limiar de aproximadamente $2,7 \mu\text{m}$ no SOL de ratos, já que o número de sarcômeros só variou em ambos os grupos quando este valor foi atingido. Schumacher *et al.* [158]

investigaram respostas musculares à distração da tíbia de coelhos e verificaram que a proliferação de células musculares ocorreu durante a intervenção e cessou quando o estímulo foi interrompido, sugerindo que o aumento do comprimento da perna teria que estar em progresso por um período de tempo ou atingir uma determinada magnitude para promover alterações celulares.

Elsalanty *et al.* [148] observaram um aumento significativo no comprimento do músculo tibial caudal de bodes submetido à distração osteogênica, com um aumento do CF (36,5%) devido ao alongamento dos sarcômeros existentes (36,7%) sem evidências de aumento da quantidade dos mesmos. Os autores assinalam que tais resultados discordam de estudos prévios que indicaram que tal técnica de alongamento estimulou o crescimento muscular [159, 160, 161] e induziu a adição de novos sarcômeros em série [92, 165–167] e que possíveis explicações para estas diferenças são o modelo animal utilizado (animais maiores comparados a ratos e coelhos) ou o fato de o músculo estudado não pertencer ao compartimento anterior da perna. Os autores descrevem que os músculos do grupamento posterior não apresentaram sarcomerogênese e o contrário para os do grupamento anterior. Kurihashi *et al.* [38] corroboraram com estes resultados demonstrando que os sarcômeros do GM de coelhos são mais alongáveis (aumentam mais seu comprimento) que os do tibial anterior durante o crescimento da tíbia induzido cirurgicamente.

Estas pesquisas que reportam o aumento do comprimento dos sarcômeros demonstram uma variação percentual similar dos comprimentos do sarcômero e da fibra muscular, o que difere dos resultados encontrados no presente estudo de Tese de aumentos de 8,5% e 5% para a fibra e o sarcômero, respectivamente. Este fato pode ser devido às diferentes técnicas de contagem de sarcômeros utilizadas (difração a laser versus *in vitro*) já que a contagem neste trabalho foi realizada na região média das fibras enquanto a difração a laser pode incluir sarcômeros de todo o comprimento da fibra.

Uma das limitações deste estudo foi a impossibilidade de medir a tensão aplicada ao pé no ângulo máximo de DF durante o protocolo de alongamento, para garantir uma intensidade controlada da intervenção. No entanto, o protocolo foi sempre realizado pelo mesmo avaliador e a amplitude limite de movimento do tornozelo com o joelho em extensão completa era facilmente detectável. Outra limitação foi a contagem de sarcômeros em uma região localizada específica das fibras, o que pode ter provocado a diferença nas variações de CF e do sarcômeros após o treinamento de flexibilidade.

Os resultados indicam um aumento do comprimento do sarcômero, coerente com o protocolo de alongamento empregado cuja intensidade é menor do que a de intervenções de distração óssea ou imobilização e similar a de protocolos de flexibilidade aplicados em humanos. Pesquisas futuras são necessárias para determinar se o aumento do comprimento do sarcômero significa uma adaptação final ou uma fase intermediária para a sarcomerogênese.

7.2 – DISCUSSÃO – HUMANOS

7.2.1 - *Discussão - Grupo de Variabilidade e Confiabilidade das Medidas*

Os valores obtidos no presente estudo encontram-se na faixa de pesquisas aplicadas que quantificam o AP e o CF, no entanto, estudos com metodologias similares [4, 5, 116, 170] não esclareceram informações como o ETM e o ICC, de grande valia na análise das medidas desses parâmetros e para análise da reprodutibilidade e confiabilidade da metodologia empregada.

As medidas de CF do GM e do GL não apresentaram diferenças significativas entre as imagens e nem entre os dias, sendo 1,67% o valor mínimo de CV (para o GM, entre as imagens) e o máximo 4,44% (para o GL, entre os dias). As médias de AP encontram-se na faixa de estudos aplicados, embora apresentem valores de CV maiores, chegando a 11,62 e 10,69% (inter-dias) para o GM e o GL, respectivamente [4, 5, 64, 72, 110, 116, 117, 170, 171]. Consequentemente, estes foram os resultados de menor ICC (GM=0,67, GL=0,83) e maior ETM (GM=3,1, GL=3,7) o que se justifica possivelmente pela dificuldade de realização da medição de AP utilizando software de imagens, pois para tal é necessária a marcação de três pontos na imagem podendo resultar em um não alinhamento adequado das retas em relação à aponeurose ou à fibra escolhida. Além disso, a escolha da fibra é subjetiva, permitindo escolher em cada imagem uma fibra de melhor visualização. No caso de existirem diferenças entre regiões distintas do músculo, tal escolha pode acrescentar mais erro à medida. É importante frisar ainda que, embora o resultado inferior do ICC tenha sido encontrado nas medidas inter-dias do AP, o ICC do AP para as medidas do mesmo dia foi elevado, ou seja, o erro quantificado não deve ser atribuído unicamente ao procedimento de medição no software, mas à marcação realizada na perna para aquisição das imagens que pode ter sido diferente entre os dias, aumentando as possibilidades de erro.

Considera-se esta uma falha metodológica que pode ser reduzida pela elaboração de um molde (em papel) na primeira visita que garanta a posição do transdutor e a aquisição da imagem no mesmo local. Todos os estudos feitos posteriormente pelo grupo já incluíram a utilização do molde sugerido.

Um estudo que também utilizou o CV e o ICC para analisar a variabilidade das medidas de arquitetura muscular obtidas através de ultrassonografia é o de Legerlotz *et al.* [168]. Os autores, com um protocolo similar ao do presente estudo, avaliaram a confiabilidade das medidas de CF e AP do GM de crianças entre 4-10 anos adquirindo imagens em duas posições articulares (90° e flexão plantar máxima) e com dois aparelhos de US. Considerando que a amostra era composta por crianças, o estudo apresentou valores de média de AP absolutos menores que os demais citados acima (16,00±2,40°). Para imagens duplicadas realizadas na mesma sessão, perna e aparelho, os autores encontraram CV e ICC variando, respectivamente, de 4,6 a 6% e 0,85 a 0,94 para o AP e de 4,9 a 6,0% e 0,88 a 0,96 para o CF. Esses valores são maiores do que os do presente estudo, provavelmente pela utilização de uma amostra composta por crianças em diferentes fases de desenvolvimento, o que altera os parâmetros de arquitetura muscular (EM, CF e AP). Os autores concluem que o US pode ser um método confiável para determinar a arquitetura muscular do gastrocnêmio em crianças saudáveis, sugerindo que a variabilidade atribuível à metodologia é aceitável dada a grande variação biológica que pode ser esperada devido a amostra [168].

Magararis *et al.* [5] testaram a reprodutibilidade de medidas de CF e do AP do tríceps sural e encontraram para o CF resultados de CV similares aos do presente estudo (4 e 3,8% para o GM e GL, respectivamente), enquanto para o AP os autores apresentaram valores maiores (8,5% para o GM e 17,2% para GL). Ito *et al.* [103] encontraram para medições repetidas na mesma imagem de US do AP do tibial anterior um CV de 7%. Martin *et al.* [166] compararam medidas similares em cadáveres e *in vivo* encontrando valores de CV muito maiores do que os encontrados no presente trabalho (19,72% (GM) e 17,7%(GL) para CF e 25% (GM) e 28% (GL) para o AP). No entanto, os autores utilizaram régua e transferidor para medição de CF e AP nas imagens de US impressas, método que se mostrou menos confiável do que o software de processamento de imagens. Tal fato é ratificado por estudo de Kubo *et al.* [169] que relataram CV entre 7,2 e 11,8%, para o CF do GM cujo método utilizado nas medições consistiu na utilização de um curvímeter para medir o CF e um transferidor para quantificar o AP. Em pesquisa de Kawakami *et al.* [4] são reportados valores médios

similares de AP do GM com ICC de 0,98, entretanto com percentuais mais altos de CV (14,28%), provavelmente pela grande heterogeneidade da amostra em relação a idade e gênero (homens e mulheres de 3 a 94 anos. Além disso, existem diferenças inerentes à condição de ativação da musculatura estudada (repouso e contração submáxima e máxima) como pode ser visto nos estudos de Martin *et al.*[4] Kawakami *et al* [110], Ito *et al.* [171], entre outros. Alguns desses autores poderiam argumentar o aumento de dificuldade do processo de medição em músculos contraídos devido à perda parcial de contato do transdutor com a pele, portanto foi enfatizada a comparação com estudos que utilizaram o mesmo protocolo (tríceps sural relaxado).

É importante destacar que, o transdutor linear de 80 mm utilizado para a realização das medidas permitiu, na maioria dos casos, o alcance de toda a extensão do CF, não havendo necessidade de extrapolações, garantindo assim maior precisão ao método.

Não foi possível encontrar resultados referentes ao ETM de medidas de CF e AP do gastrocnêmio derivados de estudos que utilizaram métodos semelhantes aos aqui apresentados. As medidas de CF de GM e GL apresentaram ETM de 2,17 e 2,25mm, enquanto a medida de AP de GM e GL gerou um ETM de 3,1 e 3,7°, respectivamente, o que indica cautela na utilização para fins de monitoramento de modificações musculares principalmente quando são esperadas pequenas alterações.

Estudos que avaliam a plasticidade da arquitetura muscular sob condições diferenciadas de treinamento ou destreino demonstram que as diferenças encontradas entre as condições superam os erros referentes ao método de quantificação encontrados no presente estudo. As menores diferenças encontradas para os músculos vasto lateral e reto femoral entre as médias dos parâmetros medidos antes e após 5 semanas de três regimes diferentes de treinamento de força foram 3,1° (45,58%) para o AP e 3,74 cm (22%) para CF [110]. Seynnes *et al.* [52] relataram aumentos relativos de $7,7 \pm 1,3\%$ do AP do quadríceps femoral 3 semanas após o início de um programa de treinamento. Com relação ao mesmo grupamento muscular, Kawakami *et al.* [170] relataram aumentos percentuais médios de $29,1 \pm 9,4\%$ para AP para o músculo tríceps braquial de seis indivíduos submetidos a treinamento de força durante 16 semanas. As diferenças percentuais apresentadas por todos esses estudos superam os maiores coeficientes de variação reportados tanto para o CF (4,44%) quanto para o AP (11,62%) no presente estudo, com exceção do trabalho de Seynnes *et al.* [52] em que as adaptações relatadas estariam na faixa de variabilidade das medições do presente estudo, embora o período

de treinamento tenha sido relativamente curto em relação aos outros trabalhos. Ou seja, as adaptações dos parâmetros da arquitetura muscular nas pesquisas citadas não poderiam ser justificadas por erros de medição ou inerentes ao protocolo de aquisição das imagens, no entanto esses erros devem ser considerados nas análises, especialmente no que se refere à sua significância prática e clínica.

