

EFEITOS DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO ASSOCIADOS AO ALONGAMENTO ESTÁTICO SOBRE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS LONGITUDINAIS DE SÓLEOS IMOBILIZADOS DE RATOS



EFFECTS OF THERAPEUTIC ULTRASOUND ASSOCIATED WITH STATIC STRETCHING ON LONGITUDINAL HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF IMMOBILIZED SOLEUS OF RATS

Elisângela Lourdes Artifon^{1,2}

Deisi Ferrari¹

Daniela Martins Cunha¹

Cassiane Merigo Nascimento¹

Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro³

Gladson Ricardo Flor Bertolini¹

1. Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) – Campus de Cascavel.

2. Bolsista PIBIC/CNPq/Unioeste.

3. Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas – Unioeste – Campus de Cascavel.

Correspondência:

Gladson Ricardo Flor Bertolini

Rua Universitária, 2.069, Jardim

Universitário, Colegiado de

Fisioterapia, Campus de Cascavel

Cx. Postal 711 – 85819-110

E-mail: gladson_ricardo@yahoo.com.br

RESUMO

O músculo é um tecido dotado de plasticidade que se adapta a diferentes estímulos. A imobilização causa danos ao sistema muscular incluindo atrofia, perda da extensibilidade e resistência muscular. O alongamento muscular e o ultrassom terapêutico são modalidades utilizadas para acelerar o processo de reparo muscular, provendo aumento da síntese proteica e melhora da extensibilidade. Objetivo: Comparar o uso do ultrassom terapêutico, associado ao alongamento, na remobilização de músculo sóleo, de ratos, submetido ao encurtamento muscular, sobre os aspectos histomorfológicos longitudinais. Materiais e métodos: Vinte e oito ratos Wistar foram imobilizados por 15 dias e, após liberados do aparato de imobilização, distribuídos em quatro grupos: grupo (GA) apenas remobilizado por alongamento durante 10 dias; e os demais foram submetidos a 10 dias de intervenção terapêutica do ultrassom de 1MHz a 1,0W/cm² (GAUS 1,0); 0,5W/cm² (GAUS 0,5); e 0,2W/cm² (GAUS 0,2), e posterior alongamento dos músculos sóleos. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram seus músculos removidos para posterior análise histológica dos parâmetros longitudinais (contagem de sarcômeros). Resultados: Na análise intragrupo, quanto ao comprimento muscular, apenas o grupo GAUS 0,5 não teve diferença significativa. Quanto à contagem de sarcômeros, os grupos GA e GAUS 0,2 tiveram diferença significativa. Quanto ao tamanho dos sarcômeros, nenhum grupo teve diferença significativa. Na análise intergrupos, nenhum grupo apresentou diferença significativa. Conclusão: O alongamento foi insuficiente para reverter os efeitos da imobilização. Quando associado ao ultrassom terapêutico, a dose 0,5W/cm² recuperou o comprimento muscular, e as doses 1,0 e 0,5W/cm² contribuíram para o aumento da quantidade dos sarcômeros em série.

Palavras-chave: imobilização, alongamento passivo, músculo esquelético, sarcômeros.

ABSTRACT

The muscle tissue is endowed with plasticity that adapts to different stimuli. Immobilization causes damage to the musculature including atrophy, loss of muscle strength and extensibility. The stretching and ultrasound treatment modalities are used to speed up muscle repair process as they can increase protein synthesis and improve extensibility. Objective: To compare the use of therapeutic thermal and non thermal ultrasound, associated with stretching, in the remobilization of the soleus muscle of rats subjected to position of muscle shortening on aspects histomorphometric longitudinal muscle. Methods: 28 rats were immobilized for 15 days, later released from the apparatus and divided into four groups: group AG only remobilized by stretching for 10 days and the others were subjected to 10 days of therapeutic intervention 1MHz of ultrasound at 1.0W/cm² (GAUS 1.0), 0.5W/cm² (GAUS 0.5), and 0.2 W/cm² (GAUS 0.2), and further stretching to the soleus. At the end of treatment, the animals were sacrificed and their soleus muscles were removed for later histological analysis of longitudinal parameters (count of sarcomeres). Results: At intragroup analysis on the muscle length, only the group GAUS 0.5 did not present significant difference. The count of sarcomeres in the groups GA and GAUS 0.2 was statistically different. The size of the sarcomeres in both groups had no statistically significant difference. In inter-group analysis both groups had no statistically significant difference for any of the variables. Conclusion: The stretching was insufficient to reverse the effects of immobilization. When associated with therapeutic ultrasound, the dose 0.5 W/cm² recovered muscle length significantly, and the doses 1.0 and 0.5 W/cm² contributed to the significant increase of the number of sarcomeres in immobilized muscles.

