



Repercussões Crónicas Musculares Esqueléticas ao Treino com Exercícios Excêntricos

Dissertação apresentada às provas para obtenção do grau de Mestre em Atividade Física e Saúde, nos termos do Decreto-Lei nº 74/2006, de 24 de março, orientada pelo Professor Doutor José Alberto Ramos Duarte (Professor Catedrático da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto) e coorientada pelo Mestre Carlos Eduardo da Silva Teixeira.

Júlio Daniel Barros Pacheco

Porto, outubro de 2016

Pacheco, J. D. B (2016). *Repercussões Crónicas Musculares Esqueléticas ao Treino com Exercícios Excêntricos*. Porto: J. Pacheco. Dissertação apresentada às provas para obtenção do grau de Mestre em Atividade Física e Saúde, apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Palavras-Chave: EXERCÍCIO EXCÊNTRICO; TOLERÂNCIA; TECIDO CONJUNTIVO; COLAGÉNIO; ENDOMÍLIO;

Para a minha mãe...

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Desta forma gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e contribuíram para que esta tarefa se tornasse realidade.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor José Alberto Duarte, pela confiança, acompanhamento, compreensão e supervisão durante a realização de todo o trabalho. Desde a primeira aula de Licenciatura que, pelo entusiasmo e domínio científico transmitido, foi para mim um modelo a seguir, acordando o meu interesse pela bioquímica e fisiologia do desporto. Sem a sua orientação não teria sido impossível concluir, tanto o trabalho, como a submissão do artigo experimental. Tal como já uma vez tinha feito com o meu pai, obrigado por me ter ajudado e aceite no seu gabinete.

Gostaria de agradecer ao meu coorientador, Eduardo Teixeira, por todo o apoio científico e emocional. Introduziu-me ao laboratório e explicou-me o seu funcionamento e os seus “truques”. Acolheu as minhas dúvidas substanciais, partilhou o seu conhecimento sobre as práticas laboratoriais, ainda antes do iniciar deste trabalho e aconselhou-me sempre de forma incansável. Obrigado pela paciência e compreensão.

Aos meus colegas de laboratório, Toni, Nilton, Ana Padrão, Daniel, Cris, Hélder, Paulo, Daniela, Laura, Fernando, Camila, Paula e Cristina pelo ambiente alegre e bem-disposto e por todas as recomendações, artigos e outros documentos que me ajudaram na elaboração desta dissertação. Em especial ao Toni Bovolini, que demonstrou uma compreensão enorme para comigo e que me apoiou emocionalmente e cientificamente em momentos de maior dificuldade, com dicas e conselhos preciosos. Espero que alcancem todos as vossas metas.

À Dona Celeste por todo o apoio profissional e emocional no tratamento e análise das amostras do trabalho. Ensinou-me todos os processos experimentais e mostrou-se sempre disponível para me ajudar. A sua

organização e experiência guiou grande parte do meu processo experimental e se não fosse sua ajuda, a minha histologia nunca teria a qualidade desejada.

À “malta da palhaçada”, que representa tudo o que há de bom numa Licenciatura e que acompanhou todo o meu percurso académico.

Aos meus colegas de mestrado e grandes amigos Luís Camacho, a quem devo uma visita à Colômbia, e Filipe Magalhães, a quem eu devo muitos almoços.

À minha família por todo o investimento feito em mim, especialmente aos meus pais, cujo tempo e vitalidade são dedicados inteiramente aos filhos sem qualquer arrependimento. O que eu sou devo-vos inteiramente a vocês.

Aos meus padrinhos por estarem sempre prontos para me ajudar e por serem, simplesmente, os melhores padrinhos que alguém pode ter.

À Lisete, pelo apoio incondicional, pela troca de tempo juntos por ajuda e compreensão. Ao longo deste trabalho foste o meu maior apoio emocional, carregando em minha vez, por várias situações, a motivação necessária para o elaborar do projeto. Bem-dita a hora em que te dirigi a palavra naquela viagem de comboio pois, mais ninguém no mundo preencheria tão bem aqueles 40 minutos de viagem e os restantes anos que se seguiram e se avizinham. Obrigado por tudo o que temos passado juntos.

Obrigado a todos.

Índice geral

Agradecimentos	V
Índice geral.....	VII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabelas	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XV
Lista de Abreviaturas.....	XVII
1. Introdução geral	1
2. Revisão da literatura	5
2.1. Dano muscular esquelético induzido pelo exercício agudo.....	5
2.1.1. Fisiopatologia.....	5
2.1.2. Manifestações clínicas do dano induzido pelo exercício.....	9
2.2. Processo regenerativo	10
2.3. Efeito protetor do treino ao exercício físico	15
3. Artigo Experimental	21
4. Conclusões gerais.....	43
5. Bibliografia.....	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Gráfico de linhas representativas da variação da concentração de CK sanguínea.....	38
Figura 2 - Fotografias representativas de cortes histológicos do quadríceps, corados com hematoxilina-eosina, de animais do grupo SED (A + B) e do grupo TR (C + D). É possível observar no grupo TR um aumento das fibras com núcleo central (assinalado com setas brancas), característica representativa de uma superior degeneração muscular. Ainda pode ser observada uma fibra necrótica na foto D caracterizada pela forma redonda e edemaciada, infiltrada por leucócitos.	40
Figura 3 - Fotografias representativas de cortes histológicos do quadríceps, corados com picrosirius red, de animais do grupo SED (A + B) e do grupo TR (C + D). É possível verificar de forma clara um maior conteúdo de colagénio e um aumento da espessura da parede do endomísio no grupo TR comparativamente ao grupo SED.	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores da mediana (intervalo interquartil) de cada grupo e dos testes estatísticos referentes à área de secção transversal, conteúdo total de colagénio e espessura do endomísio.....	39
Tabela 2 - Valores da mediana (intervalo interquartil) dos testes estatísticos referentes aos índices de dano muscular total e individual (degeneração, inflamação, necrose e organização) de cada grupo.....	42

Resumo

O exercício excêntrico é um veículo de sobrecarga mecânica e metabólica com forte potencial lesivo para o músculo esquelético e quando praticado de forma inabitual ou extenuante, induz dano nos músculos solicitados. No entanto, indivíduos exercitados regularmente parecem possuir tolerância a este tipo de estímulo sendo este fenómeno explicado, em parte, por adaptações crónicas morfológicas ao nível das fibras musculares e ao nível do tecido conjuntivo intramuscular. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar as alterações no conteúdo de colagénio do quadríceps sujeito a treino com exercício excêntrico. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos (n=5 por grupo): controlo (SED) e treinado (TR). Os animais TR praticaram corrida em tapete rolante (-25°; 30m/minuto; 60 min) 1x/semana, durante 8 semanas. A atividade sanguínea da Creatina Quinase foi avaliada ao longo do protocolo e, após sacrifício, recolheu-se o músculo quadríceps para análise histológica. O efeito protetor do treino ao exercício foi demonstrado pelos resultados da atividade sanguínea da Creatina Quinase ($p=0,002$). Verificou-se um aumento da área de secção transversal ($p=0,000$) das fibras musculares, simultaneamente com um aumento do conteúdo total de colagénio e da espessura do endomísio ($p=0,000$) nos músculos esqueléticos. É possível concluir-se que, paralelamente ao efeito de tolerância, o treino com exercício excêntrico promoveu um acentuado aumento do conteúdo muscular esquelético de colagénio e um incremento moderado da área de secção transversal das fibras musculares.

Palavras-chave: EXERCÍCIO EXCÊNTRICO; TOLERÂNCIA; TECIDO CONJUNTIVO; COLAGÉNIO; ENDOMÍCIO;

Abstract

Eccentric exercise is a vehicle of enhancement of mechanical and metabolic stress with strong potential to adversely affect the skeletal muscle and when practiced on a unusual or strenuous way induces muscle damage in the requested muscles. However, regularly trained individuals seem to have tolerance to this type of stimulus, a phenomenon partly explained by chronic morphological adaptations on muscle fibers and on intramuscular connective tissue. The objective of this study was to evaluate the changes in the collagen content of eccentric exercise trained quadriceps. Male wistar rats were divided into two groups (n=5 per group): Control (SED) and trained (TR). The TR animals practiced downhill running on a treadmill (-25°; 30meters/minute; 60 minutes) 1x/week, for 8 weeks. Blood activity of Creatin Kinase was measured during the protocol and, after sacrifice, the quadriceps muscle was collected to histological analysis. A progressive protective effect of training to exercise bout was demonstrated by blood activity of Creatin Kinase ($p=0,002$). there was an increase in muscle fibers cross-sectional area ($p=0,000$), simultaneously with an increase in the total collagen content and endomysium thickness ($p = 0.000$) in trained skeletal muscles. It can be concluded in addition to the tolerance effect, that eccentric exercise training induced a remarkable increase in skeletal muscle collagen content in parallel with a slight increase of muscle fibers cross-sectional area.

Key words: ECCENTRIC EXERCISE; TOLERANCE; CONNECTIVE TISSUE; COLLAGEN; ENDOMYSIUM;

Lista de Abreviaturas

CK – Creatina Quinase.

ExEx – Exercício excêntrico.

MMPs – Metaloproteína(s).

PIIMP – N-pró-peptídeo do colágeno III.

SED – Grupo sedentário.

TNC – Tenascina-C.

TIIMPs - Inibidores teciduais de metaloproteinases.

TR – Grupo treinado.

Esta dissertação é baseada num artigo experimental, submetido à Revista Portuguesa de Ciências do Desporto. Está apresentado no capítulo 3 da dissertação e encontra-se escrito segundo a formatação exigida para submissão.

O artigo denomina-se “O treino com exercícios de contração excêntrica induz a longo prazo fibrose muscular esquelética” e conta com a participação dos seguintes autores:

Júlio Daniel Barros Pacheco

Paula Maria Nogueira Gonçalves da Rocha

Carlos Eduardo da Silva Teixeira

José Alberto Ramos Duarte

1. Introdução geral

O exercício físico impõe ao músculo esquelético diferentes exigências adaptativas conforme os tipos distintos de contração muscular. As contrações excêntricas são realizadas quando a carga imposta no músculo é superior à força produzida pelo conjunto de fibras musculares recrutadas (Boppart et al., 2013), sendo por esse motivo o tipo de contração maior potencial lesivo para o músculo esquelético (Lieber & Friden, 1999). Este potencial lesivo deve-se ao facto de, comparativamente às contrações concêntricas e isométricas, as contrações excêntricas recrutarem uma menor quantidade de unidades motoras para a mesma exigência mecânica, levando a uma distribuição do stress mecânico por uma menor quantidade de músculo (Abbott et al., 1952).

Desta forma, a prática inabitual ou extenuante de exercício com predominância de contrações excêntricas tende a induzir dano sobre a estrutura muscular esquelética, podendo, em situações de grande exigência, motivar o aparecimento de uma entidade anatomopatológica nos músculos recrutados denominada por miopatia do exercício (Duarte et al., 2001). Indivíduos com miopatia do exercício frequentemente manifestam diminuição da força máxima voluntária e involuntária não atribuível à fadiga, distúrbios da propriocepção, coativação do músculo antagonista, edema, redução em repouso do ângulo articular, elevação de enzimas lisossómicas, elevação plasmática de várias proteínas musculares, alterações estruturais e ultra-estruturais musculares e sensação retardada de desconforto muscular (Appell et al., 1992; Paulsen, Crameri, et al., 2010; Prasartwuth et al., 2006; Proske & Morgan, 2001; Semmler et al., 2007; Soares & Duarte, 1989; Weerakkody et al., 2003). Por sua vez, estas manifestações têm como base lesões agudas de carácter local, que podem culminar em necrose segmentar das fibras musculares recrutadas (Appell et al., 1992; Duarte, 2009; Soares & Duarte, 1989). As principais evidências histológicas descrevem a existência de desorganização do padrão estriado (Appell et al., 1992; Crameri et al., 2007; Duarte et al., 2001; Malm & Yu, 2012; Raastad et al., 2010), dano ao nível do

sarcolema com consequente aumento da permeabilidade ao íon cálcio (Duarte, 2009; Proske & Morgan, 2001), dilatação do sistema de tubos transversos e fragmentação do retículo sarcoplasmático, aumentando também, consequentemente, o nível de cálcio intracelular (Butterfield & Best, 2009; Duarte et al., 1992; Lieber & Friden, 2002). Verifica-se também vacuolização sarcoplasmática, induzida geralmente por anomalias mitocondriais, causadas, em parte, pela perda celular da homeostasia ao íon cálcio anteriormente descrita (Duarte, 2009).