É importante ressaltar que as técnicas de aquisição de imagens e de quantificação dos parâmetros utilizadas variam entre os estudos, e a maioria deles não relata um estudo de confiabilidade das medidas, dificultando a comparação de resultados e indicando a necessidade de adoção de uma metodologia reprodutível comum às pesquisas aplicadas.

7.2.2 – Discussão – Grupo de Treinamento de Alongamento

Os resultados demonstram que o programa de alongamento empregado foi capaz de provocar aumento da amplitude articular, como demonstrado previamente em diversos estudos [43, 107, 120, 125]. Por outro lado, o torque passivo máximo não apresentou um padrão consistente de mudança para todos os indivíduos. Foram detectadas mudanças estruturais, como o aumento do comprimento de fibra máximo e redução do AP mínimo no ângulo máximo de DF. Finalmente, foram evidenciadas respostas diferentes nas contribuições do músculo e do tendão para a variação de comprimento da UMT durante mobilização passiva do tornozelo.

É frequentemente sugerido na literatura que o aumento do torque passivo alcançado nos limites do movimento durante o alongamento passivo está correlacionado com a sensação de desconforto e dor, se constituindo um fator limitante para máximas amplitudes articulares [16,40]. Tal aumento pode ser o resultado tanto de fatores neurais quanto mecânicos [20, 35, 68], sendo por isto uma variável muito investigada em estudos envolvendo intervenções de alongamento.

Diversos autores [48, 91, 104] revelaram aumento do torque passivo com a mudança de comprimento muscular dos flexores plantares durante a DF do tornozelo. Este aumento é explicado por um número maior de elementos elásticos tensionados durante a deformação. Para um alongamento suave, poucos elementos contribuem para a rigidez enquanto a maior parte se encontra frouxa, já para uma maior amplitude de movimento, mais elementos contribuem para gerar tensão [48]. Assim, de acordo com Folpp *et al.* [48] um aumento de amplitude decorrente de um programa de alongamento acarretaria um maior pico de torque passivo, o que não foi observado no presente

estudo. Alguns estudos demonstraram que durações totais de alongamento de 9000s não observaram este aumento a partir da análise da curva torque-ângulo [23], sugerindo que a magnitude das variações de tensão passiva pode ser secundária a uma combinação de fatores, e não somente a amplitude articular. Chan *et al.* [123] relataram aumentos simultâneos de amplitude e resistência passiva máximas depois de 4 semanas de um programa de alongamento dos isquiotibiais, enquanto uma duração de 8 semanas do mesmo treinamento não provocou aumento correspondente dos valores de torque passivo máximo. Os autores sugerem que as mudanças de torque passivo estão relacionadas ao período de tempo em que a força passiva é aplicada e, portanto 4 semanas de intervenção pode ter sido insuficiente para uma adaptação dos tecidos muscular e conjuntivo. O termo extensibilidade é utilizado por Chan *et al.* [123] para descrever a capacidade máxima de deformação dos isquiotibiais e o aumento desta capacidade foi verificado após quatro e oito semanas de alongamento. Entretanto, não foi possível determinar a contribuição relativa de mudanças mecânicas/fisiológicas do músculo ou de aumento na tolerância ao alongamento para o aumento da extensibilidade dos isquiotibiais. Com relação aos flexores plantares, Gajdosik *et al.* [50] relataram o aumento do ângulo máximo de DF e do torque passivo máximo após 6 semanas de treinamento de alongamento, realizado 3 vezes por semana. Uma duração e frequência inferiores a do presente estudo, uma amostra composta somente de mulheres e o não acompanhamento presencial do treinamento são fatores que podem explicar o aumento da resistência passiva, indicativo da ausência de adaptação estrutural. Guissard *et al.* [35] analisaram propriedades mecânicas da UMT em diferentes intervalos após o início de um programa de treinamento de alongamento de alto volume (600 segundos por sessão) com 5 sessões semanais durante 6 semanas. Os autores encontraram aumentos significativos do ângulo de DF máxima a cada 10 sessões de alongamento, com um percentual mais alto para as 10 primeiras. No entanto, o torque passivo máximo só apresentou um pequeno aumento significativo após as 10 primeiras sessões, retornando aos valores pré-treinamento com a sequência do programa. Estes autores concluem que o aumento da tolerância ao alongamento, indicado por valores maiores de torque máximo, é um efeito transiente e que mudanças plásticas dos elementos elásticos em paralelo devem ter ocorrido com a progressão do treinamento.

De acordo com os resultados da presente Tese, um treinamento com 10 semanas de duração não demonstrou aumento significativo, em média, dos torques passivos máximo e na posição neutra de tornozelo (0°), apesar de um padrão individual variado.

Tais resultados corroboram com os achados de Chan *et al.* [123] e Guissard *et al.* [35] para treinamentos de longa duração, capazes de permitir uma adaptação estrutural responsável pela manutenção de valores de torque passivo máximo similares às condições pré-treinamento mesmo com o aumento de amplitude articular.

Alguns autores [48, 175] questionam a extensibilidade real adquirida com um programa de alongamento, quando esta é verificada somente pelo aumento da amplitude de movimento e torque máximo correspondente, e sugerem a análise do ângulo articular para um torque padronizado. Folpp *et al.* [48] relataram que um treinamento de alongamento de 4 semanas aumentou a extensibilidade aparente dos isquiotibiais, ou seja, a tolerância ao alongamento determinada pela flexão de quadril para um torque não padronizado, evidenciando o aumento da ADM e do torque passivo máximo. Por outro lado, não foi verificado o aumento da extensibilidade real dos isquiotibiais, pois não houve aumento da flexão de quadril para um torque padrão.

Aplicando este conceito nos resultados do presente estudo, não seria possível indicar uma extensibilidade real dos flexores plantares uma vez que para o mesmo torque apresentado no ângulo máximo do pré-teste, o ângulo do pós-teste correspondente não foi diferente. No entanto, em contraste aos dados de Folpp *et al.* [48], também não foi detectado um aumento de torque passivo máximo concomitante ao aumento do ângulo máximo de movimento, o que contraria a teoria de uma tolerância aumentada e reforça a sugestão de uma adaptação estrutural, confirmada pelo aumento do CF máximo encontrado nesta tese.

Há poucos estudos relacionados a programas de alongamento que realizem uma abordagem sobre as adaptações na arquitetura muscular, por exemplo, o CF e o AP [72, 75, 176] e a maioria deles analisa somente os efeitos agudos de manobras de alongamento nas propriedades musculares sem progredir para a investigação de mudanças plásticas crônicas da UMT submetida a um treinamento de longo prazo.

Abellana *et al.* [66] observaram, através de imagens de US durante uma mobilização passiva do tornozelo até a DF máxima, um aumento significativo do CF (de $57,6 \pm 8,9$ mm para $80,5 \pm 10,1$ mm) com redução simultânea significativa do AP ($21,2 \pm 4,3^\circ$ para $14,5^\circ \pm 3,0^\circ$) do GM, ratificando resultados anteriores de Morse *et al.* [63]. Em se tratando de efeitos agudos de 5 séries de alongamento passivo estático, Morse *et al.* [63] demonstraram o aumento de amplitude articular sem alterações correspondentes do CF e do AP. A complacência muscular aumentada (analisada pelo deslocamento do JMT), foi justificada por alterações nas propriedades do tecido conjuntivo intramuscular

– endomísio, perimísio e epimísio - e não devido à mudanças estruturais no CF, já que não houve aumento agudo da deformação deste parâmetro após o alongamento. Resultados similares foram apresentados por Nakamura *et al.* [72] e por Samukawa *et al.* [172] (para alongamentos dinâmicos) com aumento significativo do CF e redução significativa do AP durante a manobra de alongamento que ocorreram somente em resposta ao *stress* mecânico imposto durante a mobilização. Uma vez cessada a tensão, não eram observadas alterações no nível estrutural das variáveis de arquitetura muscular em intervalos curtos após o alongamento agudo.

No presente estudo, o mesmo comportamento de aumento significativo do CF e redução significativa do AP durante a dorsiflexão do tornozelo foi observado nos testes antes e depois do programa de alongamento (pré: de $4,48 \pm 0,72$ a $7,24 \pm 0,86$ cm e $26,73 \pm 4,35$ a $16,53 \pm 1,59^\circ$; pós: $4,56 \pm 0,77$ a $7,65 \pm 1,65$ cm e $25,79 \pm 3,58$ a $15,68 \pm 2,48^\circ$). Os estudos citados indicam não haver adaptação do CF e do AP como efeito agudo do alongamento, mas 10 semanas de alongamento provocaram como efeito crônico um aumento significativo do CF máximo e uma redução significativa do AP mínimo, sugerindo que o tempo prolongado de aplicação do estímulo foi suficiente para desencadear respostas adaptativas de remodelação tecidual. O único estudo encontrado que avaliou o CF após um período maior de programa de alongamento (Nakamura *et al.* [51] demonstrou a manutenção dos valores deste parâmetro após 4 semanas de alongamento estático dos flexores plantares. Os resultados divergentes podem ser explicados pelo fato de Nakamura *et al.* [51] terem utilizado uma metodologia diferente, estimando o CF a partir de valores de espessura muscular e AP ($EM = CF \cdot \text{sen.}(AP)$) nos ângulos de 0 a 30° e não terem investigado a variação do CF máximo atingido com o ganho de amplitude. Além disso, o treinamento teve uma menor duração (4 semanas), que pode não ter sido suficiente para desencadear processos morfológicos para remodelação tecidual e aumento crônico do CF.

Alterações permanentes no CF foram descritas por modelos animais com intervenções de alongamento de longo prazo, como imobilização em posição alongada por dias ou semanas ou técnicas de distração óssea, que demonstraram o aumento do número de sarcômeros em série e no comprimento total da fibra [38, 39, 153, 159]. Além disso, Williams *et al.* [37] demonstraram que o alongamento moderado sustentado durante 30 minutos por dia foi suficiente para reduzir ou reverter o encurtamento das fibras relacionado à imobilização na posição encurtada de músculos de ratos. Somente um estudo de caso em humanos analisou *in vivo* o comprimento do sarcômero dos

fascículos musculares do vasto lateral de uma jovem submetida à cirurgia corretiva para assimetria de membros [34]. A análise foi realizada 3 meses antes e 1 ano depois da cirurgia e os resultados indicaram um aumento de 100% do CF. Estas evidências indicam adaptações estruturais ao alongamento, embora tenham utilizado protocolos de intensidade muito alta. O experimento com alongamento em ratos reportado nesta Tese utilizou um protocolo de alongamento passivo estático menos intenso e mais próximo ao prescrito para humanos, tendo apresentado o aumento significativo do CF, concomitante ao aumento do comprimento dos sarcômeros. A teoria de que o sarcômero deve alcançar um comprimento limite para a indução da sarcomerogênese, explicada com detalhes na seção 7.1.3 desta Tese [156] poderia explicar as diferenças entre os estudos. O resultado desta Tese também com humanos detectou o aumento significativo do CF máximo, assim como a redução do AP mínimo, após o treinamento de flexibilidade, ratificando os resultados encontrados para os animais e reforçando a teoria de remodelação tecidual como adaptação ao estímulo crônico de alongamento com intensidade mais baixa.

