

FACULDADE DE FARMÁCIA



UNIVERSIDADE DO PORTO

U.PORTO

**EFEITO DE UM PROTOCOLO DE CORRIDA EM PLANO DESCENDENTE NA
FUNCIONALIDADE DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATINHO**

FACULDADE DE FARMÁCIA

UNIVERSIDADE DO PORTO



U. PORTO

**EFEITO DE UM PROTOCOLO DE CORRIDA EM PLANO DESCENDENTE NA
FUNCIONALIDADE DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATINHO**

Dissertação apresentada à Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas, realizada sob orientação do Professor Doutor José Magalhães e do Professor Doutor António Ascensão, Professores Auxiliares da Faculdade de Desporto da Universidade de Porto e orientação do Professor Doutor Franklim Marques, Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

*À Filipa,
Às minhas filhas,
Maria João e Maria Raquel
e aos Meus Pais*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Magalhães e ao Professor Doutor António Ascensão, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, os meus agradecimentos sinceros por me terem proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação técnico-científica, pela disponibilidade sempre demonstrada e pelos sábios ensinamentos que me transmitiram, dando luz ao tema que inicialmente “mergulhei” praticamente no escuro. Um muito obrigado pelo tempo generosamente despendido, pela paciência, pelo enorme incentivo e sobretudo pela amizade que sempre demonstraram.

Ao Professor Doutor Franklim Marques, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela ajuda na minha escolha para este tema, pela amizade, pela compreensão e interesse e ainda pelo grande sentido de paixão e dedicação ao Mestrado em Análises Clínicas.

À minha mulher, Filipa, que sem ela esta dissertação não seria possível, pois organizou a sua vida neste ano de forma a eu ter tempo para me dedicar a este trabalho. Agradeço-te pelo grande apoio, compreensão e paciência que sempre demonstraste.

Ao Sr. Aguiar, sócio-gerente do Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa, e aos filhos, Paulo e Américo, pela amizade, pela flexibilidade no meu horário laboral e pela oportunidade de realizar algumas das determinações bioquímicas.

Aos meus colegas de trabalho, no Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa, D. Leonor, Dr^a. Ana Abreu, Dr^a. Ana Almeida, Dr. Pedro, Dr. José Fernando, Amélia, Isabel, Bela, Ana, Dr^a. Eduarda e Dr. Filipe, pela disponibilidade que sempre demonstraram para me ajudar e pelas palavras de incentivo.

À Marta, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, pela tua boa disposição e simpatia que logo de início demonstraste, pela amizade e grande entreatajuda.

Aos meus amigos que se mostraram interessados em ajudar-me e sempre tiveram uma palavra de ânimo.

A todos um MUITO OBRIGADO!

4.2.8 – Anóxia e reoxigenação.....	40
4.3 – Procedimentos estatísticos.....	41
5 – Resultados.....	43
6 – Discussão.....	51
6.1 – Discussão de metodologia.....	51
6.2 – Discussão dos resultados.....	54
7 – Conclusões.....	65
8 – Referências bibliográficas.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado dos efeitos do exercício excêntrico no músculo esquelético. Adaptado de Proske e Allen (2005).....	10
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico na actividade plasmática de creatina quinase (CK) e nas concentrações plasmáticas de mioglobina (Mb) e interleucina-6 (IL-6).....	43
Tabela II. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico na actividade respiratória de mitocôndrias de músculo esquelético de ratinhos, energizadas com substratos para o complexo I (malato + piruvato).....	44
Tabela III. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico na actividade respiratória de mitocôndrias de músculo esquelético de ratinhos, energizadas com substratos para o complexo II (succinato).....	45
Tabela IV. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico na variação do potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de músculo esquelético de ratinhos, energizadas com substratos para o complexo I (malato + piruvato).....	46
Tabela V. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico na variação do potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de músculo esquelético de ratinhos, energizadas com substratos para o complexo II (succinato).....	47
Tabela VI. Efeito de um estímulo “in vitro” de anóxia-reoxigenação (A/R) na actividade respiratória de mitocôndrias de músculo esquelético energizadas com substratos para o complex I (malato + piruvato).....	48
Tabela VII. Magnitude do efeito do estímulo “in vitro” de anóxia-reoxigenação (A/R) na actividade respiratória de mitocôndrias do músculo esquelético energizadas com substrato para o complexo I (malato + piruvato).....	49

RESUMO

O exercício agudo excêntrico tem um efeito lesivo na homeostasia muscular esquelética e atendendo a este facto, pretendeu-se com este estudo verificar o impacto do exercício com predomínio de contracções excêntricas na funcionalidade de mitocôndrias do músculo esquelético de ratinhos. Trinta ratinhos macho da estirpe Charles River CD-1 (doze semanas, ~40g) foram aleatoriamente divididos em três grupos (n=10/grupo): controlo (C), sacrificados imediatamente após o protocolo agudo de exercício excêntrico (Exc0h) e sacrificados 48 horas (Exc48h) após o mesmo protocolo. O protocolo agudo de exercício excêntrico consistiu num período de 120 minutos de corrida em tapete rolante com -16° de inclinação a uma velocidade média de 16,6m/min. Foram avaliadas a actividade plasmática da creatina quinase (CK), as concentrações de mioglobina (Mb) e interleucina 6 (IL-6) bem como os parâmetros respiratórios associados ao consumo de O₂ e ao potencial transmembranar utilizando substratos para o complexo I e II da cadeia transportadora de electrões mitocondrial. Verificou-se um incremento significativo dos valores de CK, Mb e IL-6 induzido pelo protocolo. O protocolo agudo de exercício induziu uma diminuição do estado 3, ICR (índice de controlo respiratório) e potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) no grupo Exc0h comparativamente aos restantes, em mitocôndrias energizadas com substratos para o complexo I (malato + piruvato). Foi observado um aumento do estado 4 no grupo Exc0h com succinato na presença de rotenona comparativamente aos grupos C e Exc48h. Adicionalmente, as mitocôndrias foram submetidas a um ensaio “in vitro” de anóxia-reoxigenação e os resultados evidenciaram que o estímulo “in vitro” apenas afectou o estado 3, estado 4 e ICR das mitocôndrias do grupo C mas não das mitocôndrias do grupo Exc0h. As diferenças observadas entre os dois grupos (C e Exc0h) nos parâmetros estado 3 e ICR antes do protocolo “in vitro” persistiram depois do protocolo. Em conclusão, o exercício agudo com predomínio de contracções excêntricas afecta, pontualmente, a funcionalidade mitocondrial, podendo contribuir para a perda da homeostasia e eventual viabilidade celular.

Palavras-chave: EXERCÍCIO EXCÊNTRICO, CORRIDA EM PLANO DESCENDENTE, BIOENERGÉTICA, MITOCÔNDRIA, LESÃO MUSCULAR, INFLAMAÇÃO, ANÓXIA-REOXIGENAÇÃO, RATINHOS

ABSTRACT

Knowing to the fact that, acute eccentric exercise has a damaging effect on skeletal muscle homeostasis, the main purpose of the present study was to analyze the impact of eccentric exercise on mice skeletal muscle mitochondrial function. Thirty male Charles-River CD-1 mice (twelve weeks, ~40g) were used and randomly divided into three groups (n=10/group): control (C), sacrificed immediately after the acute protocol of eccentric exercise (Exc0h) and 48h (Exc48h) after the same protocol. The exercise protocol consisted of continuously 120 minutes of downhill running (-16°) at an average velocity of 16,6m/min. There was a significant increase of CK, Mb and IL-6 due to the acute protocol of eccentric exercise, suggesting that the protocol in use caused muscle damage. Regarding the measured end-points of mitochondrial function, data showed a significant decrease in state 3, respiratory control ratio (ICR) as well as transmembrane potencial ($\Delta\Psi$) in Exc0h compared to C and Exc48h in mitochondrias energized with substrates for complex I. State 4 increased in group Exc0h, in mitochondria energized with substrates for complex II, compared to C and Exc48h. Futhermore, the mitochondrias were submitted to an “in vitro” anoxia-reoxygenation assay and the results demonstrate that the stimuli “in vitro” only caused a significant effect on state 3, state 4 and ICR in the C group, but not in Exc0h. The diferences observed between the two groups (C and Exc0h), in regard to state 3 and ICR before the “in vitro” anoxia-reoxygenation assay, maintained the same after de assay. In conclusion, data demonstrates that eccentric exercise causes impairment of skeletal muscle mitochondrial function, which can lead to lose of homeostasis and cellular viability.

Keywords: ECCENTRIC EXERCISE, DOWNHILL TREADMILL RUNNING, BIOENERGETICS, MITOCHONDRIA, MUSCLE DAMAGE, INFLAMATION, ANOXIA-REOXYGENATION, MICE

ABREVIATURAS

$\Delta\psi$ – potencial eléctrico
 $\Delta\mu\text{H}^+$ – potencial químico
 ΔpH – gradiente de pH
ADP – Adenosina difosfato
ADP/O – rácio adenosina difosfato/oxigénio
AIF – factor indutor de apoptose
ANT – translocases de nucleótidos de adenina
A/R – anóxia-reoxigenação
AST – aspartato aminotransferase
ATP – adenosina trifosfato
C – grupo controlo
 Ca^{2+} - ião cálcio
CAT – catalase
CK – creatina quinase
CRP – proteína C reactiva
Da – Dalton
DNA – ácido desoxirribonucleico
ERON – espécies reactivas de oxigénio/nitrogénio
Exc0h – grupo de ratinhos sacrificados imediatamente após o protocolo
Exc48h – grupo de ratinhos sacrificados 48 horas após o protocolo
 FADH_2 – dinucleótido de flavina adenina reduzida
GPX – glutationa peroxidase
GSH – glutationa reduzida
 H_2O_2 – peróxido de hidrogénio
HSP - proteínas de choque térmico
ICR – índice de controlo respiratório
IL-6 – interleucina 6
IMF – mitocôndrias intermiofibrilares
 K^+ - ião potássio
LDH – lactato desidrogenase
Mb – mioglobina

mtDNA – ácido desoxirribonucleico mitocondrial
Na⁺ - ião sódio
NADH – nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
O₂ – oxigênio
Pi/PCr – fosfato/ fosfocreatina
PTM – permeabilidade transitória mitocondrial
RMN – ressonância magnética nuclear
SOD – superóxido dismutase
SRDM – sensação retardada de desconforto muscular
SS – mitocôndrias subsarcolemais
TNF – factor de necrose tumoral
UCP – proteínas desacopladoras

1 – INTRODUÇÃO

O exercício físico pode definir-se como todo o movimento do corpo, com frequência contínua, que produz um gasto energético (Caspersen et al. 1985). O exercício físico é geralmente considerado como benéfico para a saúde (Astrand 1992) e é hoje visto como um acto social e um estímulo atractivo para todas as faixas etárias, pois proporciona uma melhoria do bem estar tanto a nível físico como mental. Adicionalmente, está comprovado que o exercício físico, praticado de forma adequada e sistemática, é um factor de prevenção de numerosas doenças, entre as quais se destacam as doenças cardiovasculares (Powers and Lennon 1999). Importa, no entanto, referir que os benefícios decorrentes da sua prática estão dependentes de inúmeros factores entre os quais se destacam, o tipo, a intensidade e a duração do exercício (Coyle 2000).

Independentemente dos seus benefícios, alguns tipos de exercício físico, nomeadamente o praticado de forma inabitual com elevada intensidade ou duração e/ou com uma elevada predominância de contracções excêntricas pode induzir perturbações morfológicas, bioquímicas e funcionais nas células do músculo esquelético (Clarkson and Sayers 1999) e, em particular, nas mitocôndrias (Ascensao and Magalhaes 2006), que podem afectar a sua homeostasia.

Durante a realização de exercício físico, o tecido muscular esquelético pode contrair de três modos distintos. Assim, consideramos que o músculo se contrai no modo isométrico ou estático, e nos modos dinâmicos concêntrico e excêntrico (Close et al. 2005b). A contracção no modo isométrico caracteriza-se pela ausência de movimento externo aparente. Nestas circunstâncias, a unidade funcional da fibra muscular, o sarcómero, contrai mas mantém o mesmo comprimento. A manifestação externa é a ausência de movimento articular. Na contracção dinâmica concêntrica, existe uma acção muscular que aproxima as duas inserções do músculo com redução do comprimento do sarcómero e, conseqüentemente, do músculo. A manifestação externa repercute-se na ocorrência de movimento articular. Por fim, na contracção muscular no modo dinâmico excêntrico, as inserções musculares tendem a afastar-se causando um alongamento muscular contrário à tendência de encurtamento, pois a resistência a vencer é superior à capacidade contráctil do músculo em produzir tensão (Close et al. 2005b). A exemplo da anterior, a expressão externa é a ocorrência de movimento articular. O

que distingue estas duas últimas formas de contracção muscular é o facto de, no modo excêntrico, a estrutura funcional ser sujeita a tensões de estiramento muito elevadas que promovem agressão e, eventualmente, a ocorrência de lesão muscular esquelética. Assim sendo, exercícios com elevada predominância de contracções excêntricas associam-se também, habitualmente, à sensação retardada de desconforto muscular (SRDM) alguns dias após o exercício (Davis et al. 2007). Por esta razão, é hoje reconhecido que o exercício com predominância de contracções excêntricas está associado à SRDM (Proske and Allen 2005; Walsh et al. 2001), e que pode afectar a função muscular induzindo diminuição da capacidade de gerar força (Fridén et al. 1983; Sargeant and Dolan 1987) e ocorrência de fadiga precoce (Brown et al. 1996). O exercício excêntrico está também associado a alterações morfológicas e metabólicas, como por exemplo, à lesão miofibrilar caracterizada pela ocorrência de disrupção da banda Z, “swelling” mitocondrial, aumento da pressão intramuscular (Fridén et al. 1983), libertação de proteínas celulares para a corrente sanguínea (Chen 2003; McHugh et al. 1999), disfunção de mecanismos de transporte (Dolezal et al. 2000; Proske and Morgan 2001), e ainda alterações na síntese do glicogénio (O’Reilly et al. 1987). Associado a este quadro fisiopatológico, tem sido ainda descrito um conjunto de eventos que globalmente caracterizam uma significativa resposta inflamatória e que, pelo menos posteriormente, poderão contribuir para amplificar a exuberância da agressão (MacIntyre et al. 1996). Do ponto de vista metabólico, o exercício excêntrico tem sido igualmente associado a um incremento da dependência muscular no metabolismo anaeróbio, eventualmente, devido ao comprometimento da função oxidativa (Walsh et al. 2001).

