

Fisioter Bras 2016;17(3):227-35

ARTIGO ORIGINAL

Imobilização de músculos esqueléticos de ratos desnutridos

Skeletal muscle immobilization in malnourished rats

Marcos Fábio de Abreu, M.Sc.*, Daiane Cristofolotti*, Bruno Ferreira Gonçalves e Silva**, Carlos Alberto da Silva, D.Sc.***

*Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPG Ft, UNIMEP) Piracicaba, **Graduando em medicina veterinária (UNIP Campinas), ***Professor do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia UNIMEP, Piracicaba/SP

Recebido em 12 de agosto de 2015; aceito em 20 de fevereiro de 2016.

Endereço de correspondência: Carlos Alberto da Silva, Universidade Metodista de Piracicaba, Faculdade de Ciências da Saúde - PPG-FT, Rodovia do Açúcar, Km 156 Campus Taquaral, 13400-901 Piracicaba SP, E-mail: casilva@unimep.br

Resumo

Introdução: Muitos estudos são realizados no intuito de aprimorar metodologias de tratamento fisioterapêutico, no entanto não se considera o estado nutricional do paciente, mesmo sabendo que a desnutrição, principalmente a proteico calórica, causa danos irreversíveis ao organismo. A imobilização é uma prática terapêutica utilizada rotineiramente por diversos profissionais frente a lesões músculo esqueléticas. **Objetivo:** Analisar o efeito da imobilização (7 dias) em ratos normais (dieta normoproteica, 45 dias) e desnutridos (dieta hipoproteica, 45 dias). **Material e métodos:** Os animais foram imobilizados com órtese de acrílico mantendo o tornozelo na posição de 90°. Para o período de remobilização, consideraram-se 7 dias após a retirada da órtese. Foi realizada a avaliação do conteúdo de glicogênio e a razão proteína total/DNA segundo kit de aplicação laboratorial e os dados foram comparados através de Anova Two Way e pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. **Resultados:** Foram observadas pequenas reservas glicogênicas tanto no grupo imobilizado quanto no grupo desnutrido antes e após a imobilização. Cabe ressaltar que na remobilização do grupo controle houve recuperação parcial das reservas, fato que não ocorreu no grupo desnutrido. **Conclusão:** A desnutrição causa um déficit no sistema músculo esquelético sendo acentuado na imobilização, possivelmente por haver também comprometimento nos processos de regeneração.

Palavras-chave: desnutrição, imobilização, atrofia muscular, glicogênio, ratos.

Abstract

Introduction: Many studies are performed in order to improve methods of physical therapy treatment, but do not consider the nutritional status of the patient, knowing that malnutrition, especially protein caloric, causes irreversible damage to the body. Immobilization is a therapeutic practice routinely used by many professionals to treat musculoskeletal disorders. **Objective:** The aim of this study was to analyze the effect of immobilization (7 days) in normal (normal diet, 45 days) and malnourished (low-protein diet, 45 days) rats. **Methods:** The animals were immobilized with acrylic splint maintaining the ankle at 90°. As remobilization period was considered 7 days after removal of the stent. We conducted the evaluation of glycogen content and the ratio total protein/DNA according to laboratory kit and laboratory data were compared using Two Way Anova and Tukey post-test, $p < 0.05$. **Results:** Results showed small glycogen reserves in both the fixed and in the malnourished group before and after immobilization. In the remobilization in the control group, there was a partial recovery of reserves, which did not occur in the malnourished group. **Conclusion:** Malnutrition causes a deficit in the musculoskeletal system which is accentuated during immobilization and may be compromised in the process of regeneration.

Key-words: malnutrition, immobilization, muscle atrophy, glycogen, rats.

Introdução

Muitos estudos são realizados na fisioterapia em busca de melhores resultados para cada tratamento, porém não se considera o estado nutricional do paciente. Contudo dever-se-ia levar em consideração o estado nutricional, haja vista que a desnutrição, principalmente a proteico calórica, pode causar danos irreversíveis ao organismo [1-4].

A desnutrição proteica calórica, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é como uma variedade de condições patológicas decorrente das deficiências de energia e proteínas em proporções variadas, sendo ela uma das principais causas de mortalidade infantil no Brasil. Isso se dá devido à nutrição proteica estar relacionada a funções importantes como formação de enzimas, anticorpos, hormônios, equilíbrio ácido básico, transporte de oxigênio, coagulação do sangue e atividade muscular [5-7].