Apesar de um aumento médio do CF pós-alongamento para os testes com humanos, a amplitude das respostas do aumento relativo desta variável entre os indivíduos foi alta (-1,00 a 12,98%) e a correlação com o ângulo articular não foi significativa ($p=0,49$). Estes dados sugerem a contribuição diferenciada de outros fatores para o aumento de amplitude de movimento associado ao treinamento. Para investigação desta hipótese, o comportamento da deformação do músculo e do tendão durante mobilização articular passiva foi avaliado através da análise do deslocamento da JMT, o que permitiu a verificação da contribuição percentual individual destas estruturas para a variação de comprimento total da UMT durante o alongamento máximo antes e depois das 10 semanas de treinamento para os dois grupos (Tabela 6.12).

Diversos autores [72, 81, 82, 177] utilizaram a metodologia repetida na presente Tese, como descrito na Figura 5.12. Com esta metodologia, foi possível relatar a contribuição relativa das porções muscular e tendínea para a deformação total da UMT durante uma manobra de alongamento [72, 75, 80, 82] ou logo após uma sessão de estímulos repetidos. Os resultados encontrados são inconclusivos e os mais discrepantes dos demais são relatados por Abellaneda *et al.* [66] e por Herbert *et al.* [71], que descreveram a predominância dos fascículos e a do tendão, respectivamente. Herbert *et al.* [71] subtraíram a variação do CF da variação total da UMT para estimar a

deformação do tendão, e encontraram uma contribuição dos fascículos de somente 27% para a deformação da UMT do GM durante a DF passiva. Por outro lado, Abellaneda *et al.* [66] utilizaram a projeção do CF como o parâmetro para estimar a deformação do músculo, relatando valores inversos de deformação relativa (28% para o tendão e 72% para os fascículos). Apesar de características distintas das amostras estudadas pelos autores (menor torque passivo para a de Abellaneda *et al.*[66]), a metodologia utilizada para estimativa da deformação das estruturas parece ser o fator de maior influência nos resultados. Morse *et al.* [63] e Mizuno *et al.* [73] relataram contribuições similares dos fascículos e tendão para a deformação total da UMT, utilizando o deslocamento da JMT para estimativa da deformação do músculo e do tendão, assim como na presente Tese. Morse *et al.* [63] encontraram que a variação do comprimento da UMT foi dividida de forma aproximadamente igual entre o músculo (47%) e o tendão (53%) antes de uma série de 5 manobras de alongamento estático de um minuto de duração. Estes resultados são similares aos apresentados aqui e por outros estudos que apresentaram uma faixa de 43-46% para contribuição do GM na DF passiva [4, 178]. Cabe ressaltar que a observação qualitativa de que o tendão é responsável por uma parcela significativa da deformação total da UMT foi feita por todos os estudos.

Morse *et al.* [63] descreveram ainda que, após as 5 manobras de alongamento estático de um minuto de duração, o aumento da deformação da UMT foi conseguido por um aumento na variação do comprimento do músculo, enquanto a variação do comprimento do tendão se manteve igual, passando cada uma a representar 55 e 45% da variação total da UMT, respectivamente. Estes autores concluíram que logo após alongamentos repetidos, um menor torque passivo máximo foi alcançado durante a movimentação do tornozelo, possivelmente devido a uma maior complacência do músculo e não do tendão. Tais resultados e hipóteses são corroborados por estudos de Mizuno *et al.* [73] e Nakamura *et al.*[72]. Mizuno *et al.* [73]. utilizaram o mesmo protocolo de Morse *et al.* [63] de 5 manobras de alongamento estático com 1 minuto de duração, avaliando seus efeitos após 0, 15, 30, 60 e 90 minutos. Eles concluíram adicionalmente que os efeitos viscoelásticos de complacência muscular aumentada observados se mantêm por menos tempo do que o aumento da amplitude máxima conseguido com as manobras de alongamento. Já Nakamura *et al.* [72], após seguirem também o mesmo protocolo de alongamento estático, calcularam a contribuição de outros fatores diferentes dos fascículos musculares a partir da subtração da variação do CF do valor de deslocamento da JMT, concluindo que o aumento da extensibilidade da

UMT pode ter relação com maior movimento da aponeurose na qual se fixam as fibras musculares e do tecido conjuntivo (perimísio, epimísio e endomísio).

Em relação a um período mais longo de treinamento, um único estudo foi localizado que analisou as variáveis de deslocamento da JMT. Nakamura *et al.* [51] relataram um aumento significativo da ADM e do deslocamento da JMT (de 0 a 30° de DF), uma redução significativa do torque passivo a 30° de DF e nenhuma alteração no CF (como já citado anteriormente) após 4 semanas. No presente estudo, poucos indivíduos foram capazes de atingir a amplitude de 30° de DF, não sendo possível a mesma análise do torque e do deslocamento da JMT. Ainda assim, a análise do torque passivo no ângulo máximo não apresentou diferença significativa após o treinamento. A análise dos resultados (da presente Tese) de deslocamento da JMT de 0° a 20° de DF (amplitude atingida por 10 indivíduos do GA) não apresentou diferença significativa após o treinamento (pré: $9,75 \pm 2,79\text{mm}$; pós: $9,16 \pm 1,50\text{mm}$, $p=0,41$). O mesmo pôde ser observado para o deslocamento da JMT de 0° ao ângulo máximo de DF (pré: $11,34 \pm 4,05\text{mm}$; pós: $12,55 \pm 3,59\text{mm}$). Estas diferenças, analisadas conjuntamente com o aumento do CF sugerem que no presente estudo houve uma remodelação tecidual provavelmente devido ao maior tempo de duração do programa de alongamento em comparação ao de Nakamura *et al.* [51] (10 semanas versus 4 semanas).

A alta variabilidade de muitos parâmetros medidos e estimados na presente pesquisa, como o torque passivo máximo, o ganho de amplitude articular e o aumento do CF, direcionou para uma análise da dependência e correlação dos parâmetros que pudesse explicar o comportamento diferenciado dos tecidos entre indivíduos. A análise do comportamento dos tecidos através de valores médios para toda a amostra pode ocultar adaptações diferenciadas entre grupos com características distintas de flexibilidade articular. Por isto, a tendência em analisar grupos de indivíduos flexíveis e rígidos, seja por valores de torque máximo ou de amplitude máxima, vem se delineando como uma premissa inovadora e necessária para investigar os efeitos de um programa de alongamento. Tal abordagem foi inicialmente proposta por Abellaneda *et al.* [66] e mais recentemente por Blazeovich *et al.* [64] para descrever o comportamento diferenciado dos tecidos de indivíduos flexíveis e rígidos, porém sem envolver questões sobre as possibilidades adaptativas crônicas de indivíduos com características diferentes de mobilidade articular, o que evidencia a originalidade da contribuição desta Tese.

Uma grande variabilidade interindividual nos valores de torque passivo máximo (pré-teste 18,44 a 54,36 Nm; pós-teste: 22,27 a 54,35 Nm) foi encontrada, assim como

em estudos de Kawakami *et al.* [173], Abellaneda *et al.* [66] e Blazevich *et al.* [64]. Quando valores individuais de rigidez e torque passivo máximo para 30° de DF foram analisados, Abellaneda *et al.* [66] encontraram uma distribuição bimodal dos indivíduos com uma separação clara em torno de 30Nm. Também foi relatada uma maior deformação dos fascículos em relação ao tendão, particularmente nos ângulos limites de alongamento, para indivíduos menos rígidos, ou seja, aqueles que apresentavam uma menor resistência ao alongamento. Como não foram encontradas diferenças no início ou na magnitude da atividade eletromiográfica do GM durante a mobilização passiva, os autores sugerem um possível mecanismo de dominância do tendão na influência sobre a flexibilidade articular. A capacidade inferior de deformação do tendão pode definir indivíduos que possuem uma maior resistência ao alongamento, pelo menos para os flexores plantares.

Corroborando estes conceitos, Kawakami *et al.* [173] relataram correlações positivas altas entre o torque passivo de flexão plantar e o índice de rigidez passiva do tendão, obtido a partir da inclinação da curva torque x variação do comprimento do tendão (=variação do comprimento da UMT – deslocamento da JMT). Kawakami *et al.* [173] sugerem que o tendão é o principal determinante da flexibilidade articular, e sua capacidade de deformação pode ser um fator gerador das diferenças interindividuais na mobilidade articular.

Possíveis explicações fisiológicas e mecânicas para este fato incluem a morfologia do tecido tendíneo, rico em fibras de colágeno, e seu comportamento durante o movimento. O desaparecimento da ondulação das fibras de colágeno, após a região da curva torque-ângulo denominada como *toe region*, e seu alongamento subsequente, caracterizando a fase linear de deformação, estão relacionados com um aumento exponencial do torque passivo na DF. Kawakami *et al.* [173] explicam que um tendão mais complacente resultaria em menor deformação correspondente do componente muscular para um mesmo comprimento da UMT e, conseqüentemente, em um menor torque passivo. Assim como tendões mais rígidos acarretariam um maior alongamento dos fascículos musculares para a mesma posição articular, e conseqüentemente, maior torque passivo, sensação de alongamento e de dor que limitaria deslocamentos articulares adicionais. Embora a rigidez do músculo possa contribuir para geração de torque passivo, é possível que o ventre muscular se alongue até certo nível inicial determinado pelo alongamento do tendão calcâneo distal, que então passa a governar os valores de torque.