Motivada pela forte agressão do exercício, é desencadeada uma resposta inflamatória local com invasão leucocitária semelhante ao padrão inflamatório de outros tecidos (Duarte, 1988, 2009; Paulsen et al., 2012), acompanhada de um processo reparativo igualmente idêntico ao geralmente descrito para outros estímulos lesivos (Duarte et al., 2001) mas que, quando provocado por exercício excêntrico inabitual ou extenuante, pode ocorrer durante semanas até o músculo conseguir retornar à sua aparência histológica normal (Paulsen, Egner, et al., 2010). Durante este processo regenerativo é normal observar, nas fibras musculares afetadas, núcleos em posição central (Duarte et al., 1994; Duarte et al., 1993; Duarte et al., 1992; Folker & Baylies, 2013), resultado da diferenciação das células satélites com fusão de mioblastos às fibras em questão (Duarte et al., 2001; Paulsen et al., 2012).

O correto desenrolar destes processos reparativos é essencial para o músculo esquelético, uma vez que é no seguimento da recuperação ao dano agudo que se desencadeiam adaptações que capacitam o músculo de uma maior tolerância a exercícios futuros idênticos. Esta tolerância manifesta-se através de uma menor resposta inflamatória, local e sistêmica, recuperação mais rápida dos níveis força máxima, perdidos após o exercício e diminuição da atividade sanguínea da Creatina Quinase (CK), que culminam numa menor sensação retardada de desconforto muscular (Dartnall et al., 2011; Hyldahl et al., 2015).

Uma adaptação a longo prazo já bem documentada, proveniente do processo reparativo, é a hipertrofia das fibras musculares após treino com

exercício excêntrico (Atherton & Smith, 2012; Flann et al., 2011; Guilhem et al., 2010; Touchberry et al., 2012).

No entanto a maioria dos trabalhos sobre o processo reparativo tem-se centrado nas alterações fenotípicas inerentes às fibras musculares, tal como o descrito anteriormente, tendo sido dedicada pouca atenção aos processos remodelativos externos, ao nível da matriz extracelular. Composta principalmente por proteoglicanos, glicoproteínas e colagénio, a matriz extracelular é primordial para providenciar uma boa funcionalidade, integridade e organização estrutural, retransmitindo sinais mecânicos e regulando o comportamento de outras células aí residentes, tal como as células satélite (Thomas et al., 2015). É por possuir esta função de distribuição e de suporte das tensões mecânicas ao longo do músculo (Hyldahl et al., 2015) que se pensa que o tecido conjuntivo possua também um papel essencial na tolerância induzida pelo treino e que as alterações nele induzidas pelo exercício físico sejam de uma grande importância. Apesar de já existirem evidências de que o treino com exercício excêntrico aumenta a transcrição dos genes envolvidos na síntese do colagénio (Hyldahl et al., 2015), não foram encontradas na literatura evidências histológicas de uma maior deposição de colagénio nos músculos treinados tal como dos efeitos do treino na espessura do endomísio.

Assim sendo, o objetivo do estudo experimental desta dissertação, apresentado no capítulo 3, foi verificar o efeito crónico do treino com exercício excêntrico no espaço extracelular, nomeadamente no conteúdo de colagénio e na espessura do endomísio, assim como na área de secção transversal das fibras musculares do músculo *quadríceps* do rato (reto femoral, vasto lateral, vasto medial). Espera-se como efeito crónico da repetição do exercício excêntrico, um aumento da quantidade de colagénio no espaço extracelular em geral, assim como um aumento da espessura do endomísio, em particular, juntamente com um aumento da área de secção transversal das fibras musculares.

A presente dissertação foi elaborada segundo o modelo escandinavo com a presença de um artigo experimental. Está, no geral, organizada em 5

capítulos principais sendo o primeiro capítulo a própria “Introdução Geral”. No 2º capítulo está presente uma revisão da literatura com o objetivo de sintetizar os temas mais relevantes para uma correta compreensão do artigo experimental, tentando reunir informação sobre das adaptações musculares a longo prazo, bem como os mecanismos e processos indutores dessas adaptações provocadas pelo treino com exercício excêntrico no músculo esquelético. No 3º capítulo é apresentado um artigo experimental que avaliou os efeitos a longo prazo do treino excêntrico, na atividade sanguínea da CK e nas alterações morfológicas do tecido conjuntivo e das fibras musculares do músculo *quadríceps*. No 4º capítulo são apresentadas as Conclusões Gerais da dissertação seguindo-se as Referências Bibliográficas no 5º capítulo.

2. Revisão da literatura

2.1. Dano muscular esquelético induzido pelo exercício agudo

O dano induzido pelo exercício tem sido alvo de estudo desde há muitos anos, não sendo as suas etiologia e fisiopatologia ainda totalmente conhecidas (Peake et al., 2005). Este dano induzido pelo exercício parece atingir maiores proporções na presença de contrações de natureza excêntrica (Lieber & Friden, 1999). Estas contrações estão presentes regularmente no nosso dia-a-dia em diversas atividades, como por exemplo, descer escadas ou pousar pesos de forma controlada, acontecendo quando a tensão imposta por uma carga no músculo, ou grupos musculares, é superior à tensão produzida pelo conjunto das unidades motoras ativadas (Boppart et al., 2013). Estas ações excêntricas musculares para a mesma exigência mecânica, comparativamente às restantes contrações concêntricas e isométricas, estão associadas a um menor recrutamento de unidades motoras (Abbott et al., 1952), provocando uma distribuição do stress mecânico por uma menor quantidade de fibras musculares recrutadas (Newham et al., 1983). Assim, apesar de reduzir o custo energético devido ao menor recrutamento de fibras musculares, este tipo de contração aumenta a probabilidade de dano muscular, uma vez que é capaz de produzir maiores níveis de força e atingir o mesmo trabalho absoluto com custos metabólicos mais baixos (Abbott et al., 1952; Newham et al., 1983).

2.1.1. Fisiopatologia

O dano induzido pelo exercício, com lesões agudas de carácter local, está bem documentado na literatura através de várias evidências histológicas (Duarte et al., 2001).

Logo após o término do exercício, sobretudo se exaustivo, inabitual e com grande percentagem de contrações excêntricas, observa-se em alguns locais pontuais do músculo, fibras com a desorganização do padrão estriado causado por um alargamento das bandas isotrópicas (I) e anisotrópicas (A) (Appell et al., 1992; Crameri et al., 2007; Malm & Yu, 2012; Raastad et al., 2010). Também se verifica disrupção do sarcolema com conseqüente aumento da permeabilidade ao ião cálcio (Duarte, 2009; Proske & Morgan, 2001), dilatação do sistema de tubos transversos e fragmentação do retículo sarcoplasmático, contribuindo igualmente para o aumento intracelular do ião cálcio (Butterfield & Best, 2009; Duarte et al., 1992; Lieber & Friden, 2002).

Esta perda da homeostasia ao ião cálcio, além de provocar edema mitocondrial com conseqüente vacuolização sarcoplasmática (Duarte, 2009) vai também iniciar um processo de degradação proteica através da ativação da proteases dependentes do cálcio, tanto em animais (Blunt et al., 2007) como em humanos (Raastad et al., 2010), sendo as mais estudadas as calpaínas. Estas proteases têm como principais substratos as estruturas miofibrilares das linhas Z e outras proteínas estruturais, como por exemplo a desmina (Belcastro et al., 1998). Possuem um papel importante na recuperação ao dano induzido pelo exercício, uma vez que, como dependem da presença do ião cálcio, induzem a degradação dos substratos e libertação das proteínas miofibrilares dos segmentos das fibras musculares afetadas pelo exercício, onde a permeabilidade ao ião cálcio se encontra desregulada (Blunt et al., 2007). Esta degradação das proteínas musculares é finalizada posteriormente pelo sistema ubiquitina-proteossoma (Wei et al., 2005).

Quando o dano muscular leva à perda irreversível da permeabilidade e homeostasia celular ao ião cálcio, juntamente com o vazamento de proteínas miofibrilares para o meio extracelular, o dano vai aumentando com o tempo culminando no colapso final da estrutura do citoesqueleto (Proske & Morgan, 2001). A zona afetada entra assim num estado de autodestruição com disrupção de várias estruturas, autofagia e forte atividade lisossômica (Duarte et al., 2001). Acontece que, ao contrário de outros tecidos, a fibra muscular é um sincício onde múltiplos núcleos monitorizam apenas uma pequena parte da

célula, o chamado domínio nuclear (Teixeira & Duarte, 2011). Assim sendo, a perda da homeostasia raramente afeta toda a fibra muscular, existindo apenas morte dos pequenos segmentos afetados pelo estímulo onde a homeostasia não foi restabelecida. Esta particularidade, característica das células musculares, denomina-se de necrose segmentar (Duarte et al., 2001). Este processo degenerativo, despoletado pelas próprias fibras aquando da perda homeostática grave, é denominado degeneração intrínseca

Além de processos degenerativos intrínsecos à fibra muscular, o exercício também provoca alterações estruturais a nível extracelular. O tecido conjuntivo muscular é formado por 3 bainhas, interligadas entre si e entre o citoesqueleto das fibras musculares. São elas, o epimísio, que engloba todo o ventre muscular, sendo ao mesmo tempo o mais espesso e rígido, o perimísio, que organiza várias fibras musculares em fascículos, sendo o segundo mais espesso e um pouco mais elástico que o anterior e por fim, o endomísio, que engloba individualmente cada fibra muscular, sendo ao mesmo tempo a mais fina camada conjuntiva e de propriedades mais elásticas, estando assim ao mesmo tempo mais sujeito a dano (Smith et al., 2010).

Este tecido conjuntivo extracelular de estrutura complexa é composto principalmente por proteoglicanos, glicoproteínas e colagénio, estando em constante interação com o sarcolema das miofibras, através das integrinas, possibilita uma boa transmissão e distribuição das forças produzidas e sofridas dentro da célula muscular para todo o músculo (Hyldahl et al., 2015).

Apesar de não haver tanta informação acerca do dano induzido pelo exercício na matriz extracelular, está descrito que este provoca um aumento da expressão da proteína tenascina-C (TNC) e do N-pró-peptídeo do colágeno III (PIIINP), dois indicadores biológicos associados à presença de dano estrutural na matriz extracelular e igualmente associados à sua remodelação (Raastad et al., 2010). Pensa-se que também participem neste processo degenerativo inicial as metaloproteínas (MMPs), uma vez que estas são as principais proteínas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, sendo ao mesmo tempo biomarcadores da ativação dos processos fibróticos, embora as

suas funcionalidades ainda não sejam completamente conhecidas (Giannandrea & Parks, 2014).

Além do stress mecânico que se faz sentir no músculo esquelético, o exercício, principalmente quando praticado de forma extenuante, vai produzir também um aumento do stress metabólico, térmico e oxidativo. Durante a prática de exercício o metabolismo muscular é superior, levando ao aumento da produção de calor, da concentração de ADP e da síntese de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Sharafi & Rahimi, 2012). Consequentemente, a maior concentração de ROS no músculo vai induzir um aumento do stress oxidativo que por sua vez agrava o dano muscular, podendo contribuir para o processo necrótico ou induzir a apoptose das células musculares em caso de perda da homeostasia (Sharafi & Rahimi, 2012). Este processo de morte celular programada é executado pelas caspases, principalmente as caspases-2, -3, -7, -8, -9 e -10, proteases responsáveis pela degradação de substratos musculares críticos para a aceleração do processo da apoptose (Shalini et al., 2015; Sharafi & Rahimi, 2012). No entanto, estas enzimas também possuem um papel importante no controlo da resposta inflamatória, principalmente as caspases-1, -4, -5, -11 e -12, promovendo a maturação de mediadores inflamatórios tais como algumas citocinas (Shalini et al., 2015).

Motivada pela forte agressão do exercício, é induzida uma resposta inflamatória local com invasão leucocitária idêntica ao padrão inflamatório de outros tecidos (Duarte, 1988, 2009; Paulsen et al., 2012). A magnitude desta resposta é reflexo da severidade do dano produzido (Paulsen, Cramer, et al., 2010; Paulsen, Egner, et al., 2010) e quando provocada por exercício excêntrico inabitual, pode decorrer durante 3 semanas até o músculo conseguir retornar ao normal a sua aparência histológica, conteúdo proteico total e funcionalidade (Paulsen, Egner, et al., 2010).