Estamos, assim, perante um quadro fisiopatológico reversível e de efeito prolongado, caracterizado pela perda da homeostasia celular. Importa referir, no entanto, que quando “doseado” de forma adequada, o exercício excêntrico tem sido utilizado na prática clínica, como por exemplo em fisioterapia para prevenção e reabilitação muscular decorrente de danos músculo-tendinosos. Pelo facto de estar associado à maior capacidade de desenvolver tensão, a um menor recrutamento de unidades motoras para uma dada intensidade de exercício e a um concomitante menor consumo de oxigénio quando comparado com o exercício

concêntrico, o exercício excêntrico adequadamente “doseado” pode ser importante em doentes com limitada capacidade física (Kellis and Baltzopoulos 1995).

O exercício implica necessariamente produção e dispêndio de energia e os organelos celulares presentes na maioria das células eucarióticas, que são responsáveis, em condições aeróbicas, pela obtenção da maior parte da energia necessária, são as mitocôndrias. Desta forma, as mitocôndrias podem ser consideradas as baterias da célula (Videira 1994). As mitocôndrias são encontradas em maior quantidade no tecido muscular, comparativamente a outros tecidos, pois são os músculos que estão adaptados à realização de trabalho contínuo e onde mais se necessita de energia (Frahm et al. 2005). As mitocôndrias são responsáveis por muitos processos de degradação de substratos fundamentais para a obtenção de energia celular, como a β -oxidação de ácidos gordos, o Ciclo de Krebs e a cadeia respiratória sendo, por isso, do ponto de vista do metabolismo oxidativo considerada vital para a funcionalidade celular (Curi et al. 2003). Estes organelos, para além de fornecerem energia para a célula, desempenham outras funções, nomeadamente a função de tamponamento relativa a alterações iónicas que ocorrem no citoplasma, como é o exemplo das alterações da concentração do ião cálcio (Ascensao and Magalhaes 2006). É também, principalmente nas mitocôndrias, onde se produzem as espécies reactivas de oxigénio durante a prática de exercício físico (Ascensao and Magalhaes 2006). Adicionalmente, a mesma importância que em tempos passados era dada à função da produção de energia às mitocôndrias é hoje dada ao processo de morte celular denominado apoptose associados a estes organelos, mais precisamente à via intrínseca da apoptose.

Vários estudos abordam o efeito do exercício a nível muscular, no entanto, poucos se têm concentrado na análise das respostas na funcionalidade mitocôndrial geradas por um tipo de exercício, o exercício excêntrico. Tendo em consideração o impacto mecânico e metabólico do exercício com predominância de contracções excêntricas no tecido muscular esquelético, torna-se, assim, um desafio e o nosso principal objectivo neste trabalho, estudar o efeito do exercício excêntrico na funcionalidade mitocôndrial do músculo esquelético de ratinhos.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – AGRESSÃO/LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO EXERCÍCIO

A agressão/lesão muscular esquelética é um processo fisiopatológico caracterizado genericamente por um conjunto de alterações homeostáticas sistêmicas e locais (Clarkson 1992). Tem sido referido por diversos estudos realizados tanto com humanos como com animais que o fenómeno de agressão/lesão muscular esquelética associado a um quadro pro-inflamatório pode ser induzido por diversos estímulos, dos quais se destaca o exercício físico (Armstrong et al. 1991; Child et al. 1999; Fielding et al. 1993; Fridén and Lieber 1992; Hellsten et al. 1997; Smith 1991; Sorichter 1995). Estes estudos relatam que a severidade do fenómeno depende do tipo, duração e intensidade do exercício, sendo que o exercício com contracções excêntricas pode causar mais lesão e inflamação do que o exercício com contracções concêntricas de igual intensidade e duração (Newham et al. 1983). O músculo esquelético, apesar de uma grande capacidade plástica e adaptativa (Fridén and Lieber 1992), é susceptível à lesão quando ultrapassado o limite homeostático das suas células.

O termo contracção refere-se à activação da capacidade de gerar força/tensão pelo complexo actomiosínico das fibras esqueléticas e à concomitante iniciação do ciclo de movimentos das pontes transversas. Quando o músculo desenvolve força ocorre uma contracção que pode ser de três tipos. Se a carga externa aplicada ao músculo é idêntica à quantidade de força que este desenvolve, então não ocorre alteração aparente do comprimento muscular e daí não há aproximação entre as inserções musculares, denominando este tipo de contracção de isométrica. Já se a resistência for inferior à força produzida pelo músculo, então observa-se uma contracção de encurtamento designada por concêntrica. Finalmente, se a resistência for superior à força desenvolvida pelo músculo, então ocorrerá uma contracção de alongamento designada por excêntrica (Close et al. 2005b). As contracções excêntricas comparativamente às contracções concêntricas, têm sido referidas por alguns autores, como por exemplo, Armstrong (1984) e Stauber (1989), como estando associadas à diminuição do consumo de oxigénio, menor activação de unidades motoras e menor produção de lactato, para a mesma intensidade exigida. Adicionalmente, tem sido demonstrado (Armstrong

1984; Bailey et al. 2007; Clarkson and Sayers 1999; Di Meo and Venditti 2001) que após a prática de exercício com elevada preponderância de contrações excêntricas ocorrem efeitos lesivos no músculo esquelético. De facto, com a prática de um exercício prolongado com contrações concêntricas ou isométricas nos músculos o organismo fica exausto, mas por pouco tempo, pois dentro de uma ou duas horas dá-se normalmente uma recuperação total. Contudo, após uma série de contrações excêntricas e inabituais, o organismo não fica apenas exausto, como os músculos exercitados ficam durante dias com sensações de rigidez, fraqueza, tumefacção e com câimbras musculares. A razão para estas sensações é que o exercício excêntrico normalmente causa lesão muscular (Proske and Allen 2005). O quadro fisiopatológico apresentado após a realização de exercício excêntrico só se manifesta na sua maior exuberância um a dois dias após o exercício (Clarkson and Hubal 2002a). O maior risco de lesão muscular ocorre durante a contração excêntrica pois, neste tipo de acção, realiza-se trabalho de força e de alongamento ao mesmo tempo, aumentando, assim, o stress sobre os tecidos (McArdle and Jackson 2000).

É importante, no entanto, ter em conta que o exercício excêntrico não está apenas associado à ocorrência de lesão, mas também a processos de adaptação muscular contra os seus efeitos lesivos. Alguns trabalhos têm demonstrado que após a realização de exercícios com predominância de contrações excêntricas existe uma adaptação muscular que confere uma certa protecção contra o mesmo tipo de exercício quando repetido posteriormente (Proske and Allen 2005). Esta protecção manifesta-se por sinais de menor SRDM um processo de recuperação mais rápido comparativamente com o ocorrido no primeiro momento do exercício (Clarkson and Hubal 2002b). Os processos adaptativos envolvem a reparação das fibras lesadas e, conseqüentemente, a formação de novos sarcómeros (Proske and Allen 2005). Esta formação de novos sarcómeros ocorre de forma a proteger o músculo contra a lesão, e para isso, o aumento do comprimento da fibra não está envolvido, mas apenas o número de sarcómeros. Assegurando desta forma que, quando é realizado um exercício, a tensão é distribuída por um maior número de sarcómeros, mantendo-se o comprimento muscular. Pode parecer que esta adaptação muscular seja um processo demorado, e sendo assim, não seria justificado este fenómeno de protecção num curto espaço de tempo. Porém,

estudos com animais têm demonstrado que novos sarcómeros podem ser formados num espaço muito curto de tempo, cerca de 5 dias. Foi demonstrado que um único período de exercício pode produzir adaptações no músculo esquelético que o tornam mais resistente à lesão contra subseqüentes períodos de exercício (Clarkson et al. 1992; Proske and Allen 2005; Sacco 1992). Assim verifica-se que existe um processo de adaptação e recuperação após a realização repetida de um dado exercício excêntrico (Clarkson and Hubal 2002b).

2.2 – ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA AGRESSÃO/LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA

O mecanismo de agressão/lesão muscular induzida pelo exercício tem sido referido como estando associado a factores de origem mecânica e metabólica, subjacentes ao uso muscular exaustivo e pouco habitual (Duarte et al. 1999). A hipótese de origem mecânica baseia-se no facto de o exercício, principalmente o excêntrico, está associado a uma distensão profunda ou seja ao estiramento. Para explicar esta hipótese é sugerido que, com a realização de contracções excêntricas, o número de pontes cruzadas vá diminuindo proporcionalmente à medida que o estiramento aumenta (Hamaoka et al. 2000). Isto conduz, conseqüentemente, a um aumento de tensão realizado por ponte cruzada e predispondo a fibra muscular à lesão, para além de que o número de unidades motoras recrutadas é menor comparativamente com as contracções concêntricas (Tee et al. 2007). Ocorre assim a disrupção dos sarcómeros, a lesão das membranas celulares e a perda da permeabilidade selectiva ao Ca^{2+} (Armstrong 1990; Armstrong et al. 1991; Proske and Allen 2005) como resultado destas alterações mecânicas. A hipótese de origem metabólica sugere que a lesão da fibra muscular ocorre devido a uma deficiente produção de energia, via fosforilação oxidativa. Isto é, as bombas de cálcio são ATP dependentes, uma diminuição na produção de energia vai afectar o seu bom funcionamento e conduzir a uma alteração da homeostasia do Ca^{2+} (Armstrong et al. 1991; Tee et al. 2007). Há, assim, um aumento de concentração do Ca^{2+} no citoplasma, uma vez que a remoção do Ca^{2+} está comprometida durante a fase de relaxamento muscular devido à diminuição da acção da Ca^{2+} /ATPase do retículo sarcoplasmático, que acaba por conduzir à degeneração da fibra muscular (Armstrong et al. 1991). Esta hipótese de origem metabólica pode ser sustentada por um trabalho realizado por

Duchen et al. (1990) que comprova que ocorrem lesões na ultraestrutura do músculo esquelético com a inibição da $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$, porém permanece ainda pouco consolidada visto que as contracções excêntricas, apresentam um metabolismo, em termos energéticos, mais económico comparativamente às contracções concêntricas (Armstrong et al. 1991).

Estas lesões induzidas pela actividade física extenuante ou inabitual e, particularmente com predominância de contracções excêntricas caracterizam-se por um quadro anatomo patológico frequentemente designado por miopatia do exercício, designação esta, utilizada por Tompkins (1977) e por Salminen et al. (1983). A miopatia do exercício é identificada, no Homem e no modelo animal, pela elevação das enzimas musculares, pela elevação de várias proteínas musculares, pelas alterações estruturais e ultraestruturais do músculo esquelético e pela diminuição da força máxima voluntária e involuntária, não atribuível à fadiga de alta frequência (Armstrong 1984; Newham et al. 1987; Salminen 1985). É importante ter em conta que existem alterações estruturais e ultraestruturais do músculo esquelético em doentes com poliomiosite e distrofia muscular, no entanto, estes diferem dos associados à miopatia do exercício por serem habitualmente indolores (Newham 1988), não estarem relacionadas especificamente com os grupos musculares utilizados, e terem uma natureza crónica (Edwards 1988). Na miopatia do exercício é possível distinguir evidências directas e indirectas (Clarkson 1992). Como evidências directas temos as lesões histológicas, estruturais e ultraestruturais, enquanto como evidências indirectas pode referir-se a SRDM, a diminuição da força não atribuível à fadiga, o aumento da circunferência e a alteração da amplitude articular dos membros exercitados e a elevação da actividade e das concentrações plasmáticas de algumas proteínas musculares (creatina quinase e mioglobina) (Lee and Clarkson 2003). No que diz respeito à SRDM, ainda persistem algumas dúvidas relativamente à sua etiologia, mas é do consenso geral que a SRDM é aceite como um importante indicador de lesão muscular esquelética induzida pelo exercício excêntrico, exaustivo e pouco habitual (MacIntyre et al. 1995; Nosaka et al. 2002). Os sinais e sintomas da miopatia do exercício podem ser induzidos no músculo humano por tipos tão variados de exercícios, como sejam a corrida, particularmente em plano descendente (Schwane et al. 1983; Sjöström et al. 1987), o subir e descer escadas (Newham et

al. 1983) ou a prática de qualquer jogo desportivo colectivo. A existência de uma elevada percentagem de contracções excêntricas envolvidas, ser de elevada intensidade ou duração e ser inabitual determinam a exuberância do fenómeno.