Blazevich *et al.* [64] questionaram a utilização do torque máximo como o critério correto para separação de indivíduos, e, em vez disso, adotaram a amplitude articular máxima para caracterizar indivíduos como flexíveis e rígidos (separação em 46° de DF) e analisar a influência de outros fatores mecânicos (músculo e tendão) e neurais na ADM máxima. Estes autores indicaram a necessidade de determinar a importância relativa destes fatores para elucidar a condição rígido/flexível, entre indivíduos. Um passo neste sentido foi dado no presente experimento, cujos resultados apresentam uma correlação significativa entre a variação total do comprimento do tendão e o ângulo máximo de DF prévio ao programa de alongamento ($p=0,005$). Estes dados ratificam a proposta de Abellaneda *et al.* [66] e Kawakami *et al.* [173] de que a capacidade de deformação do tendão está diretamente relacionada com a flexibilidade articular. Ainda reforçando esta proposta e nossos achados, é possível citar um estudo de Kato *et al.* [175] que analisaram os fatores relacionados a extensibilidade da UMT do GM que influenciam a diferença de amplitude máxima articular do tornozelo comumente observada entre gêneros. Estes autores utilizaram a mesma metodologia desta Tese e relataram que maiores amplitudes articulares detectadas para o gênero feminino estavam relacionadas a um maior alongamento do tendão, ou seja, que um maior ADM máxima, característica de pessoas flexíveis, estava acompanhado de maior capacidade de deformação do tendão.

Blazevich *et al.*[64] relataram uma correlação linear positiva entre o torque máximo e o ângulo máximo de DF, encontrando um maior pico de torque passivo para indivíduos flexíveis, além de valores menores de torque para um mesmo ângulo, corroborando com resultados de Abellaneda *et al.* [66]. No entanto, resultados divergentes são relatados em relação à variação de comprimento dos tecidos associada com as características individuais de flexibilidade, pois Blazevich *et al.* [64] encontraram que indivíduos flexíveis e rígidos apresentaram comportamentos similares de mudança de comprimento de músculo e tendão apesar de maiores comprimentos finais da UMT para indivíduos flexíveis. Tais diferenças podem ser explicadas pelo gênero dos participantes, genética, histórico de exercícios (que pode influenciar as propriedades do tecido conjuntivo intramuscular), padrão de atividades pré-teste e metodologia empregada. Apesar de semelhanças metodológicas com a pesquisa de Blazevich *et al.*[64], os resultados da presente Tese em relação às características de flexibilidade dos indivíduos corroboraram os apresentados por Abellaneda *et al.* [66].

Por outro lado, Blazeovich *et al.* [64] relataram que na parte final da manobra de alongamento, indivíduos flexíveis exibiram uma deformação do tendão significativamente maior do que indivíduos rígidos e, portanto, aumentos no comprimento da UMT no limite da amplitude máxima foram possíveis pela extensão do tendão e não do músculo. Eles concluem que esta capacidade do tendão se alongar mais durante extremos de dorsiflexão pode ser considerada um fator que separa indivíduos flexíveis e rígidos. Apesar deste comportamento somente no final do movimento, estes resultados apresentam coerência com a correlação do presente estudo que evidenciou que uma maior magnitude de variação do comprimento do tendão está associada com um maior ângulo máximo de DF. Isto pode significar que a partir de um determinado ângulo em que o músculo atinge seu potencial de variação de comprimento máximo, o tendão assume a deformação adicional da UMT.

Por fim, como contribuição original, nosso estudo investigou características individuais de adaptação dos tecidos a um programa de alongamento de longo prazo através da análise de correlação entre os parâmetros. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo similar. Primeiramente, foi verificada uma correlação significativa entre o percentual de ganho de amplitude com o treinamento e o ângulo máximo de dorsiflexão inicial, revelando que indivíduos mais rígidos apresentam um ganho maior de amplitude articular do que indivíduos flexíveis.

Além disso, outro dado inovador apresentado foi que a variação da contribuição percentual da deformação do músculo para a deformação máxima da UMT apresentou correlação significativa com a amplitude máxima de movimento inicial, de forma que indivíduos com maior ângulo inicial de dorsiflexão apresentaram um aumento na contribuição do músculo para a deformação total. A relação inversa foi observada para a variação da contribuição do tendão para a deformação total da UMT, indicando que indivíduos com menor amplitude inicial mostraram um aumento proporcional maior na contribuição do tendão. Estes resultados foram reforçados pela correlação significativa entre o aumento percentual do ângulo máximo de DF obtido com o treinamento e a variação das contribuições relativas do músculo e do tendão antes e depois das 10 semanas de alongamento. Tal correlação indicou que a amplitude articular aumentou de forma associada com o aumento da contribuição do tendão e com a redução da contribuição do músculo.

Estes dados indicam respostas diferentes de adaptação de acordo com o grau inicial de flexibilidade articular dos indivíduos: ganhos adicionais de amplitude articular

para indivíduos flexíveis são menores e ocorrem prioritariamente por uma variação na contribuição do músculo e, para indivíduos rígidos, por uma variação na contribuição do tendão. É possível sugerir que para um mesmo comprimento da UMT, tendões mais complacentes permitiriam uma menor deformação muscular e, por conseguinte, indivíduos mais flexíveis alcançariam uma maior amplitude máxima em que o tendão estaria próximo ao seu limite adaptativo de deformação, passando a exigir adaptações do músculo para ganhos adicionais de amplitude. Tendões mais rígidos e, teoricamente com maior potencial de adaptação, responderiam primeiro ao estímulo para o ganho de amplitude já que a deformação muscular está associada à sensação de desconforto, tornando-se mais complacentes antes de demandar uma resposta adicional dos fascículos e estruturas intramusculares. Ou seja, é possível que o ventre muscular se alongue até certo nível determinado pelo alongamento do tendão e que, para indivíduos flexíveis nos quais o alongamento do tendão é próximo ao máximo, o ventre muscular seja exigido para aumento da deformação da UMT e, para indivíduos rígidos, a capacidade de alongamento do tendão passa por adaptações antes de transferir a sobrecarga para o músculo.

De acordo com a literatura, o aumento da ADM em longo prazo poderia ocorrer por uma maior tolerância a cargas de alongamento ou por uma maior capacidade de deformação do músculo e/ou do tendão. Com relação ao músculo, existem teorias de que a maior extensibilidade poderia advir de uma resposta reflexa muscular contrátil reduzida durante o alongamento ou de uma menor resistência de estiramento ou rotação dos fascículos musculares (ou seja, menor adesão interfascicular ou maior complacência dos componentes elásticos em paralelo). Possíveis fatores relacionados ao tecido muscular que poderiam explicar as diferenças individuais de flexibilidade são: tecidos conjuntivos intramusculares [69, 108], estruturas passivas como os filamentos de titina [47, 108], ou número de sarcômeros em série [152].

Entre estes fatores, os tecidos conjuntivos intramusculares parecem ter o papel mais importante para o aumento da resistência passiva quando um músculo é alongado. A grande quantidade de perimísio é comumente considerada como a maior responsável por este aumento, pois parece que a rede de colágeno do perimísio (referida classicamente como componente elástico em paralelo) previne o estiramento acima do normal dos fascículos musculares. É possível que uma variação na quantidade de perimísio existente nos músculos de cada indivíduo contribua para a variabilidade de mobilidade articular. As fibras de colágeno do perimísio aparecem enrugadas em

comprimentos musculares pequenos e o alongamento progressivo promove seu realinhamento longitudinal e o fim da aparência enrugada [108, 109]. À medida que o colágeno se torna estirado, a rigidez aumenta, o que pode limitar a amplitude de movimento. Para indivíduos flexíveis, em que o tendão está muito alongado, é possível que o estímulo repetido de estiramento das fibras de colágeno aumente seu potencial de deformação. Com relação aos miofilamentos, a titina presente entre os discos Z e a linha M podem apresentar um papel similar e contribuir para o aumento do torque passivo durante o alongamento. Foi demonstrado em músculos isolados de sapos que os filamentos de titina parecem suportar toda a tensão passiva durante a deformação, mas não se pode afirmar sua real contribuição *in vivo* [151]. Processos morfológicos indutores de síntese de isoformas distintas de titina poderiam promover o aumento de contribuição do músculo para a variação do comprimento muscular.

Alterações nas propriedades mecânicas do tendão tem sido normalmente consideradas menos importantes do que as mudanças musculares para a variação de comprimento do músculo adulto [151]. Por exemplo, foi mostrado que o tendão do músculo SOL de gatos e coelhos não muda seu comprimento se o músculo é imobilizado nas posições encurtada ou alongada [152]. No entanto, é possível que para indivíduos rígidos, o estímulo de alongamento promova alterações no tecido tendíneo de forma a aumentar sua capacidade de deformação relativa para uma dada força passiva. Dados de Abellaneda *et al.* [66] e Bojsen-Moller *et al.* [105] mostram que a deformação do tendão é menor durante o alongamento do que durante uma CVM, sugerindo que tecidos tendíneos apresentam um potencial adicional para deformar-se passivamente. Por fim, existe a possibilidade de que a força produzida por transmissão miofascial extramuscular [105] ou por estruturas articulares e ligamentos *in vivo* [66] possa ter um papel no grau de amplitude articular, além do músculo e do tendão, particularmente quando o tornozelo está próximo dos limites de DF e também contribuir para as diferenças individuais.

O presente estudo apresentou adaptações de remodelação tecidual do tecido muscular (aumento do CF máximo e redução do AP mínimo) decorrentes de um programa de alongamento estático dos flexores plantares com 10 semanas de duração, além de resultados inovadores indicativos de adaptações diferenciadas dos tecidos muscular e tendíneo correlacionadas com o grau de flexibilidade individual. É necessário ressaltar que estudos futuros envolvendo intervenções de alongamento de longo prazo devem levar em consideração que características individuais afetarão os

resultados do treinamento, sendo sugerido a análise destas características antes do início da intervenção para separação dos indivíduos de acordo com a resposta estrutural esperada.

8 – CONCLUSÃO

O alongamento é uma técnica amplamente utilizada nos âmbitos esportivo e de reabilitação, embora pesquisas sobre o assunto reportem resultados controversos e hipóteses diferentes sobre os mecanismos que levam ao aumento da ADM após intervenções, atribuído à remodelação tecidual ou a adaptações neurais.

A presente Tese seguiu uma sequência de experimentos com a tentativa de elucidar as adaptações mecânicas da UMT a intervenções de aumento crônico do comprimento muscular. Primeiramente, estudos de confiabilidade e variabilidade das medidas confirmaram o potencial de aplicação das técnicas de análise de imagens de BMU e US para investigação longitudinal de parâmetros da arquitetura muscular. O experimento seguinte, envolvendo uma técnica de imobilização muscular na posição alongada, ou seja, um alongamento de intensidade alta, mostrou adaptações da arquitetura muscular coerentes com um suposto aumento do CF e remodelação tecidual para atender às condições impostas ao músculo. Ao traçar um protocolo de alongamento para animais com características mais próximas daqueles aplicados em humanos, foi possível verificar a redução do AP e o aumento do comprimento da fibra e dos sarcômeros, confirmando a hipótese inicial de que as estruturas musculares passam por alterações para que sua função seja otimizada na nova condição articular. Pesquisas futuras são necessárias para determinar se o aumento do comprimento do sarcômero significa uma adaptação final ou uma fase intermediária para a sarcomerogênese.