Keywords: immobilization, passive stretching, skeletal muscle, sarcomeres.

INTRODUÇÃO

Apesar de ser um recurso bastante utilizado para a reabilitação de lesões, a imobilização acarreta diversos prejuízos ao sistema musculoesquelético¹. Um curto período de imobilização (sete dias) já é suficiente para que o músculo sofra adaptações morfológicas e mecânicas como redução da massa e comprimento musculares, do número de sarcômeros, aumento da densidade do tecido conjuntivo e redução da resistência máxima de ruptura muscular²⁻⁴. O aumento de tecido conjuntivo induz a ligações cruzadas anormais das fibras de tecido conjuntivo, o que resulta em rápida rigidez muscular e redução de amplitude de movimento^{1,5}.

Contra esses efeitos deletérios, o alongamento previne a atrofia muscular, a proliferação de tecido conjuntivo e a perda de sarcômeros em série, além da possibilidade de ativar a síntese proteica e induzir hipertrofia e hiperplasia muscular¹. Alguns autores alegam que alongamento passivo com tempo de 30 segundos é suficiente para obter uma maior mobilidade, enquanto outros autores não encontraram nenhum efeito⁶. O alongamento muscular promove um acúmulo de miosina RNAm oxidativa lenta na terminação das fibras que ajudam na síntese de proteínas contráteis, na rápida união de sarcômeros e na extensão das miofibrilas. Em especial, um grande espaço citoplasmático contendo polissomas abre-se entre as miofibrilas e o sarcolema da junção miotendínea de fibras alongadas e muitas miofibrilas são encontradas⁷.

O ultrassom terapêutico (UST) é um recurso comumente aplicado nos distúrbios do sistema musculoesquelético, bem como na aceleração do reparo tecidual de lesões musculares, aumento da proliferação celular e síntese proteica durante a cicatrização, além de ter efeito na circulação sanguínea. Este recurso se utiliza de ondas sonoras de alta frequência para penetrar profundamente tecidos moles⁸⁻¹⁰. A possibilidade de usar diferentes frequências entre 1 e 3MHz é importante na medida em que as frequências mais altas (3MHz) são absorvidas mais intensamente, tornando-as mais específicas para o tratamento de tecidos superficiais, enquanto que as frequências mais baixas (1MHz) penetram mais profundamente, devendo ser usadas para os tecidos mais profundos¹⁰.

Os efeitos do ultrassom são classificados em térmicos e não térmicos. Ter Haar^{11,12} relata que, dentre os efeitos não térmicos do ultrassom, à medida que as ondas mecânicas do ultrassom atravessam os tecidos elas provocam agitação das moléculas, o que confere maior permeabilidade das membranas teciduais, permitindo, assim, melhor troca de seus nutrientes e remoção de catabólitos. Além disso, pelos efeitos não térmicos (mecânicos) do ultrassom, tem-se melhora do metabolismo celular, além do auxílio na liberação de aderências, pela separação das fibras colágenas¹³. Já quanto aos efeitos térmicos, tem-se o aquecimento dos tecidos, o qual proporciona inúmeros benefícios fisiológicos, principalmente o aumento do fluxo sanguíneo na área a ser tratada, aumento da extensibilidade do colágeno, diminuição da rigidez articular, alívio da dor e diminuição de espasmos musculares^{11,12}.