Assim, a desnutrição afeta o crescimento e desenvolvimento orgânico do sistema nervoso resultando em menor tamanho cerebral, menor número de células, menor quantidade de lipídios, redução da mielina e alterações na atividade de vários sistemas enzimáticos [8-10].

Na imobilização musculoesquelética, observam-se alterações representadas pela perda funcional acompanhada de perda de massa muscular [11]. A atrofia do músculo esquelético decorrente da imobilização ocorre pela diminuição da síntese e conseqüentemente aumento na degradação proteica, associado ao aumento do tecido conectivo, fatores associados que induzem o comprometimento funcional [12,13]. Os estudos dos efeitos metabólicos locais e sistêmicos da imobilização se revestem de grande importância por fornecer as informações necessárias para a compreensão e intervenção terapêutica nas situações de privação da mobilidade de partes do corpo merecendo destaque as entorses, fraturas ósseas, rupturas ligamentares, tendíneas e de outros tecidos moles [14,15].

Objetivo

Avaliar o comportamento metabólico do músculo esquelético remobilizado após 7 dias de imobilização em ratos controle e desnutridos.

Material e métodos

Foram utilizados 36 ratos *albinus*, Wistar, com 21 dias de idade, divididos em grupos experimentais e tratados com dieta normoproteica ou hipoproteica durante 45 dias. Os animais foram alimentados com dieta especial e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura constante ao redor de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro escuro controlado de 12 h, manejados de acordo com o guia de tratamento de animais de laboratório do National Research Council, 1996 e aprovado pelo CEUA – UNIMEP sob nº 09/2015.

Tabela I – Distribuição dos ratos em grupos experimentais (n = 6).

n	
6	Controle (dieta normoproteica durante 45 dias)
6	Imobilizados por 7 dias
6	Remobilizados (avaliados 7 dias após retirada da órtese)
6	Desnutridos (alimentados com dieta hipoproteica durante 45 dias)
6	Desnutridos imobilizados (submetidos a imobilização durante 7 dias)
6	Desnutridos remobilizados (avaliados 7 dias após retirada da órtese)

Imobilização

A imobilização foi realizada utilizando uma órtese de resina acrílica, a qual manteve a articulação do tornozelo em posição de 90º, permitindo que as articulações do joelho e quadril permanecessem livres conforme modelo descrito por Silva et al. [12]. Consideramos os períodos experimentais como sendo períodos agudos, pois Von Deutsch et al. [16] relataram que até 7 dias de imobilização ainda é considerado dessa forma. Neste sentido, como protocolo de remobilização, os animais tiveram a órtese retirada locomovendo-se livremente pela caixa.

Protocolo de desnutrição e recuperação nutricional

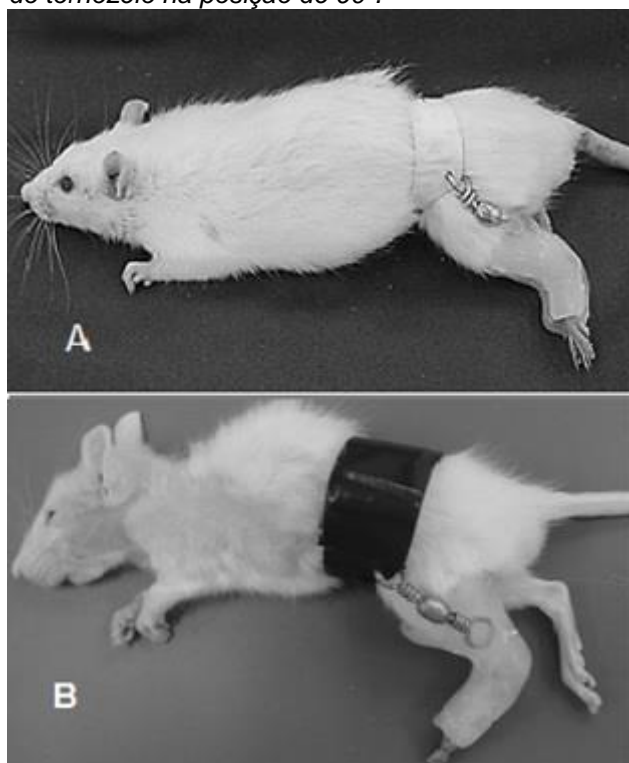
Durante o experimento foram empregadas dietas normoproteica (AN 93M - 14%) e hipoproteica (AN - 6%) comercializada pela PragSoluções Serviços e Comércio; (composição descrita na tabela II).