A invasão leucocitária é geralmente detetável 24-48 horas após o estímulo (Paulsen, Cramer, et al., 2010) sendo os neutrófilos os primeiros leucócitos a chegar à zona lesada. Estes atingem o seu pico numérico às 24 horas após a lesão, deixando rapidamente de serem detetados no músculo

danificado por volta das 36-48 horas (Saclier et al., 2013). Estas células imunes iniciam o processo inflamatório e facilitam a regeneração muscular através da libertação de citocinas pró-inflamatórias, radicais livres e enzimas lisossômicas, aumentando o dano e atraindo macrófagos adicionais para a área lesada (Buford et al., 2014). Este contributo é denominado de degeneração extrínseca.

2.1.2. Manifestações clínicas do dano induzido pelo exercício

É atualmente aceite que sempre que se faz exercício moderado ou ligeiro é induzido algum stress nas fibras musculares recrutadas, as quais, se o exercício for habitual desenvolvem adaptações crónicas que dão tolerância a esse stress. No entanto, quando praticado de forma inabitual ou extenuante e com grande percentagem de contrações excêntricas, ou seja, em situações de grande exigência mecânica, o exercício pode provocar, como descrito acima, um dano considerável nos músculos esqueléticos recrutados, onde a degeneração celular é exuberante, provocando ao mesmo tempo uma forte destabilização do ambiente interno do músculo (Duarte et al., 2001).

Esta entidade anatomopatológica, habitualmente designada por miopatia do exercício, tem um carácter transitório e é geralmente acompanhada de várias manifestações de ordem clínica. Está descrito na literatura o aparecimento de distúrbios de controlo nervoso com interferências a nível do sistema nervoso central, tais como alterações da propriocepção (Weerakkody et al., 2003), redução da força muscular máxima voluntária (Hubal et al., 2008; Paulsen, Crameri, et al., 2010; Prasartwuth et al., 2006; Raastad et al., 2010), hipertonia muscular com redução do ângulo articular em repouso (Paulsen, Crameri, et al., 2010; Proske & Morgan, 2001), aumento de biomarcadores sanguíneos de lesão, como por exemplo a atividade sanguínea da CK (Brancaccio et al., 2007).

Este estado anatomopatológico apresenta sintomas característicos, tais como a sensação do aumento da rigidez do músculo, astenia e sensação

retardada de desconforto muscular (Järvinen et al., 2013), com câibras e dor muscular espontânea ou induzida pela palpação ou pelo movimento. O pico sintomático ocorre por volta do 2-3 dia, possuindo assim uma natureza retardada e localizada aos músculos exercitados (Appell et al., 1992; Duarte, 2009; Soares & Duarte, 1989). Esta sensação retardada de desconforto muscular tem sido frequentemente observada com prática de exercícios excêntricos, não sendo, no entanto, exclusividade dos mesmos (Brickson et al., 2014; Guilhem et al., 2010; Järvinen et al., 2013; Stauber et al., 1990). Atinge especialmente músculos não treinados (Järvinen et al., 2013), os quais não têm tolerância ao exercício realizado, e vai desaparecendo progressivamente ao longo de 5-7 dias após exercício (Guilhem et al., 2010; Järvinen et al., 2013).

A magnitude deste quadro clínico assim como o número de fibras musculares afetadas e a intensidade do dano nem sempre são idênticos de estudo para estudo, existindo vários fatores condicionantes (Duarte, 1988, 2009; Soares & Duarte, 1989). Diferenças na intensidade do exercício (Paulsen, Crameri, et al., 2010), volume do exercício (Nosaka et al., 2002), variações na suscetibilidade entre os indivíduos da amostra (Paulsen, Crameri, et al., 2010; Paulsen, Egner, et al., 2010), métodos de estimulação distintos e ângulos de movimento diferentes, induzindo diferentes intensidades de exercício (Black et al., 2008), tipo de músculo exercitado, o que pode levar a diferenças na percentagem de cada tipo de fibras recrutado, nível de atividade física, índices de dano avaliados e espaço temporal desde a prática de exercício excêntrico até ao dia de avaliação (Crameri et al., 2007; Lovering & Brooks, 2014) são alguns dos fatores já referenciados na literatura.

2.2. Processo regenerativo

Após as fases de degeneração intrínseca e extrínseca das fibras musculares, há infiltração de monócitos nas zonas lesadas dos músculos recrutados, os quais se diferenciam em macrófagos M1 (Chazaud et al., 2009). A sua concentração muscular mantém-se elevada durante 3-4 dias (Paulsen,

Cramer, et al., 2010), diminuindo apenas após diferenciação e fusão das células miogénicas (Arnold et al., 2007). De uma forma geral estes leucócitos têm por missão fagocitar e remover as áreas necróticas e outros detritos celulares, libertando ao mesmo tempo citocinas e fatores de crescimento nas áreas lesadas (Pelosi et al., 2007). Progressivamente começa a haver uma mudança, em termos funcionais, nos macrófagos residentes (Arnold et al., 2007) através da diferenciação dos macrófagos M1 em macrófagos M2, passando de um estado pró-inflamatório para um anti-inflamatório. Esta mudança é essencial para a resolução da inflamação (Arnold et al., 2007) e para o desenvolvimento do processo miogénico (Arnold et al., 2007; Tidball & Villalta, 2010).

Após a remoção dos produtos celulares danificados pelas células inflamatórias decorre um evento reparativo igualmente idêntico ao geralmente descrito para outros estímulos lesivos e que engloba tanto as fibras musculares como a matriz extracelular (Duarte et al., 2001).

Relativamente às fibras musculares, durante este processo miogénico, há um recrutamento de uma população de células estaminais, as células satélite, cuja concentração aumenta rapidamente nas primeiras 24 horas e se mantém geralmente elevada nos 8 dias seguintes (Paulsen et al., 2012), havendo até, em caso de prática de exercício excêntrico inabitual e exuberantes, relatos de concentrações elevadas destas células ao 27º dia após exercício (Hyldahl et al., 2015). Estas células satélite, que em situação basal se encontram num estado quiescente e num local discreto entre o sarcolema e a lâmina basal do músculo, constituem a maior fonte de células progenitoras musculares (Murphy et al., 2011). Após a sua ativação, proliferam para mioblastos que por sua vez se fundem com as fibras lesadas adjacentes e, no local de dano muscular, se diferenciam em miotubos, repondo ou acrescentando material contrátil e mionúcleos às fibras musculares lesadas, sofrendo posterior maturação para fibras musculares completamente regeneradas ao final de 2-3 semanas (Bruusgaard et al., 2010). Este último processo de maturação dos miotubos em fibras musculares completamente regeneradas é histologicamente detetável em microscopia ótica, em cortes

transversais, através da observação da posição central dos mionúcleos (Duarte et al., 2001; Paulsen, Egner, et al., 2010). A posição central do núcleo indica que a fibra em questão foi afetada e está, naquele momento, em processo reparativo (Duarte et al., 1994; Duarte et al., 1993; Duarte et al., 1992; Folker & Baylies, 2013). É importante também realçar que, durante a proliferação das células satélite, uma parte da população não chega a executar o programa miogénico, restabelecendo o nicho muscular de células satélite quiescentes e garantindo ao mesmo tempo a sua autorrenovação e prontidão para um próximo caso de miogénese (Crameri et al., 2007; Sambasivan et al., 2011). Um número reduzido de células satélite no músculo equivale a um menor potencial regenerativo (Sambasivan et al., 2011) e como tal, a regeneração muscular induz também um aumento desta reserva estaminal celular (Crameri et al., 2007).

Quanto ao espaço extracelular, as mudanças ao nível da composição da matriz extracelular e dos seus componentes são um processo muito importante para uma correta restauração da arquitetura tecidual durante a regeneração muscular, uma vez que é o ambiente promovido por esta estrutura que permite o funcionamento das fibras musculares contrácteis. No entanto, a maioria dos estudos tem-se centrado nas alterações fenotípicas e nos processos reparativos inerentes às fibras musculares havendo menor conhecimento sobre os processos que aqui decorrem. No espaço extracelular, o processo reparativo parece ter início logo nas primeiras horas após o estímulo mecânico (Raastad et al., 2010), e a magnitude da resposta encontra-se relacionada com a intensidade desse mesmo estímulo (Hyldahl et al., 2015). São inicialmente libertadas proteases (Hyldahl et al., 2015; Raastad et al., 2010) que vão provocar alguma degradação da matriz extracelular e desta forma induzir um estado ligeiro de desadesão celular. Das proteínas responsáveis pela ação desadesiva, salienta-se a participação da TNC e da PIIINP e principalmente das MMPs, tal como já referido anteriormente (Giannandrea & Parks, 2014; Raastad et al., 2010). Estas últimas, além da função catabólica dos constituintes da matriz extracelular possuem outros papéis no desenrolar do processo reparativo, existindo cerca de 25 tipos destas proteínas (Cunha

Nascimento et al., 2015; Nagase et al., 2006; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010), destacando-se na literatura as MMP-2 e MMP-9. As MMP-2 são essencialmente secretadas pelas células satélite e pelos fibroblastos intramusculares (Smith et al., 2010) e a sua atividade está relacionada com a formação de novas fibras musculares através da degradação do colagénio tipo IV da membrana basal, permitindo assim uma melhor proliferação, migração e fusão dos mioblastos às fibras adjacentes (Cunha Nascimento et al., 2015; Nagase et al., 2006; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010). As MMP-9 são essencialmente secretadas pelos neutrófilos (Smith et al., 2010) e a sua atividade está não só relacionada com a degradação da matriz extracelular durante a inflamação como também com a ativação das células satélite (Cunha Nascimento et al., 2015; Nagase et al., 2006; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010).

O estado catabólico e desadesivo inicialmente provocado pelas MMPs é posteriormente regulado, no final da reparação extracelular, pelos inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs), que de forma antagónica promovem um estado adesivo da matriz extracelular e a deposição dos seus principais componentes, sendo o desequilíbrio da proporção entre estas 2 proteínas, que a níveis basais se encontra 1:1, que vai provocar a mudança entre um estado de desadesão ou de adesão extracelular (Cunha Nascimento et al., 2015; Nagase et al., 2006; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010).

Este estado desadesivo inicial da matriz extracelular é essencial para o processo regenerativo através da criação de um ambiente favorável ao processo miogénico e à consequente remodelação da matriz extracelular (Hyldahl et al., 2015; Raastad et al., 2010; Stauber et al., 1990; Thomas et al., 2015). O estado desadesivo, favorecido por estas proteases, permite um melhor recrutamento e mobilidade das células envolvidas no processo reparativo da matriz extracelular e das fibras musculares, como é o caso dos leucócitos, fibroblastos e células satélite para o local de lesão (Cunha Nascimento et al., 2015; Nagase et al., 2006; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010; Stauber et al., 1990; Wernbom et al., 2012).

Deste conjunto de células, os fibroblastos são essenciais para o crescimento desta estrutura extracelular, uma vez que são eles que produzem as suas componentes, incluindo integrinas ligantes como as fibronectinas, colagénio tipo I e III e proteoglicanos e ao mesmo tempo para a proliferação celular através da libertação de fatores de crescimento essenciais para a reparação muscular (Murphy et al., 2011; Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010). Um dos aspetos mais importantes para o correto funcionamento destas células produtoras de tecido conjuntivo está na ligação à matriz através de integrinas, uma ligação que permite a leitura e reação a qualquer estímulo mecânico imposto na matriz extracelular (Smith et al., 2010). Além da produção dos componentes da matriz extracelular em geral, estas células também reagem à presença de lesão nas fibras adjacentes, principalmente em caso de rutura da lâmina basal ou do sarcolema, formando uma camada provisória de tecido conjuntivo à volta da lesão segmentar com o objetivo de proteger a zona de rutura, fornecendo algum poder preventivo relativamente a um posterior agravamento da zona lesada através de novas contrações musculares (Abdelmagid et al., 2012; Murphy et al., 2011). As componentes produzidas pelos fibroblastos, incluindo a síntese de colagénio, parecem ser induzidas de forma atrasada, sendo apenas notória o seu aumento, geralmente, no segundo dia após prática de exercício (Hyldahl et al., 2015). Hyldahl et al. (2015) ainda mostraram que o exercício excêntrico praticado de forma inabitual e extenuante, pode induzir uma expressão dos genes responsáveis pela produção colagénica até 27 dias após o estímulo.