Na prática clínica fisioterapêutica, o ultrassom e o alongamento são recursos bastante utilizados, porém muitas vezes não se tem conhecimento dos reais efeitos no nível celular destas modalidades, neste caso, sobre a fibra muscular. Sabendo-se disso e dos efeitos deletérios da imobilização sobre as fibras musculares, torna-se importante compreender as implicações dos mesmos na recuperação do músculo encurtado, para assim transpor estas informações à clínica.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar e comparar o uso de alongamento associado, ou não, ao uso do ultrassom terapêutico térmico e não térmico, na remobilização do músculo sóleo, de ratos, submetido à posição de encurtamento muscular, a respeito dos aspectos histomorfométricos longitudinais destes músculos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 28 ratos machos albinos da linhagem Wistar, com 10 ± 2 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). O estudo conduziu-se segundo as Normas Internacionais de Ética na Experimentação Animal¹⁴ e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Estudos com Animais da Unioeste. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições ambientais controladas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com acesso a água e ração *ad libitum*.

Todos os animais tiveram o membro posterior direito imobilizado em flexão plantar máxima, por 15 dias consecutivos, e posteriormente foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos com sete animais cada para a intervenção terapêutica:

GA (Grupo Alongamento): no qual, após o período de imobilização, os animais foram submetidos ao protocolo de alongamento estático do músculo sóleo;

GAUS 1,0 (Grupo Alongamento e UST de $1,0\text{W}/\text{cm}^2$): grupo em que os animais foram submetidos ao protocolo de tratamento com UST e, logo em seguida, ao protocolo de alongamento estático;

GAUS 0,5 (Grupo Alongamento e UST de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$): semelhante ao grupo anterior, porém com dose de $0,5\text{W}/\text{cm}^2$;

GAUS 0,2 (Grupo Alongamento e UST de $0,2\text{W}/\text{cm}^2$): semelhante aos grupos anteriores, porém com dose terapêutica de $0,2\text{W}/\text{cm}^2$.

Protocolo de imobilização

Para realizar o estudo, utilizou-se como aparato de imobilização o modelo desenvolvido por Coutinho *et al.*¹⁵, o qual visa obter o encurtamento do músculo sóleo. Para tanto, a articulação do tornozelo foi imobilizada em flexão plantar máxima. A posição de encurtamento foi escolhida por ser a que provoca maiores prejuízos à função muscular¹⁶. Os animais foram diariamente observados, durante os 15 dias de imobilização, a fim de observar possíveis danos ao aparato. Após a retirada da imobilização, os ratos foram pesados e submetidos à tricotomia do membro posterior direito na região do músculo tríceps sural (sóleo).

Protocolo de aplicação do ultrassom

Para a realização da terapia com ultrassom foi utilizado o aparelho Sonopulse da marca Ibramed[®], com frequência de 1,0MHz e dose de $1,0\text{W}/\text{cm}^2$, $0,5\text{W}/\text{cm}^2$, $0,2\text{W}/\text{cm}^2$, respectivamente aos grupos GAUS 1,0, GAUS 0,5 e GAUS 0,2, durante três minutos sobre a região de sóleo, do membro posterior direito, por um período de 10 dias, com intervalo de dois dias ao final de semana. Para aplicação do mesmo, utilizou-se um contensor artesanal na imobilização, para minimizar o estresse sofrido pelo animal.

Protocolo de alongamento

Para efetuar a técnica de alongamento no músculo sóleo, a articulação do tornozelo foi mantida, manualmente, em flexão dorsal máxima, durante todo o período de alongamento, no limite da tensão tecidual. A intervenção consistiu em três séries de 30 segundos, com intervalo de repouso de 30 segundos entre as séries, durante 10 dias. Igualmente, houve o descanso de dois dias ao final de semana.

Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, todos os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação em guilhotina. Logo após, isolou-se os músculos sóleos direito (tratado) e esquerdo (controle) para a limpeza e pesagem em balança analítica (Shimadzu[®]). Em seguida, os músculos foram fixados em uma placa de isopor, em seu comprimento de repouso, para aferição do comprimento utilizando-se paquímetro analógico (Mitutoyo[®]) e posterior preparo das lâminas para análise histológica.

Preparo das lâminas e análise histológica

Após a fixação em placas de isopor, os músculos foram mergulhados em formol (10%) durante três horas, para fixação dos tecidos. Após esse período, os mesmos foram imersos em ácido nítrico (30%) por 72 horas, visando a quebra do tecido conjuntivo e, em seguida, armazenados em solução de glicerol (50%)¹⁷.

Posterior a esse procedimento, os músculos foram colocados em uma placa de Petri e, com o auxílio de lente ótica (Micronal[®]), isolou-se nove fibras musculares, com auxílio de pinças com pontas ultrafinas. As fibras isoladas, então, foram posicionadas sobre lâminas histológicas envernizadas. Das nove fibras selecionadas, cinco foram utilizadas para a contagem do número de sarcômeros em série (elegendo-se as com melhor aspecto visual), no decorrer de 50µm em seis campos não consecutivos, totalizando uma 300µm de análise.

Para realizar a análise, utilizou-se um microscópio de luz comum (Olympus[®]), com objetiva com magnificação do campo de visualização em 40 vezes, acoplado a uma câmera DCE-s, com a qual digitalizou-se as imagens, e com o auxílio do programa Image-Pro-Plus 3.0, foi realizada a contagem dos sarcômeros na distância correspondente a 50µm.

Realizou-se o cálculo de regra de três simples para estimar o total de sarcômeros em série no músculo analisado. As variáveis consideradas incluíram comprimento muscular do sóleo, tamanho e número de sarcômeros em série.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste *t* de Student (para comparação dentro dos grupos) e ANOVA (para comparação entre grupos), com pós-teste de Tukey. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5%.

RESULTADOS

Análise intragrupo

Com base nos parâmetros histomorfométricos longitudinais, dos músculos sóleos imobilizados de ratos Wistar, não houve diferença quando se comparou músculo esquerdo (controle) e direito (experimental, imobilizado e alongado com prévia aplicação de ultrassom 0,5W/cm²), (tabela 1. Quanto ao comprimento muscular, na análise intragrupo, apenas o grupo GAUS 0,5 não apresentou diferença significativa. Em relação à contagem de sarcômeros, os grupos GA e GAUS 0,2 tiveram diferença significativa entre os músculos direito (tratado) e esquerdo (controle). Enfim, quanto ao tamanho dos sarcômeros, nenhum dos grupos apresentou diferença significativa.

Análise intergrupos

Os resultados mostrados na análise entre os diferentes grupos de tratamento (GA, GAUS 0,2, GAUS 0,5 e GAUS 1,0) não apresentaram diferença estatisticamente para nenhuma das variáveis analisadas.

DISCUSSÃO

O comprimento funcional de um músculo é importante para influenciar as suas propriedades contráteis¹⁸⁻²⁰ e determinar se o músculo adiciona ou perde sarcômeros^{20,21}.

No presente estudo, apenas o grupo imobilizado e alongado com prévio ultrassom terapêutico na dose de 0,5W/cm² não apresentou diferença estatisticamente significativa, em relação à quantidade de sarcômeros em série e comprimento muscular, quando comparado o músculo imobilizado e o não imobilizado; ou seja, essa dose associada ao alongamento apresentou efeitos positivos quanto à recuperação dos efeitos deletérios causados pela imobilização. Costa *et al.*²² relatam que o ultrassom produz aumento de temperatura nas estruturas

Tabela 1. Resultado das variáveis comprimento muscular, quantidade de sarcômeros em série e tamanho dos sarcômeros, de acordo com o grupo avaliado, comparando os valores dos músculos sóleo direito (MID) com os do esquerdo (MIE).