Com contracções excêntricas, têm sido habitualmente descritas duas fases distintas na lesão muscular induzida pelo exercício (Armstrong et al. 1991). Numa primeira fase, designada por degeneração intrínseca, existe, entre outros eventos, a ruptura mecânica do sarcolema induzida pela tensão muscular que será um factor determinante na entrada de forma desregulada de Ca^{2+} para o interior da célula (Bar et al. 1990). Se a concentração de Ca^{2+} não for exagerada, as bombas de cálcio poderão funcionar normalmente e reestabelecer o equilíbrio, fazendo com que a homeostasia não seja alterada (Byrd 1992). No entanto, se a concentração de Ca^{2+} for exagerada, ultrapassado a capacidade de expulsão das referidas bombas, entramos num fenómeno de sobrecarga de cálcio. Este excesso de cálcio provoca activação de algumas proteases assim como a fosforilação mitocondrial não acoplada (Bar et al. 1990). Deste modo, para além da diminuição relativa de ATP provocada pelo próprio exercício e pela sua menor produção via fosforilação oxidativa, as bombas de cálcio, que são ATP dependentes, passam a funcionar gradualmente pior. Entramos assim, num ciclo vicioso de agravamento de todo este quadro anatomo e fisiopatológico. Numa segunda fase, designada por degeneração extrínseca, que ocorre poucas horas após o exercício e se pode prolongar pelos dias subsequentes, ocorre infiltração celular de células inflamatórias, que embora seja determinante para a posterior regeneração, numa primeira fase parece agravar as alterações morfológicas observadas (Armstrong 1984). Podemos dizer que a ruptura do sarcolema, por acção mecânica ou por produção acrescida de radicais livres de oxigénio, será um dos fenómenos celulares chave no processo de alteração da homeostasia celular e da consequente lesão com posterior reparação (Rodriguez-Sinovas et al. 2005).

Cada fibra muscular contém centenas a milhares de miofibrilas com disposição paralela. Quando as miofibrilas são estiradas durante uma contracção excêntrica, alguns sarcómeros resistem mais que outros, e isto deve-se ao facto de existirem sarcómeros com mais sobreposições dos miofilamentos. Como consequência, os sarcómeros mais fracos, os que têm menos sobreposições, vão ficando progressivamente mais fracos até não existir qualquer sobreposição dos

miofilamentos (Morgan 1990; Peake et al. 2005; Proske and Allen 2005). Cada vez que o músculo relaxa, alguns miofilamentos, de um sarcómero que foi demasiado estirado, podem não conseguir voltar ao seu ponto de partida, e ocorre a ruptura do sarcómero. Quando um ou mais sarcómeros ficarem disfuncionais, o referido “estrago” pode difundir-se longitudinalmente a sarcómeros adjacentes ou ainda transversalmente a miofibrilas adjacentes, chegando ao ponto em que as estruturas distorcidas produzidas pela presença de sarcómeros demasiado estirados levam à lesão membranar, incluindo membranas do retículo sacroplasmático, tubulos transversos e/ou sarcolema. Isto é acompanhado pelo movimento descontrolado de Ca^{2+} para dentro do sarcoplasma (Proske and Allen 2005), desencadeando a próxima etapa no processo de lesão. Com o aumento de Ca^{2+} sarcoplasmático, o Ca^{2+} leva à proteólise associada à quebra e reparação de fibra (Yeung et al. 2002)

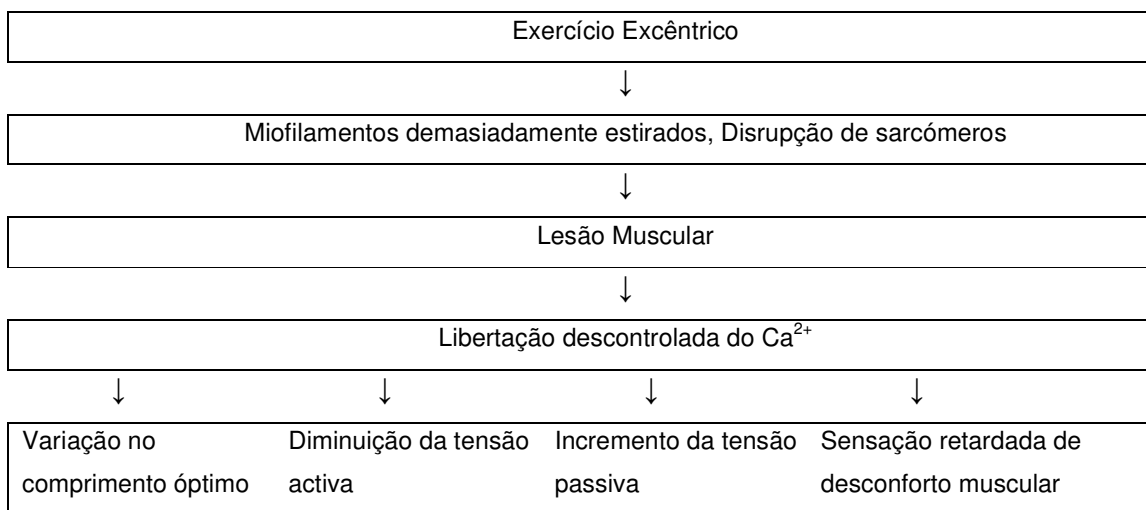


Figura 1. – Esquema simplificado dos efeitos do exercício excêntrico no músculo esquelético. Adaptado de Proske & Allen (2005).

São, no entanto, apontadas várias causas como possíveis factores associados à etiologia das lesões nas fibras musculares esqueléticas, entre as quais a fadiga muscular, a quebra da homeostasia celular ao ião cálcio e a produção de espécies reactivas de oxigénio/nitrogénio (ERON) (Clebis and Natali 2001). As ERON são, por definição, moléculas ou átomos que contêm electrões desemparelhados numa das suas órbitas e, por isso, possuem elevada

instabilidade e reactividade bioquímica (Close et al. 2005a; Halliwell and Gutteridge 1999), adquirindo a estabilidade química interagindo com substâncias não radicais para lhes captar um electrão e convertendo-as em radicais oxidados (Halliwell and Gutteridge 1999). No que diz respeito à fadiga muscular, este facto pode alterar o adequado funcionamento muscular, devido à falência de mediadores em vários níveis, podendo estabelecer um desequilíbrio muscular e favorecendo o surgimento de lesões (Fitts and Balog 1996). Como já referimos anteriormente, a quebra da homeostasia celular ao ião cálcio, ou seja, o inadequado funcionamento dos mecanismos responsáveis por manterem baixas as concentrações deste ião no interior da célula é outra razão apontada para as lesões musculares e a morte celular induzidas pelo exercício (Duarte et al. 1993). A produção de ERON está também associada à lesão muscular, uma vez que as ERON podem modificar proteínas e ácidos nucleicos, assim como alterar o funcionamento e a estrutura das membranas celulares, devido à peroxidação lipídica, podendo provocar lesões celulares (Duarte et al. 1993). As ERON são produzidos na membrana citoplasmática, no retículo endoplasmático, nos lisossomas, nas mitocôndrias, nos peroxisomas e no citoplasma, e a sua produção é proporcional à quantidade de oxigénio consumida pelas mitocôndrias. De facto, é sugerido que as ERON aumentam durante a actividade física, o que provoca condições celulares de stress oxidativo, isto é uma condição desequilibrada entre a produção acrescida de ERON e a capacidade antioxidante (Duarte et al. 1993). Importa referir que as ERON constituem uma parte integral do metabolismo e estão continuamente a ser formados no organismo. Muitas fontes do stress, como o calor, radiação, hipóxia, inflamação, aumento de metabolismo, incluindo o exercício, lesão, e até processos de reparação, conduzem ao aumento de radicais livres e ERON (Ascensao and Magalhaes 2006).

Efectivamente, a par do efeito nefasto que a sua produção exagerada pode acarretar em determinados momentos, e ao contrário da ideia conventional que as ERON são principalmente moléculas nocivas, induzindo a lesão oxidativa de estruturas biológicas, hoje é reconhecido que em concentrações relativamente baixas e controladas são essenciais e a chave para a regulação de uma grande variedade de mecanismos moléculares associadas à adaptação celular, entre eles a biogenese mitocondrial.

2.3 – IMPACTO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO

2.3.1 - Morfológico e estrutural

Um dos primeiros estudos publicados acerca de lesão muscular induzida por exercício foi em 1902, em que Hough (1902) descreve uma sensação retardada de desconforto muscular (SRDM), e sugere que esta sensação é resultante de microrupturas no músculo. Mas é preciso quase um século para se chegar à conclusão que o exercício pode provocar lesão muscular esquelética. Foi Fridén et al. (1981) que demonstraram as primeiras evidências de lesão nas fibras musculares após exercício. Os músculos esqueléticos possuem diferentes tipos de fibras que se adaptam, física e bioquimicamente, para responder ao que lhes é exigido (Yang et al. 1997). As alterações celulares mais evidentes provocadas pelo exercício que sugerem lesão muscular, a nível estrutural são, o aparecimento de núcleos picnóticos e em posição central, áreas de necrose segmentar e invasão leucocitária, irregularidades do padrão estriado, e a nível ultraestrutural podem encontrar-se “swelling” mitocondrial, edema generalizado, disrupção miofibrilar, com rupturas das linhas z, activação lisossómica, ruptura e/ou vacuolização do retículo sarcoplasmática (para refs ver Carvalho et al. 1993). O exercício físico pode causar lesão às células musculares em termos de desarranjos e rompimentos de miofilamentos, de linhas Z e de sarcómeros. Causa também rompimento da arquitectura e a desorganização dos organelos e dos elementos do citoesqueleto (Fielding et al. 1993; Fridén and Lieber 1992), perda de desmina (Lieber et al. 1996) bem como alteração da permeabilidade da membrana (McNeil and Khakee 1992) e ainda uma actividade lisossomal acentuada e infiltração de células mononucleadas, principalmente macrófagos. Assim sendo, trabalhos que se tenham dedicado ao estudo do fenómeno de agressão/lesão muscular induzida pelo exercício, particularmente do exercício excêntrico, com o auxílio da microscopia óptica e/ou electrónica, têm conseguido demonstrar inúmeras evidências directas de lesão muscular, nomeadamente alterações da estrutura nativa dos sarcómeros, disrupções das linhas Z, do sarcolema e dos túbulos transversais, tumefacção mitocondrial e infiltração tecidual de leucócitos (Clarkson and Hubal 2002b; Proske and Allen 2005).

2.3.2 – Sensação retardada de desconforto e funcionalidade muscular

A par, e como consequência, de todas as repercussões estruturais e ultraestruturais atrás referidas, o exercício excêntrico também conduz a perturbações da funcionalidade muscular e a um quadro sintomatológico caracterizado por uma sensação de desconforto muscular. A sensação de desconforto muscular está relacionada com o tipo de trabalho muscular (contrações concêntricas, excêntricas ou isométricas), a duração, o grau de habituação e com a intensidade do exercício. É todavia, este último parâmetro o que maior influência tem na exuberância deste quadro de sintomas (Soares and Duarte 1989). Existe uma relação entre a magnitude das manifestações da sensação de desconforto muscular, a duração e a intensidade do esforço, mas independente disto, parece que o tipo de contração que mais contribui para o seu desenvolvimento são as realizadas no modo excêntrico (Talag 1973). A contração excêntrica sobrecarrega em excesso os componentes estruturais do músculo, o que poderia resultar no aparecimento de sensações de desconforto muscular tardias. Duarte e Soares (1990), numa revisão sobre o tema, sugerem que os sintomas que caracterizam a sensação tardia de desconforto muscular envolvem dores para movimentação dos segmentos, podendo passar ocasionalmente por câimbras. Quanto aos procedimentos que poderiam atenuar os sintomas de desconforto, estes também são alvo de discussão. Armstrong (1984) sugere que, embora de efeito temporário, o exercício físico parece ser o meio mais eficiente para o alívio da dor, ainda que os mecanismos para tal não estejam completamente esclarecidos. A dor muscular é causada devido ao acúmulo de metabólitos e do edema tissular provocado por uma elevada pressão hidrostática, que força o líquido do plasma para o interior dos tecidos. As explicações para as sensações de desconforto muscular tardias ou retardadas após exercício é motivo de controvérsia. Contudo, sabe-se que o acúmulo de ácido láctico não exerce influência neste mecanismo. Segundo Newham (1991), a isquemia ou o acúmulo de ácido láctico não ocasiona a dor tardia, pois pessoas com síndrome de MacCardle, incapazes de produzir ácido láctico pela deficiência de miofosfolirase, apresentam esta sensação de desconforto muscular numa extensão maior que sujeitos normais. Por outro lado, as concentrações de lactato, embora eventualmente elevadas durante o exercício e nos momentos imediatamente

subsequentes, retornam aos valores pré-exercício no curto espaço de 45 minutos a uma hora.