Tabela II - Composição das dietas (g/kg) utilizadas para desnutrição sendo AN93 M -14% normoproteica e AN-6% hipoproteica.

Dieta AN 93 M - 14%		Dieta NA - 6%	
Ingredientes	p 1 kg	Ingredientes	p 1 kg
Amido de milho	465.000	Amido de milho	508.000
Caseína	140.000	Caseína	66.000
Amido destrinado	155.000	Amido destrinado	166.500
Sacarose	10.000	Sacarose	121.000
Óleo de soja	40.000	Óleo de soja	40.000
Fibra (Cel. microcrist)	50.000	Fibra (Cel. microcrist)	50.000
L-cistina	1.800	L-cistina	1.800
Cloreto colina	2.500	Cloreto colina	2.500
Mix mineral G	35.000	Mix mineral G	35.000
Mix vitamínico	10.000	Mix vitamínico	10.000
Total	1000.0	Total	1000.0

Para a determinação do conteúdo muscular de glicogênio foi utilizado o método do fenol sulfúrico segundo Siu *et al.*[17]. Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido. Para determinação do conteúdo de proteínas totais, foi utilizado o método do biureto e os valores são expressos em mg/mL, por sua vez, para a determinação da concentração de DNA foi utilizado o método da difenilamina em que o homogenato tecidual é submetido à presença de uma solução de difenilamina e posteriormente a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm segundo o método proposto por Giles e Myers [18]. Na análise estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (Anova) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Figura 1 - Em (A) observa-se a órtese de resina acrílica composta de uma bota de acrílico, rotadores e cinta abdominal aplicados em rato controle (tratado 45 com dieta contendo 14% de proteína). Em (B) pode-se observar a órtese adaptada ao corpo do rato desnutrido (tratado com dieta contendo 6% de proteína por 45 dias). Cabe ressaltar que a órtese manteve a articulação do tornozelo na posição de 90°.



Resultados

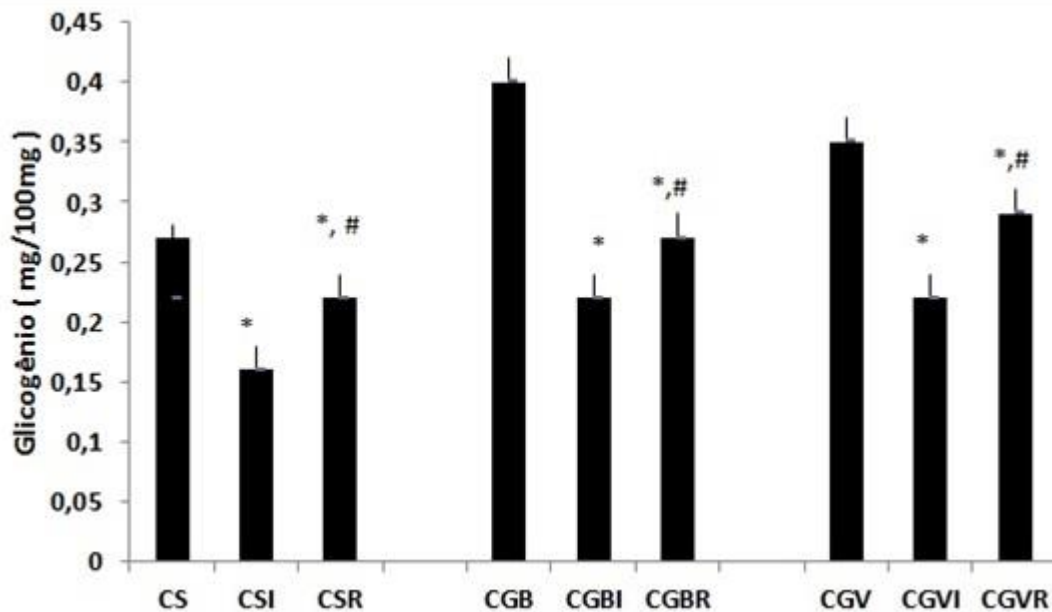
Apresenta-se inicialmente uma fotografia dos animais controle e desnutridos imobilizados pela órtese, para que sejam observadas as condições orgânicas diferenciais, principalmente no que se refere ao animal desnutrido (figura 1).

