

REGENERAÇÃO DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS LESÃO POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR

BOTELHO AP, FACIO FA E MINAMOTO VB

Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, SP - Brasil

Correspondência para: Profa. Dra. Viviane Balisardo Minamoto, Curso de Mestrado em Fisioterapia, FACIS – UNIMEP, Rodovia do Açúcar, Km 156, CEP 13400-911, Piracicaba, SP – Brasil, e-mail: vbminamo@unimep.br

Recebido: 07/06/2005 - Revisado: 18/04/2006 - Aceito: 28/07/2006

RESUMO

Contextualização: Lesões no musculoesquelético podem ser causadas pela própria contração muscular. **Objetivo:** Analisar em diferentes períodos a lesão do músculo tibial anterior (TA) induzida pela eletroestimulação. **Material e Método:** ratos Wistar macho ($298,2 \pm 16,0\text{g}$) foram divididos nos grupos: eletroestimulado (EE) e analisado após 3 e 5 dias ($n=20$) e controle (C), 3 e 5 dias ($n=14$). O TA, mantido em alongamento, foi lesado por eletroestimulação neuromuscular (90 min, 30Hz, 1m/s, Ton/Toff 4s e 4mA). Após 3 e 5 dias, os animais foram sacrificados e os músculos retirados, sendo os cortes histológicos ($10\text{ }\mu\text{m}$) obtidos em criostato e corados com Azul de Toluidina. Os pesos corporal e muscular foram analisados estatisticamente pelo teste T-Student ($p \leq 0,05$). **Resultado:** Aumento do peso corporal final quando comparado com inicial em C3 e C5 ($288,5 \pm 18,3\text{g} \times 308,5 \pm 24,3\text{g}$; $288,4 \pm 15,0\text{g} \times 305,5 \pm 20,7\text{g}$, respectivamente) e diminuição em EE3 e EE5 ($305,0 \pm 13,0\text{g} \times 285,6 \pm 13,2\text{g}$; $306,1 \pm 12,4\text{g} \times 278,4 \pm 20,9\text{g}$, respectivamente). Peso muscular relativo do EE5 foi menor quando comparado com o C5 ($0,20 \pm 0,001\%$ $\times$ $0,22 \pm 0,01\%$, respectivamente). Análise histológica mostrou variabilidade na extensão e nos sinais de fibras lesadas e/ou em regeneração e a região distal foi a mais lesada. Grupo EE3 apresentou predominância de infiltrado celular e hipercontração dos miofilamentos, e no grupo EE5 houve predominância de infiltrado celular, basofilia e fibrose. **Conclusão:** O período de 2 dias após eletroestimulação foi suficiente para observar diferença no processo de regeneração com maior susceptibilidade à lesão na região distal do músculo tibial anterior.

Palavras-chave: regeneração muscular, tibial anterior, estimulação elétrica, lesão muscular.

ABSTRACT

Regeneration of the tibialis anterior muscle at different times following injury induced by neuromuscular electrical stimulation