	GAUS E	GAUS D	p<0,05
Comprimento do músculo	2,23 ± 0,14	2,05 ± 0,13*	p = 0,0250
Sarcômeros em série	11359,0 ± 77,640	9988,00 ± 1122,00*	p = 0,0393
Tamanho dos sarcômeros	1,97 ± 0,143	2,06 ± 0,01173	p = 0,2892
	GAUS 1,0 E	GAUS 1,0 D	p<0,05
Comprimento do músculo	2,24 ± 0,07	2,07 ± 0,12*	p = 0,0131
Sarcômeros em série	11668,00 ± 975,60	10793,00 ± 745,60	p = 0,1442
Tamanho dos sarcômeros	1,93 ± 0,13	1,92 ± 0,12	p = 0,9350
	GAUS 0,5 E	GAUS 0,5 D	p<0,05
Comprimento do músculo	2,13 ± 0,14	2,03 ± 0,12	p = 0,2016
Sarcômeros em série	11410,00 ± 793,30	10508,00 ± 895,40	p = 0,0728
Tamanho dos sarcômeros	1,86 ± 0,04	1,94 ± 0,012	p = 0,1636
	GAUS 0,2 E	GAUS 0,2 D	p<0,05
Comprimento do músculo	2,14 ± 0,09	2,04 ± 0,13*	p = 0,012
Sarcômeros em série	11234,00 ± 500,60	10359,00 ± 782,20*	p = 0,0491
Tamanho dos sarcômeros	1,90 ± 0,07	1,98 ± 0,14	p = 0,3171

* Diferença estatisticamente significativa.

musculares, proporcionando relaxamento muscular e alteração na viscoelasticidade. Tais propriedades podem ter influenciado no retorno do comprimento muscular para este grupo.

A vantagem da dose 0,5W/cm² pode estar ligada à presença dos efeitos não térmicos associados aos efeitos térmicos, os quais seriam responsáveis pela produção de uma alteração na permeabilidade da membrana e estimulação do transporte de substâncias, tais como os segundos mensageiros. Esses segundos mensageiros estimulam a proliferação de células satélites, as quais poderiam formar novas fibras em caso de morte da célula ou ajudariam no reparo de uma lesão focal⁹. Bertolini *et al.*²³ analisaram os efeitos do alongamento e do ultrassom, associados ou não, e verificaram que o alongamento passivo estático associado ao ultrassom terapêutico de 0,5W/cm² produziu alterações apenas no comprimento muscular em repouso, o qual foi aumentado, coincidindo com o resultado deste estudo.

A aplicação de UST 1,0W/cm², associada ao alongamento, não foi suficiente para restabelecer o comprimento muscular após imobilização. Para Garret *et al.*²⁴, para obter efeito térmico com a aplicação de ultrassom, são necessários, no mínimo, cinco minutos de aplicação. Sendo assim, o tempo de aplicação de ultrassom no presente estudo (três minutos) pode não ter sido suficiente para promover os efeitos térmicos desejados com a dose de 1,0W/cm².

Rantanen *et al.*⁸ não verificaram regeneração do tecido muscular pela aplicação de ultrassom não térmico. O mesmo foi verificado no presente estudo, no qual a dose não térmica de 0,2W/cm², não recuperou o comprimento muscular.

A síntese do DNA, do músculo, parece ser controlada por sua atividade contrátil^{25,26} e estímulos mecânicos, tais como alongamento^{27,28}. A imobilização em posição de encurtamento induz à atrofia e perda de proteína tecidual^{29,30}. Além disso, fatores promotores de crescimento não atuam no músculo imobilizado em posição de encurtamento e, portanto, perde sarcômeros e sofre atrofia²¹.