Como a magnitude da expressão de colagénio é controlada pela severidade do dano sofrido, quando este é exagerado ou existe contínua lesão muscular, pode resultar num processo inflamatório exagerado com proliferação excessiva dos fibroblastos provocando conseqüentemente a deposição excessiva de colagénio e restantes componentes da matriz extracelular, com formação de uma cicatriz fibrótica não funcional, prejudicando ao mesmo tempo o processo regenerativo (Carosio et al., 2011). Esta é uma das razões pela qual o repouso nos primeiros dias após uma lesão, evitando novas ruturas e novo dano do local já lesado anteriormente, é muito importante, caso

contrário poderá formar-se uma cicatriz tecidual, capaz de diminuir a funcionalidade do músculo e a sua capacidade contrátil (Järvinen et al., 2013).

Num outro ponto de vista encontra-se também o efeito nefasto da falta de carga mecânica sobre esta estrutura, levando a uma desregulação com diminuição da expressão de colagénio muscular, sugerindo mais uma vez a ideia da rápida e dinâmica resposta, por parte da matriz extracelular, ao aumento ou diminuição de estímulo mecânico. (Smith et al., 2010)

Paralelamente ao processo regenerativo das fibras musculares e do espaço extracelular, o sistema vascular responde também ao dano induzido pelo exercício através do processo angiogénico. A angiogénese possui uma forte ligação com o processo regenerativo, uma vez que é necessária uma boa reperfusão de tecido danificado para poder ocorrer uma completa e correta reparação muscular (Buford et al., 2014). O processo angiogénico tem como fator chave o VEGF (vascular endothelial growth factor) (Buford et al., 2014), secretado após stress mecânico, por exemplo, pelas células satélite e citocinas do processo inflamatório (Buford et al., 2014; Huntsman et al., 2013). O VEGF estimula o crescimento e a remodelação vascular no músculo após exercício excêntrico (Wagner, 2011), além de influenciar o crescimento e diferenciação das células miogénicas (Christov et al., 2007).

2.3. Efeito protetor do treino ao exercício físico

O produto final dos processos reparativos musculares esqueléticos é essencial para o futuro dos mesmos, uma vez que é no seguimento da recuperação ao dano agudo do exercício que se desencadeiam adaptações que induzem no músculo uma maior tolerância a estímulos futuros idênticos (Guilhem et al., 2010; Hylidahl et al., 2015).

Este fenómeno manifesta-se através da redução de vários sinais de dano muscular após uma segunda sessão do mesmo treino com exercício excêntrico (Dartnall et al., 2011). Estão descritos, após exercício, uma menor resposta inflamatória aguda, local e sistémica, diminuição da atividade

sanguínea de CK circulante, menor expressão de TNC, significando uma menor degradação da matriz extracelular, e uma recuperação mais rápida dos níveis de força máxima perdidos após exercício, culminando numa sintomatologia induzida pelo exercício excêntrico reduzida e evidente na menor sensação retardada de desconforto muscular (Dartnall et al., 2011; Hyldahl et al., 2015).

Apesar deste fenómeno se encontrar vivamente comprovado por vários estudos, parece haver pouco consenso sobre os mecanismos por detrás deste efeito (Chen et al., 2009; Dartnall et al., 2011; Hyldahl et al., 2015), que geralmente se faz notar logo 2-3 dias após exercício chegando a durar até 4 semanas (Chen et al., 2009). Tal como nos processos regenerativos, existe maior conhecimento sobre as adaptações do exercício excêntrico a longo prazo nas fibras musculares do que no tecido conjuntivo extracelular.

Relativamente às fibras musculares, um dos efeitos crónicos do exercício excêntrico, proveniente dos processos reparativos, é a hipertrofia muscular (Atherton & Smith, 2012; Flann et al., 2011; Guilhem et al., 2010; Touchberry et al., 2012). Este crescimento muscular resulta do acumular sucessivo de aumentos na síntese proteica e da fusão de mioblastos com as fibras musculares estimuladas após sessões repetidas de exercício excêntrico (Atherton & Smith, 2012; Flann et al., 2011; Guilhem et al., 2010). Pensa-se que este aumento do número de sarcómeros ajude a dissipar a energia, uma vez que permite a distribuição da energia sofrida e produzida pelo forte estímulo mecânico do exercício excêntrico por uma maior quantidade de massa contrátil (Flann et al., 2011). Uma vez que as contrações excêntricas são capazes de apresentar maiores produções de força comparativamente aos outros dois tipos de contrações, com a inerente ocorrência de dano muscular, muito autores têm vindo a defender que este tipo de contração possui um maior potencial para desenvolver crescimento muscular. De facto, Kostek et al. (2007) observaram uma maior expressão dos genes responsáveis pelo crescimento muscular após exercício com contrações excêntricas comparativamente a exercícios com contrações concêntricas ou isométricas.

Uma outra adaptação, relacionada, em parte, com o efeito hipertrófico do exercício excêntrico, é o aumento da força muscular, provocando um aumento da funcionalidade músculo-esquelética e um conseqüente melhor suporte das tensões mecânicas induzidas pelos estímulos excêntricos (Flann et al., 2011). Novamente pelas particularidades das contrações excêntricas, parece que o exercício excêntrico possui um potencial para induzir superiores ganhos de força, quando comparada ao exercício concêntrico ou isométrico (Remaud et al., 2007).

No entanto, parece que a principal contribuição para este efeito protetor do treino ao exercício excêntrico recai sobre as remodelações da matriz extracelular e no aumento da deposição de colagénio (Hyldahl et al., 2015).

Já foi abordado anteriormente que o exercício excêntrico, pela inerente produção de altos níveis de stress sobre as fibras musculares recrutadas, provoca uma forte remodelação da matriz extracelular, promovendo o seu aumento e permitindo conseqüentemente uma melhor dissipação das tensões sofridas pelo músculo ao longo de toda a matéria amorfa extracelular, incluindo o tendão (Hyldahl et al., 2015; Thomas et al., 2015). Desta forma, pensa-se que o treino promova um aumento do tecido conjuntivo, com grande ênfase no aumento do colagénio intramuscular, juntamente com a reorganização do citoesqueleto celular, levando a um aumento da rigidez, de forma passiva e ativa, do sistema muscular esquelético e culminando assim numa maior resistência a futuros estímulos idênticos (Guilhem et al., 2010; Hyldahl et al., 2015).

O tecido conjuntivo, providencia ao sistema muscular uma boa integridade e organização estrutural (Thomas et al., 2015). A habilidade das fibras musculares em contrair é inútil se a força produzida nessas contrações não for conduzida até aos tendões, sendo que a estrutura responsável por essa transmissão mecânica é, nada mais nada menos que, o próprio tecido conjuntivo e como tal, o seu reforço e homeostasia são de extrema importância funcional para o músculo esquelético (Smith et al., 2010).

Contudo, apesar de inicialmente vantajoso, se a deposição dos componentes da matriz extracelular for exagerada, devido à persistência de

dano e reação inflamatória, levando a uma libertação excessiva de citocinas, fatores de crescimento e consequente ativação exaustiva de fibroblastos, pode induzir um estado patogénico característico de doenças musculares como a distrofia muscular de Duchenne e do próprio envelhecimento, levando à substituição de fibras musculares contrácteis por tecido fibrótico (Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010). Assim, ao mesmo tempo que uma produção adequada de tecido conjuntivo é benéfica para o músculo, uma vez que melhora a distribuição e o suporte de forças mecânicas ao longo do músculo, por outro lado uma produção excessiva de tecido fibrótico pode induzir alterações não desejáveis na rigidez do músculo, provocando a diminuição da sua distensibilidade e performance muscular.

Relativamente ao processo danoso oxidativo induzido pela prática de exercício físico inabitual ou extenuante, através da elevação da concentração de ROS no músculo, parece que o treino habitual promove também proteção contra este stress metabólico. Devido ao aumento do sistema antioxidante corporal em indivíduos treinados, os níveis oxidativos musculares sofrem um menor aumento após exercício, levando assim a menores níveis de apoptose miofibrilar. Há também um aumento da atividade enzimática mitocondrial responsável por modular a produção de ROS nesta estrutura (Shalini et al., 2015).

Finalizando, alguns autores também sugerem que, além da influência das alterações morfológicas do músculo esquelético na tolerância ao exercício induzida pelo treino, adaptações ao nível do sistema neuromuscular possam estar igualmente na origem deste mesmo efeito (Dartnall et al., 2011). Aliás, pensa-se que estas sejam as mais rápidas alterações a induzir proteção contra exercícios excêntricos posteriores, observáveis logo 24 horas após o término do exercício (Dartnall et al., 2011). Estas alterações do sistema nervoso central induzem uma melhor sincronização das unidades motoras ativadas, através da melhoria, tanto do tempo como da intensidade, da descarga dos potenciais de ação em diferentes unidades motoras (Dartnall et al., 2011), ao mesmo tempo que existe também um aumento do número de unidades motoras recrutadas para contração, repartindo assim o stress por uma maior quantidade de

músculo e diminuindo conseqüentemente a probabilidade de dano muscular (Dartnall et al., 2011).

3. Artigo Experimental

O Treino com Exercícios de Contração Excêntrica Induz a Longo Prazo Fibrose Muscular Esquelética

Júlio Daniel Barros Pacheco

Paula Maria Nogueira Gonçalves da Rocha

Carlos Eduardo da Silva Teixeira

José Alberto Ramos Duarte

CIAFEL, Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, Porto

Correspondência:

Júlio Pacheco

FADEUP - Rua Dr. Plácido Costa, 91

4200-450 Porto, Portugal

111101057@fade.up.pt

Submetido à Revista Portuguesa de Ciências do Desporto e aqui apresentado segundo a formatação exigida para submissão.

Abstract:

Eccentric exercise (EcEx), specially when unusual or strenuous, is harmful to skeletal muscle. However, when usually repeated through time it motivates tolerance to future exercises. Despite the chronic adaptations of muscle fibers may explain some of this tolerance, the possible contribution of increased connective tissue to the training-induced protection can not be excluded. The objective of this study was to evaluate the changes in the collagen content of EcEx trained quadriceps. Male wistar rats were divided into two groups (n=5 per group): Sedentary control (SED) and trained (TR). The TR animals practiced downhill running on a treadmill (-25°; 30meters/minute; 60 minutes) 1x/week, for 8 weeks. Blood activity of Creatine Kinase (CK) was measured during the protocol and, after sacrifice, the quadriceps muscle was collected to histological analysis. CK results demonstrated a progressive training protective effect to exercise bout (p=0,002). In TR skeletal muscles, there was a moderate increase in muscle fibers cross-sectional area (p=0,000), simultaneously with a huge increase in the total collagen content and endomysium thickness (p = 0.000). It can be concluded in addition to the tolerance effect, that EcEx training induced a remarkable increase in skeletal muscle collagen content in parallel with a moderate increase of muscle fibers cross-sectional area.

Key words: Eccentric exercise; Tolerance; Connective tissue; Collagen; Endomysium; Quadriceps muscle;

Resumo:

O exercício excêntrico (ExEx), inabitual ou extenuante, é um indutor de dano muscular esquelético. Contudo, quando repetido no tempo, de forma habitual, motiva tolerância muscular a essa agressão. Apesar das adaptações crônicas das fibras musculares poderem explicar alguma desta tolerância, não é de excluir a possível contribuição do aumento do tecido conjuntivo muscular para essa proteção induzida pelo treino. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar as alterações no conteúdo de colagénio do músculo *quadriceps* sujeito a treino com ExEx. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos (n=5 por grupo): sedentário controlo (SED) e treinado (TR). Os animais TR praticaram corrida em tapete rolante (-25°; 30m/minuto; 60 min) 1x/semana, durante 8 semanas. A atividade sanguínea da Creatina Quinase (CK) foi avaliada ao longo do protocolo e, após sacrifício, recolheu-se o músculo *quadriceps* para análise histológica. Os resultados da CK demonstraram o efeito protetor do treino ao exercício (p=0,002). Nos músculos esqueléticos, observou-se um aumento da área de secção transversal (p=0,000) das fibras musculares, simultaneamente com um aumento do conteúdo total de colagénio e da espessura do endomísio (p=0,000). É possível concluir-se que, paralelamente ao efeito de tolerância, o treino ExEx promoveu um acentuado aumento do conteúdo muscular esquelético de colagénio e um incremento moderado da área de secção transversal das fibras musculares.