Background: Skeletal muscle injuries may be caused by contraction of the muscle concerned. **Objective:** To analyze the tibialis anterior muscle at different times following injury induced by electrical stimulation. **Method:** Male Wistar rats ($298.2 \pm 16.0\text{g}$) were divided into two electrically stimulated groups evaluated after three and five days ($n=20$) and two control groups, also evaluated after three and five days ($n=14$). While stretched, the tibialis anterior muscle was injured by neuromuscular electrical stimulation (90 minutes, 30 Hz, 1 m/s, Ton/Toff 4 s and 4 mA). Three and five days afterwards, the animals were sacrificed and the muscles were removed. Histological sections were cut ($10\text{ }\mu\text{m}$) using a cryostat and were stained with toluidine blue. The body and muscle weights were statistically analyzed using Student's t test ($p \leq 0.05$). **Results:** The final body weight was higher than the initial weight for the 3-day control group ($288.5 \pm 18.3\text{g}$ vs. $308.5 \pm 24.3\text{g}$) and 5-day control group ($288.4 \pm 15.0\text{g}$ vs. $305.5 \pm 20.7\text{g}$) and lower for the 3-day stimulated group ($305.0 \pm 13.0\text{g}$ vs. $285.6 \pm 13.2\text{g}$) and 5-day stimulated group ($306.1 \pm 12.4\text{g}$ vs. $278.4 \pm 20.9\text{g}$). The relative muscle weight in the 5-day stimulated group was lower than in the 5-day control group ($0.20 \pm 0.001\%$ vs. $0.22 \pm 0.01\%$, respectively). The histological analysis showed variance between the animals regarding the extent and signs of fiber damage and/or regeneration, and the distal region was the most injured. The 3-day stimulated group presented predominance of cell infiltrate and myofilament hypercontraction, while the 5-day stimulated group presented predominance of cell infiltrate, basophils and fibrosis. **Conclusion:** A period of two days following electrical stimulation was sufficient for showing a difference in the regeneration process. The distal region of the tibialis anterior muscle was more susceptible to injury.

Key words: muscle regeneration, tibialis anterior, electrical stimulation, muscle injury.

INTRODUÇÃO

A lesão muscular decorrente da prática desportiva é muito comum em indivíduos ativos, o que causa, na maioria das vezes, dor e incapacidade, levando a um comprometimento tanto nas atividades ocupacionais quanto nas atividades de lazer¹. Desse modo, o tratamento desse tipo de lesão muscular é muito freqüente nas clínicas de fisioterapia.

Exercícios físicos de fortalecimento muscular ou *endurance*, especialmente aqueles realizados em contração excêntrica, podem provocar lesão muscular², sendo a contração considerada um mecanismo natural de lesão³, pois ocorre em condições fisiológicas quando comparada com outras formas de indução da mesma⁴.

Apesar da alta incidência de lesão, o musculoesquelético apresenta capacidade de regeneração, sendo bem documentado na literatura que as fases do processo regenerativo são similares, independente dos diferentes mecanismos indutores de lesão⁵, mas com duração e características específicas às causas da lesão⁶.

Devido ao fato de a contração muscular ser uma das causas das lesões observadas durante a prática esportiva, o objetivo deste estudo foi realizar a análise histológica do músculo tibial anterior em diferentes períodos após lesão muscular induzida pela estimulação elétrica neuromuscular. Os dados resultantes promoverão entendimento das respostas musculares em diferentes períodos de tempo após a lesão por contração.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals⁷. Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade em gaiolas individuais de polietileno e submetidos a ciclo claro/escuro de 12h e temperatura de 23 ± 2 °C, tiveram livre acesso à água e ração peletizada. Trinta e quatro ratos machos Wistar, com peso médio de $298,2 \pm 16$ g foram divididos em grupos: eletroestimulado e analisado após 3 (n= 10; EE3) e 5 (n= 10; EE5) dias, e controle: 3 (n= 7; C3) e 5 (n= 7; C5) dias. Nos grupos eletroestimulados, os animais foram submetidos a uma única sessão de estimulação elétrica neuromuscular e analisados 3 ou 5 dias após a mesma.

A estimulação elétrica foi realizada com o intuito de causar lesão no músculo tibial anterior direito (TAD). Esse músculo foi escolhido por apresentar fibras dispostas longitudinalmente, o que facilita a análise histológica⁸.

Os animais submetidos à eletroestimulação foram anestesiados com hidrato de cloral (460 mg/Kg – 1,4ml/300g, ip). Dois eletrodos foram fixados no nervo fibular para a estimulação do músculo TA, utilizando-se o aparelho Dualpex 961® (Quark), devidamente calibrado, com os seguintes parâmetros: largura de pulso 1 m/s, intensidade 4 mA, Ton/off 4 s e freqüência 30 Hz, durante 90 minutos.

Durante todo o procedimento de eletroestimulação, a pata posterior direita foi mantida em alongamento máximo contínuo em flexão plantar, por meio da utilização de pequena tala de madeira, conforme proposto e discutido em artigo prévio⁹.