Tem sido considerado a SRDM como uma importante repercussão local da agressão/lesão muscular esquelética induzida pelo exercício físico exaustivo e inabitual e a sua exuberância proporcional ao grau de severidade da lesão muscular (Magalhaes 1996). Em humanos, a SRDM manifesta-se cerca de 8 horas após a finalização do exercício, apresentando valores mais elevados entre as 24 e as 72 horas subsequentes ao mesmo, podendo prolongar-se por mais que uma semana (Duarte and Soares 1990; Gleeson et al. 1995; MacIntyre et al. 1995). Dos sintomas que constituem a SRDM, constam-se a dor espontânea na região ou grupo muscular envolvido no exercício e a dor provocada por palpação ou pelo movimento, as sensações de rigidez, de fraqueza, de fadiga, de tumefacção e as câimbras musculares (MacIntyre et al. 1995; Sjostrom and Friden 1984). A correlação entre a SRDM e a resposta inflamatória proveniente da lesão muscular provocada pelo exercício, tem sido o objectivo de alguns estudos (Nosaka et al. 2002), porém tem se verificado que vários factores podem contribuir para o efeito da SRDM, o edema muscular, o processo inflamatório associado à lesão, o aumento da temperatura local e a produção de espécies reactivas (Close et al. 2005a). A SRDM parece ser transmitida por dois grupos de fibras nervosas, as fibras mielínicas do grupo III e as fibras amielínicas do grupo IV. As fibras mielínicas do grupo III localizam-se especialmente nas zonas da junção tendinosa, transmitindo impulsos de forma rápida, uma vez que são bastante sensíveis a estímulos mecânicos localizados (Miles and Clarkson 1994). As fibras amielínicas do grupo IV apresentam-se em maior número que as do grupo III, com terminações nervosas em todo o músculo, especialmente no tecido conjuntivo entre as fibras musculares, nas regiões das arteríolas e capilares, e nas junções musculotendinosas, sendo sensíveis a estímulos de natureza mecânica, química e térmica. Por serem sensíveis a um maior número de estímulos e pelo seu carácter de transmissão lenta e de dor difusa mal definida, são consideradas as principais responsáveis pela transmissão da SRDM (Duarte and Soares 1990; Duarte et al. 1999; Miles and Clarkson 1994). Friden et al. (1986) têm referido uma outra hipótese de etiologia para a SRDM que relaciona o edema das fibras ao aumento da pressão intersticial muscular, que aparece após a realização de determinados

exercícios. Porém esta hipótese deixa de ter algum sentido, pois apenas se aplica a SRDM por aumentos de pressão tecidual nos compartimentos muito pouco complacentes, já que não consegue explicar nos casos em que a SRDM persiste e estão em causa grupos musculares de compartimentos mais complacentes (Duarte and Soares 1990). A síntese de prostaglandinas pelos monócitos originadas na fase de infiltração celular, tem sido também uma hipótese apontada para tentar explicar a SRDM (Clarkson 1992; Smith 1991). No entanto, também este mecanismo, parece ser discutível dado saber-se que em alguns casos a fase de maior acumulação de monócitos dá-se 7 dias após a realização de um exercício, ou seja, bastante tempo após o período de maior exuberância da SRDM (Jones and Bigland-Ritchie 1986). Independentemente das várias hipóteses acerca da etiologia da SRDM, é hoje aceite que serve como um importante indicador de lesão muscular esquelética induzida pelo exercício físico exaustivo e/ou inabitual (MacIntyre et al. 1995; Miles and Clarkson 1994; Pizza et al. 1995).

No que diz respeito à funcionalidade muscular e mais especificamente à capacidade de gerar força, vários estudos evidenciam uma diminuição da capacidade de produzir tensão muscular após a realização de exercício excêntrico. No estudo efectuado por Clarkson et al. (1992) foi verificado nos músculos flexores do antebraço que após a realização de um exercício excêntrico é possível observar uma diminuição muito acentuada da força muscular. Esta diminuição da capacidade funcional é mais profunda imediatamente após a finalização do exercício e, ao fim de 10 dias é ainda possível encontrar níveis de força inferiores ao estado de controlo. A etiologia da diminuição da força é ainda relativamente desconhecida. As alterações morfológicas no padrão estriado do músculo após a realização de exercícios excêntricos têm sido frequentemente invocadas como uma possível razão para a menor funcionalidade de alguns sarcómeros e, desta forma, da diminuição da força (Newham 1988). Sabe-se, porém, que as lesões celulares se vão intensificando nas fases em que a força vai recuperando, contrariando assim esta hipótese. Ou seja, não existe uma coincidência temporal entre lesão morfológica e diminuição da força (Soares and Duarte 1989). A perda de força pode manter-se até uma semana após exercício excêntrico, já o mesmo não acontece com exercício concêntrico onde existe uma recuperação da força, 1 a 2 horas após o exercício (Proske and Allen 2005). A relação comprimento-tensão é

uma propriedade fundamental do músculo, em que uma alteração na relação comprimento-tensão é uma medida viável e útil para determinar a quantidade de lesão existente no músculo devido às contracções excêntricas. Ao contrário da perda de força, este parametro é independente aos níveis de fadiga (Morgan et al. 2004). A exuberância da alteração é directamente proporcional ao grau da lesão após o exercício excêntrico (Jones et al. 1997). A perda de força, em alguns protocolos de exercício chega a atingir metade da sua força inicial, isto verificado imediatamente após o exercício. Ocorre uma recuperação praticamente total da força voluntária máxima pelo décimo dia, mas serão necessárias duas semanas para atingir a recuperação total (Sayers and Clarkson 2001). Clarkson et al. (1992) sugerem que a diminuição dos níveis de força, observada imediatamente após o final do exercício é devida à fadiga muscular e/ou a lesões estruturais e ultraestruturais nas fibras musculares. Os mesmos autores sugerem ainda outra explicação, referindo que as tensões a que os sarcómeros estão sujeitos, especialmente durante as contracções excêntricas, levam ao seu hiperestiramento, diminuindo a interdigitação entre os filamentos de actina e miosina e conseqüentemente, prejudicando a capacidade das fibras musculares se contraírem e conseqüentemente perdem a capacidade de gerar força. A disrupção de alguns sarcómeros devido à excessiva tensão exercida na fibra muscular durante o alongamento do músculo pode levar à total ruptura do sarcolema, túbulos T e retículo sarcoplasmático. Assim sendo, a perda de força verificada após exercício excêntrico pode ser explicada pela alterações observadas nos sarcómeros lesados que impedem de produzir tensão (Yeung et al. 2002), bem como à produção excessiva de ERON, que modificam a funcionalidade do músculo esquelético e, conseqüentemente, a capacidade de produzir força (Reid 2001). As alterações na permeabilidade do sarcolema e/ou do retículo sarcoplasmático, terão como consequência modificações nas concentrações de Ca^{2+} intracelular e, assim, estarão criadas condições para a hipercontracção das fibras musculares (Bar et al. 1990).

2.3.3 - Bioquímico

Os indicadores directos de lesão muscular são difíceis de obter, pois só são possíveis através de análises de biopsia muscular ou ressonância magnética nuclear (RMN). No caso das biopsias musculares, para além da complexidade técnica e da, óbvia, dificuldade na obtenção de sujeitos disponíveis, uma outra limitação é que apenas uma pequena amostra é analisada. Considerando que a lesão muscular induzida pelo exercício apresenta um carácter extremamente focalizado, a análise por biopsia pode levar a uma resposta sobrevalorizada do evento.

Um grande número de estudos no âmbito da lesão muscular esquelética induzida pelo exercício físico recorre a indicadores indirectos sendo os mais comuns, a avaliação da sensação de desconforto muscular e análises sanguíneas nomeadamente a células, proteínas e enzimas que alteram na corrente sanguínea. As alterações da estrutura celular e a perda de integridade de algumas estruturas, como a do sarcolema e de membranas de diferentes organelos, leva a perda da homeostasia o que por sua vez desencadeia uma movimentação de diversas proteínas do músculo para o espaço intersticial e, conseqüentemente, para a corrente sanguínea (Lee and Clarkson 2003; Sayers and Clarkson 2003). Assim sendo, a actividade e/ou a concentração de proteínas musculares como, a creatina quinase (CK), a mioglobina (Mb), a lactato desidrogenase (LDH), a troponina e a aspartato aminotransferase (AST) têm sido utilizadas como indicadores indirectos da lesão muscular induzida pelo exercício (Kasper et al. 2002).

A creatina quinase (CK) desempenha um importante papel regulador no metabolismo intracelular dos tecidos contrácteis, estando presente principalmente no músculo esquelético, no tecido cardíaco e no cérebro, existindo uma quantidade, mais ou menos estabilizada, desta enzima no sangue (Caquet 2004a). Se a permeabilidade do sarcolema for alterada, por razões metabólicas e/ou mecânicas, ocorre uma extensa libertação desta enzima intramuscular para a corrente sanguínea (Bar et al. 1990). Assim o doseamento da actividade desta enzima é utilizado no diagnóstico das lesões e doenças da musculatura esquelética e no infarto agudo do miocárdio. Encontra-se marcadamente elevada na distrofia muscular de Duchenne (Ramellia et al. 2006), com elevações que variam de 20 a 200 vezes o limite superior da normalidade, exercícios extenuantes, polimiosite,

dermatomiosites, miosites, miocardites, traumas musculares, injeções intramusculares recentes e após crises convulsivas (Caquet 2004a). Níveis plasmáticos desta enzima podem estar diminuídos em situações nas quais ocorra perda de massa muscular, nas hepatopatias alcoólicas, nas doenças do tecido conjuntivo e na artrite reumatóide. O doseamento da actividade plasmática desta enzima tem, igualmente, sido utilizado como indicador indirecto de lesão muscular esquelética em trabalhos que estudam o impacto do exercício excêntrico na homeostasia muscular (Clarkson et al. 2006). A CK surge, habitualmente, com o seu pico máximo na corrente sanguínea 24 a 48 horas após a realização de exercício excêntrico, sendo o seu aparecimento retardado compativamente com outros marcadores, como por exemplo a mioglobina. Uma hipótese para explicar o efeito tardio do seu aparecimento, é que a CK é libertada do músculo para o sistema linfático onde é depois transportada para o ducto torácico onde entra na corrente sanguínea. Sendo a CK uma enzima de elevado peso molecular e de grande porção, tem a sua entrada dificultada no endotélio microvascular. Para além disso, o sistema linfático é mais lento e depende de forças externas, como a contractilidade muscular, para facilitar o movimento (Sayers and Clarkson 2003). Normalmente, os indivíduos que apresentam os valores mais elevados de CK no sangue são aqueles que têm as maiores lesões musculares quando comparados com as imagens de RMN, apesar que não existir uma relação e/ou correlação perfeita (Nosaka and Clarkson 1996). Um estudo realizado por Gunst et al. (1998), demonstra que a actividade da CK não é um marcador viável quando associado à condição de existir uma baixa concentração de glutatona. Adicionalmente, têm sido descritos três grupos de pessoas com diferentes formas de libertação desta enzima (Clarkson 1992). Por este facto, têm sido denominados por “high CK responders”, “medium CK responders” ou “low CK responders”. As razões para esta variabilidade inter-individual na resposta são também ainda desconhecidas.

A mioglobina é uma proteína de baixo peso molecular, muito compacta, presente no citoplasma das células dos músculos cardíacos e esqueléticos (Caquet 2004c). É uma proteína com grande afinidade para o oxigénio, o que facilita a sua movimentação dentro das células musculares. A sua função é armazenar e fornecer oxigénio às células musculares (Moore et al. 2002). O peso molecular da mioglobina é de aproximadamente 17.800 daltons (Bhayana and Henderson 1995).

Uma vez que a mioglobina está presente tanto no músculo cardíaco como no músculo esquelético, qualquer lesão num destes tipos de músculos resulta na sua libertação para a corrente sanguínea. Nos indivíduos com infarto agudo do miocárdio, podemos encontrar níveis de mioglobina elevados já nas primeiras horas após infarto, com pico entre 6 e 9 horas, retomando aos níveis normais em 24 a 48 horas após o infarto (Caquet 2004c). A elevação da mioglobina é extremamente precoce quando comparada a outras proteínas cardíacas e/ou musculares, devido ao seu baixo peso molecular, que permite um rápido deslocamento para a circulação (Sayers and Clarkson 2003). Essa mesma característica justifica a sua curta permanência em níveis alterados, já que é rapidamente filtrada e eliminada pelos rins. Como já referimos, concentrações elevadas de mioglobina podem ser encontrados também nas lesões da musculatura esquelética, não tendo portanto uma especificidade para lesões cardíacas (Caquet 2004c). Devido à sua característica de rápida eliminação renal, resultados alterados obtidos em indivíduos com patologias renais devem ser interpretados com cautela, pois podem ser causados pela diminuição da eliminação renal. De tudo em todo, a análise das variações das concentrações desta enzima no plasma após a realização de exercício físico tem sido considerada como um indicador indirecto importante da ocorrência de lesão muscular induzida pelo exercício.