Palavras-chave: Exercício excêntrico; Tolerância; Tecido conjuntivo; Colagénio; Endomísio; Músculo *quadriceps*;

Introdução

O tecido muscular esquelético possui uma forte capacidade plástica, estando em constante adaptação às exigências fisiológicas a que é solicitado (Saclier et al., 2013). Durante o exercício físico e comparativamente ao repouso, os músculos esqueléticos solicitados estão sujeitos a um maior stress metabólico e/ou mecânico, dependendo do tipo de contrações efetuadas. As contrações excêntricas são aquelas com maior potencial lesivo para o músculo (Lieber & Friden, 1999), uma vez que, comparativamente às contrações concêntricas e isométricas, recrutam uma menor quantidade de unidades motoras para o mesmo trabalho efetuado, levando a uma distribuição do stress mecânico por uma menor quantidade de fibras musculares (Abbott et al., 1952). Desta forma, a prática inabitual ou extenuante de exercícios com predomínio de contrações excêntricas, pela grande sobrecarga mecânica imposta, tende a induzir dano sobre as estruturas musculares, podendo, em situações de grande exigência, motivar o aparecimento de uma entidade anatomopatológica nos músculos recrutados denominada por miopatia do exercício, com manifestações clínicas e laboratoriais (Duarte et al., 2001).

Como consequência desta agressão pelo exercício, é despoletada localmente uma reação inflamatória, com a consequente invasão leucocitária (Dehne et al., 2011; Paulsen et al., 2012), semelhante ao modelo inflamatório padrão observado noutros tecidos (Duarte, 1988, 2009), seguindo-se também um processo reparativo, envolvendo a regeneração e/ou cicatrização, idêntico aos geralmente descritos para outros estímulos lesivos (Duarte et al., 2001; Paulsen, Egner, et al., 2010). A reparação pode ocorrer durante semanas, como demonstra a presença de núcleos em posição central das fibras musculares (Duarte et al., 1994; Duarte et al., 1993; Duarte et al., 1992; Folker & Baylies, 2013).

Curiosamente, durante a recuperação a este dano agudo, desencadeiam-se adaptações que capacitam o músculo de uma maior tolerância para estímulos idênticos futuros (Guilhem et al., 2010; Hyldahl et al.,

2015), estando este fenómeno na base da proteção muscular ao exercício em indivíduos treinados. A existência de uma menor resposta inflamatória, local e sistmica, a menor atividade da CK circulante e uma recuperação mais rápida dos níveis de força máxima perdidos após o exercício, culminando numa sensação retardada de desconforto muscular reduzida (Dartnall et al., 2011; Hyldahl et al., 2015), são alguns exemplos desta maior tolerância induzida pelo treino para exercícios futuros.

A maioria da investigação efetuada sobre o processo reparativo muscular após exercício tem-se centrado no estudo das alterações fenotípicas das fibras musculares esqueléticas, estando, por exemplo, já bem documentada a hipertrofia das fibras musculares após treino ExEx (Atherton & Smith, 2012; Flann et al., 2011; Guilhem et al., 2010; Touchberry et al., 2012). No entanto, a matriz extracelular, sendo uma estrutura complexa composta principalmente por proteoglicanos, glicoproteínas e colagénio, é essencial para providenciar uma boa funcionalidade, integridade e organização estrutural, retransmitindo sinais mecânicos e regulando o comportamento de outras células a residentes, tal como as células satelite (Thomas et al., 2015), possibilitando ao mesmo tempo uma melhor distribuição e suporte das tensões mecânicas ao longo do músculo (Hyldahl et al., 2015). Por esta razão,  possível que o tecido conjuntivo possua também um papel importante na tolerância induzida pelo exercício, apesar de pouca atenção por parte dos investigadores lhe ter sido dada. Por exemplo, num desses estudos, está descrito um aumento da expressão dos genes envolvidos na síntese de colagénio no músculo esquelético após treino com ExEx (Hyldahl et al., 2015) apesar de não haver evidência histológica da maior deposição de colagénio nesses músculos treinados.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal verificar o efeito crnico do treino com ExEx no espaço extracelular, nomeadamente no conteúdo de colagénio e na espessura do endomísio, assim como a área de secção transversal das fibras musculares no músculo *quadriceps* do rato (reto femoral; vasto lateral; vasto medial). Espera-se, como efeito crnico da repetição do ExEx, um aumento da quantidade de colagénio no espaço

extracelular em geral, assim como um aumento da espessura do endomísio, em particular, juntamente com um aumento da área de secção transversal das fibras musculares.

Material e métodos

Modelo animal e desenho experimental

Para a realização do estudo foram utilizados 10 ratos Wistar, machos com 16 semanas de idade, provenientes de Charles River Laboratories, Espanha S. A. (Barcelona). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 por gaiola), em condições ambientais controladas (21°C-22°C de temperatura, 50%-60% humidade), num ciclo de luz/escuridão invertido de 12h e com livre acesso à água e comida comercial para roedores (dieta padrão de laboratório 4RF21®, Mucedola, Itália). Após 1 semana de aclimatização os animais foram distribuídos aleatoriamente por 2 grupos: grupo controlo sedentário (SED, n=5, peso de 466g ± 28,99g) e grupo experimental exercitado (TR, n=5, peso de 461g ± 43,09g).

Os animais do grupo TR foram submetidos a um protocolo de treino em tapete rolante (Treadmill Control LE 8710, Harvard Apparatus, USA), com declive negativo (-25°, 30 metros/minuto, durante 60 minutos), uma vez por semana, ao longo de 8 semanas. Antes do início do protocolo o grupo TR teve 1 semana de adaptação ao tapete (10 min/dia sem inclinação e a baixa intensidade durante a aclimatização). Os animais do grupo SED permaneceram limitados ao espaço da gaiola durante todo o protocolo experimental.

Durante o protocolo foram efetuadas recolhas sanguíneas, numa veia da cauda, de 32 ml para medição da atividade sanguínea de CK. A todos os grupos foi efetuada uma colheita basal, antes do início do protocolo. Aos animais do grupo TR as recolhas sanguíneas aconteceram 48 após cada sessão de treino. Os valores de CK, expressos em unidades por litro (µ/L),

foram medidos com tiras apropriadas (Roche, Ref 373007) com recurso a um aparelho de química seca, o reflotron analyser (The Reflotron Plus, Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands).

Uma semana após a oitava sessão de treino, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamina e Xilazina e eutanizados por exsanguinação, procedendo-se de seguida à colheita amostral dos músculos quadríceps (reto femoral; vasto lateral; vasto medial).

Microscopia ótica e análise histológica

Após excisão dos músculos *quadríceps*, estes foram seccionados em porções de menores dimensões (4 a 5 porções) e imersos, durante 24h, numa solução de paraformaldeído 4% (v/v) em tampão PBS 0,1M, pH 7,2, a 4 °C para fixação. De seguida as porções foram lavadas com tampão PBS 0,1M pH 7,2 e desidratadas através de etanol graduado. Foram diafanizadas em xileno e incluídas em parafina, utilizando-se numa primeira fase soluções de xileno:parafina em diferentes proporções e, numa segunda fase, parafina pura.

Secções transversais (5 µm de espessura) dos blocos de parafina foram cortadas num micrótomo (Leica, RM 2125) e colocadas em lâminas revestidas a silano. As secções foram desparafinadas em xileno e hidratadas através de etanol graduado. Parte das lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e a outra parte corada com picosirius Red, de acordo com o método descrito por Sweat et al. (1964). Para montagem das lâminas usou-se o DPX.

Procedeu-se à análise das lâminas ao microscópio ótico com digitalização aleatória de fotos através de uma câmara digital acoplada (AxioCam MRc5, Axio Imager A1, Carl Zeiss; Alemanha).

Análise da área de secção transversa e da posição do núcleo das fibras musculares

Fotos aleatórias coradas com hematoxilina-eosina de magnitude 100x foram analisadas pelo software ImageJ 1.50b (National Institute of Health, USA) para contagem da área de secção transversal e posição do núcleo das fibras musculares. A cada fibra muscular, simultaneamente à medição da área de secção transversal, foi atribuída a classificação 0 quando o seu núcleo se encontrasse em posição periférica e a classificação 1 quando o seu núcleo se encontrasse em posição central. O número total de fibras musculares analisadas nos grupos SED e TR foi de 13.345 e 14.295, respetivamente.

Análise do conteúdo total de colagénio e espessura do endomísio

Fotos aleatórias coradas com Picrosirius Red, de magnitude 400x, foram analisadas pelo software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc). Analisaram-se no total 100 fotos, 50 por cada grupo e 10 por cada músculo. Quantificou-se a área percentual (rácio) de colagénio por tecido muscular. Para a medição da espessura da parede do endomísio, fotos aleatórias coradas com Picrosirius Red de magnitude 400x foram analisadas pelo software ImageJ 1.50b (National Institute of Health, USA). Analisaram-se no total 1800 pontos de medição, 900 por cada grupo e 180 por cada músculo. Foram apenas medidas as paredes de endomísio cujas fibras musculares se encontravam justapostas. Cada parede que separava duas células foi medida em 3 pontos distintos, diminuindo assim a probabilidade de medir apenas zonas de menor ou maior espessura.

Análise dos índices de dano muscular

Fotos aleatórias, coradas com hematoxilina-eosina, de magnitude 400x, foram avaliadas segundo 4 parâmetros indicadores de dano muscular, sendo eles sinais de Degenerescência Celular (dilatação das fibras, vacuolização, presença de núcleos picnóticos e densidade sarcoplasmática), de Necrose (fibras musculares necróticas ou eosinofílicas), da presença de Reação Inflamatória (leucócitos intersticiais ou no interior das fibras) e o grau de Desorganização Tecidual, de acordo com a metodologia previamente descrita (Dinis-Oliveira, Duarte, et al., 2006; Dinis-Oliveira, Remião, et al., 2006; Dinis-Oliveira et al., 2007). Analisaram-se no total 100 fotos, 50 por cada grupo e 10 por músculo.

Análise estatística

Para testar a normalidade dos dados usou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para amostras com $n > 50$ (valores da área de secção transversal das fibras musculares; valores do conteúdo total de colagénio e valores do espessamento do endomísio) e o teste Shapiro-Wilk para amostras com $n < 50$ (valores da atividade sanguínea de CK). As variáveis com distribuição não normal ou categóricas foram apresentadas sobre a forma de mediana e intervalo interquartil, enquanto que as variáveis com distribuição normal foram apresentadas sobre a forma de média \pm desvio padrão. Para comparar as diferenças intergrupais foi utilizado o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney (variáveis categóricas ou sem distribuição normal), o teste não-paramétrico de Friedman para a análise de variáveis com medidas repetidas (atividade da CK) e o teste Chi-Square para análise bivariada (posição do núcleo na fibra muscular). O nível de significância estabelecida foi de 5%. Para a análise dos dados recorreu-se ao programa IBM SPSS Statistics versão 23

Resultados

Resultados da análise da atividade sanguínea de CK

Não se verificaram diferenças entre os valores basais de ambos os grupos (Figura 1). Durante o protocolo de treino verificou-se no grupo TR um aumento significativo ($p=0,002$) dos valores de CK 48 horas após o 1º exercício do protocolo. Contudo, após as restantes sessões de treino, os valores de CK retomaram os níveis basais (Figura 1) demonstrando a tolerância adquirida pelo primeiro exercício.

Resultados da área de secção transversal e posição do núcleo da fibra muscular

O treino também induziu um aumento significativo da área de secção transversal das fibras musculares do quadríceps, tal como pode ser verificado na Tabela 1. Comparativamente ao grupo SED, o grupo TR teve um aumento de 20,9% deste parâmetro.

Ainda relativamente à análise da fibra muscular, observou-se no grupo TR um aumento significativo ($p=0,000$) da quantidade de fibras musculares com o núcleo em posição central. Enquanto no grupo SED 3,8 % do total das fibras musculares analisadas apresentaram o núcleo em posição central, no grupo TR 6% do total das fibras analisadas apresentaram núcleo em posição central (Figura 2).

Resultados do conteúdo total de colagénio

O protocolo experimental resultou num aumento significativo da percentagem do conteúdo de colagénio por quantidade de tecido muscular

(Tabela 1). Comparativamente ao grupo SED, o grupo TR sofreu um aumento exuberante de 262,2% neste parâmetro, tal como demonstrado na tabela 1 observado na Figura 3.

Resultados da espessura do endomísio

Durante o período experimental, o treino provocou um aumento significativo da espessura da parede do endomísio. Comparativamente ao grupo SED, o grupo TR sofreu aumentos de 74% deste parâmetro, tal como ilustrado na Tabela 1 e na Figura 3.

Resultados dos índices de dano muscular

Não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos relativamente à totalidade do dano muscular (Tabela 2). O mesmo se observou nas comparações intergrupais de cada uma das 4 variáveis de dano muscular avaliadas. Na Tabela 2 também é possível verificar que os valores da mediana de todas as variáveis possuem um valor igual a 0, expressando o baixo nível de dano muscular 8 dias após o término do protocolo experimental, em ambos os grupos.

Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que a prática repetida de ExEx induziu um efeito de tolerância, um acentuado aumento da área percentual do conteúdo de colagénio muscular juntamente com o aumento da espessura da parede do endomísio. Os nossos resultados também mostram que o treino ExEx promoveu uma hipertrofia moderada das fibras musculares.

No que respeita à atividade sanguínea de CK, convém referir que esta enzima tem sido frequentemente usada na investigação científica como um importante marcador de lesão muscular, estando a sua atividade elevada após a prática de ExEx inabitual (Brancaccio et al., 2007). O aumento da atividade de CK 48h após a 1ª sessão de treino era esperado e está de acordo com a literatura. Tal como explica Duarte et al. (2001), a miopatia induzida pelo exercício é superior quando este é inabitual e/ou extenuante, sendo mais intensa quando o exercício praticado possui elevada percentagem de contrações excêntricas. O retorno desta variável a valores basais 48 horas após a segunda sessão de treino, mantendo-se assim nas avaliações subsequentes, sugere a ocorrência de adaptações protetoras teciduais induzidas pela 1ª sessão e que se mantiveram ao longo do protocolo de treino. A inexistência de diferenças intergrupais na análise semi-quantitativa do dano muscular correspondeu ao esperado, apoiando também a ideia de tolerância ao exercício, uma vez que não demonstram a presença significativa de insultos focais no músculo *quadriceps* dos animais TR. Desta forma, o nível de degenerescência muscular, da resposta inflamatória, da necrose celular e da desorganização celular dos músculos exercitados foi idêntica à dos músculos sedentários, estando todos muito próximo de 0, valor equivalente a uma aparência estrutural muscular normal.

Quanto às alterações fenotípicas estruturais musculares, o aumento significativo da área de secção transversal das fibras musculares encontra-se em conformidade com a literatura (Atherton & Smith, 2012; Flann et al., 2011; Franchi et al., 2015; Guilhem et al., 2010; Touchberry et al., 2012; Vikne et al., 2006). O ExEx demonstrou ser um potenciador do crescimento das fibras musculares, bastando apenas 1 sessão de treino por semana (durante 8 semanas de treino). Para este parâmetro foram avaliadas mais de 27,500 fibras, um valor bastante superior à média de fibras analisadas noutros trabalhos, permitindo uma melhor caracterização e avaliação de todo o músculo, ultrapassando ao mesmo tempo algumas das limitações que podem ser apontadas à metodologia de outros trabalhos, nomeadamente, a da análise insuficiente e não representativa das fibras musculares. Este aumento da área

de secção transversal das fibras pode ser explicado pelo incremento do número de sarcómeros em paralelo, isto é, pelo maior número de miofibrilas, situação que ajudará a dissipar a energia através da repartição do stress mecânico por uma maior quantidade de miofibrilas, podendo assim diminuir a possibilidade de dano estrutural e contribuir para a tolerância ao exercício presente em indivíduos treinados (Flann et al., 2011). Este processo miogénico é apoiado pelo maior número, estatisticamente significativo, de fibras musculares com presença de núcleos centrais. Esta centralidade nuclear representa um fator típico de regeneração celular (Duarte et al., 1993; Duarte et al., 1992; Folker & Baylies, 2013), estando relacionada com uma elevada concentração de células satélite (verificada 8 dias após o estímulo) (Paulsen et al., 2012) e o seu processo de diferenciação em mioblastos, miotubos e fusão com as miofibras em reparação (Duarte et al., 2001). Desta forma, este fenómeno parece representar o estímulo das fibras musculares e o consequente processo miogénico induzido pelo exercício em causa.

Além das adaptações morfológicas detetadas nas fibras musculares esqueléticas, também verificámos uma alteração estrutural no tecido conjuntivo, um tecido essencial para providenciar uma boa integridade, organização e funcionalidade musculares (Thomas et al., 2015). Comparativamente às alterações ocorridas nas dimensões das fibras musculares, é de realçar que as modificações do tecido conjuntivo foram, proporcionalmente, mais exuberantes. Já tinha sido constatado num outro estudo um aumento da expressão de mRNA para a síntese de colagénio após um único treino de ExEx (Hyldahl et al., 2015), no entanto, os nossos dados suportaram histologicamente esses dados bioquímicos como efeito crónico do treino ExEx. Observámos, ao mesmo tempo, um aumento de 74% da espessura do endomísio que, apesar de existirem artigos que defendam o aumento da matriz extracelular como resultado da prática de ExEx, não foi encontrado nenhum trabalho que tivesse estudado histologicamente o efeito do ExEx na espessura da parede do endomísio. Estas adaptações extracelulares são extremamente importantes para o músculo, uma vez que se especula fornecerem alguma proteção contra posteriores estímulos danosos (Hyldahl et

al., 2015) através de uma melhor dissipação das tensões sofridas pelas fibras musculares e aumento da rigidez passiva e ativa do sistema muscular (Guilhem et al., 2010; Hyldahl et al., 2015; Thomas et al., 2015). Estão relacionados com a redução de sinais de dano muscular, entre os quais se encontram uma menor infiltração leucocitária e CK sanguínea (Dartnall et al., 2011; Hyldahl et al., 2015), sendo fortes mecanismos hipotéticos da tolerância ao ExEx. Contudo, a produção excessiva dos componentes característicos da matriz extracelular, da qual faz parte o colagénio, através da ativação excessiva e recorrente dos fibroblastos, é uma característica presente em patologias como a distrofia muscular de Duchenne, e no próprio envelhecimento, com inerente redução da funcionalidade do músculo (Serrano & Muñoz-Cánoves, 2010). Estes resultados sugerem que, apesar desta formação de tecido fibrótico ser vantajosa no suporte estrutural contra posteriores exercícios excêntricos idênticos, o mesmo pode não se acontecer noutras exigências fisiológicas, como por exemplo com a necessidade de distensibilidade usada para altas amplitudes articulares.

No seguimento da análise dos possíveis efeitos responsáveis pela tolerância ao exercício induzida pelo treino, além das alterações morfológicas extracelulares e ao nível da fibra muscular, é importante referir que também podem ter existido influências neuronais favoráveis que não foram avaliadas. Uma melhor sincronização das unidades motoras ativadas e um aumento do número de fibras em contração (Dartnall et al., 2011), são alguns dos mecanismos neuronais provocados pelo treino, sendo estes também capazes de repartir o stress por uma maior quantidade de músculo e diminuir a probabilidade de dano. Estas alterações surgem temporalmente mais cedo do que as adaptações morfológicas, sugerindo uma explicação para o facto dos valores da atividade sanguínea da CK terem sofrido um cedo retorno aos níveis basais logo após o 2º exercício.

Em conclusão, o ExEx praticado uma vez por semana induziu, de forma crónica, um aumento moderado da área de secção transversal das fibras musculares e um acentuado incremento da deposição de colagénio assim como do espessamento do endomísio, sendo estes alguns dos mecanismos

hipotéticos explicativos da tolerância ao exercício verificada na redução dos valores sanguíneos de CK.

Bibliografia

Abbott, B. C., Bigland, B., & Ritchie, J. M. (1952). The physiological cost of negative work. 117, 380.

Atherton, P. J., & Smith, K. (2012). Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. 590, 1049.

Brancaccio, P., Maffulli, N., & Limongelli, F. M. (2007). Creatine kinase monitoring in sport medicine. 81-82, 209.

Dartnall, T. J., Nordstrom, M. A., & Semmler, J. G. (2011). Adaptations in biceps brachii motor unit activity after repeated bouts of eccentric exercise in elbow flexor muscles. 105, 1225.

Dehne, N., Kerkweg, U., Flohé, S. B., Brüne, B., & Fandrey, J. (2011). Activation of hypoxia-inducible factor 1 in skeletal muscle cells after exposure to damaged muscle cell debris. 35, 632.

Dinis-Oliveira, R. J., Duarte, J. A., Remião, F., Sánchez-Navarro, A., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats. 227, 73.

Dinis-Oliveira, R. J., Remião, F., Duarte, J. A., Ferreira, R., Sánchez Navarro, A., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). Original Contribution: P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity. 41, 1213.

Dinis-Oliveira, R. J., Sousa, C., Remião, F., Duarte, J. A., Navarro, A. S., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2007). Original Contribution: Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate. 42, 1017.

Duarte, J. A., Mota, M. P., Neuparth, M. J., Appell, H. J., & Soares, J. M. C. (2001). Miopatia do exercício: anatomopatologia e fisiopatologia. / Exercise induced muscle damage: anatomopathology and physiopathology. 1, 73.

Duarte, J. A., Soares, J. M. C., Carvalho, F., Bastos, M. L., & Appell, H. J. (1994). Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? , 68.

Duarte, J. A. R. (1988). Miopatia do exercício : alterações morfológicas no músculo esquelético do ratinho sujeito a dois protocolos diferentes de corrida / José Alberto Ramos Duarte. Dissertação de Provas de Aptidão Científica e de Capacidade Pedagógica apresentada a Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Duarte, J. A. R. (2009). Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico. Dissertação de Doutoramento apresentada a Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Duarte, J. A. R., Appell, H. J., Carvalho, F., Bastos, M. L., & Soares, J. M. (1993). Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. 14.

Duarte, J. A. R., Soares, J. M. C., & Appell, H. J. (1992). Nifedipine diminishes exercise-induced muscle damage in mouse (La nifedipine diminue le dommage musculaire provoqué par l'exercice, chez la souris). 13, 274.

Flann, K. L., LaStayo, P. C., McClain, D. A., Hazel, M., & Lindstedt, S. L. (2011). Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain? , 214, 674.

Folker, E. S., & Baylies, M. K. (2013). Nuclear positioning in muscle development and disease. 4, 363.

Franchi, M. V., Wilkinson, D. J., Quinlan, J. I., Mitchell, W. K., Lund, J. N., Williams, J. P., Reeves, N. D., Smith, K., Atherton, P. J., & Narici, M. V. (2015). Early structural remodeling and deuterium oxide-derived protein metabolic responses to eccentric and concentric loading in human skeletal muscle. 3.

Guilhem, G., Cornu, C., & Guével, A. (2010). Update article / Mise au point: Neuromuscular and muscle-tendon system adaptations to isotonic and isokinetic eccentric exercise. 53, 319.

Hyldahl, R. D., Nelson, B., Xin, L., Welling, T., Groscost, L., Hubal, M. J., Chipkin, S., Clarkson, P. M., & Parcell, A. C. (2015). Extracellular matrix

remodeling and its contribution to protective adaptation following lengthening contractions in human muscle. 29, 2894.

Lieber, R. L., & Friden, J. (1999). Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. 2, 253.

Paulsen, G., Egner, I. M., Drange, M., Langberg, H., Benestad, H. B., Fjeld, J. G., Hallén, J., & Raastad, T. (2010). A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. 20, e195.

Paulsen, G., Ramer Mikkelsen, U., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? , 18, 42.

Saclier, M., Cuvellier, S., Magnan, M., Mounier, R., & Chazaud, B. (2013). Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. The FEBS Journal, 280(17), 4118-4130.

Serrano, A. L., & Muñoz-Cánoves, P. (2010). Review: Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. Relatorio de Estagio apresentado a

Sweat, F., Puchtler, H., & Rosenthal, S. I. (1964). SIRIUS RED F3BA AS A STAIN FOR CONNECTIVE TISSUE. 78, 69.

Thomas, K., Engler, A. J., & Meyer, G. A. (2015). Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. 56, 1.

Touchberry, C. D., Gupte, A. A., Bomhoff, G. L., Graham, Z. A., Geiger, P. C., & Gallagher, P. M. (2012). Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. 17, 693.

Vikne, H., Refsnes, P. E., Ekmark, M., Medbø, J. I., Gundersen, V., & Gundersen, K. (2006). Muscular performance after concentric and eccentric exercise in trained men. 38, 1770.