Os animais foram pesados no 1º dia do experimento e 3 e 5 dias após a eletroestimulação, quando os mesmos foram sacrificados. Os músculos tibial anterior direito e esquerdo dos grupos eletroestimulados e dos grupos controle foram cuidadosamente dissecados e pesados individualmente em balança analítica (Bel Engineering, UMark®-210A) para posterior análise do peso muscular relativo, obtido por meio da relação com o peso corporal.

Após a dissecação, os músculos foram divididos com bisturi em três partes similares (proximal, média e distal), colados com uma mistura de *tissue tek* e *gum-tragacanth* em um pedaço de madeira, resfriados em isopentano e congelados em nitrogênio líquido. Após esse procedimento, os músculos foram estocados em galão de nitrogênio líquido até serem processados e analisados.

As três partes dos músculos foram seccionadas por meio de cortes histológicos transversais de 10µm, obtidos por meio de micrótomo criostato (Ancap®, mod 300), e os cortes foram corados com Azul de Toluidina (10%). Os sinais de fibras lesadas e de fibras em regeneração foram identificados em microscópio óptico (Olympus®, BX-41), onde observou-se presença de sinais de lesão e de fibras em regeneração caracterizados por : a) fibras com necrose celular, as quais apresentam periferia delimitada e o interior com aspecto de vidro opaco; b) basofilia periférica ou generalizada, conseqüente à proliferação ribossômica; c) fibras musculares com núcleo centralizado e nucléolo proeminente; d) presença de hipercontração dos miofilamentos, e e) infiltrado celular^{10,11}.

As lesões encontradas nas três partes dos músculos eletroestimulados foram classificadas como leve, moderada ou severa, de acordo com a extensão dos sinais por corte analisado, conforme relatado previamente⁹. Em todas as regiões, a porcentagem dos sinais indicativos de lesão foi determinada analisando a presença ou ausência desses sinais em cada músculo dos grupos eletroestimulados.

Para a análise estatística foi utilizado o *software* Origin versão 6.0. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste T-Student independente (entre grupos) e pareado (intergrupos), significativo quando $p \leq 0,05$, a fim de se realizar a análise comparativa dos pesos corporal e muscular.

RESULTADOS

Na análise do peso corporal, foi observado que o peso corporal final, quando comparado com o inicial, foi maior nos grupos C3 ($288,5 \pm 18,3$ g x $308,5 \pm 24,3$ g; $p < 0,01$) e C5 ($288,4 \pm 15$ g x $305,5 \pm 20,7$ g; $p < 0,01$). Os grupos eletroestimulados apresentaram diminuição significativa do peso corporal final quando comparado com o inicial, tanto nos grupos EE 3 (305 ± 13 g x $285,6 \pm 13,2$ g; $p < 0,01$) quanto

Tabela 1. Média e desvio-padrão da massa corporal inicial e final e massa muscular relativa do tibial anterior direito (TAD) e esquerdo (TAE) dos grupos controle 3 e 5 dias (C3 e C5) e eletroestimulado 3 e 5 dias (EE3 e EE5).

Grupos	Peso corporal (g)		Peso muscular (%)	
	Inicial	Final	TAD	TAE
C3	288,5 ± 18,3	308,7 ± 24,3*	0,20 ± 0,009	-
C5	288,4 ± 15,0	305,4 ± 20,7*	0,22 ± 0,010	-
EE3	305,0 ± 13,0	285,6 ± 13,2*	0,20 ± 0,013	0,21 ± 0,014
EE5	306,1 ± 12,4	278,4 ± 20,9*	0,20 ± 0,001**	0,25 ± 0,010

* diferença estatisticamente significativa quando comparado com o peso corporal inicial ($p < 0,01$). ** diferença estatisticamente significativa quando comparado com o TAE e com o músculo do grupo controle 5 dias ($p < 0,01$).

nos EE 5 ($306,1 \pm 12,4\text{g} \times 278,4 \pm 20,9\text{g}$; $p < 0,01$) (Tabela 1).