A LDH, lactato desidrogenase, é uma enzima intracelular responsável pela oxidação reversa do lactato em piruvato. É amplamente distribuída em todas as células do organismo, concentrando-se mais especialmente no miocárdio, rim, fígado, eritrócitos e músculos, possuindo cinco formas de isoenzimas (Caquet 2004b). Os seus valores encontram-se elevados em todas as situações em que ocorre grande destruição celular. Os níveis elevados são encontrados em diferentes condições como anemia megaloblástica e hemolítica, leucemias, linfoma, hemoglobinopatias, infarto agudo do miocárdio, infarto pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência coronariana, choque e hipóxia importantes, doenças musculares, lesões hepáticas, neoplasias primárias ou secundárias (metastáticas), hepatites, icterícias obstrutivas e cirrose (Caquet 2004b). A determinação da enzima, lactato desidrogenase (LDH) no plasma é outra possibilidade utilizada para identificar de forma indirecta a eventualidade de

ocorrência de lesão muscular induzida pelo exercício. Diversos estudos têm demonstrado aumentos significativos desta enzima após a realização de exercício exaustivo (Miliás et al. 2005; Taylor et al. 2003). Num estudo realizado por Miliás et al. (2005) a actividade plasmática da LDH após a realização de exercícios excêntricos, sofreu um aumento estatisticamente significativo ao fim de 24h após o exercício, atingindo o seu máximo nas 96h seguintes.

Do ponto de vista metabólico, a realização de exercício excêntrico parece, igualmente, motivar adaptações celulares significativas. De facto resultados sugerem que após a prática de exercício excêntrico ocorrem alterações do metabolismo muscular passando o fornecimento de energia a ser mais dependente do metabolismo anaeróbio, eventualmente como resultado de um compromisso da função oxidativa (Walsh et al. 2001). Assim sendo, após exercício excêntrico prévio, as concentrações de lactato têm sido descritas como estando elevadas em repouso e significativamente mais aumentadas após exercício submaximo e máximo. Adicionalmente, um aumento do rácio Pi/PCr até 10 dias após exercício excêntrico tem sido descrito no tecido muscular em repouso (McCully et al. 1992; Rodenburg et al. 1994; Walsh et al. 2001). Os potenciais mecanismos que poderão levar a uma eventual alteração do metabolismo oxidativo são i) aumentos da utilização de oxigénio de músculos não envolvidos no exercício, para fornecer energia à reparação dos tecidos lesados, ii) diminuição da disponibilidade de oxigénio derivada de uma difusão restrita do fluxo sanguíneo, iii) diminuição da capacidade máxima de respiração mitocondrial e iv) diminuição da sensibilidade da respiração mitocondrial ao ADP (Walsh et al. 2001).

2.3.4 - Resposta inflamatória ao exercício excêntrico

A inflamação é uma ocorrência fisiopatológica, que ocorre segundo um esquema bem descrito, sendo os principais eventos: (1) lesão tecidular, (2) libertação de substâncias vasoactivas pelo tecido lesado, (3) vasodilatação, (4) adesão leucocitária, (5) migração leucocitária da corrente sanguínea para o local lesado e eventualmente (6) reparação tecidular (Malm 2001).

Como já foi anteriormente referindo nesta revisão, as alterações na homeostasia celular, provocadas pelo exercício excêntrico, motivadas pelo excessivo stress mecânico bem como por desequilíbrios metabólicos,

nomeadamente a produção acrescida de espécies reactivos de oxigénio/nitrogénio (Chen and Yu 1994), desencadeiam um processo de autodegradação das estruturas lípidicas e protéicas, denominado por degeneração intrínseca (Duarte et al. 1993). Depois deste processo de degradação de zonas focalizadas da fibra muscular esquelética, surge uma resposta inflamatória (MacIntyre et al. 1995) que, entre outras consequências, contribui para o processo de degeneração eliminando os detritos da área lesada, bem como, para a regeneração do tecido lesado (Peake et al. 2005)

As primeiras observações sobre leucocitose induzida por exercício, são datadas de 1893 (Schultz 1893). A infiltração leucocitária no músculo esquelético após exercício excêntrico parece ser superior no sexo feminino, pelo menos nos humanos, apesar de a razão ser ainda desconhecida para esta observação. Ensaio realizados em animais têm demonstrado que animais do sexo feminino têm uma resposta reduzida à lesão por exercício, provalvemente devido à presença de estrogénio, porém, este facto não está completamente esclarecido nos humanos (Stupka et al. 2000). Quando a inflamação ocorre, origina infiltração fagocitária para o local lesado, levando também a uma elevação de proteínas degradadas, 48 horas após lesão muscular (Lowe et al. 1995). A infiltração celular inicia-se, normalmente, 4 a 6 horas após o final do exercício, podendo manter-se durante alguns dias, consoante a gravidade da lesão (Cannon et al. 1989; Stauber et al. 1990), verificando-se assim uma diminuição dos leucócitos circulantes e o correspondente aparecimento de neutrófilos no músculo esquelético (Beaton et al. 2002; MacIntyre et al. 1995; Walsh et al. 2001). A invasão leucocitária dos músculos lesados, caracterizada pela elevada actividade fagocítica, pela libertação de enzimas proteolíticas e pela produção de espécies reactivas de oxigénio/nitrogénio (ERON), contribui para o catabolismo protéico e remoção do tecido lesado e estimula os processos de regeneração destas fibras. Neutrófilos e macrófagos contribuem para a degradação do tecido muscular lesado pela libertação de espécies reactivas de oxigénio/nitrogénio (ERON) (Nguyen and Tidball 2003), bem como a produção de citocinas pro-inflamatórias (Cannon et al. 1989). As citocinas pro-inflamatórias, interleucina (IL)-1 β , interleucina (IL)-6 e factor de necrose tumoral (TNF)- α aparecem no músculo esquelético dentro de 5 dias após exercício (Cannon et al. 1989; Fielding et al. 1993).

A neutrofilia e a presença de neutrófilos no músculo lesado após vários tipos de exercício excêntrico têm sido documentadas por vários autores (Fielding et al. 1993; MacIntyre et al. 1996). Efectivamente, os neutrófilos são as primeiras células a infiltrarem e acumularem no tecido lesado, destruindo o tecido necrótico por fagocitose e trabalhando em conjunto com os macrófagos já existentes no músculo lesado. A neutrofilia acontece poucas horas após o exercício excêntrico, mas não se verifica após 48 horas o que sugere que a inflamação pode levar a uma migração dos neutrófilos para o tecido muscular lesado (Malm et al. 1999). A resposta dos monócitos no sangue é semelhante à dos neutrófilos, isto é, existe uma monocitose após (6 horas) o exercício excêntrico o que não se verifica 24 e/ou 48 horas após o exercício (Malm et al. 1999).

O aumento das concentrações plasmáticas das enzimas intramusculares como a creatina quinase (CK) sugere que a lesão muscular leva a um aumento da permeabilidade da membrana (Lowe et al. 1995). Estas observações, juntamente com o aparecimento de outros marcadores de inflamação no sangue e músculo, como a proteína C reactiva, a mioglobina e a interleucina 6 (IL-6), e acompanhadas por edema muscular e ainda uma SRDM, têm sugerido que o exercício físico causa inflamação muscular, especialmente quando se trata de exercício que envolve contracções excêntricas. No estudo realizado por Walsh et al. (2001), não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos valores da CK, dois dias após a realização de exercício excêntrico. Em termos genéricos, poderíamos dizer que tal como Evans e Cannon (1991), a libertação da CK representa mais uma manifestação de lesão muscular do que um indicador quantitativo dessa mesma lesão.

As interleucinas são proteínas produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e células teciduais (Petersen and Pedersen 2005). As interleucinas possuem várias funções, mas a maioria delas está envolvida na activação dos linfócitos e na indução da divisão de outras células. Cada interleucina actua sobre um grupo limitado e específico de células que expressam receptores adequados para cada interleucina. A IL-6 também designada por interferon β 2 é uma proteína multifuncional, secretada pelas células T, B, macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e muitas linhagens de células tumorais. É também produzida a partir

do músculo e encontra-se elevada em resposta à contração muscular, ou seja após exercício intenso. Esta citocina induz a produção de proteínas de fase aguda, podendo-se referir que é uma citocina anti-inflamatória.

2.4 – AS MITOCÔNDRIAS NA HOMEOSTASIA CELULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

As mitocôndrias foram identificadas há 120 anos nas células eucariotas (Benda 1898) e descritas como um conjunto de vesículas individuais, existindo centenas de cópias que flutuavam livremente no citoplasma. Estruturalmente, apresentam duas membranas fosfolipídicas, uma externa lisa e outra interna que se dobra formando vilosidades, chamadas cristas. A região limitada pela membrana interna é conhecida como matriz mitocondrial, onde existem proteínas, ribossomas e ácido desoxirribonucleico (DNA) contendo genes de proteínas necessárias à respiração celular (Scheffler 2001). A presença de material genético, nomeadamente o seu próprio DNA, DNA mitocondrial (mtDNA), fez emergir teorias sobre a sua origem, sugerindo-se hoje que as mitocôndrias teriam sido um organismo bacteriano fagocitado por uma célula eucariota, passando a partir daí a viver em simbiose com seu hospedeiro (Scheffler 2001). Na última década, grandes avanços têm sido dados, muito devido às novas tecnologias, nomeadamente no desenvolvimento de culturas celulares e microscopia de fluorescência, o que levou a conseguir dados mais exactos com imagens tri-dimensionais das mitocôndrias em células humanas de vários tecidos (Bereiter-Hahn and Voth 1994; Griparic and van der Bliek 2001; Yaffe 1999). Estes estudos mais recentes têm demonstrado que as mitocôndrias não são apenas pequenas vesículas individuais, mas antes um complexo organelo com um conjunto de longos tubulos organizados em rede. Torna-se cada vez mais evidente, que ao que habitualmente denominamos por mitocôndria, não é mais do que um túbulo mitocondrial individual, visto naquele ângulo sectorial, sendo assim mais correcto chamar de “Rede Tubular Mitocondrial” ao complexo organelo, tendo em consideração a sua arquitectura reticular tri-dimensional. Isto tem levado progressivamente à alteração de terminologia no que se refere a este organelo na célula (Benard and Rossignol 2008). O desenvolvimento tecnológico permitiu, também, verificar a existência de uma grande variabilidade neste organelo. A

estrutura da rede mitocondrial acaba, em termos de organização, por obedecer às necessidades e funcionalidades dos diversos tecidos, existindo diferenças de tecido para tecido como sejam o número de cristas e a densidade da matriz. O músculo esquelético apresenta um grande número de mitocôndrias ao longo das miofibrilas em compartimentos membranosos e altamente compactados (Benard and Rossignol 2008). Alguns estudos têm demonstrado que, de uma forma geral, as mitocôndrias do músculo esquelético, não se distribuem de forma homogénea, permitindo assim limitar duas subfracções mitocondriais. Junto aos pólos dos núcleos, imediatamente sob o sarcolema, encontramos mitocôndrias designadas por subsarcolemais (SS). Estas mitocôndrias existem em abundância e constituem cerca de 10% a 15% do volume mitocondrial total (Hood 2001). No entanto, o maior número de mitocôndrias encontra-se no interior das fibras distribuídas em fileiras longitudinais entre as miofibrilas (Cogswell et al. 1993) e designam-se por intermiofibrilares (IMF). Estas subfracções apresentam taxas distintas de consumo de oxigénio, bem como de síntese de ATP. Vários trabalhos, no âmbito da bioquímica do exercício têm demonstrado que as mitocôndrias IMF isoladas possuem maior taxa de síntese proteica e respiratória, maior capacidade de importação de proteínas percursoras, mas níveis inferiores de cardiolipina, um fosfolípido intimamente relacionado com o metabolismo energético mitocondrial (Adhihetty et al. 2005; Connor et al. 2000; Hood 2001; Ljubicic et al. 2004; Takahashi and Hood 1996). Existem também diferenças nas subfracções mitocondriais relativamente à sua adaptabilidade aos diversos estímulos, sugerindo-se que a sua localização diferencial na célula influencia a sua sensibilidade a sinais intracelulares comuns. Neste sentido, tem sido sugerido que, por exemplo, com o aumento da actividade muscular contráctil as mitocôndrias SS adaptam-se melhor ou mais rapidamente a estes estímulos que as mitocôndrias IMF (Adhihetty et al. 2007; Hoppeler 1986; Krieger et al. 1980). Este facto pode ser justificado pela proximidade da localização das mitocôndrias SS relativamente à periferia dos núcleos das células musculares esqueléticas, assim como à capacidade diferencial das subfracções mitocondriais para a síntese e importação de proteínas (Joseph et al. 2008). As subfracções mitocondriais IMF e SS, no músculo esquelético, exibem uma diferença na taxa de consumo de oxigénio, sendo aproximadamente 2,5 vezes superior nas IMF do que nas SS (Cogswell et

al. 1993). Adicionalmente, as IMF apresentam concentrações de ATP intracelular mais elevados do que as SS (Connor et al. 2000; Takahashi and Hood 1996).