Por fim, o experimento com humanos apresentou adaptações estruturais do tecido muscular (aumento do CF máximo e redução do AP mínimo) coerentes com os resultados encontrados para os animais, confirmando a hipótese de que para um programa de alongamento de longo prazo, o músculo passa por uma remodelação tecidual. Além disso, o estudo indicou existirem respostas diferenciadas do músculo e do tendão para adaptações relacionadas ao ganho de amplitude articular e ainda, que estas respostas estão associadas ao grau de flexibilidade articular individual inicial. Conclui-se, portanto que se deve levar em consideração tal variabilidade para estudos futuros de adaptações crônicas ao alongamento.

Referências Bibliográficas

- [1] Y. A. Koryak, “Functional and clinical significance of the architecture of human skeletal muscles,” *Human Physiology*, vol. 34, no. 4, pp. 482–492, 2008.
- [2] R. L. Lieber and S. C. Bodine-Fowler, “Skeletal muscle mechanics: implications for rehabilitation,” *Physical Therapy*, vol. 73, no. 12, pp. 844–856, 1993.
- [3] Y. Kawakami, “The effects of strength training on muscle architecture in humans,” *International Journal of Sport and Health Science*, vol. 3, no. Special_Issue_2005, pp. 208–217, 2005.
- [4] Y. Kawakami, Y. Ichinose, and T. Fukunaga, “Architectural and functional features of human triceps surae muscles during contraction,” *Journal of Applied Physiology*, vol. 85, no. 2, pp. 398–404, 1998.
- [5] C. N. Maganaris, V. Baltzopoulos, and a J. Sargeant, “In vivo measurements of the triceps surae complex architecture in man: implications for muscle function.,” *The Journal of physiology*, vol. 512 (Pt 2, pp. 603–14, Oct. 1998.
- [6] M. Narici, “Human skeletal muscle architecture studied in vivo by non-invasive imaging techniques: functional significance and applications,” *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 9, pp. 97–103, 1999.
- [7] T. Fukunaga, Y. Kawakami, S. Kuno, K. Funato, and S. Fukashiro, “Muscle architecture and function in humans,” *Journal of biomechanics*, vol. 30, no. 5, pp. 457–463, 1997.
- [8] F. S. Foster, C. J. Pavlin, G. R. Lockwood, L. K. Ryan, K. A. Harasiewicz, L. Berube, and A. M. Rauth, “Principles and Applications of Ultrasound Backscatter Microscopy,” *ieee transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, vol. 40, no. 5, pp. 608–617, 1993.
- [9] F. S. Foster, P. N. Burns, D. H. Simpson, S. R. Wilson, D. A. Christopher, D. E. Goertz, and M. Imaging, “Ultrasound for the visualization and quantification of tumor microcirculation,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 19, pp. 131–138, 2000.
- [10] F. Foster, M. Zhang, Y. Zhou, G. Liu, J. Mehi, E. Cherin, K. Harasiewicz, B. Starkoski, L. Zan, D. Knapik, and others, “A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice,” *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 28, no. 9, pp. 1165–1172, 2002.
- [11] D. H. Turnbull, “In utero ultrasound backscatter microscopy of early stage mouse embryos,” *Computerized Medical Imaging and Graphics*, vol. 23, pp. 25–31, 1999.
- [12] D. H. Turnbull, T. S. Bloomfield, H. S. Baldwin, F. S. Foster, and A. L. Joyner, “Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain

- development,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, no. March, pp. 2239–2243, 1995.
- [13] G. Lockwood, D. Turnbull, D. Christopher, and F. Foster, “Beyond 30MHz: Applications of High Frequency Ultrasound,” *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, no. nov/dez, pp. 60–71, 1996.
- [14] C. C. Peixinho, M. B. Ribeiro, C. M. C. Resende, and L. F. De Oliveira, “Ultrasound biomicroscopy for biomechanical characterization of healthy and injured triceps surae of rats,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 214, pp. 3880–3886, 2011.
- [15] C. C. Peixinho, “Biomicroscopia Ultrassônica para Caracterização Biomecânica do Tríceps Sural Saudável e Lesionado de Ratos,” Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- [16] S. P. Magnusson, “Passive properties of human skeletal muscle during stretch maneuvers. A review.,” *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 8, no. 2, pp. 65–77, Apr. 1998.
- [17] W. Bandy and J. Irion, “The effect of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscles,” *Physical Therapy*, vol. 7, no. 9, pp. 845–852, 1994.
- [18] S. P. Magnusson, E. B. Simonsen, P. Aagaard, J. Boesen, F. Johannsen, and M. Kjaer, “Determinants of musculoskeletal flexibility: viscoelastic properties, cross-sectional area, EMG and stretch tolerance.,” *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 7, no. 4, pp. 195–202, Aug. 1997.
- [19] P. Aagaard, J. L. Andersen, P. Dyhre-Poulsen, A.-M. Leffers, A. Wagner, and S. P. Magnusson, “A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture,” *Journal of Physiology*, vol. 534, no. 2, pp. 613–623, 2001.
- [20] M. McHugh, I. KREMENIC, and M. FOX, “The role of mechanical and neural restraints to joint range of motion during passive,” *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 30, no. 6, pp. 928–932, 1998.
- [21] K. Kubo, H. Kanehisa, Y. Kawakami, and T. Fukunaga, “Influences of repetitive muscle contractions with different modes on tendon elasticity in vivo.,” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 91, no. 1, pp. 277–82, Jul. 2001.
- [22] K. Kubo, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, “Is passive stiffness in human muscles related to the elasticity of tendon structures?,” *European Journal of Applied Physiology*, vol. 85, no. 3–4, pp. 226–232, Aug. 2001.
- [23] S. P. Magnusson, E. B. Simonsen, P. Aagard, P. Dyhre-Poulsen, M. P. Mchugh, and M. Kjaer, “Mechanical and physiological responses to stretching with and without preisometric contraction in human skeletal muscle*1,” *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 77, no. 4, pp. 373–378, Apr. 1996.

- [24] S. P. Magnusson, E. B. Simonsen, P. Aagaard, H. Sørensen, and M. Kjaer, "A mechanism for altered flexibility in human skeletal muscle.," *The Journal of physiology*, vol. 497 (Pt 1, no. 1996, pp. 291–8, Nov. 1996.
- [25] S. P. Magnusson, E. B. Simonsen, P. Dyhre-Poulsen, P. Aagaard, T. Mohr, and M. Kjaer, "Viscoelastic stress relaxation during static stretch in human skeletal muscle in the absence of EMG activity.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 6, no. 6, pp. 323–8, Dec. 1996.
- [26] K. Kubo, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, "Effects of resistance and stretching training programmes on the viscoelastic properties of human tendon structures in vivo.," *The Journal of Physiology*, vol. 538, no. 1, pp. 219–226, Dec. 2001.
- [27] K. Kubo, H. Kanehisa, Y. Kawakami, and T. Fukunaga, "Influence of static stretching on viscoelastic properties of human tendon structures in vivo.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 90, no. 2, pp. 520–7, Feb. 2001.
- [28] J. R. Fowles, D. G. Sale, and J. D. MacDougall, "Reduced strength after passive stretch of the human plantarflexors.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 89, no. 3, pp. 1179–88, Sep. 2000.
- [29] M. P. McHugh and M. Nesse, "Effect of stretching on strength loss and pain after eccentric exercise.," *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 40, no. 3, pp. 566–73, Mar. 2008.
- [30] S. P. Magnusson, P. Aagaard, E. Simonsen, and F. Bojsen-Moller, "Passive tensile stress and energy of the human hamstring muscles in vivo.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 10, pp. 351–359, 2000.
- [31] D. E. Weir, J. Tingley, and G. C. B. Elder, "Acute passive stretching alters the mechanical properties of human plantar flexors and the optimal angle for maximal voluntary contraction.," *European journal of applied physiology*, vol. 93, no. 5–6, pp. 614–23, Mar. 2005.
- [32] J. T. Cramer, T. J. Housh, J. W. Coburn, T. W. Beck, and G. O. Johnson, "Acute effects of static stretching on maximal eccentric torque production in women.," *Journal of strength and conditioning research*, vol. 20, no. 2, pp. 354–358, May 2006.
- [33] J. T. Cramer, T. W. Beck, T. J. Housh, L. L. Massey, S. M. Marek, S. Danglemeier, S. Purkayastha, J. Y. Culbertson, K. A. Fitz, and A. D. Egan, "Acute effects of static stretching on characteristics of the isokinetic angle - torque relationship, surface electromyography, and mechanomyography.," *Journal of sports sciences*, vol. 25, no. 6, pp. 687–698, Apr. 2007.
- [34] R. L. Lieber, *Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity. The Physiological Basis of Rehabilitation.*, 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott, Williams & Wilkins, 2010.

- [35] N. Guissard and J. Duchateau, "Effect of static stretch training on neural and mechanical properties of the human plantar-flexor muscles.," *Muscle & nerve*, vol. 29, no. 2, pp. 248–55, Feb. 2004.
- [36] J. C. Tabary, C. Tabary, C. Tardieu, G. Tardieu, and G. Goldspink, "Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts," *Journal of Physiology*, vol. 224, pp. 231–244, 1972.
- [37] P. E. Williams, "Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle," *Annals of the Rheumatic Diseases*, no. July 1989, pp. 316–317, 1990.
- [38] A. Kurihashi, K. Tamai, K. Saotome, M. Takemura, A. Fujiwara, and S. Fujita, "Difference in stretching of sarcomeres between medial gastrocnemius and tibialis anterior by tibial lengthening : an experiment in rabbits," *Science*, vol. 14, no. 2, pp. 147–150, 2006.
- [39] P. E. Williams and G. Goldspink, "Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle," *Journal of Anatomy*, vol. 127, no. 3, pp. 459–468, 1978.
- [40] N. Guissard and J. Duchateau, "Neural aspects of muscle stretching.," *Exercise and sport sciences reviews*, vol. 34, no. 4, pp. 154–8, Oct. 2006.
- [41] E. Cè, S. Rampichini, M. A. Maggioni, A. Veicsteinas, and G. Merati, "Effects of passive stretching on post-activation potentiation and fibre conduction velocity of biceps brachii muscle," *Sport Sciences for Health*, vol. 4, no. 3, pp. 43–50, Feb. 2008.
- [42] J. T. Cramer, T. J. Housh, J. P. Weir, G. O. Johnson, J. W. Coburn, and T. W. Beck, "The acute effects of static stretching on peak torque, mean power output, electromyography, and mechanomyography.," *European journal of applied physiology*, vol. 93, no. 5–6, pp. 530–539, Mar. 2005.
- [43] D. a. Reid and P. J. McNair, "Passive Force, Angle, and Stiffness Changes after Stretching of Hamstring Muscles," *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 36, no. 11, pp. 1944–1948, Nov. 2004.
- [44] M. Kucharová, S. Doubal, P. Klemra, P. Rejchrt, and M. Navrátil, "Viscoelasticity of biological materials - measurement and practical impact on biomedicine.," *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, vol. 56 Suppl 1, pp. S33–7, Jan. 2007.
- [45] R. I. Griffiths, "Shortening of muscle fibres during stretch of the active cat medial gastrocnemius muscle: the role of tendon compliance," *Journal of Physiology*, vol. 436, pp. 219–236, 1991.