Não houve diferença significativa na análise do peso muscular relativo quando comparados os músculos tibiais anteriores eletroestimulados com o contralateral e com o controle dos animais analisados após 3 dias. O peso relativo do músculo eletroestimulado e analisado após 5 dias foi significativamente menor que o peso do músculo contralateral e controle 5 dias ($0,20 \pm 0,001\% \times 0,25 \pm 0,01\% \times 0,22 \pm 0,01\%$; respectivamente), conforme apresentado na Tabela 1.

Os músculos dos grupos controle e os músculos contralaterais dos grupos eletroestimulados apresentaram padrão morfológico muscular normal (Figura 1A). Os músculos eletroestimulados e analisados após 3 e 5 dias apresentaram sinais de fibras lesadas e em regeneração, tais como infiltração, hipercontração, fibra com basofilia, fibra com núcleo centralizado e nucléolo proeminente, bem como fibras com áreas de menor calibre (Figuras 1B e 1C).

Em relação aos sinais de lesão, o grupo eletroestimulado e analisado após 3 dias apresentou predominância de infiltrado celular e hipercontração dos miofilamentos, sinais indicativos de lesão precoce. (Figura 2A) Já o grupo eletroestimulado e analisado após 5 dias apresentou, além da alta incidência de infiltrado celular, maior porcentagem de fibras em processo de regeneração, sendo essas caracterizadas pela basofilia e fibras com núcleo centralizado e nucléolo proeminente. A fibrose foi observada nos músculos lesados, porém foi encontrada somente no grupo analisado após 5 dias da lesão e com maior incidência na região distal (Figura 2B).

Em relação às regiões musculares analisadas, foi observada diferença quantitativa dos sinais de lesão entre as diferentes regiões e entre os grupos eletroestimulados. Desse modo, em ambos os grupos eletroestimulados, as regiões proximal, média e distal apresentaram lesões classificadas como leve e moderada. Entretanto, somente a região distal