No que respeita às funções das mitocôndrias, foram durante muito tempo apenas vistas como tendo a função principal de produção de energia celular. Contudo, é hoje em dia claro a importância do seu papel associado à regulação osmótica, à modulação do estado redox celular, controlo de pH, transdução do sinal, homeostasia do cálcio (Wallace et al. 1997) e, ainda, terem um papel importante na morte celular, nomeadamente na via intrínseca da apoptose (Nicholls 2004). Comparadas a “casas de energia”, pois têm como importante função a produção de energia celular num processo que culmina com a denominada fosforilação oxidativa, fornecendo energia para o crescimento celular e para as actividades biológicas, energia essa, necessária por exemplo, para a contracção muscular (Hoppeler and Fluck 2003). Cerca de 90% do consumo de oxigénio nos mamíferos é mitocondrial (Skulachev 1999) e serve principalmente para a síntese de ATP, apesar de em níveis de consumo variáveis dependendo do tecido e da actividade do organismo (Benard and Rossignol 2008). Importa referir, no entanto, que a relação entre o consumo de oxigénio e a síntese de ATP, a nível mitocondrial, sendo essencial para as necessidades energéticas não se verifica em pleno e parte do oxigénio consumido é atribuído à desacoplação mitocondrial (Brand et al. 1999). A respiração desacoplada está associada à dissipação do gradiente protónico mitocondrial e, conseqüentemente, à produção de calor, em vez de ser utilizada como mediador na síntese de ATP. A existência de determinadas proteínas mitocondriais, como proteínas desacopladoras (UCP) e as translocases de nucleótidos de adenina (ANT), podem ser uma explicação para tal facto, pois actuam como mediadores da fuga de prótons ou seja como desacopladores da fosforilação oxidativa (Ascensao and Magalhaes 2006). As UCP podem-se considerar como uma grande família de transportadores mitocondriais, localizados na membrana interna. Recentemente, foi identificada uma proteína desacopladora, UCP3, expressa no músculo esquelético como sendo importante no desacoplamento da fosforilação oxidativa e resultando na produção de calor sem ocorrer síntese de ATP (Boss et al. 1997; Clapham et al. 2000; Russell et al. 2003a; Vidal-Puig et al. 2000). A nível proteico, a UCP3 tem maior expressão nas fibras glicolíticas (tipo II) e menor expressão nas fibras oxidativas (tipo I) (Hesselink

et al. 2001). Este facto parece ainda ser influenciado pelo exercício e pelo nível de treino, pois tal como se verifica no estudo realizado por Russel et al (2003b), a expressão das UCP3 é menor em indivíduos treinados comparativamente com sujeitos sedentários.

A energia produzida pelas mitocôndrias pode alternar entre dois estados energéticos: basicamente, no estado 4, a respiração é lenta não havendo produção de ATP ($\Delta\psi$ é elevado), enquanto no estado 3, a respiração é rápida ocorrendo produção de ATP ($\Delta\psi$ é diminuído). Em condições fisiológicas normais, é considerado que as mitocôndrias produzem ATP no estado intermédio que se situa entre os estados 3 e 4 (Benard and Rossignol 2008). O ATP é a única forma de energia utilizada pela célula, e quando produzido pelas mitocôndrias é exportado para o citoplasma pela translocase de nucleótidos de adenina (ANT) em troca com o ADP citoplasmático (Benard and Rossignol 2008).

As mitocôndrias geram grande parte dos equivalentes reduzidos ou coenzimas a partir da degradação de hidratos de carbono, gorduras e proteínas (Benard and Rossignol 2008). Assim, são sintetizadas moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido reduzida (NADH) e/ou dinucleótido de flavina adenina reduzida ($FADH_2$) maioritariamente através da β -oxidação e do ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico (Andreyev et al. 2005). O NADH e o $FADH_2$ são posteriormente degradados na cadeia respiratória mitocondrial num processo designado por fosforilação oxidativa, onde os electrões libertados pela oxidação do NADH e $FADH_2$ são transferidos ao longo de um conjunto de complexos proteicos designados por cadeia transportadora de electrões (Fariss et al. 2005). Por cada molécula de NADH oxidada, dois electrões são transportados e reduzem um átomo de oxigénio. A eficiência da fosforilação oxidativa pode ser expressa pelo rácio adenosina difosfato/oxigénio (ADP/O), isto é, o número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigénio consumido (Estabrook 1967) sendo que a funcionalidade de uma mitocôndria se associa à capacidade de produzir ATP com menor consumo de oxigénio. Quando as mitocôndrias dispõem de substratos energéticos, como o succinato, malato e/ou piruvato, e ainda de oxigénio e de fosfato inorgânico, a oxidação dos substratos ocorre, e a redução de oxigénio diminui rapidamente à medida que o ADP for convertido em ATP (Monteiro et al. 2003). As mitocôndrias possuem, ainda, um sistema que regula o seu

funcionamento em função das necessidades energéticas da célula, o qual está dependente da concentração do cálcio intramitocondrial (Monteiro et al. 2003).

A cadeia transportadora de electrões está localizada na membrana interna mitocondrial, principalmente na região das cristas, e consiste em quatro complexos enzimáticos (I a IV) e dois transportadores móveis de electrões (Coenzima Q e Citocromo c) (Benard and Rossignol 2008). Na presença de equivalentes reduzidos (NADH e FADH₂), a transferência de electrões dos complexos (I ou II para o IV) medeia o bombeamento de protões da matriz para o espaço intermembranar gerando um gradiente electroquímico de protões que é posteriormente utilizado pela partícula F₀F₁ ATP sintase (complexo V) para a produção de ATP (Benard and Rossignol 2008). Este gradiente é composto por duas componentes, um potencial eléctrico ($\Delta\psi$) e um potencial químico ($\Delta\mu\text{H}^+$) e também pode ser expresso como gradiente de pH (ΔpH) (Benard and Rossignol 2008). O complexo I, tem a capacidade de oxidar o NADH e bombeia protões para o espaço intermembranar da mitocôndria, contribuindo para o gradiente electroquímico de protões, podendo conduzir à geração de ERO. Resumidamente, o complexo I tem como principais inibidores a rotenona e o óxido nítrico. O complexo II cataliza a oxidação do succinato em fumarato, com a formação de ubiquinol a partir da ubiquinona, tendo como inibidores o malonato e também o óxido nítrico. Através do ubiquinol, e ao mesmo tempo que ocorre a extrusão de um protão para o espaço intermembranar, um electrão é transferido para o citocromo c que reduz a citocromo c oxidase. No complexo IV, o citocromo c oxidase reduz o O₂ a água e utiliza a energia produzida para bombear protões para o espaço intermembranar, tendo como inibidores o cianeto e o monóxido de carbono. O gradiente de protões estabelecido pelos complexos anteriores entre o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial é utilizado para a síntese de ATP.

Como já referido anteriormente, outra função das mitocôndrias, hoje encarada como igualmente muito importante é o seu papel na activação de mecanismos de morte celular, nomeadamente na activação da via intrínseca da apoptose (Nicholls 2004). Diversas proteínas mitocondriais encontram-se directamente ligadas à apoptose, como o citocromo c, que se encontra na face externa da membrana interna e o factor indutor de apoptose (AIF), localizado no espaço intermembranar (Adhietty et al. 2005), que funcionam como activadores

das caspases e endonucleases respectivamente (Gunter et al. 2000). O citocromo c é libertado para o citoplasma levando à formação de um complexo protéico denominado de apoptosoma, que conseqüentemente desencadeia uma série de clivagens proteolíticas levadas a cabo por diferentes caspases. Já a libertação do AIF, que também induz a apoptose, é independente das caspases, e induz desfragmentação do DNA (Adhietty et al. 2005). Estudos sugerem que o “swelling” mitocondrial que pode ocorrer por perda da homeostasia, por exemplo, do íon cálcio, induz permeabilidade transitória mitocondrial (PTM) e a libertação de proteínas que conduzem à apoptose (Gunter et al. 2000). No músculo esquelético, tem-se demonstrado que a apoptose contribui para a degeneração muscular em estados patológicos como distrofias musculares, atrofia devido ao desuso, denervação, lesão de tensão e miopatias com origem mitocondrial (Adhietty et al. 2003; Primeau et al. 2002; Siu et al. 2004; Smith et al. 2000). Adicionalmente, a apoptose aparenta, igualmente, estar associada à diminuição da massa muscular relacionada com o processo de sarcopenia (Dirks and Leeuwenburgh 2002; Dirks and Leeuwenburgh 2004).

Uma vez que as mitocôndrias têm um papel importante na homeostasia do cálcio intracelular, funcionando como tampões dependentes de potencial, quando carregadas com cálcio e na presença de fosfato, desenvolvem uma susceptibilidade acrescida à abertura de uma entidade designada por poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PTM). Este fenómeno está associado à entrada de moléculas inferiores a 1500 Da e ao “swelling” mitocondrial. O “swelling” mitocondrial acontece devido à entrada de moléculas inferiores a 1500 Da o que conseqüentemente leva à entrada de água para tentar controlar a diferença de osmolaridade, ou seja, no sentido que promover um equilíbrio osmótico, a mitocôndria fica túrgida levando à conseqüente ruptura da sua membrana externa (Zoratti and Szabo 1995). Com a ruptura da membrana externa, existe a libertação de citocromo c que por sua vez activa os factores pro-apoptóticos, promovendo desta forma a apoptose. Porém, não existe consenso neste assunto, pois há quem defenda que não é a ruptura da membrana mitocondrial que leva à libertação de citocromo c, mas sim outro mecanismo, como o da translocação do citocromo c através de canais na membrana externa, sem envolvimento do poro. Tendo em consideração o que foi referido até aqui, isto é a implicação do exercício excêntrico

na perda da homeostasia das concentrações celulares de cálcio, a análise da susceptibilidade da funcionalidade mitocondrial a estas alterações induzidas pela realização de exercício excêntrico assume particular importância.

As mitocôndrias são igualmente consideradas fontes importantes de ERON durante a prática de exercício físico. Efectivamente, cerca de 90% de todo o oxigénio utilizado pelo organismo é consumido nas mitocôndrias em condições fisiológicas normais (Richter 1997), sendo que mesmo em situações de repouso, 2 a 5% do oxigénio utilizado pelas mitocôndrias, resulta na formação de ERON (Alessio 1993; Ji 1995).

O nível de produção de ERON depende muito do estado energético das mitocôndrias, sendo favorecido pelos valores elevados de potencial membranar ($\Delta\psi$) (Korshunov et al. 1997). A nível celular, a lesão induzida pela excessiva produção de ERON ocorre através da degradação oxidativa de proteínas, lípidos, e DNA, resultando na condição conhecida por stress oxidativo. No entanto, uma vez que as mitocôndrias se constituem como organelos privilegiados para a formação de radicais livres nas células, elas próprias podem ser consideradas alvos significativamente vulneráveis ao stress oxidativo (Polster and Fiskum 2004), ou seja de desequilíbrio entre a produção acrescida de ERON e a capacidade antioxidante. Sendo o exercício físico, como dissemos, uma condição metabolicamente favorável à produção de ERON, por via do elevado aumento do consumo de oxigénio, entre outros factores, importa por isso avaliar o impacto que a eventual condição de stress oxidativo poderá acarretar para a funcionalidade mitocondrial.

Para combater o efeito da lesão induzida pelos ERON, as células possuem sistemas de defesa antioxidante que podem ser de natureza enzimática ou não enzimática (Powers and Sen 2000). A distribuição das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutases (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPX) variam de tecido para tecido, sendo que os dois principais tipos de SOD encontrados em células mamíferas são o SOD magnésiano (MnSOD) e o SOD de cobre-zinco (CuZnSOD). A MnSOD é encontrado nas mitocôndrias, enquanto a CuZnSOD no núcleo e no citoplasma. A GPX que é dependente do selénio é encontrada no núcleo, no citoplasma e também nas mitocôndrias, enquanto a CAT é normalmente encontrada no citoplasma mas também nas mitocôndrias

cardíacas. A principal função da CAT e GPX é catalisar a decomposição de H_2O_2 , embora estas duas enzimas diferem na sua afinidade ao H_2O_2 a nível do substrato. Nos mamíferos, a GPX tem maior afinidade ao H_2O_2 do que a CAT, desempenhando um papel mais activo na remoção de H_2O_2 nas células do músculo esquelético. A CAT apresenta-se em concentrações elevadas nos peroxissomas e nas mitocôndrias (Halliwell and Gutteridge 1999). No que diz respeito aos antioxidantes não enzimáticos, podemos salientar a glutathione (GSH), vitamina E, vitamina C, ácido lipóico, caratenóides, ácido úrico, bilirrubina e ubiquinona. A GSH é a fonte tiol não proteica mais abundante na célula (Martensson et al. 1991) e tem como função principal a neutralização do peróxido de hidrogénio e peróxidos orgânicos durante a reacção catalizada pela GPX. A vitamina E, também designado de tocoferol, é o maior antioxidante presente na natureza e é o principal responsável pela interrupção dos fenómenos em cadeia de peroxidação lipídica das membranas celulares (Novelli et al. 1997). Uma vez que a vitamina E tem uma elevada solubilidade lipídica, acaba por estar associada às membranas altamente lipídicas como as existentes nas mitocôndrias, retículo sarcoplasmático e membrana plasmática (Sacheck et al. 2003). Já a vitamina C, ou ácido ascórbico, é hidrofílico e desempenha a sua função em ambientes aquosos (Evans 2000). Os caratenóides são antioxidantes liposolúveis localizados nas membranas dos tecidos (Evans 2000). Todos os antioxidantes têm como função neutralizar ERON ou transformá-los em radicais menos reactivos (Powers and Sen 2000). Níveis excessivos de ERON não só causam stress oxidativo como podem estimular a morte celular (Adihetty et al. 2005; Kroemer 2003).