- [46] W.-R. Su, H.-H. Chen, and Z.-P. Luo, "Effect of cyclic stretching on the tensile properties of patellar tendon and medial collateral ligament in rat.," *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)*, vol. 23, no. 7, pp. 911–7, Aug. 2008.
- [47] A. Magid and D. Law, "Myofibrils bear most of the resting tension in frog skeletal muscle.," *Science*, vol. 109, no. 1973, pp. 2–4, 1985.
- [48] H. Folpp, S. Deall, L. a Harvey, and T. Gwinn, "Can apparent increases in muscle extensibility with regular stretch be explained by changes in tolerance to stretch?," *The Australian journal of physiotherapy*, vol. 52, no. 1, pp. 45–50, Jan. 2006.
- [49] D. S. Davis, P. E. Ashby, K. L. McCale, J. A. McQuain, and J. M. Wine, "The effectiveness of 3 stretching techniques on hamstring flexibility using consistent stretching parameters.," *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, vol. 19, no. 1, pp. 27–32, Feb. 2005.
- [50] R. L. Gajdosik, J. D. Allred, H. L. Gabbert, and B. a Sonsteng, "A stretching program increases the dynamic passive length and passive resistive properties of the calf muscle-tendon unit of unconditioned younger women.," *European journal of applied physiology*, vol. 99, no. 4, pp. 449–54, Mar. 2007.
- [51] M. Nakamura, T. Ikezoe, Y. Takeno, and N. Ichihashi, "Effects of a 4-week static stretch training program on passive stiffness of human gastrocnemius muscle-tendon unit in vivo.," *European journal of applied physiology*, vol. 112, no. 7, pp. 2749–55, Jul. 2012.
- [52] O. R. Seynnes, M. de Boer, and M. V Narici, "Early skeletal muscle hypertrophy and architectural changes in response to high-intensity resistance training.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 102, no. 1, pp. 368–73, Jan. 2007.
- [53] N. N. Mahieu, A. Cools, B. De Wilde, M. Boon, and E. Witvrouw, "Effect of proprioceptive neuromuscular facilitation stretching on the plantar flexor muscle-tendon tissue properties.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 19, no. 4, pp. 553–60, Aug. 2009.
- [54] K. Kubo, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, "Effects of transient muscle contractions and stretching on the tendon structures in vivo.," *Acta physiologica Scandinavica*, vol. 175, no. 2, pp. 157–64, Jun. 2002.
- [55] D. Grieve, P. Cavanagh, and S. Pheasant, "Prediction of gastrocnemius length from knee and ankle posture," in *Biomechanics*, vol. VI-A, 1978, pp. 405–412.
- [56] M. L. Latash and V. M. Zatsiorsky, "Joint stiffness: myth or reality?," *Human, Movements and Science*, vol. 12, pp. 653–692, 1993.
- [57] B. Abbott and J. Lowy, "Stress relaxation in muscle.," *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 146, no. B, pp. 281–288, 1956.

- [58] D. C. Taylor, J. D. J. Dalton, A. V Seaber, and W. E. J. Garrett, "Viscoelastic stress relaxation during static stretch in human skeletal muscle in the absence of EMG activity.," *American Journal of Sports Medicine*, vol. 18, pp. 300–309, 1990.
- [59] J. Avela, T. Finni, and T. Liikavainio, "Neural and mechanical responses of the triceps surae muscle group after 1 h of repeated fast passive stretches.," *Journal of Applied Physiology*, vol. 96, no. 2325–2332, 2004.
- [60] P. I. Purslow, "Strain-induced reorientation of an intramuscular connective tissue network: Implications for passive muscle elasticity.," *Journal of Biomechanics*, vol. 22, pp. 21–31, 1989.
- [61] L. R. OSTERNIG, R. N. ROBERTSON, R. K. TROXKI, and P. HAN-SEN, "Muscle activation during proprioceptive neuromuscular facilitation (PNF) stretching techniques.," *American Journal of Physical Medicine*, vol. 56, pp. 298–307, 1987.
- [62] D. Cannavan, D. R. Coleman, and A. J. Blazeovich, "Lack of effect of moderate-duration static stretching on plantar flexor force production and series compliance.," *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)*, vol. 27, no. 3, pp. 306–12, Mar. 2012.
- [63] C. I. Morse, H. Degens, O. R. Seynnes, C. N. Maganaris, and D. A. Jones, "The acute effect of stretching on the passive stiffness of the human gastrocnemius muscle tendon unit.," *The Journal of physiology*, vol. 586, no. 1, pp. 97–106, Jan. 2008.
- [64] a J. Blazeovich, D. Cannavan, C. M. Waugh, F. Fath, S. C. Miller, and a D. Kay, "Neuromuscular factors influencing the maximum stretch limit of the human plantar flexors.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 113, no. 9, pp. 1446–55, Nov. 2012.
- [65] C. H. Weppeler and S. P. Magnusson, "Increasing muscle extensibility: a matter of increasing length or modifying sensation?," *Physical therapy*, vol. 90, no. 3, pp. 438–49, Mar. 2010.
- [66] S. Abellaneda, N. Guissard, and J. Duchateau, "The relative lengthening of the myotendinous structures in the medial gastrocnemius during passive stretching differs among individuals.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 106, no. 1, pp. 169–77, Jan. 2009.
- [67] K. E. Burgess, P. Graham-Smith, and S. J. Pearson, "Effect of acute tensile loading on gender-specific tendon structural and mechanical properties.," *Journal of orthopaedic research*, vol. 27, no. 4, pp. 510–516, 2009.
- [68] R. L. Gajdosik, D. W. Vander Linden, P. J. McNair, T. J. Riggin, J. S. Albertson, D. J. Mattick, and J. C. Wegley, "Viscoelastic properties of short calf muscle-tendon units of older women: effects of slow and fast passive dorsiflexion

- stretches in vivo.," *European journal of applied physiology*, vol. 95, no. 2–3, pp. 131–9, Oct. 2005.
- [69] A. Viidik, "Simultaneous mechanical and light microscopic studies of collagen fibers," *Z Anat Entwicklungsgesch*, vol. 136, pp. 204–212, 1972.
- [70] A. D. Kay and A. J. Blazeovich, "Moderate-duration static stretch reduces active and passive plantar flexor moment but not Achilles tendon stiffness or active muscle length.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 106, no. 4, pp. 1249–56, Apr. 2009.
- [71] R. D. Herbert, A. M. Moseley, J. E. Butler, and S. C. Gandevia, "Change in length of relaxed muscle fascicles and tendons with knee and ankle movement in humans," *The Journal of Physiology*, vol. 539, no. 2, pp. 637–645, Jan. 2002.
- [72] M. Nakamura, T. Ikezoe, Y. Takeno, and N. Ichihashi, "Acute and prolonged effect of static stretching on the passive stiffness of the human gastrocnemius muscle tendon unit in vivo.," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 29, no. 11, pp. 1759–63, Nov. 2011.
- [73] T. Mizuno, M. Matsumoto, and Y. Umemura, "Viscoelasticity of the muscle-tendon unit is returned more rapidly than range of motion after stretching.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 23, no. 1, pp. 23–30, Feb. 2013.
- [74] J. A. Schwane and R. B. Armstrong, "Effects of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats.," *Journal of Applied Physiology*, vol. 55, pp. 969–975., 1983.
- [75] R. L. Lieber, T. M. Woodburn, and J. Friden, "Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain," *Journal of Applied Physiology*, vol. 70, pp. 2498–2507, 1991.
- [76] J. Kokkonen, A. G. Nelson, and A. Cornwell, "Acute muscle stretching inhibits maximal strength performance," *Research Quarterly for Exercise and Sport*, vol. 69, pp. 411–415, 1998.
- [77] A. G. Nelson, A. N. K. Guillory, A. Cornwell, and J. Kokkonen, "Inhibition of Maximal Voluntary Isokinetic Torque Production Following Stretching Is Velocity-Specific," *Journal of strength and conditioning research*, vol. 15, no. 2, pp. 241–246, 2001.
- [78] A. Cornwell, A. G. Nelson, and B. Sidaway, "Acute effects of stretching on the neuromechanical properties of the triceps surae muscle complex," *European journal of applied physiology*, vol. 86, no. 5, pp. 428–434, 2002.
- [79] D. G. Behm, A. Bambury, F. Cahill, and K. Power, "Effect of Acute Static Stretching on Force, Balance, Reaction Time, and Movement Time," *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 36, no. 8, pp. 1397–1402, Aug. 2004.

- [80] J. L. R. Rosário, A. P. Marquesi, and S. A. Maluf, “Aspectos clínicos do alongamento: uma revisão de literatura,” *Revista Brasileira de Fisioterapia*, vol. 8, no. 1, pp. 83–88, Dec. 2004.
- [81] A. V. Rowlands, V. F. Marginson, and J. Lee, “Chronic flexibility gains: effect of isometric contraction duration during proprioceptive neuromuscular facilitation stretching techniques,” *Research Quarterly for Exercise and Sport*, vol. 74, no. 1, pp. 47–51, 2003.
- [82] E. Toft, G. T. Esperson, S. Kalund, T. Sinkjaer, and B. C. Horne- Mann, “Passive tension of the ankle before and after stretching.,” *American Journal of Sports Medicine*, vol. 17, pp. 489–494, 1989.
- [83] P. Williams, H. Simpson, P. Kyberd, J. Kenwright, and G. Goldspink, “Effect of Rate of Distraction on Loss of Range of Joint Movement , Muscle Stiffness , and Intramuscular Connective Tissue Content During Surgical Limb-Lengthening : A Study in the Rabbit,” vol. 83, no. November 1998, pp. 78–83, 1999.
- [84] P. De Deyne, “Lengthening of muscle during distraction osteogenesis,” *Clinical orthopaedics and related research*, no. 403, pp. 171–177, 2002.
- [85] V. J. Caiozzo, A. Utkan, R. Chou, A. Khalafi, H. Chandra, M. Baker, B. Rourke, G. Adams, K. Baldwin, and S. Green, “Effects of distraction on muscle length : Mechanisms involved in sarcomerogenesis,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 403, pp. 133–145, 2002.
- [86] a Kurihashi, K. Tamai, K. Saotome, M. Takemura, A. Fujiwara, and S. Fujita, “Difference in stretching of sarcomeres between medial gastrocnemius and tibialis anterior by tibial lengthening: an experiment in rabbits.,” *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)*, vol. 14, no. 2, pp. 147–50, Aug. 2006.
- [87] S. A. Spector, P. F. Gardiner, R. F. Zernicke, R. R. Roy, and V. R. Edgerton, “Muscle architecture and force velocity of cat soleus and medial gastrocnemius: implications for motor control,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 44, pp. 951–960, 1980.
- [88] a R. S. Gomes, E. L. Coutinho, C. N. França, J. Polonio, and T. F. Salvini, “Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology.,” *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, vol. 37, no. 10, pp. 1473–80, Oct. 2004.
- [89] A. R. S. Gomes, A. Cornachione, T. F. Salvini, and A. C. Mattiello-Sverzut, “Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle.,” *Journal of anatomy*, vol. 210, no. 3, pp. 328–35, Mar. 2007.
- [90] R. B. Fisioter and R. B. De Fisioterapia, “Efeito do alongamento e do exercício contra-resistido no músculo esquelético de rato Effect of stretching and resistive exercise on skeletal muscles in rats,” vol. 12, no. 3, 2008.