A perda do número de sarcômeros, em série, pode ser causada por um ajuste das fibras em suas extremidades, com sobreposição ideal

de actina e miosina em miofibrilas para desenvolver a tensão máxima em posição de encurtamento^{20,31}. No presente estudo, verificou-se que, apesar do alongamento, não houve reversão da diminuição da quantidade de sarcômeros em série, decorrente da imobilização em posição de encurtamento. Em estudos anteriores^{32,33}, o alongamento de curto período, por si só, também não normalizou a quantidade de sarcômeros em série comparando-se com o músculo controle.

A falta de resultados positivos no presente estudo quanto ao alongamento pode ser atribuída à falta de intervalos entre as intervenções com o mesmo, tendo em vista que outros estudos^{34,35} sugeriram que uma baixa frequência de alongamento impediria a degeneração e as alterações da fibra muscular. Sendo assim, o tempo de aplicação de alongamento, 30 segundos, realizado aqui, pode não ter sido suficiente. Além disso, a alta frequência de aplicação pode não ter disponibilizado tempo para recuperação muscular. Sugere-se, então, uma análise com o período de alongamento maior que 30 segundos, bem como dias de intervalo entre as aplicações.

Nos grupos em que foi utilizado alongamento associado ao UST 1,0 e 0,5W/cm² não se apresentaram diferenças significativas entre os membros direito e esquerdo, em relação à quantidade de sarcômeros; ou seja, foi revertido o efeito de redução de sarcômeros em série decorrente da imobilização. A possível adição de sarcômeros pode ser o resultado da proliferação de células satélites, que se fundem com as células da fibra muscular preexistente⁶.

Nos grupos GAUS e GAUS 0,2W/cm², houve diferença significativa entre a quantidade de sarcômeros em série, quando comparados os membros direito e esquerdo; ou seja, não houve recuperação da quantidade de sarcômeros. Deyne³⁶ analisou os efeitos do alongamento e da estimulação contrátil sobre a miofibrillogênese e não verificou o alongamento como fator importante para o desenvolvimento e manutenção das estruturas sarcoméricas musculares. Quando uma

substância é exposta a uma força passiva (alongamento), irá deformar de acordo com as propriedades do material, e quando uma força relativamente baixa é sustentada por um longo período de tempo, a maioria dos materiais deforma-se em uma maneira tempo-dependente. Dessa forma, a duração do alongamento realizado isoladamente pode ter sido insuficiente para promover essa deformação⁶.

O aumento no comprimento do sarcômero em músculos encurtados se deve ao alongamento dos sarcômeros restantes, permitindo, assim, o desenvolvimento da tensão máxima do músculo mesmo estando encurtado³¹. Os grupos GA, GAUS 0,2, GAUS 0,5 e GAUS 1,0 não apresentaram diferença significativa quanto ao tamanho dos sarcômeros entre os membros imobilizados e não imobilizados, demonstrando o possível retorno ao tamanho pré-imobilização.

CONCLUSÕES

No presente estudo, o alongamento de forma isolada não foi suficiente para reverter os efeitos deletérios da imobilização. Quando associado ao ultrassom terapêutico, apenas a dose 0,5W/cm² recuperou o comprimento muscular significativamente, e as doses 1,0 e 0,5W/cm² contribuíram para o retorno significativo da quantidade dos sarcômeros em série a valores normais dos músculos submetidos à imobilização.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo financiamento parcial do estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio com bolsa de iniciação científica.