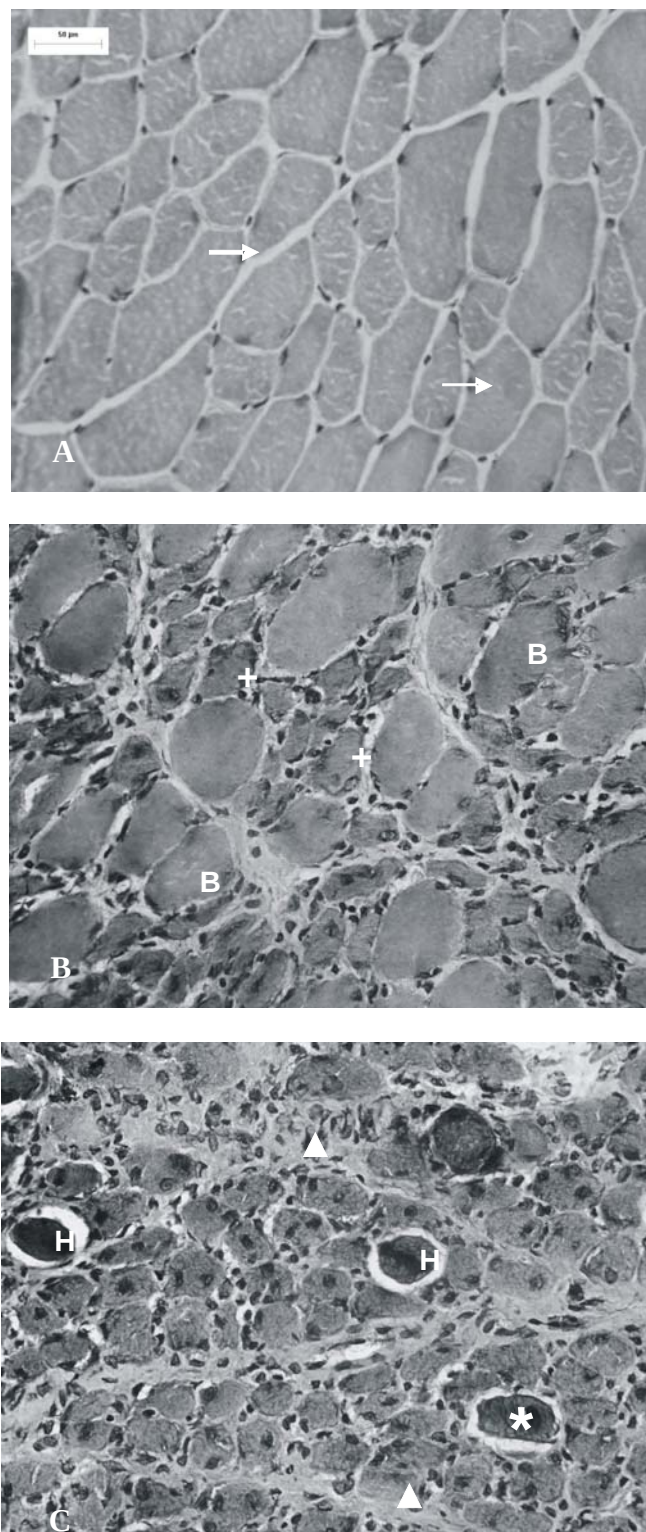
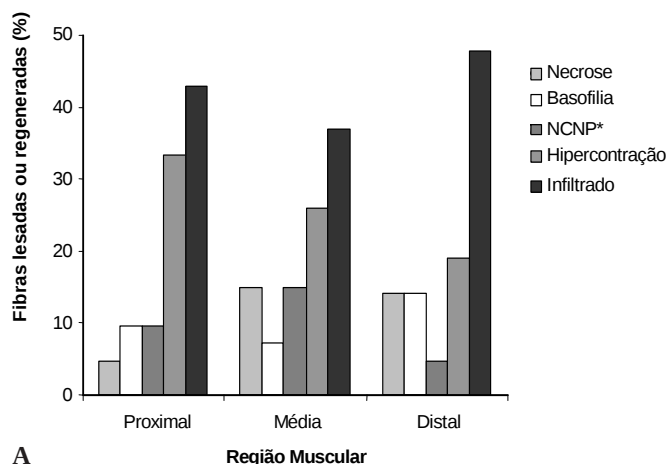
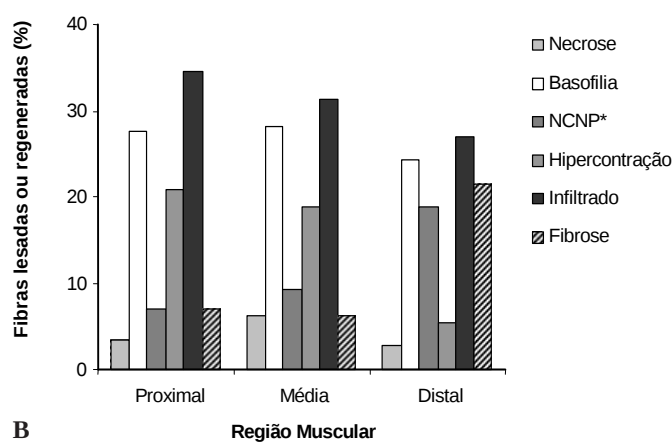


Figura 1. A: Músculo tibial anterior do grupo controle. Observam-se fibras normais, com núcleos periféricos (seta) e formato hexagonal. Músculo eletroestimulado e analisado após 3 (B) e 5 (C) dias. B: Observa-se fibra muscular com basofilia (B) e fibra com área de menor calibre (cruz). C: Infiltração (triângulo), hipercontração dos miofilamentos (H) e fibra com núcleo centralizado e nucléolo proeminente (asterisco). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento em microscopia óptica: 400x.



A



B

* NCNP: fibras musculares com núcleo centralizado e nucléolo proeminente.