2.5 – ADAPTAÇÕES MITOCONDRIAS AO EXERCÍCIO AGUDO

O exercício físico quando praticado de forma regular, é determinante para a aquisição de um estilo de vida saudável, comportando-se como um agente terapêutico e/ou de prevenção para numerosas situações de morbilidade, com a consequente diminuição da mortalidade que lhe está associada (Booth et al. 2002). No entanto, em franca oposição aos seus potenciais efeitos benéficos, o exercício físico agudo pode, sobretudo se exaustivo e/ou inabitual e com elevado predomínio de contracções excêntricas, induzir alterações orgânicas nefastas, especialmente

quando os diferentes tecidos não se encontram suficientemente adaptados para suportar os diferentes tipos de sobrecarga que lhes são exigidas (Powers et al. 1999). Dependendo do tipo, duração, intensidade e ainda da frequência, o exercício agudo exaustivo, tem demonstrado a induzir perturbações morfológicas, bioquímicas e funcionais nas células do músculo esquelético, como as já caracterizadas nesta revisão. As mitocôndrias desempenham um papel de grande importância na fisiologia celular, querem repouso quer durante o exercício, pelo que muitos dos estímulos associados ao exercício têm repercussões a nível mitocondrial. Estas repercussões são esperadas, visto que, durante o exercício intenso, as mitocôndrias são expostas a aumentos de concentração de lactato, prótons, fosfatos, Ca^{2+} e ERON que, a par de inúmeras adaptações, podem motivar consequências nocivas no DNA mitocondrial, proteínas da membrana e fosfolípidos (Ascensao and Magalhaes 2006). Durante o exercício existe uma exigência em aumentar o ATP e aumentar o fluxo de electrões através da cadeia transportadora de electrões na mitocôndria que conseqüentemente causa uma fuga de electrões para o O_2 , causando um aumento de formação de ERON. A disfunção mitocondrial pode conduzir a uma ampla variedade de condições patofisiológicas que afectam tanto o músculo esquelético como o cardíaco, e comprometer a produção de energia. Porém, tanto o músculo esquelético como o músculo cardíaco têm uma notável capacidade de adaptação (Ascensao and Magalhaes 2006).

Até à data, é curioso, que o efeito ou o impacto do exercício agudo sobre a funcionalidade das mitocôndrias isoladas do músculo esquelético têm sido pouco explorado. Estudos realizados em cavalos que demonstram que a respiração máxima ($V_{\text{máx}}$) diminui em amostras de músculo esquelético homogeneizado de mitocôndrias isoladas, após exercício realizado até à exaustão (Chen and Gollnick 1994; Gollnick et al. 1990). Trabalhos realizados com mitocôndrias isoladas de músculo esquelético humano demonstraram que a capacidade respiratória mitocondrial não é afectada pela realização de exercício agudo exaustivo (Tonkonogi et al. 1999). Desta forma, o potencial máximo oxidativo do músculo humano parece estar bem protegido contra os efeitos nocivos provocados nos meios químicos e físicos das células musculares após a realização de exercício exaustivo (Tonkonogi and Sahlin 2002).

Dos vários trabalhos, apesar de poucos, que estudaram o efeito do exercício agudo na função respiratória do músculo esquelético, o único que refere um aumento do estado 4 foi um estudo realizado por Tonkonogi et al. (1998). O aumento do estado 4 em fibras isoladas após exercício poderá contribuir para o aumento do consumo de oxigénio após o exercício. Fernstrom et al. (2004) realizaram um trabalho em que reportam em amostras de mitocôndrias isoladas imediatamente após exercício agudo um aumento da tolerância das mitocôndrias à sobrecarga com Ca^{2+} . Apesar de não existir nenhum estudo que sugira mecanismos que desencadeiam esta protecção, os autores sugerem que os aumentos na tolerância ao Ca^{2+} funcionam como protectores da degradação mitocondrial após a execução de exercício.

Molnar et al. (2006) num estudo relativamente recente efectuado no músculo esquelético de ratinhos, analisou o efeito do exercício excêntrico na produção mitocondrial de H_2O_2 , consumo de oxigénio e ainda a actividade das enzimas antioxidantes. Este estudo sugere que após exercício excêntrico a produção de H_2O_2 diminui de forma significativa em mitocôndrias energizadas com malato e piruvato, não se verificando o mesmo com succinato. Os parâmetros respiratórios mitocondriais analisados, nomeadamente o consumo de oxigénio no estado 3 e 4, o índice de controlo respiratório (ICR) e ainda o ADP/O, não sofreram alterações significativas com malato/piruvato como substrato. Apenas o ADP/O foi alterado após exercício excêntrico com o substrato para o complexo II. A diminuição da produção de H_2O_2 , segundo os autores, não pode ser atribuída à capacidade antioxidante mas sim a alterações da composição da membrana mitocondrial, nomeadamente a um aumento do rácio ácidos gordos poliinsaturados/saturados.

3 – DEFINIÇÃO DE OBJECTIVOS

3.1 – OBJECTIVO GERAL

Pretendeu-se com este estudo verificar o impacto da realização de exercício com predomínio de contracções excêntricas em parâmetros plasmáticos de lesão muscular e de inflamação bem como na funcionalidade de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de ratinhos, com particular destaque para a análise de parâmetros de consumo de oxigénio e potencial transmembranar.

3.2 – OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

Como objectivos específicos, o presente estudo pretende analisar o efeito de um protocolo de exercício de corrida com predomínio de contracções excêntricas:

- na actividade da CK e as concentrações de Mb e IL-6 no plasma para averiguar a existência de lesão muscular e inflamação induzida pelo exercício;
- na variação dos parâmetros de consumo de O₂ (com substratos para os complexos I e II associados a um ciclo fosforilativo);
- na variação do potencial transmembranar (com substratos para os complexos I e II associados a um ciclo fosforilativo);
- na susceptibilidade dos parâmetros de consumo de O₂ a um estímulo “in vitro” de anoxia-reoxigenação.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Neste estudo foram utilizados trinta ratinhos macho da estirpe Charles River CD1 com doze semanas de vida e aproximadamente 40 g de peso. Os ratinhos foram acomodados em gaiolas (dois ratinhos por gaiola) numa sala controlada atmosféricamente (21-22°C, ~50 – 60% de humidade) e com um sistema de controlo da luminosidade de 12h de escuro e 12h de luz. Foi fornecida aos animais alimentação própria para ratinhos e água fresca *ad libitum*. Os ratinhos foram divididos em três grupos de estudo: ratinhos de controlo (C), ratinhos excêntrico 0h (Exc0h) e ratinhos excêntrico 48h (Exc48h).

4.2 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os ratinhos Exc0h e Exc48h foram submetidos a um protocolo agudo de corrida contínua/sem paragens em plano descendente num tapete rolante com 16° de inclinação negativa (43cm do chão à base do tapete) a uma velocidade média de corrida de 16,60m/min durante 120 minutos.

Previamente à realização efectiva do protocolo, todos os ratinhos, excepto os do controlo, realizaram uma adaptação prévia à situação experimental.

Os ratinhos foram anestesiados e de seguida sacrificados por tracção cervical. Os ratinhos Exc0h foram sacrificados imediatamente após a realização do protocolo e os ratinhos Exc48h sacrificados 48h após.

Foram respeitadas todas as Medidas Nacionais de Saúde e manipulação em condições experimentais relativas ao Cuidado e Uso Laboratorial de Animais.

4.2.1 – Colheita de sangue para as determinações bioquímicas

Antes do sacrifício, já com o ratinho anestesiado, foi realizado um corte ao longo do tórax e abdómen e foi colhido o sangue por venipunctura na veia porta para a determinação de marcadores bioquímicos de lesão e inflamação, como a creatina quinase (CK), mioglobina e interleucina 6 (IL-6). As amostras foram colhidas para tubos de hemograma de 1mL (Aquisel® tubo de hemograma ref. 1501116, 1mL, Abrera, Barcelona, Spain) contendo EDTA como anticoagulante.

Imediatamente após a colheita o tubo de sangue foi agitado lentamente para evitar a coagulação. O sangue foi de seguida centrifugado a 2000rpm durante 10 minutos e separado o plasma (resultando 300 – 400µl de plasma a partir de 1ml de sangue total colhido) para um tubo seco previamente identificado e guardado a - 80°C para determinação dos marcadores bioquímicos referidos.

4.2.2 – Determinação da actividade enzimática da creatina quinase (CK)

A actividade total da CK no plasma foi medida quantitativamente utilizando um kit de diagnóstico disponível comercialmente (Creatine Kinase 7D63-20, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA) para o Architect ci8200 (Abbott Diagnostics, USA), um auto analisador de bioquímica e imunologia.

A CK presente na amostra, catalisa a transferência de um grupo fosfato altamente energético a partir da creatina fosfato para o ADP. O ATP produzido nesta reacção é subseqüentemente utilizado para fosforilar a glicose produzindo-se glicose-6-fosfato na presença de hexoquinase. A glicose-6-fosfato é em seguida oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase com redução simultânea da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH). A taxa de formação de NADPH é monitorizada a 340nm e é proporcional à actividade da CK na amostra. Estas reacções ocorrem na presença de N-acetil-L-cisteína (NAC), uma substância presente sob a forma de reactivador enzimático (Abbott-Diagnostics 2006).

4.2.3 - Determinação da mioglobina

A concentração de mioglobina no plasma foi determinada utilizando um kit de diagnóstico disponível comercialmente (stat Myoglobin 2K43, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA) para o Architect ci8200 (Abbott Diagnostics, USA), o mesmo auto analisador utilizado na determinação da CK.

A determinação quantitativa da concentração de mioglobina no plasma consiste num imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA = Carbonylmetalloimmunoassay) que envolve dois passos, com protocolos de ensaio flexíveis, designados Chemiflex®. No primeiro passo, a amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas de anticorpos anti-mioglobina são combinadas e incubadas. A mioglobina presente na amostra liga-se às

micropartículas revestidas de anticorpos anti-mioglobina. Após a lavagem, no segundo passo, o conjugado de anticorpos anti-mioglobina marcado com acridínio é adicionado. Após outra incubação e lavagem, a solução pré-activadora e a solução activadora são adicionadas à mistura de reacção. A reacção quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas (RLUs). Existe uma relação directa entre a quantidade de mioglobina presente na amostra e as RLUs detectadas pelo sistema óptico do auto analisador (Abbott-Diagnostics 2005).

4.2.4 – Determinação da IL-6 (Interleucina 6)

O método utilizado para esta determinação baseia-se na interacção anticorpo-antígeno. O imunoensaio realizado é uma ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) de fase sólida com a duração de 4,5 horas. É utilizado um kit de diagnóstico disponível comercialmente (Quantikine IL-6 Immunoassay D6050, R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA) e utilizando um leitor de microplaca.

O ensaio implica uma técnica de imunoensaio enzimático do tipo sandwich quantitativo. É usada uma microplaca de superfície inerte com poços onde serão adsorvidas as proteínas de interesse, neste caso os poços serão adsorvidos com anticorpos monoclonais específicos para a IL-6. Esta técnica, ao contrário das outras é realizada manualmente. O ensaio inicia-se com a realização de uma lavagem com uma proteína inespecífica para que esta ocupe os poços livres. A superfície é então tratada com solução de anticorpo primário - sabendo-se que exista uma quantidade maior de anticorpo do que a proteína - específico para a proteína de interesse e este vai-se ligar a ela (R&D-Systems 2007).

Calibradores, controlos e amostras são então pipetadas para os poços e qualquer IL-6 presente vai ligar-se ao anticorpo adsorvido nos poços. A superfície é lavada novamente para retirar os anticorpos primários que não foram incorporados em nenhuma proteína. Em seguida o produto é tratado com anticorpos secundários que possuem uma enzima acoplada que irá produzir uma substância corada e que se constitui de um anticorpo para o anticorpo primário. A superfície é lavada novamente para a retirada do anticorpo secundário que não se ligou ao anticorpo primário. Adiciona-se o substrato de ligação para a enzima produzir a substância

corada e, assim, medindo-se a intensidade da cor da superfície, pode-se quantificar e verificar a presença da IL-6 na amostra. A leitura da microplaca é feita a 450nm com correção de λ de 540nm e é lida até ao máximo de 30 minutos após o último passo (adicionar o substrato) (R&D-Systems 2007).

4.2.5 – Isolamento de mitocôndrias do músculo esquelético

Após o sacrifício foram extraídos os músculos quadríceps, solear, gastrocnêmios e espinotrapézio.