Um consenso na literatura científica é que a reserva muscular de glicogênio é imprescindível para a manutenção de condições energéticas ideais determinando a eficiência da contração muscular. Inicialmente foi avaliado o comportamento das reservas glicogênicas no grupo controle no qual se destaca que o músculo sóleo (fibra tipo I), apresentou diminuição significativa de 36% nas reservas em decorrência da imobilização. Cabe ressaltar que após o período de remobilização de 7 dias, as reservas glicogênicas ainda apresentavam-se 21% menores do que o controle, porém recuperadas em 22% se comparado ao grupo imobilizado (figura 2).

Alterações nas reservas glicogênicas também foram constatadas no músculo gastrocnêmio porção branca e vermelha, além disso, foi observada diminuição das reservas em 49% e 42 %, respectivamente. Nestes músculos, também houve recuperação das reservas no período de remobilização atingindo valores 26% e 30%, se comparado ao imobilizado e da mesma forma que no sóleo ainda permaneceram 31% e 17% menores que o controle (figura 2).

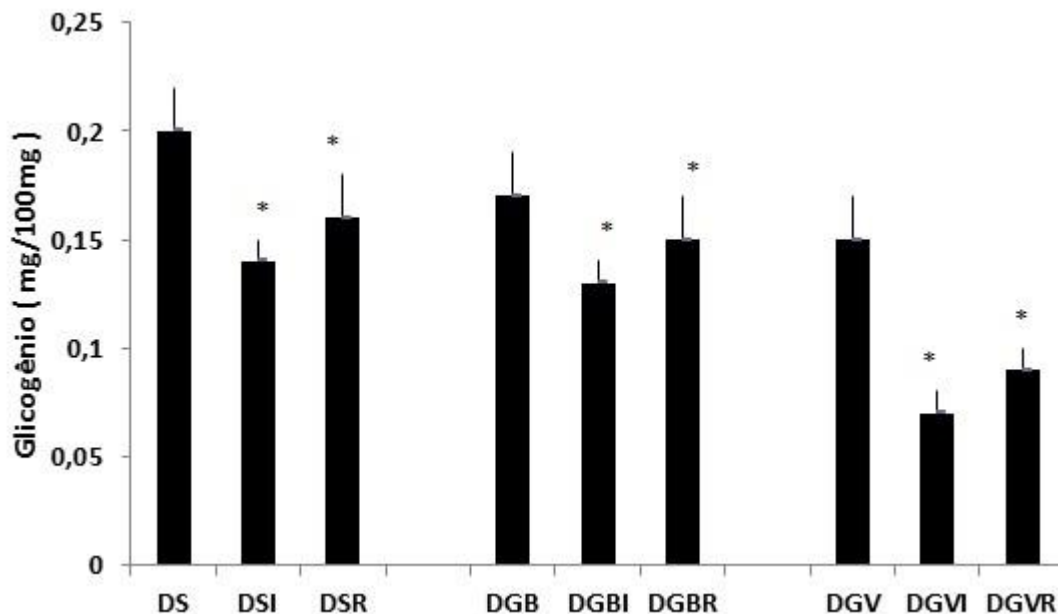
A seguir foi avaliado o efeito da desnutrição sobre as reservas glicogênicas, e observou-se que as reservas apresentaram-se 28,5% menores no sóleo, 56,4% no gastrocnêmio porção branca e 58,3% no gastrocnêmio vermelho se comparado ao grupo tratado com dieta normoproteica. Quando imobilizados, as reservas glicogênicas tornaram-se ainda menores atingindo valores 35% menores no sóleo e no gastrocnêmio porção branca e 53% no gastrocnêmio vermelho. Por outro lado, o evento mais expressivo foi observado na remobilização, condição em que não foi observada recuperação, não diferindo da condição imposta pelo desuso (figura 3).