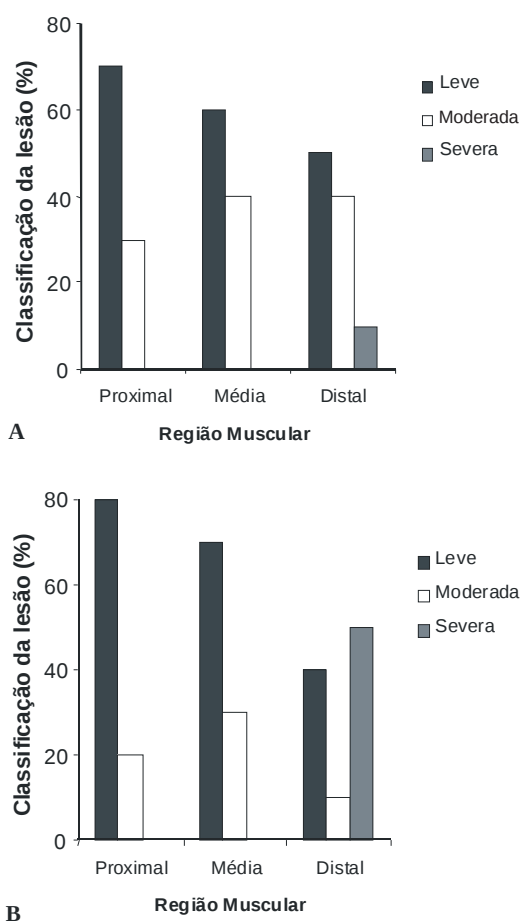
Figura 2. Incidência dos sinais de lesão ou regeneração encontrados nas regiões proximal, média e distal dos músculos tibiais anteriores eletroestimulados e analisados após 3 (A), e 5 (B) dias.

apresentou lesão classificada como severa, sendo essa mais pronunciada no grupo eletroestimulado e analisado após 5 dias.

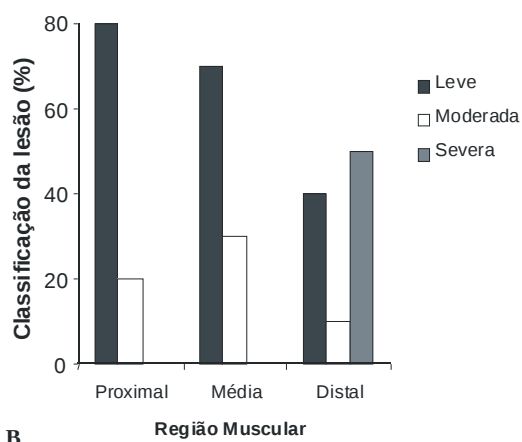
No grupo eletroestimulado e analisado após 3 dias, a lesão muscular classificada como leve esteve presente em 70, 60 e 50% e a moderada em 30, 40 e 40% dos animais, nas regiões proximal, média e distal, respectivamente. A lesão muscular severa foi observada na região distal em somente 10% dos animais desse grupo (Figura 3A). Já no grupo eletroestimulado e analisado após 5 dias, a lesão leve foi encontrada em 80, 70 e 40% e a moderada em 20, 30 e 10% dos animais, nas regiões proximal, média e distal, respectivamente. Somente a região distal apresentou sinal de lesão classificada como severa, sendo esse tipo de lesão encontrada em 50% dos animais desse grupo (Figura 3B).

DISCUSSÃO

Apesar de a contração excêntrica ser a mais lesiva, o presente trabalho utilizou-se de um modelo de lesão por



A



B

Figura 3. Classificação das lesões encontradas nas regiões proximal, média e distal dos músculos tibiais anteriores eletroestimulados e analisados após 3 (A) e 5 (B) dias.

contração isométrica com o músculo imobilizado em posição de alongamento, conforme proposto em artigo prévio⁹. Esse tipo de contração simula as alterações morfológicas induzidas pela contração excêntrica^{3,12}, pois, em adição à tensão gerada pelo próprio músculo durante a contração, ocorre a tensão muscular provocada pela posição de alongamento^{1,13,14}. Na contração excêntrica, o músculo contrai para gerar tensão e então é passivamente alongado por uma força externa, gerando tensão adicional¹⁵.