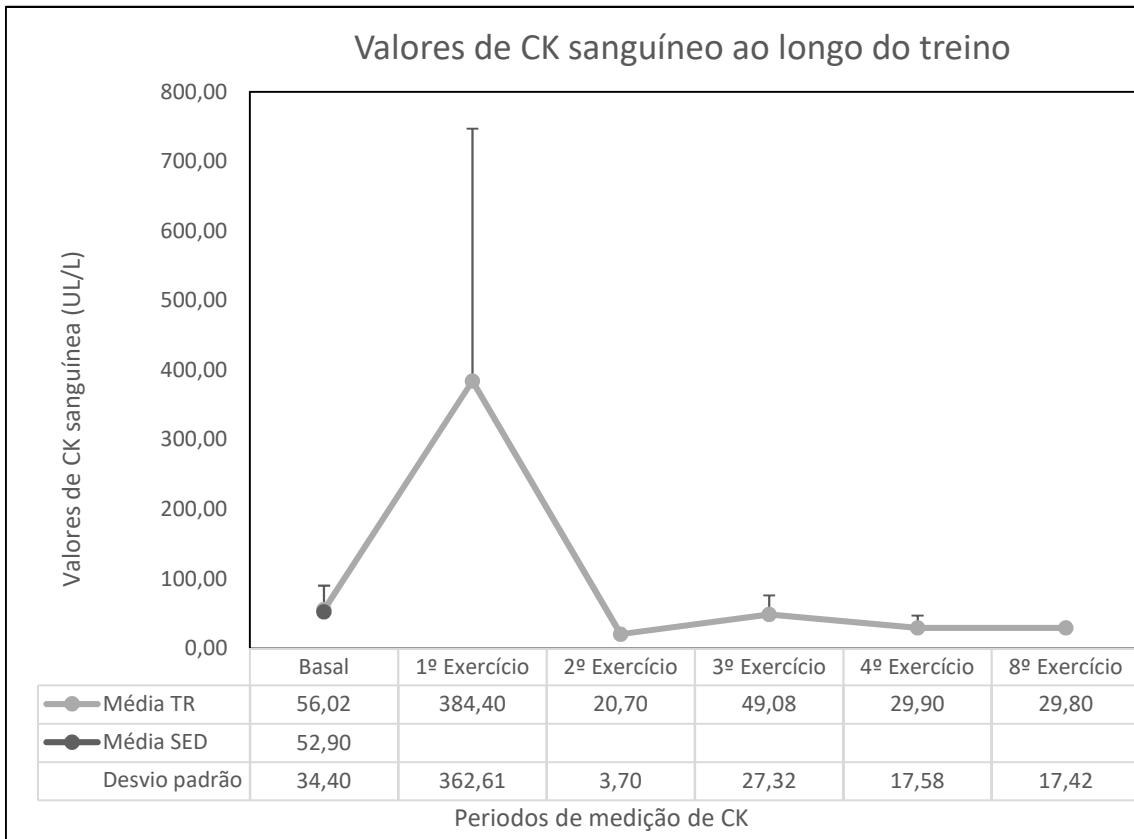


Figura 1 - Gráfico de linhas representativas da variação da concentração de CK sanguínea.

Tabela 1 - Valores da mediana (intervalo interquartil) de cada grupo e dos testes estatísticos referentes à área de secção transversal, conteúdo total de colagénio e espessura do endomísio.

Grupos	Área secção transversal (μm^2)	Conteúdo total colagénio (%)	Espessura endomísio (μm)
<u>SED</u>	1842,0 (1237,7-2675,8)	3,7 (2,3-5,1)	0,477 (0,405-0,573)
<u>TR</u>	2226,3 (1593,9-3009,8)	13,4 (8,8-20,7)	0,778 (0,589-1,057)
Mann-Whitney U Asymp. Sig. (2-tailed)	0,000	0,000	0,000

SED – Grupo sedentário

TR – Grupo treinado

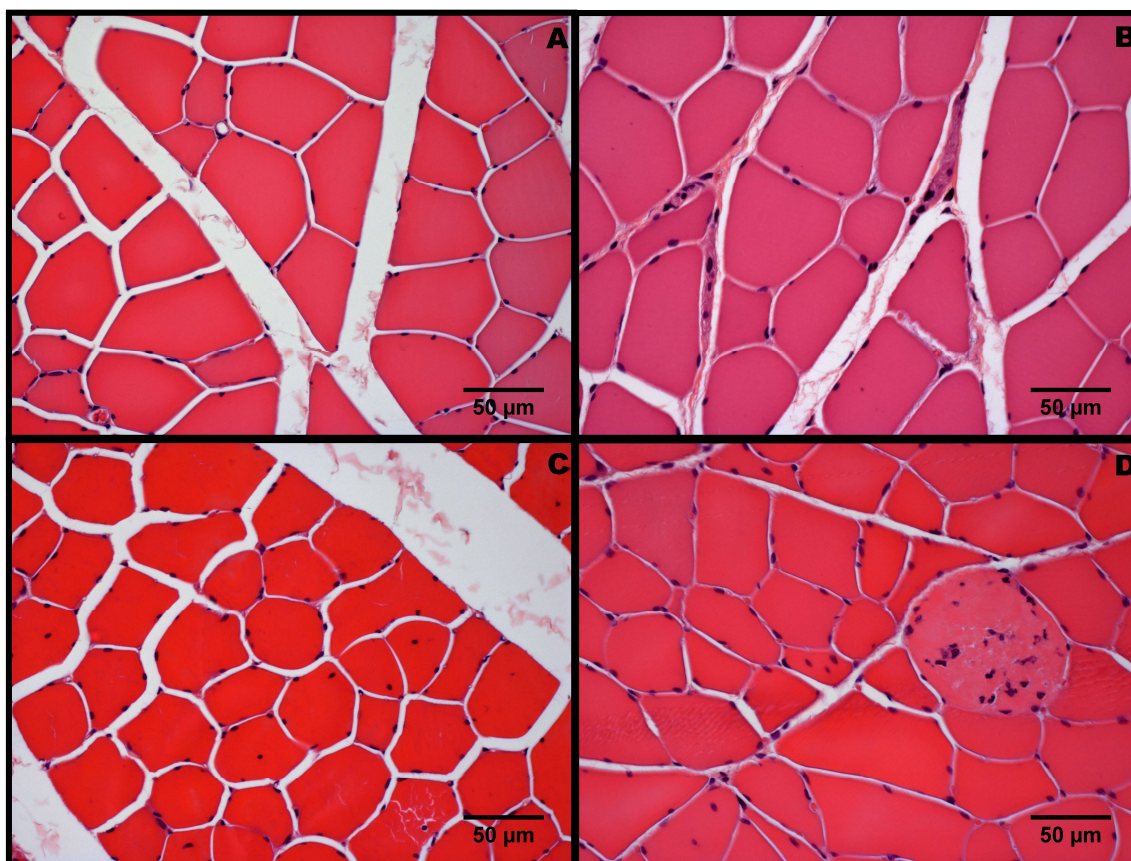


Figura 2 - Fotografias representativas de cortes histológicos do quadríceps, corados com hematoxilina-eosina, de animais do grupo SED (A + B) e do grupo TR (C + D). É possível observar no grupo TR um aumento das fibras com núcleo central (assinalado com setas brancas), característica representativa de uma superior degeneração muscular. Ainda pode ser observada uma fibra necrótica na foto D caracterizada pela forma redonda e edemaciada, infiltrada por leucócitos.

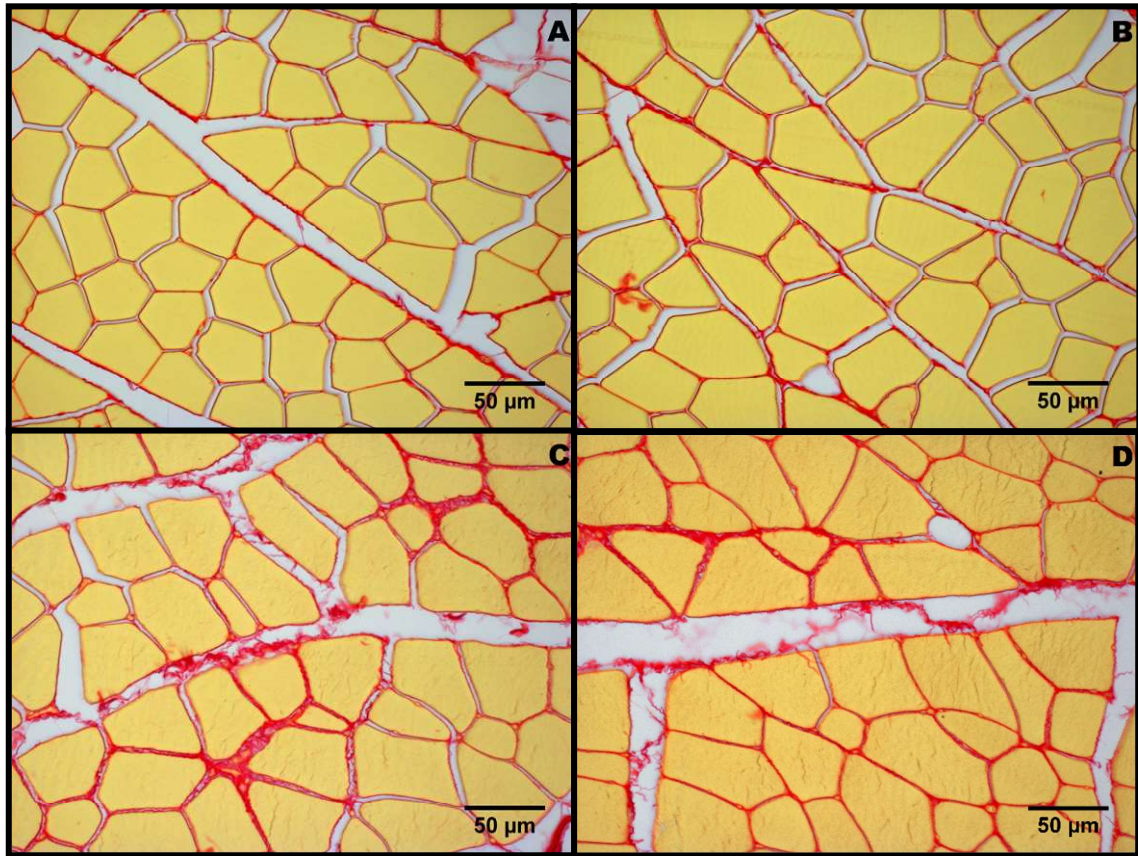


Figura 3 - Fotografias representativas de cortes histológicos do quadríceps, corados com picrosirius red, de animais do grupo SED (A + B) e do grupo TR (C + D). É possível verificar de forma clara um maior conteúdo de colagénio e um aumento da espessura da parede do endomísio no grupo TR comparativamente ao grupo SED.

Tabela 2 - Valores da mediana (intervalo interquartil) dos testes estatísticos referentes aos índices de dano muscular total e individual (degeneração, inflamação, necrose e organização) de cada grupo.

Grupos	Degenerescência celular	Resposta inflamatória	Necrose celular	Desorganização tecidual	Dano total
<u>SED</u>	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-1)
<u>TR</u>	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-2)
Mann-Whitney U Asymp. Sig. (2-tailed)	0,277	0,519	0,707	0,317	0,487

SED – Grupo sedentário

TR – Grupo treinado

4. Conclusões gerais

Tendo como base os objetivos propostos no capítulo 1 e os resultados obtidos, é possível concluir que o treino com exercício excêntrico, realizado uma vez por semana, promoveu a longo prazo:

- Uma tolerância ao exercício excêntrico, verificada na redução dos valores da atividade sanguínea de CK para níveis basais 48h após a segunda sessão de treino.
- Uma moderada hipertrofia muscular esquelética através de um aumento da área de secção transversal das fibras musculares, sendo esta um hipotético mecanismo explicativo da tolerância ao exercício induzida pelo treino.
- Um incremento exuberante do conteúdo muscular esquelético de colagénio e um forte aumento da espessura do endomísio, sendo estes hipotéticos mecanismos explicativos da tolerância ao exercício induzida pelo treino.

Aceitam-se assim as hipóteses inicialmente formuladas de que o treino com exercício excêntrico provoca um aumento da quantidade de colagénio no espaço extracelular em geral, assim como um aumento da espessura do endomísio, em particular, juntamente com um aumento da área de secção transversal das fibras musculares aliado a um efeito protetor do treino a exercícios excêntricos idênticos.

Como sugestões para estudos futuros achamos que seria interessante acrescentar um segundo grupo experimental, com um protocolo de treino concêntrico, na tentativa de avaliar que diferenças poderão existir, entre os dois tipos de treino, concêntrico ou excêntrico, relativamente aos efeitos hipertróficos (não havendo um claro consenso na literatura revista) e remodelativos da matriz extracelular.

5. Bibliografia

Abbott, B. C., Bigland, B., & Ritchie, J. M. (1952). The physiological cost of negative work. *117*, 380.