Figura 2 - Concentração muscular de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) nas condições controle (C), imobilizado (I) e remobilizado (R). Os valores correspondem a média \pm epm, n = 10.



*p < 0,05 comparado ao controle e # p < 0,05 comparado ao imobilizado.

Figura 3 - Concentração muscular de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) nas condições desnutrido (D), imobilizado (I) e remobilizado (R). Os valores correspondem a média \pm epm, n = 10.



*p < 0,05 comparado ao controle.

Passou-se à avaliação do peso muscular, sendo escolhido o sóleo devido a melhor delimitação anatômica. Nesta condição, observou-se redução de 36% em decorrência da imobilização, havendo recuperação de 24% no peso na fase da remobilização. O peso foi alterado também na desnutrição, apresentou-se 69% menor do que do grupo tratado com dieta

normoproteica. Na condição de imobilização aplicada na desnutrição foi observada redução de 27% devido à imobilização e recuperação de 11% na fase de remobilização (tabela III).

No intuito de aprimorar a análise, optou-se por avaliar a relação proteína total/DNA (PT/DNA), observando-se que a imobilização no grupo controle promoveu redução de 25,2% com elevação de 10% no período de remobilização. Por sua vez, a relação PT/DNA determinada no grupo desnutrido mostrou-se 52% menor se comparado ao controle. Nesta condição a imobilização promoveu redução de 14% na relação a condição não imobilizado e, ainda, houve recuperação de 6% na fase de desmobilização (tabela III).

Tabela III - Peso (mg) e relação Proteína Total/DNA (PT/DNA, mg/100mg) no sóleo de ratos controle e desnutridos submetidos a imobilização e remobilização.

	Peso	PT/DNA
Controle	132,50 ± 2,1	2,42 ± 0,01
Imobilizado	84 ± 3,1	1,81 ± 0,01
Remobilizado	100,70 ± 3,8 [#]	2,00 ± 0,03 [#]
Desnutridos	40,7 ± 5,3	1,16 ± 0,06
Desnutridos imobilizados	29,6 ± 1,7 [*]	1,00 ± 0,01 [*]
Desnutridos remobilizados	33 ± 2,8 ^{**}	1,06 ± 0,02 ^{**}

Os valores correspondem à média ± DP, n = 6; *p < 0,05 comparado ao controle; #p < 0,05 comparado ao imobilizado, ?p < 0,05 comparado ao desnutrido.

Discussão

O músculo esquelético é um dos principais tecidos ligados ao controle glicêmico por apresentar mecanismos responsáveis pela captação, metabolização e reserva de glicose. Esta capacidade decorre da expressão gênica de transportadores do tipo 1 (Glut1) envolvido na captação basal da glicose e transportadores do tipo 4 (Glut4) cuja atividade mostra ser dependente da insulina e do aumento na atividade contrátil [19,20]. Cerca de 70 a 85% da glicose captada é direcionada a formação de reservatórios de glicogênio ou pode ainda ser oxidada para geração de energia [21]. Neste contexto, destaca-se que as reservas musculares de glicogênio são uma importante fonte de energia durante a atividade contrátil. Desta forma, flutuações no conteúdo, podem interferir no desempenho, ou seja, concomitante a elevação nas reservas observa-se melhora na resistência durante atividade física, porém, em pequenas quantidades participam dos processos associados à fadiga muscular [22].

Hirose *et al.* [23] estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90º, durante sete dias, e verificaram redução na transdução do sinal insulínico, sugerindo déficit na ativação do receptor e nas enzimas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a ativação da PI3-K, demonstrando que o quadro de resistência à insulina, também pode ser desencadeado na imobilização. Essa alteração na dinâmica de sinalização da insulina pode explicar os resultados deste estudo, no qual foi observado que, sob condição aguda de imobilização, houve redução nas reservas musculares de glicogênio.