- [91] F. Foster, "Advances in ultrasound biomicroscopy," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, no. 1, pp. 1–27, Jan. 2000.
- [92] L. Kessler, A. Korpel, and P. Palermo, "Simultaneous acoustic and optical microscopy," *Nature*, vol. 239, pp. 111–112, 1972.
- [93] L. Lemons and C. F. Quate, "Acoustic microscopy: scanning version," *Applied Physics Letters*, vol. 24, pp. 163–165, 1974.
- [94] C. J. Pavlin, M. D. Sherar, and F. S. Foster, "Subsurface imaging of the eye by ultrasound biomicroscopy," *Ophthalmology*, vol. 97, pp. 244–250, 1990.
- [95] H. J. Kim, K. N. Ryu, D. W. Shung, and Y. K. Park, "Correlation between sonographic and pathologic findings in muscle injury: experimental study in the rabbit," *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 21, no. 10, pp. 1113–1119, 2002.
- [96] R. S. Witte, D. E. Dow, R. Olafsson, Y. Shi, and M. O'Donnell, "High resolution ultrasound imaging of skeletal muscle dynamics and effects of fatigue," in *IEEE International Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control Joint 50th Anniversary Conference*, 2004, vol. 00, no. c, pp. 764–767.
- [97] L. Harvey, R. Herbert, and J. Crosbie, "Does stretching induce lasting increases in joint ROM? A systematic review," *Physiotherapy research international : the journal for researchers and clinicians in physical therapy*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2002.
- [98] B. E. Hashimoto, D. J. Kramer, and L. Wiitala, "Applications of musculoskeletal sonography," *Journal of Clinical Ultrasound*, vol. 27, no. 6, pp. 293–318, 1999.
- [99] R. Schleip, I. L. Naylor, D. Ursu, W. Melzer, A. Zorn, H.-J. Wilke, F. Lehmann-Horn, and W. Klingler, "Passive muscle stiffness may be influenced by active contractility of intramuscular connective tissue," *Medical hypotheses*, vol. 66, no. 1, pp. 66–71, Jan. 2006.
- [100] R. L. Gajdosik, "Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications," *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)*, vol. 16, no. 2, pp. 87–101, Feb. 2001.
- [101] M. Kjaer, "Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading," *Physiological reviews*, vol. 84, no. 2, pp. 649–98, Apr. 2004.
- [102] K. Borg and B. Caulfield, "MORPHOLOGY OF CONNECTIVE SKELETAL MUSCLE TISSUE," vol. 12, no. 1, pp. 197–207, 1980.
- [103] M. Ito, Y. Kawakami, Y. Ichinose, S. Fukashiro, and T. Fukunaga, "Nonisometric behavior of fascicles during isometric contractions of a human muscle," *Journal of applied physiology*, vol. 85, no. 4, pp. 1230–5, Oct. 1998.

- [104] P. D. Hoang, R. D. Herbert, G. Todd, R. B. Gorman, and S. C. Gandevia, "Passive mechanical properties of human gastrocnemius muscle tendon units, muscle fascicles and tendons in vivo.," *The Journal of experimental biology*, vol. 210, no. Pt 23, pp. 4159–68, Dec. 2007.
- [105] J. Bojsen-Møller, P. Hansen, P. Aagaard, U. Svantesson, M. Kjaer, and S. P. Magnusson, "Differential displacement of the human soleus and medial gastrocnemius aponeuroses during isometric plantar flexor contractions in vivo.," *Journal of applied physiology*, vol. 97, no. 5, pp. 1908–1914, Nov. 2004.
- [106] J. W. Heslinga and P. A. Huijting, "Muscle length-force characteristics in relation to muscle architecture: a bilateral study of gastrocnemius medialis muscles of unilaterally immobilized rats," *European Journal of Applied Physiology*, vol. 66, pp. 289–298, 1993.
- [107] R. Lynn, J. a Talbot, and D. L. Morgan, "Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 85, no. 1, pp. 98–104, Jul. 1998.
- [108] C. M. Eng, L. H. Smallwood, M. P. Rainiero, M. Lahey, S. R. Ward, and R. L. Lieber, "Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb.," *The Journal of experimental biology*, vol. 211, no. Pt 14, pp. 2336–45, 2008.
- [109] R. S. Chow, M. K. Medri, D. C. Martin, R. N. Leekam, A. M. Agur, and N. H. McKee, "Sonographic studies of human soleus and gastrocnemius muscle architecture : gender variability," *European Journal of Applied Physiology*, vol. 82, no. 3, pp. 236–244, 2000.
- [110] A. J. Blazevich, N. D. Gill, R. Bronks, and R. U. Newton, "Training-specific muscle architecture adaptation after 5-wk training in athletes.," *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 35, no. 12, pp. 2013–2022, 2003.
- [111] M. Narici and P. Cerretelli, "Changes in human muscle architecture in disuse-atrophy evaluated by ultrasound imaging.," *Journal of Gravitational Physiology*, vol. 5, pp. 73–74, 1998.
- [112] A. J. Blazevich, "Effects of Physical Training and Detraining, Immobilisation, Growth and Aging on Human Fascicle Geometry," *Sports Medicine*, vol. 36, no. 12, pp. 1003–1017, 2006.
- [113] A. J. Blazevich and N. C. C. Sharp, "Understanding muscle architectural adaptation: macro- and micro-level research.," *Cells, tissues, organs*, vol. 181, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2005.
- [114] M. Miyatani, H. Kanehisa, M. Ito, Y. Kawakami, and T. Fukunaga, "The accuracy of volume estimates using ultrasound muscle thickness measurements in different muscle groups.," *European journal of applied physiology*, vol. 91, no. 2–3, pp. 264–72, Mar. 2004.

- [115] C. N. Maganaris, "A predictive model of moment-angle characteristics in human skeletal muscle: application and validation in muscles across the ankle joint.," *Journal of theoretical biology*, vol. 230, no. 1, pp. 89–98, Sep. 2004.
- [116] C. N. Maganaris, V. Baltzopoulos, and A. J. Sargeant, "In vivo measurements of the triceps surae complex architecture in man: implications for muscle function," *The Journal of Physiology*, vol. 512, no. 2, pp. 603–614, 1998.
- [117] T. Fukunaga, K. Kubo, Y. Kawakami, S. Fukashiro, H. Kanehisa, and C. N. Maganaris, "In vivo behaviour of human muscle tendon during walking.," *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, vol. 268, no. 1464, pp. 229–33, 2001.
- [118] S. Rosager, P. Aagaard, P. Dyhre-Poulsen, K. Neergaard, M. Kjaer, and S. P. Magnusson, "Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 12, no. 2, pp. 90–8, Apr. 2002.
- [119] K. Kubo, H. Kanehisa, M. Ito, and T. Fukunaga, "Effects of isometric training on the elasticity of human tendon structures in vivo.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 91, no. 1, pp. 26–32, Jul. 2001.
- [120] S. Kurokawa, T. Fukunaga, and S. Fukashiro, "Behavior of fascicles and tendinous structures of human gastrocnemius during vertical jumping.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 90, no. 4, pp. 1349–58, Apr. 2001.
- [121] A. J. Blazevich, N. D. Gill, N. Deans, and S. Zhou, "Lack of human muscle architectural adaptation after short-term strength training.," *Muscle & nerve*, vol. 35, no. 1, pp. 78–86, Jan. 2007.
- [122] S. P. Magnusson, P. Aagaard, S. Rosager, P. Dyhre-Poulsen, and M. Kjaer, "Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis in vivo," *Journal of Physiology*, vol. 531, no. 1, pp. 277–288, 2001.
- [123] S. P. Chan, Y. Hong, and P. D. Robinson, "Flexibility and passive resistance of the hamstrings of young adults using two different static stretching protocols.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 11, no. 2, pp. 81–6, Apr. 2001.
- [124] J. B. Feland, J. W. Myrer, S. S. Schulthies, G. W. Fellingham, and G. W. Measom, "The Effect of Duration of Stretching of the Hamstring Muscle Group for Increasing Range of Motion in People Aged 65 Years or Older," *Physical Therapy*, vol. 81, no. 5, pp. 1110–1117, 2001.
- [125] D. C. Taylor, J. D. Dalton, A. V. Seaber, and W. E. Garrett, "Viscoelastic properties of muscle-tendon units: The biomechanical effects of stretching," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 18, no. 3, pp. 300–309, Jun. 1990.