Em relação ao peso corporal, pode-se supor que a diminuição significativa do peso no grupo eletroestimulado e analisado após 3 e 5 dias seja decorrente do estresse submetido aos animais, o que interfere na dieta e/ou metabolismo dos mesmos^{16,17}. Além disso, pode-se observar que o período de cinco dias após a lesão muscular não foi suficiente para que os animais alcançassem o peso observado no grupo controle.

Houve diminuição significativa do peso do músculo eletroestimulado e analisado após 5 dias quando comparado ao contralateral e ao controle, sendo esse resultado sugestivo de atrofia muscular. Essa diminuição de peso também foi observada em trabalho prévio³, quando o tibial anterior foi

analisado após 5 dias (diminuição de 11,6% de peso quando comparado com o contralateral), mas sem alteração do peso quando analisado 1 dia após a lesão. A não diminuição do peso muscular, observada no grupo analisado após 3 dias da lesão, pode ser devido ao fato de a atrofia muscular estar sendo mascarada pela presença do edema¹⁸, uma vez que o processo inflamatório tem seu pico de desenvolvimento entre 24 e 48 horas após a lesão muscular¹⁹.

A lesão muscular foi produzida pela contração, sendo inicialmente induzida por um componente mecânico (contração), e, posteriormente, exacerbada devido a componente inflamatório, secundário à lesão inicial^{2,20}. Essa característica da lesão pode explicar o fato de o grupo analisado após 3 dias ter apresentado maior incidência de sinais de fibras lesadas, uma vez que a análise do mesmo foi durante o pico do processo inflamatório¹⁹, enquanto que o grupo analisado após 5 dias apresentou maior incidência de sinais de fibras em regeneração. Estudos prévios também relatam maior comprometimento muscular durante o período de instalação do processo inflamatório^{3,20,21,22}.

A lesão caracterizada como sendo severa, por apresentar grande extensão da área de lesão, foi mais evidente no grupo eletroestimulado e analisado após 5 dias. Entretanto, os sinais que predominaram nesse grupo foram os sinais de fibras em processo de regeneração. Esse resultado mostra que o processo de regeneração após lesão por eletroestimulação é relativamente rápido, pois em apenas 2 dias houve uma evolução significativa do processo regenerativo. Dados similares foram encontrados em estudo prévio, em que o tibial anterior de animais analisados após 7 dias da eletroestimulação também apresentou lesão significativamente reduzida quando comparado com os animais analisados após 5 dias, sendo que, após 7, dias a região média do músculo apresentou padrão bastante similar ao do grupo controle³.

No presente estudo, a maior severidade de lesão foi observada na região distal, sendo que trabalhos prévios também relatam maior ocorrência da lesão na região miotendínea^{1,3}. Isso se explica porque cada miofibrila é ligada às suas regiões terminais por tecido conjuntivo, e a contração das miofibrilas é transformada em movimento, via junção miotendínea²³. Desse modo, a lesão observada mais intensamente nessa área pode ocorrer devido à concentração de estresse na região distal da fibra muscular. Como a articulação talocrural encontrava-se imobilizada, a restrição de movimento impedia a transmissão adequada da força para o tendão⁸.

A fibrose muscular foi observada somente nos animais analisados após 5 dias da lesão, o que sugere que o período de 3 dias não tenha sido suficiente para uma proliferação significativa de fibroblastos que levasse ao aparecimento do tecido cicatricial. Apesar de trabalhos prévios mostrarem síntese de colágeno tipo I e II nos primeiros dias após a lesão, os maiores níveis foram observados nos períodos de 5 a 7 dias^{24,25}, o que fortalece os resultados encontrados neste estudo.