O presente estudo mostra que, no músculo sóleo, houve redução significativa no conteúdo de glicogênio somente a partir do segundo dia do desuso. Neste sentido, Ploug [24], estudando o comportamento metabólico de músculos vermelhos submetidos a um curto período de imobilização (48 horas) verificaram diminuição significativa na população dos transportadores Glut1 e Glut4 além da redução na atividade das vias glicogênicas e sugeriram o desenvolvimento do quadro de resistência no desuso. Ainda com relação às reservas musculares de glicogênio, demonstramos que no músculo gastrocnêmio porção branca (fibra tipo II), houve a maior redução no conteúdo se comparado ao sóleo (fibras tipo I). Neste sentido, há de se considerar que a órtese permitia a descarga de peso no membro imobilizado e este fato pode ter contribuído para a diferenciação do efeito se comparar ao músculo sóleo, uma vez que é um músculo postural. Assim, os dados deste estudo corroboram a literatura referendando que a órtese aqui utilizada como modelo de imobilização mostrou ser um modelo gerador de resistência à insulina comprometendo a homeostasia das vias metabólicas das fibras musculares.

Entre os anos 70 e 80, havia contradição quanto ao tipo de fibras mais susceptíveis à hipotrofia: alguns autores sugeriam que as fibras brancas (tipo II) eram mais susceptíveis [25], enquanto outros se referiram às fibras vermelhas (tipo I) como sendo as mais susceptíveis [26]. No entanto, há trabalhos que não evidenciaram qualquer diferença no comportamento dos diferentes tipos de fibras à hipotrofia [27,28]. Em 1986, Appell [29] verificou que o decréscimo

mais pronunciado do diâmetro das fibras ocorre durante a primeira semana de imobilização e em estudos realizados com animais e com tempos de imobilização variáveis, foi demonstrado que as fibras tipo I foram as que apresentaram sinais mais evidentes de hipotrofia, sugerindo que tal fato ocorre devido à redução da atividade das enzimas oxidativas como reiterado por [30]. Neste sentido, os diferentes trabalhos se diferenciam quanto ao período de desuso avaliado e nossos resultados mostram que já existem alterações significativas desencadeadas precocemente, ou seja, nos primeiros dias do desuso. Cabe salientar que a homeostasia energética do músculo gastrocnêmio branco já ficou comprometida nos primeiros dias da imobilização

A escolha de direcionar o estudo à posição do tornozelo a 90° se deve ao fato de ser a posição anatômica mais utilizada na clínica ortopédica e também pela existência de trabalhos que mantiveram o tornozelo imobilizado nessa posição. Nestes trabalhos, as articulações do quadril e joelho também estavam imobilizadas, diferenciando de nossa proposta na qual a articulação do joelho e quadril se mantiveram livres [23,24,31]. Dentro destas considerações, a órtese foi capaz de promover na musculatura, alterações metabólicas e na taxa proteína total/DNA indicando o desenvolvimento de proteólise, uma vez que esta relação serve como índices de tamanho celular.

Recentemente Herrera *et al.* [32] estudaram a inatividade muscular em membros posteriores de ratos e observaram que o músculo sóleo sofreu hipotrofia mais evidente que o músculo extensor longo dos dedos, apontando a provável relação com o tipo de fibra e função muscular durante a condição normal de descarga de peso. Tanaka *et al.* [33] também associaram o tipo de fibras ao grau de hipotrofia muscular, e como o sóleo possui um maior número de fibras tipo I e o extensor longo dos dedos mais fibras do tipo II, o primeiro músculo sofre mais durante a imobilização, devido à menor solicitação das fibras posturais [24].

Dentro desta linha de raciocínio, observamos que o músculo gastrocnêmio porção branca foi o mais afetado pela imobilização e possivelmente deve-se ao fato de ser bi-articular e neste modelo de desuso, apresentar limitação na sua condição fisiológica. Assim, por haver descarga de peso, o músculo sóleo recebia estímulo constante enquanto o animal deambulava. Uma vez que tem sido descrito que frente à elevação da atividade contrátil há elevação na captação de glicose decorrente da translocação de transportadores Glut4, é sugestivo o fato que o sóleo adquire um status energético diferenciado dos outros músculos, razão pela qual os dados diferem do consenso presente na literatura.

Concomitante ao comprometimento das reservas energéticas, a relação proteína total/DNA muscular também foi comprometida pela imobilização do membro, sendo significativa a partir do 2º dia e com especificidade no músculo gastrocnêmio porção branca, reiterando que dentro da especificidade deste modelo de imobilização as fibras brancas foram afetadas precocemente.