Abdelmagid, S. M., Barr, A. E., Rico, M., Amin, M., Litvin, J., Popoff, S. N., Safadi, F. F., & Barbe, M. F. (2012). Performance of repetitive tasks induces decreased grip strength and increased fibrogenic proteins in skeletal muscle: role of force and inflammation. *7*, e38359.

Appell, H. J., Soares, J. M. C., & Duarte, J. A. R. (1992). Exercise, muscle damage and fatigue (Exercice, dommage musculaire et fatigue). *13*, 108.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R. K., & Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *204*, 1057.

Atherton, P. J., & Smith, K. (2012). Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. *590*, 1049.

Belcastro, A. N., Shewchuk, L. D., & Raj, D. A. (1998). Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *179*, 135.

Black, C. D., Elder, C. P., Gorgey, A., & Dudley, G. A. (2008). High specific torque is related to lengthening contraction-induced skeletal muscle injury. *104*, 639.

Blunt, B. C., Creek, A. T., Henderson, D. C., & Hofmann, P. A. (2007). H₂O₂ activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *293*, H1518.

Boppart, M. D., De Lisio, M., Zou, K., & Huntsman, H. D. (2013). Defining a role for non-satellite stem cells in the regulation of muscle repair following exercise. *4*, 310.

Brancaccio, P., Maffulli, N., & Limongelli, F. M. (2007). Creatine kinase monitoring in sport medicine. *81-82*, 209.

Brickson, S. L., McCabe, R. P., Pala, A. W., & Vanderby Jr, R. (2014). A model for creating a single stretch injury in murine biarticular muscle. *6*, 1.

Bruusgaard, J. C., Johansen, I. B., Egner, I. M., Rana, Z. A., & Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *107*, 15111.

Buford, T. W., MacNeil, R. G., Clough, L. G., Dirain, M., Sandesara, B., Pahor, M., Manini, T. M., & Leeuwenburgh, C. (2014). Active muscle regeneration following eccentric contraction-induced injury is similar between healthy young and older adults. *116*, 1481.

Butterfield, T. A., & Best, T. M. (2009). Stretch-activated ion channel blockade attenuates adaptations to eccentric exercise. *41*, 351.

Carosio, S., Berardinelli, M. G., Aucello, M., & Musarò, A. (2011). Review: Impact of ageing on muscle cell regeneration. *10*, 35.

Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P., & Chretien, F. (2009). Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *37*, 18.

Chen, T. C., Chen, H. L., Lin, M. J., Wu, C. J., & Nosaka, K. (2009). Muscle damage responses of the elbow flexors to four maximal eccentric exercise bouts performed every 4 weeks. *106*, 267.

Christov, C., Chrétien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F. J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., & Gherardi, R. K. (2007). Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *18*, 1397.

Crameri, R. M., Aagaard, P., Qvortrup, K., Langberg, H., Olesen, J., & Kjaer, M. (2007). Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *583*, 365.

Cunha Nascimento, D., Cassia Marqueti Durigan, R., Tibana, R., Durigan, J., Navalta, J., & Prestes, J. (2015). The Response of Matrix Metalloproteinase-9 and -2 to Exercise. *45*, 269.

Dartnall, T. J., Nordstrom, M. A., & Semmler, J. G. (2011). Adaptations in biceps brachii motor unit activity after repeated bouts of eccentric exercise in elbow flexor muscles. *105*, 1225.

Dehne, N., Kerkweg, U., Flohé, S. B., Brüne, B., & Fandrey, J. (2011). Activation of hypoxia-inducible factor 1 in skeletal muscle cells after exposure to damaged muscle cell debris. *35*, 632.

Dinis-Oliveira, R. J., Duarte, J. A., Remião, F., Sánchez-Navarro, A., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats. *227*, 73.

Dinis-Oliveira, R. J., Remião, F., Duarte, J. A., Ferreira, R., Sánchez Navarro, A., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). Original Contribution: P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity. *41*, 1213.

Dinis-Oliveira, R. J., Sousa, C., Remião, F., Duarte, J. A., Navarro, A. S., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2007). Original Contribution: Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate. *42*, 1017.

Duarte, J. A., Mota, M. P., Neuparth, M. J., Appell, H. J., & Soares, J. M. C. (2001). Miopatia do exercício: anatomopatologia e fisiopatologia. / Exercise induced muscle damage: anatomopathology and physiopathology. *1*, 73.

Duarte, J. A., Soares, J. M. C., Carvalho, F., Bastos, M. L., & Appell, H. J. (1994). Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? , *68*.

Duarte, J. A. R. (1988). *Miopatia do exercício : alterações morfológicas no músculo esquelético do ratinho sujeito a dois protocolos diferentes de corrida / José Alberto Ramos Duarte*. Dissertação de Provas de Aptidão Científica e de Capacidade Pedagógica apresentada a Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Duarte, J. A. R. (2009). *Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico*. Dissertação de Doutoramento apresentada a Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Duarte, J. A. R., Appell, H. J., Carvalho, F., Bastos, M. L., & Soares, J. M. (1993). Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *14*.

Duarte, J. A. R., Soares, J. M. C., & Appell, H. J. (1992). Nifedipine diminishes exercise-induced muscle damage in mouse (La nifedipine diminue le dommage musculaire provoqué par l'exercice, chez la souris). *13*, 274.

Flann, K. L., LaStayo, P. C., McClain, D. A., Hazel, M., & Lindstedt, S. L. (2011). Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain? , *214*, 674.

Folker, E. S., & Baylies, M. K. (2013). Nuclear positioning in muscle development and disease. *4*, 363.

Franchi, M. V., Wilkinson, D. J., Quinlan, J. I., Mitchell, W. K., Lund, J. N., Williams, J. P., Reeves, N. D., Smith, K., Atherton, P. J., & Narici, M. V. (2015). Early structural remodeling and deuterium oxide-derived protein metabolic responses to eccentric and concentric loading in human skeletal muscle. *3*.

Giannandrea, M., & Parks, W. C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *7*, 193.

Guilhem, G., Cornu, C., & Guével, A. (2010). Update article / Mise au point: Neuromuscular and muscle-tendon system adaptations to isotonic and isokinetic eccentric exercise. *53*, 319.

Hubal, M. J., Chen, T. C., Thompson, P. D., & Clarkson, P. M. (2008). Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect. *294*, R1628.

Huntsman, H. D., Zachwieja, N., Zou, K., Ripchik, P., Valero, M. C., De Lisio, M., & Boppart, M. D. (2013). Mesenchymal stem cells contribute to vascular growth in skeletal muscle in response to eccentric exercise. *304*, H72.

Hyldahl, R. D., Nelson, B., Xin, L., Welling, T., Groscost, L., Hubal, M. J., Chipkin, S., Clarkson, P. M., & Parcell, A. C. (2015). Extracellular matrix remodeling and its contribution to protective adaptation following lengthening contractions in human muscle. *29*, 2894.

Järvinen, T. A. H., Järvinen, M., & Kalimo, H. (2013). Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *3*, 337.

Kostek, M. C., Chen, Y. W., Cuthbertson, D. J., Shi, R., Fedele, M. J., Esser, K. A., & Rennie, M. J. (2007). Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. *31*, 42.

Lieber, R. L., & Friden, J. (1999). Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. *2*, 253.

Lieber, R. L., & Friden, J. (2002). Morphologic and mechanical basis of delayed-onset muscle soreness. *10*, 67.

Lovering, R. M., & Brooks, S. V. (2014). Eccentric exercise in aging and diseased skeletal muscle: good or bad? , *116*, 1439.

Malm, C., & Yu, J. G. (2012). Exercise-induced muscle damage and inflammation: re-evaluation by proteomics. *138*, 89.

Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A., & Kardou, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *138*, 3625.

Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *69*, 562.

Newham, D. J., Mills, K. R., Quigley, B. M., & Edwards, R. H. (1983). Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. *64*, 55.

Nosaka, K., Newton, M., & Sacco, P. (2002). Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *12*, 337.

Paulsen, G., Cramer, R., Benestad, H. B., Fjeld, J. G., Mørkrid, L., Hallén, J., & Raastad, T. (2010). Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *42*, 75.

Paulsen, G., Egner, I. M., Drange, M., Langberg, H., Benestad, H. B., Fjeld, J. G., Hallén, J., & Raastad, T. (2010). A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. *20*, e195.

Paulsen, G., Ramer Mikkelsen, U., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? , *18*, 42.

Peake, J., Nosaka, K., & Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *11*, 64.

Pelosi, L., Giacinti, C., Nardis, C., Borsellino, G., Rizzuto, E., Nicoletti, C., Wannenes, F., Battistini, L., Rosenthal, N., Molinaro, M., & Musarò, A. (2007). Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *21*, 1393.

Prasartwuth, O., Allen, T. J., Butler, J. E., Gandevia, S. C., & Taylor, J. L. (2006). Length-dependent changes in voluntary activation, maximum voluntary torque and twitch responses after eccentric damage in humans. *571*, 243.

Proske, U., & Morgan, D. L. (2001). Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *537*, 333.

Raastad, T., Owe, S. G., Paulsen, G., Enns, D., Overgaard, K., Cramer, R., Kiil, S., Belcastro, A., Bergersen, L., & Hallén, J. (2010). Changes in calpain activity, muscle structure, and function after eccentric exercise. *42*, 86.

Remaud, A., Guével, A., & Cornu, C. (2007). [Antagonist muscle coactivation and muscle inhibition: effects on external torque regulation and resistance training-induced adaptations]. *37*, 1.

Saclier, M., Cuvellier, S., Magnan, M., Mounier, R., & Chazaud, B. (2013). Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *The FEBS Journal*, *280*(17), 4118-4130.

Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., & Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *138*, 3647.

Semmler, J. G., Tucker, K. J., Allen, T. J., & Proske, U. (2007). Eccentric exercise increases EMG amplitude and force fluctuations during submaximal contractions of elbow flexor muscles. *103*, 979.

Serrano, A. L., & Muñoz-Cánoves, P. (2010). Review: Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *316*, 3050.

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *22*, 526.

Sharafi, H., & Rahimi, R. (2012). The Effect of Resistance Exercise on p53, Caspase-9, and Caspase-3 in Trained and Untrained Men. *Journal of Strength & Conditioning Research (Lippincott Williams & Wilkins)*, 26(4), 1142-1148.

Smith, A. S. T., Shah, R., Hunt, N. P., & Lewis, M. P. (2010). The Role of Connective Tissue and Extracellular Matrix Signaling in Controlling Muscle Development, Function, and Response to Mechanical Forces. *16*, 135.

Soares, J. M. C., & Duarte, J. A. R. (1989). Miopatia do exercicio: etiologia, fisiopatologia e factores de prevencao. / Exercise myopathy: etiology, physiopathology, prevention and therapy. *7*, 187.

Stauber, W. T., Clarkson, P. M., Fritz, V. K., & Evans, W. J. (1990). Extracellular matrix disruption and pain after eccentric muscle action (Perturbation du milieu extracellulaire et douleur apres des contractions excentriques). *69*, 868.

Sweat, F., Puchtler, H., & Rosenthal, S. I. (1964). Sirius Red F3BA as a Stain for Connective Tissue. *78*, 69.

Teixeira, C. E., & Duarte, J. A. (2011). Changes in cross sectional area per myonucleus on mice soleus muscle during one week of hindlimb suspension reinforce the concept of myonuclear domain. *2*, 76.

Thomas, K., Engler, A. J., & Meyer, G. A. (2015). Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *56*, 1.

Tidball, J. G., & Villalta, S. A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *298*, R1173.

Touchberry, C. D., Gupte, A. A., Bomhoff, G. L., Graham, Z. A., Geiger, P. C., & Gallagher, P. M. (2012). Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *17*, 693.

Vikne, H., Refsnes, P. E., Ekmark, M., Medbø, J. I., Gundersen, V., & Gundersen, K. (2006). Muscular performance after concentric and eccentric exercise in trained men. *38*, 1770.

Wagner, P. D. (2011). The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow. *39*, 1556.

Weerakkody, N., Percival, P., Morgan, D. L., Gregory, J. E., & Proske, U. (2003). Matching different levels of isometric torque in elbow flexor muscles after eccentric exercise. *149*, 141.

Wei, W., Fareed, M. U., Evenson, A., Menconi, M. J., Yang, H., Petkova, V., & Hasselgren, P. O. (2005). Sepsis stimulates calpain activity in skeletal muscle by decreasing calpastatin activity but does not activate caspase-3. *288*, R580.

Wernbom, M., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Hisdal, J., & Raastad, T. (2012). Contractile function and sarcolemmal permeability after acute low-load resistance exercise with blood flow restriction. *112*, 2051.