Uma hipótese para a ocorrência de fibrose é a isquemia e a baixa oxigenação, o que favorece a proliferação de fibroblastos²⁶. É importante ressaltar que a regeneração muscular e a formação de fibrose na área lesada são eventos competitivos, sendo que este último pode levar à inibição completa da regeneração muscular²⁷. Sendo assim, recursos fisioterapêuticos, como a mobilização, devem ser recomendados durante o processo de regeneração muscular para prevenção do aparecimento de fibrose²³.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo, dentro das condições experimentais utilizadas, mostraram que a lesão por estimulação elétrica promoveu maior lesão na região muscular distal, sugerindo que a região miotendínea é mais susceptível à lesão. Além disso, a análise histológica mostrou que a regeneração após eletroestimulação é relativamente rápida, pois, após 5 dias da lesão, foi observada grande incidência de fibras em regeneração e padrão morfológico qualitativamente melhor, quando comparado com o grupo analisado após 3 dias da eletroestimulação.

Agradecimentos: Ao Prof. Dr. Rinaldo Roberto de J. Guirro pelo auxílio no procedimento de estimulação elétrica.

Apoio: FAPESP (02/07171-0) e FAP-UNIMEP (314/02).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kirkendall DT, Garrett Jr WEJ. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin Orthop*. 2002;403:81-9.
2. Fridén J, Lieber RL. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fiber components. *Acta Physiol Scand*. 2001;171:321-6.
3. Hill M, Wernig A, Goldspink G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat*. 2003;203:89-99.
4. Armand AS, Launay T, Gaspara BD, Charbonnier F, Gallien CL, Chanoine C. Effects of eccentric treadmill running on mouse soleus: degeneration/regeneration studied with Myf-5 and MyoD probes. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:75-84.
5. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-38.
6. Lefaucheur JP, Sébille A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord*. 1995;5(6):501-9.
7. Guide for the use of laboratory animals. Washington (DC): Research Council; 1996.
8. Lieber RL, Woodburn TM, Fridén J. Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain. *J Appl Physiol*. 1991;70(6):2498-507.

9. Botelho AP, Facio FA, Minamoto VB. Modelo de lesão no músculo tibial anterior de rato induzida pela estimulação elétrica neuromuscular. *Rev Bras Fisioter.* 2005;9(3):313-8.
10. Carpenter S, Karpati G. *Pathology of skeletal muscle.* New York, Edinbrugh, London, Melbourne: Churchill Livingstone; 1984.
11. Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(11):1447-52.
12. Lieber RL, Fridén J. Mechanisms of muscle injury gleaned from animal models. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(11):70-9.
13. Leech SJ. Review of muscle healing. *NZ J Physiot.* 1997;25: 15-8.
14. Jarvinen TA, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(2):155-61.
15. Stauber WT. Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Ex Sport Sci Rev.* 1989;17:157-85.
16. Kinney JM, Elwin DH. Protein metabolism and injury. *Ann Rev Nutr.* 1983;3:433-66.
17. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
18. Emery PW, Ghossein-Choueiri A. The local and systemic effects of minor injury on muscle protein synthesis in the rat. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995;27(8):815-20.
19. Miles MP, Clarkson PM. Exercise induced muscle pain, soreness and cramps. *J Sports Med Phys Fitness.* 1994;34(3):203-16.
20. Newham DJ, McPhall G, Mills KR, Edwards RH. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci.* 1983;61:109-22.
21. Takekura H, Fujinami N, Nishizawa T, Ogasawara H, Kasuga N. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 2001;533(2):571-83.
22. Lieber RL. *Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity.* 2ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
23. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6): 332-7.
24. Letho M, Sims TJ, Bailey AJ. Skeletal muscle injury-molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med.* 1985;185:95-106.
25. Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, Letho M, Vuorio E. Localization of type I and II collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. *Labor Investigation.* 1991; 64(1):76-84.
26. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res Pract.* 2001;187:1-22.
27. Letho M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. *The Bone Joint Sur.* 1985; 67(5):820-8.