Conclusão

O estudo mostra a importância em se considerar o estado nutricional do paciente, pois esse pode influenciar na eficiência terapêutica. Conforme demonstrado, a imobilização promove dano estrutural e funcional em maior intensidade se houver o quadro de desnutrição, já que nesta condição há comprometimento na recuperação do tecido lesado.

Referências

1. Crace CJ, Swenne I, Khon PG, Strain J, Milner RDG. Protein energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. *Diabetes Metabolism* 1995;16:484-91.
2. Monte CMG. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil Undernourishment: a century old challenge to infant nutrition. *J Pediatr* 2000;76 (Supl3):S285-S97.
3. Galdino R, Mello MAR, Almeida RL, Almeida CCS. Desnutrição proteico-calórica. In: Dâmaso A, ed. *Nutrição e exercício na prevenção de doenças*. Medsicc 2001;1:225-75.
4. Lima AM, Gamallo SMM, Oliveira FLC. Protein-energy malnutrition during hospital stay: physiopathology and treatment. *Rev Paul Pediatr* 2010;28(3):353-61.
5. Neiva CM, Guerino MR, Mello MAR. Análise dos efeitos da desnutrição proteico-calórica sobre as respostas ao exercício agudo (single session) parâmetros metabólicos. *Motriz* 1999;1(1):32-43.

6. Levitasky DA, Strupp BJ. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr Bethesda* 1995;125: 2212-20.
7. Fraga JAA, Varela SS. The relationship between malnutrition and child development. *Rev Assoc Bras Nutr* 2012;4(5):59-62.
8. Moysés APA, Lima GZ. Fracasso escolar, um fenômeno complexo: Desnutrição apenas mais um fator. *Pediatr (São Paulo)* 1983;5(4):263-9.
9. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:471-83.
10. Lukoyanov NV, Andrade JP. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res* 2000;112(1-2):85-97.
11. Brito VC, Oliveira BDR, Moraes SRA. Effects of immobilization on rat skeletal muscle tissue. *J Morphol Sci* 2011;28(4):217-21.
12. Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:979-85.
13. Polizello JC, Carvalho LC, Freitas FC, Padula N, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Morphological effects of resumption of loading after immobilization of skeletal muscles in lengthened position in female rats. *Rev Bras Fisioter* 2011;15(1):73-9.
14. Durigan JLD, Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação. *Fisioter Mov* 2005;18(4):53-62.
15. Oliveira PD, Gomes CRG, Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, Bertolini SMMG. Histomorphometric alterations of muscle soleus provoked by drawn out immobilization: experimental study with Wistar lineage rats. *Fisioter Mov* 2015;28(2):289-95.
16. Von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Wineski LE, Silvestrov NA, Bayorh MA, Potter DE. Changes in muscle proteins and spermidine content in response to unloading and clenbuterol treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81(1):28-39.
17. Siu LO, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970;28(2):234-36.
18. Giles KW, Myers K. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965;206(4979):93-4.
19. Kern MJ, Wells JA, Stephens JM, Elton CW, Friedman J, Tapscott EB et al. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determinate by glucose transporter (GLUT 4) protein level. *Biochem J* 1990;270:397-400.
20. Machado UF, Beatriz D, Schaan BD, Seraphim PM. Glucose transporters in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(2):177-89.
21. Henriksen EJ, Holloszy JO. Effects of phenylarsine oxide on stimulation of glucose transport in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1990;258(4 Pt 1):C648-C653.
22. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(4):665-79.
23. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279(6):1235-41.
24. Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995;268:E980-6.
25. MacDougall JD, Elder GC, Sale DG, Moroz JR, Sutton JR. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. *Eur J Appl Physiol* 1980;43:25-34.
26. Booth FW, Seider MJ. Recovery of skeletal muscle after 3 mo. of hindlimb immobilization in rats. *J Appl Physiol* 1979;47(2):435-9.
27. Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. *J Anat (London)* 1978;127:459-68.
28. Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984;138:343-504.
29. Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization. *Sports Med* 1990;7:42-58.

30. Alves AP, Dâmaso AR, Pai VD. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J Pediatr* 2008;84(3):264-71.
31. Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:512-7.
32. Herrera NM, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2001;82(7):930-34.
33. Tanaka T, Kariya Y, Hoshino Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. *J Orthop Sci* 2004;9(1):76-85.