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

REFERÊNCIAS

1. Caierão QM, Teodori RM, Minamoto VB. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. *Fisioter Mov* 2007;20:87-92.
2. Silva CA, Guirio RR, Polacow ML, Cancellieri KM, Durigan JL. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:979-85.
3. Lima SC, Caierão QM, Durigan JLO, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, et al. Short-term immobilization causes morphometric and mechanical alterations on rat muscles. *Rev Bras Fisioter* 2007;11:261-6.
4. Natali LH, Silva RS, Ciena AP, Padoin MJ, Alves EPB, Aragão F A, et al. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. *Rev Bras Med Esporte* 2008;14(6).
5. Williams PE. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Ann Rheum Dis* 1988;47:1014-6.
6. Deyne PG. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. *Phys Ther* 2001;81:19-27.
7. Dix DJ, Eisenberg BR. Myosin mRNA accumulation and myofibrillogenesis at the myotendinous junction of stretched muscle fibers. *J Cell Biol* 1990;111:1885-94.
8. Rantanen JJ, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med* 1999;27:54-9.
9. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2002;83:1-4.
10. Matheus JPC, Oliveira FB, Gomide LB, Milani JGPO, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. *Rev Bras Fisioter* 2008;12:241-7.
11. Ter Haar G. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound* 1999;9:3-9.
12. Ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:111-29.
13. Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1987;7:116-30.
14. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami, R, Martins PJF, Magalhães LE, et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004.
15. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1329-32.
16. Williams PE, Goldspink G. Connective tissues changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984;138(pt 2):343-50.
17. Williams PE, Goldspink G. The longitudinal growth of striated muscle fibres. *J Cell Sci* 1971;9:751-67.
18. Herring SW, Grimm AF, Grim BR. Regulation of sarcomere number in skeletal muscle: a comparison of hypotheses. *Muscle Nerve* 1984;7:161-73.
19. Fischbach GD, Robbins N. Changes in contractile properties of disused soleus muscles. *J Physiol* 1969;201:305-20.
20. Tabary JC, Tabary C, Tardieu C, Tardieu G, Goldspink G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J Physiol* 1972;224:231-44.
21. Goldspink DF. The influence of activity on muscle size and protein turnover. *J Physiol* 1977;264:283-96.
22. Costa LOP, Costa LCM, Mendes PL, Cancado RL, Lara KL, Lima MD, et al. Efeitos do aquecimento por ultra-som e atividade física aeróbica na flexibilidade do tríceps sural humano: um estudo comparativo. *Fisioter Mov* 2006;19:19-24.
23. Bertolini GRF, Barbieri CH, Mazzer N. Análise longitudinal de músculos sóleos, de ratos, submetidos ao alongamento passivo com uso prévio de ultra-som terapêutico. *Rev Bras Med Esporte* 2009;15:115-8.
24. Garret CL, Draper DO, Knight KL. Heat distribution in the lower leg from pulsed short-wave diathermy and ultrasound treatments. *J Athl Train* 2000;35:50-5.
25. Goldberg AL, Etlinger JD, Goldspink DF, Jablecki C. Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med Sci Sports* 1975;7:248-61.
26. Goldspink DF. The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem J* 1976;156:71-80.
27. Kimberg DV, Loeb JN. Differential sensitivity of nuclear and mitochondrial DNA synthesis to suppression by cortisone treatment. *Biochim Biophys Acta* 1971;246: 412-20.
28. Goldspink DF, Goldberg AL. Influence of pituitary growth hormone on DNA synthesis in rat tissues. *Am J Physiol* 1975;228:302-9.
29. Goldspink DF. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol* 1977;264:267-82.
30. Shah SB, Peters D, Jordan KA, Milner DJ, Fridén J, Capetanaki Y, et al. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol* 2001;204(pt 10):1703-10.
31. Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. *J Anat* 1978;127(pt 3):459-68.
32. Konno EAB, Alves EPB, Bertolini GRF, Barbieri CH, Mazzer N. Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. *Rev Bras Med Esporte* 2007;14:122-25.
33. Moseley MM, Herbert RD, Nightingale EJ, Taylor DA, Evans TM, Robertson GJ, et al. Passive stretching does not enhance outcomes in patients with plantarflexion contracture after cast immobilization for ankle fracture: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil* 2005;86:1118-26.
34. Vanderburgh HH, Hatfaludy S, Sohar J. Stretch-induced prostaglandins and protein turnover in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol* 1990;259(Cell Physiol 28):C232-C240.
35. Gomes ARS, Cornachione A, Salvini TF, Mattiello-Sverzut AC. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. *J Anat* 2007;210:328-35.
36. Deyne PG. Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretching contracting contractile activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:1801-11.