- [126] E. L. Coutinho, A. R. S. Gomes, C. N. França, J. Oishi, and T. F. Salvini, "Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology," *Brazilian journal of medical and biological research*, vol. 37, no. 12, pp. 1853–1861, Dec. 2004.
- [127] P. E. Williams and G. Goldspink, "Longitudinal growth of striated muscle fibres.," *Journal of cell science*, vol. 9, no. 3, pp. 751–67, Nov. 1971.
- [128] R. L. Gajdosik, D. W. Vander Linden, P. J. McNair, A. K. Williams, and T. J. Riggan, "Effects of an eight-week stretching program on the passive-elastic properties and function of the calf muscles of older women.," *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)*, vol. 20, no. 9, pp. 973–83, Nov. 2005.
- [129] C. N. Maganaris and J. P. Paul, "In vivo human tendon mechanical properties," *Journal of Physiology*, vol. 521, no. 1, pp. 307–313, 1999.
- [130] C. N. Maganaris and J. P. Paul, "Load-elongation characteristics of in vivo human tendon and aponeurosis.," *The Journal of experimental biology*, vol. 203, no. Pt 4, pp. 751–6, Feb. 2000.
- [131] P. E. Williams and G. Goldspink, "The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres.," *Journal of anatomy*, vol. 116, no. Pt 1, pp. 45–55, Oct. 1973.
- [132] K. O'Sullivan, E. Murray, and D. Sainsbury, "The effect of warm-up, static stretching and dynamic stretching on hamstring flexibility in previously injured subjects.," *BMC musculoskeletal disorders*, vol. 10, p. 37, Jan. 2009.
- [133] M. P. McHugh and D. T. Tetro, "Changes in the relationship between joint angle and torque production associated with the repeated bout effect," *Journal of sports sciences*, vol. 21, no. 11, pp. 927–932, 2003.
- [134] N. Babault, B. Y. L. Kouassi, and K. Desbrosses, "Acute effects of 15min static or contract-relax stretching modalities on plantar flexors neuromuscular properties.," *Journal of science and medicine in sport*, vol. 13, no. 2, pp. 247–252, Mar. 2010.
- [135] P. Fish, *Physics and instrumentation of diagnostic medical ultrasound*, 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 1990.
- [136] S. A. Rubin, *The Principles of Biomedical Instrumentation: A Beginner's Guide*, 1st ed. London: Year Book Medical Publishers Inc., 1987.
- [137] E. L. Coutinho, A. R. S. Gomes, C. N. Franca, and T. F. Salvini, "A new model for the immobilization of the rat hind limb," *Brazilian journal of medical and biological research*, vol. 35, no. 11, pp. 1329–1332, Nov. 2002.
- [138] E. L. Coutinho, J. Oishi, T. F. Salvini, and D. P. Muscular, "Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology," *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, vol. 37, pp. 1853–1861, 2004.

- [139] T. F. Salvini, E. L. Coutinho, T. L. Russo, and C. Deluca, "ONE-MINUTE BOUTS OF PASSIVE STRETCHING AFTER IMMOBILIZATION INCREASE SARCOMEROGENESIS IN RAT SOLEUS MUSCLE," vol. 23, pp. 271–277, 2006.
- [140] W. G. Hopkins, "Measures of reliability in sports medicine and science.," *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, vol. 30, no. 1, pp. 1–15, Jul. 2000.
- [141] M. V. Narici, T. Binzoni, E. Hiltbrand, J. Fasel, F. Terrier, and P. Cerretelli, "In vivo human gastrocnemius architecture with changing joint angle at rest and during graded isometric contraction.," *The Journal of Physiology*, vol. 496, no. Pt 1, pp. 287–297, 1996.
- [142] K. Legerlotz, H. K. Smith, and W. A. Hing, "Variation and reliability of ultrasonographic quantification of the architecture of the medial gastrocnemius muscle in young children," *Clinical Physiology and Functional Imaging*, vol. 30, pp. 198–205, 2010.
- [143] N. S. da F. Martins, C. C. Peixinho, and L. F. de Oliveira, "Reliability of Triceps Surae Muscle Architecture Measurements Obtained with Somographic Images," *Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance*, vol. 14, no. 2, pp. 212–220, 2012.
- [144] Y. Kawakami, T. Abe, and T. Fukunaga, "Muscle fiber pennation angles are greater in hypertrophied than in normal muscles," *Journal of Applied Physiology*, vol. 74, no. 6, pp. 2740–2744, 1993.
- [145] C. M. M. De Carvalho, A. C. Shimano, and J. B. Volpon, "Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético.," *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, vol. 18, no. 2, pp. 65–73, Mar. 2002.
- [146] M. Fournier, R. R. Roy, H. Perham, C. P. Simard, and V. R. Edgerton, "Is limb immobilization a model of muscle disuse?," *Experimental neurology*, vol. 80, no. 1, pp. 147–56, Apr. 1983.
- [147] a R. S. Gomes, E. L. Coutinho, C. N. França, J. Polonio, and T. F. Salvini, "Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology.," *Brazilian journal of medical and biological research*, vol. 37, no. 10, pp. 1473–80, Oct. 2004.
- [148] M. Elsalanty, M. Makarov, A. Cherkashin, J. Birch, and M. Samchukov, "Changes in pennate muscle architecture after gradual tibial lengthening in goats.," *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, vol. 290, no. 5, pp. 461–7, May 2007.
- [149] J. S. Sun, S. M. Hou, T. K. Liu, and K. S. Lu, "Analysis of neogenesis in rabbit skeletal muscles after chronic traction.," *Histology and histopathology*, vol. 9, no. 4, pp. 699–703, Oct. 1994.

- [150] M. Elsalanty, M. Makarov, A. Cherkashin, J. Birch, and M. Samchukov, "Changes in Pennate Muscle Architecture After Gradual Tibial Lengthening in Goats," *Journal Of Pediatric Orthopedics*, vol. 467, no. September 2006, pp. 461–467, 2007.
- [151] "1988_Herbert_The passive mechanical properties of muscle and their adaptations to altered patterns of use.pdf." .
- [152] C. Tardieu, J. C. Tabary, E. H. de la Tour, C. Tabary, and G. Tardieu, "The relationship between sarcomere length in the soleus and tibialis anterior and the articular angle of the tibia-calcaneum in cats during growth.," *Journal of anatomy*, vol. 124, no. Pt 3, pp. 581–8, Dec. 1977.
- [153] B. Brenner, "Sarcomeric domain organization within single skinned rabbit psoas fibers and its effects on laser light diffraction patterns.," *Biophysical journal*, vol. 48, no. 6, pp. 967–82, Dec. 1985.
- [154] C. A. Lindsey, M. R. Makarov, S. Shoemaker, J. G. Birch, P. H. Buschang, A. M. Cherkashin, R. D. Welch, and M. L. Samchukov, "The Effect of the Amount of Limb Lengthening on Skeletal Muscle," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 402, pp. 278–287, 2002.
- [155] J. Fride and E. Ponte, "Immobilization of the rabbit tibialis anterior muscle in a lengthened position causes addition of sarcomeres in series and extra-cellular matrix proliferation," *Journal of Biomechanics*, vol. 41, pp. 1801–1804, 2008.
- [156] V. J. Caiozzo, A. Utkan, R. Chou, A. Khalafi, H. Chandra, M. Baker, B. Rourke, G. Adams, K. Baldwin, and S. Green, "Effects of Distraction on Muscle Length : Sarcomerogenesis," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 403, pp. 133–145, 2002.
- [157] P. Williams, P. Kyberd, H. Simpson, J. Kenwright, and G. Goldspink, "The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb • lengthening," *Journal of anatomy*, vol. 193, pp. 131–138, 1998.
- [158] B. Schumacher, J. Keller, and I. Hvid, "Distraction effects on muscle," *Acta orthopaedica Scandinavica*, vol. 65, no. 6, pp. 647–650, 1994.
- [159] "Application of Passive Stretch and Its Implications for Muscle Fibers," *Physical Therapy*, pp. 819–827, 2001.
- [160] P. G. De Deyne, "Lengthening of Muscle During Distraction Osteogenesis," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 403, pp. 171–177, 2002.
- [161] P. Williams, H. Simpson, P. Kyberd, J. Kenwright, and G. Goldspink, "Effect of rate of distraction on loss of range of joint movement, muscle stiffness, and intramuscular connective tissue content during surgical limb-lengthening: a study in the rabbit.," *The Anatomical record*, vol. 255, no. 1, pp. 78–83, May 1999.

- [162] C. a Lindsey, M. R. Makarov, S. Shoemaker, J. G. Birch, P. H. Buschang, A. M. Cherkashin, R. D. Welch, and M. L. Samchukov, "The effect of the amount of limb lengthening on skeletal muscle.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 402, pp. 278–87, Sep. 2002.
- [163] A. Simpson, P. Williams, P. Kyberd, G. Goldspink, and J. Kenwright, "The response of muscle to leg lengthening," *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 77, pp. 630–636, 1995.
- [164] P. Williams, P. Kyberd, H. Simpson, J. Kenwright, and G. Goldspink, "The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb • lengthening," *Journal of anatomy*, vol. 193, pp. 131–138, 1998.
- [165] T. Finni, J. A. Hodgson, A. M. Lai, V. R. Edgerton, and S. Sinha, "Nonuniform strain of human soleus aponeurosis-tendon complex during submaximal voluntary contractions in vivo.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 95, no. 2, pp. 829–37, Aug. 2003.
- [166] D. C. Martin, M. K. Medri, R. S. Chow, V. Oxorn, R. N. Leekam, a M. Agur, and N. H. McKee, "Comparing human skeletal muscle architectural parameters of cadavers with in vivo ultrasonographic measurements.," *Journal of anatomy*, vol. 199, no. Pt 4, pp. 429–34, Oct. 2001.
- [167] Y. Kawakami, T. Abe, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, "Human skeletal muscle size and architecture: variability and interdependence," *American Journal of Human Biology*, vol. 18, no. 6, pp. 845–848, 2006.
- [168] K. Legerlotz, H. K. Smith, and W. a Hing, "Variation and reliability of ultrasonographic quantification of the architecture of the medial gastrocnemius muscle in young children.," *Clinical physiology and functional imaging*, vol. 30, no. 3, pp. 198–205, May 2010.
- [169] K. Kubo, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, "Gender differences in the viscoelastic properties of tendon structures.," *European journal of applied physiology*, vol. 88, no. 6, pp. 520–6, Feb. 2003.
- [170] Y. Kawakami, T. Abe, S. Y. Kuno, and T. Fukunaga, "Training-induced changes in muscle architecture and specific tension.," *European journal of applied physiology and occupational physiology*, vol. 72, no. 1–2, pp. 37–43, Jan. 1995.
- [171] M. Ben and L. a Harvey, "Regular stretch does not increase muscle extensibility: a randomized controlled trial.," *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, vol. 20, no. 1, pp. 136–44, Feb. 2010.
- [172] M. Samukawa, M. Hattori, N. Sugama, and N. Takeda, "The effects of dynamic stretching on plantar flexor muscle-tendon tissue properties.," *Manual therapy*, vol. 16, no. 6, pp. 618–22, Dec. 2011.

- [173] Y. Kawakami, H. Kanehisa, and T. Fukunaga, "The relationship between passive ankle plantar flexion joint torque and gastrocnemius muscle and achilles tendon stiffness: implications for flexibility.," *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, vol. 38, no. 5, pp. 269–76, May 2008.
- [174] C. N. Maganaris, "Force-length characteristics of the in vivo human gastrocnemius muscle.," *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, vol. 16, no. 3, pp. 215–23, May 2003.
- [175] E. Kato, T. Oda, K. Chino, and T. Kurihara, "Musculotendinous Factors Influencing Difference in Ankle Joint Flexibility between Women and Men," no. 2003, pp. 218–225, 2005.