As mitocôndrias foram isoladas pelo método convencional de centrifugação diferencial descritos por Tonkonogi et. Salin (1997) e Magalhães et al. (2005). Os músculos após serem extraídos, foram cortados em pedaços mais pequenos no sentido de facilitar a homogeneização mecânica e colocados em meio de isolamento mantido em gelo contendo 100mM de sucrose, 0,1mM de EGTA, 50mM Tris HCl, 100mM KCl, 1mM KH_2PO_4 e 0,2% de BSA (albumina do soro bovino), (pH 7.4). O tecido foi limpo de partículas de gordura e sangue e suspenso em 10mL de novo meio com 0,2mg/ml de proteínase bacterial (Nagarse, E.C.3.4.21.62, tipo XXVII; Sigma) e agitado durante 2 minutos. A amostra foi de seguida cuidadosamente homogeneizada através de um Potter-Elvehjen e um pilão de Teflon. Após a homogeneização, foram adicionados 3 volumes de meio de isolamento sem Nagarse. A amostra foi novamente homogeneizada e dividida para centrifugação. Este processo compreendeu três fases. Na primeira centrifugação a velocidade foi de 700g com duração de 10 minutos. O pellet foi removido e o sobrenadante submetido a nova centrifugação, desta vez a 10000g com a duração de 10 minutos. Seguidamente o sobrenadante foi decantado e o pellet delicadamente resuspenso em meio de isolamento (1,3ml/100mg do tecido inicial) e novamente centrifugado a 7000g durante 4 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o pellet final contendo a porção mitocondrial (0,4 μ l/mg do tecido inicial) foi novamente resuspenso muito delicadamente em meio contendo 225mM mannitol, 75mM sucrose, 10mM Tris e 0,1mM EGTA, (pH 7.4).

A determinação da concentração de proteína mitocondrial foi estimada num espectrofotómetro utilizando o método do biureto e BSA como padrão. A fracção mitocondrial foi mantida em baixas temperaturas (0-4°C) durante todo o processo experimental. Não se verificaram alterações no índice respiratório das mitocôndrias

entre o primeiro e o último ensaio, o que permite diagnosticar bom estado da amostra.

4.2.6 – Determinação da actividade respiratória mitocondrial

Foi utilizado um eléctrodo de oxigénio tipo Clark (Hansatech DW1) com registo poligráfico para determinar a actividade respiratória da mitocôndria, tal como sugerem Tonkonogi et. Salin (1997) e Magalhães et al. (2005).

As reacções ocorreram numa câmara com 0,75mL de volume, termicamente controlada (25°C) e contendo um agitador magnético. Colocou-se 0,5mg de proteína numa reacção contendo 225mM mannitol, 75mM sucrose, 10mM Tris, 10mM KCl, 10mM KH₂PO₄ e 0,1mM EGTA, (pH 7.5) de acordo com Tonkonogi et. Salin (1997). Após a calibração, deu-se início à adição de substratos 2mM de malato + 5mM de piruvato (M+P) ou 10mM de succinato + 4μM de rotenona (S+R). O estado 3 da respiração foi determinado após adição de 400μM de ADP e o estado 4 estimado como o valor do consumo total de oxigénio após a fosforilação total de ADP. O índice de controlo respiratório-ICR (rácio entre estado 3 e estado 4) e o ADP/O (rácio entre o ADP fosforilado e o consumo de oxigénio) foram calculados segundo Estabrook (1967), utilizando 225nmol O₂/mL como o valor de solubilidade do oxigénio a 25°C.

4.2.7 – Determinação do potencial eléctrico transmembranar (TPP⁺)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) foi estimado com base na actividade do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP⁺) utilizando um eléctrodo selectivo para TPP⁺ preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo et al. (1979) usando como referencia um eléctrodo AgCl (Tacussel, Model MI 402). Ambos os eléctrodos, TPP⁺ e o de referência foram inseridos numa câmara aberta agitada magneticamente e conectada a um medidor de pH (Jenway, Model 3305). Os sinais foram ampliados através de um gravador potenciometrico (Kipp & Zonen, Model BD 121). Não foi utilizado qualquer factor de correcção para rectificar a contribuição passiva do TPP⁺ para o potencial de membrana, uma vez que o propósito deste trabalho é estudar as alterações relativas em detrimento de valores absolutos. Consequentemente, os valores do $\Delta\psi$ obtidos à *priori* são ligeiramente sobreestimados.

Foi assumido 1,1 μ l/mg como valor de proteína matricial mitocondrial. As reacções ocorreram em 1ml de meio de reacção (225mM manitol, 75mM de sacarose, 10mM Tris, 10mM KCL, 10mM K₂HPO₄ e 0,1mM EDTA, pH 7.5) suplementada com 3 μ M TPP⁺ e 0,5mg/ml de proteína (25°C). Para a monitorização do $\Delta\psi$ com substratos para o complexo I, adicionou-se malato (2mM) e piruvato (5mM) e o potencial de despolarização foi registado após a adição de ADP (400 μ M). Para a monitorização do $\Delta\psi$ com substratos para o complexo II foi adicionado succinato (10mM) ao meio de reacção contendo rotenona (4 μ M) e suplementada com TPP⁺ (3 μ M). A lag phase, expressa em segundos, reflecte a capacidade mitocondrial para despolarizar e repolarizar após a adição de ADP, foi mensurada usando como substratos malato+piruvato e succinato na presença de rotenona.

4.2.8 – Anóxia e reoxigenação

O ensaio de anóxia e reoxigenação foi realizado para verificar a capacidade de fosforilação das mitocôndrias após um período de anóxia “in-vitro”. Para isso, foi utilizado malato e piruvato como substratos e injectados 400 μ M ADP obtendo desta forma índices respiratórios pré-anóxia/reoxigenação. Depois desta fase inicial injectou-se maior concentração de ADP de forma a consumir todo o oxigénio existente na câmara. Quando os valores do oxigénio atingiram zero, o agitador da câmara foi parado durante 1 minuto. Ao fim deste período destapou-se a câmara do oxímetro e em 4 minutos reoxigenou-se o meio, aumentam os valores de oxigénio na câmara e adicionou-se novamente 400 μ M ADP após estabilização. Verificou-se nova fosforilação até atingir estado 4. Pretendeu-se com este ensaio comparar os parâmetros de consumo de O₂ antes e após o período de anóxia/reoxigenação.

4.3 – PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao programa SPSS 14.0 para Windows.

A normalidade da amostra foi testada com base no teste Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram testadas através da análise de variância de medidas repetidas (*Anova*) com recurso a um teste post hoc de Bonferroni.

Foi calculado a magnitude do efeito nas alterações verificadas no ensaio “in vitro” de anóxia/reoxigenação (A/R) através da fórmula *standard*:

$$ES = (m_1 - m_2) / s_1$$

ES = magnitude do efeito (*effect size*)

m_1 = valor da média antes A/R

m_2 = valor da média após A/R

s_1 = desvio padrão antes A/R

É considerado uma magnitude do efeito reduzido para valores até 0,2; moderado para valores de 0,5 e elevado a partir de 0,8.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 – RESULTADOS

Na tabela I são apresentadas as médias e respectivos desvios-padrão da actividade plasmática da creatina quinase (CK) e das concentrações plasmáticas de mioglobina (Mb) e de interleucina-6 (IL-6) do grupo controlo (C), do grupo animais sacrificados 0 horas após o exercício excêntrico (Exc0h) e do grupo de animais sacrificados 48 horas após a realização do exercício excêntrico (Exc48h).

Tabela I. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico, na actividade plasmática de creatina quinase (CK) e nas concentrações plasmáticas de mioglobina (Mb), e interleucina-6 (IL-6) dos ratinhos dos respectivos grupos.

	Mb (ng/mL)	CK (U/L)	IL-6 (pg/mL)
C	1.75 ± 0.38	119.42 ± 17.91	2.45 ± 0.39
Exc0h	7.57 ± 1.19 *	1061.33 ± 146.37 *	5.95 ± 0.84 *
Exc48h	1.20 ± 0.13	256.83 ± 48.61	2.85 ± 0.54

- p<0.05, Exc0h vs C e Exc48h

Os valores apresentados correspondem à média ± desvio-padrão da actividade plasmática da enzima CK (creatina quinase) e das concentrações de Mb (mioglobina) e de interleucina 6 (IL-6). C – Controlo; Exc0h – Grupo de ratinhos sacrificados imediatamente após a realização do protocolo; Exc48h – Grupo de ratinhos sacrificados 48h após a realização do protocolo.

Os resultados obtidos no grupo Exc0h relativamente à actividade da CK e à concentração plasmática da Mb e IL-6 são significativamente mais elevados comparativamente aos dos grupos C e Exc48h. No entanto, não existem diferenças entre os grupos C e Exc48h relativamente a nenhum dos parâmetros avaliados.

Na tabela seguinte (Tabela II), são apresentados, para os diferentes grupos, os resultados dos parâmetros respiratórios analisados, nomeadamente o estado 3 e estado 4, o índice de controlo respiratório (ICR) e o ADP/O em mitocôndrias energizadas com substratos para o complexo I.

Tabela II. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico, na actividade respiratória de mitocôndrias do músculo esquelético de ratinhos, energizadas com substratos para o complexo I (malato + piruvato).

	Estado 3 nmolO ₂ /mg prot/min	Estado 4 nmolO ₂ /mg prot/min	ICR	ADP/O
C	243.68 ± 7.32	29.63 ± 1.36	8.44 ± 0.45	2.20 ± 0.10
Exc0h	177.70 ± 10.19 *	31.69 ± 1.61	5.65 ± 0.98 *	2.12 ± 0.14
Exc48h	218.08 ± 11.68	26.20 ± 1.29	8.43 ± 0.53	2.48 ± 0.13

* p<0.05, Exc0h vs C e Exc48h

Os valores apresentados correspondem à média ± erro-padrão da média dos diferentes índices respiratórios de mitocôndrias energizadas com substrato para o complexo I malato (2mM) e piruvato (5mM) após a adição de ADP (400µM). ICR – Índice de controlo respiratório (estado 3/estado 4); ADP/O – rácio do ADP fosforilado pelo oxigénio consumido; C – Controlo; Exc0h – Grupo de ratinhos sacrificados imediatamente após a realização do protocolo; Exc48h – Grupo de ratinhos sacrificados 48h após a realização do protocolo.

Os valores do estado 3 e do índice de controlo respiratório (ICR) dos ratinhos pertencente ao grupo Exc0h apresentam diminuições estatisticamente significativas relativamente aos dos grupo C e Exc48h. Não se verificou uma diferença significativa nos valores dos ratinhos do grupo Exc48h comparativamente com os ratinhos do grupo C. Adicionalmente, não foram encontradas quaisquer diferenças entre grupos no que diz respeito ao estado 4 e ao ADP/O.

Na tabela seguinte são apresentados os resultados do estado 3 e estado 4, do ICR e do ADP/O de mitocôndrias dos diferentes grupos energizadas com substratos para o complexo II.

Tabela III. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico, na actividade respiratória de mitocôndrias do músculo esquelético de ratinhos, energizadas com substratos para o complexo II.

	Estado 3 nmolO ₂ /mg prot/min	Estado 4 nmolO ₂ /mg prot/min	ICR	ADP/O
C	245.82 ± 11.03	74.13 ± 4.27	3.38 ± 0.16	1.75 ± 0.09
Exc0h	260.64 ± 11.48	83.53 ± 3.64 *	3.12 ± 0.08 *	1.59 ± 0.09
Exc48h	235.87 ± 13.12	63.23 ± 4.41	3.75 ± 0.12	1.57 ± 0.10

* p<0.05, Exc0h vs Exc48h

Os valores apresentados correspondem à média ± erro-padrão de média dos diferentes índices respiratórios de mitocôndrias energizadas com substrato para o complexo II succinato (10mM) e rotenona (4μM) após a adição de ADP (400μM). ICR – Índice de controlo respiratório (estado 3/estado 4); ADP/O – rácio do ADP fosforilado pelo oxigénio consumido; C – Controlo; Exc0h – Grupo de ratinhos sacrificados imediatamente após a realização do protocolo; Exc48h – Grupo de ratinhos sacrificados 48h após a realização do protocolo.

Na Tabela III, é possível observar que existem diferenças estatisticamente significativas no estado 4 e no ICR do grupo Exc0h comparativamente com os grupos C e Exc48h. Os resultados obtidos às 48h não foram distintos dos registados no grupo de controlo. O estado 4 apresenta aumentos significativos enquanto que o ICR apresenta diminuições significativas no grupo Exc0h. No estado 3 e no ADP/O não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Os valores do potencial mitocondrial transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias energizadas com malato e piruvato são representados na Tabela IV.

Tabela IV. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico, na variação do potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias do músculo esquelético dos ratinhos, energizadas com substratos para o complexo I (malato + piruvato).

	Energizadas com Malato+Piruvato $\Delta\Psi$ (-mV)	ADP Despolarização $\Delta\Psi$ (-mV)	Repolarização $\Delta\Psi$ (-mV)	Lag Phase (s)
C	201.84 ± 2.02	179.51 ± 2.27	206.85 ± 2.24	39.75 ± 1.90
Exc0h	191.83 ± 2.09 *	173.80 ± 1.62	196.33 ± 2.42 **	42.89 ± 3.20
Exc48h	200.80 ± 1.83	178.29 ± 1.81	203.52 ± 2.82	36.75 ± 2.58

* $p < 0.05$, Exc0h vs C e Exc48h

** $p < 0.05$, Exc0h vs C

Os valores apresentados correspondem à média ± erro-padrão da média dos diferentes valores de potencial transmembranar máximo de mitocôndrias energizadas com substrato para o complexo I malato (2mM) e piruvato (5mM). A despolarização foi iniciada após a adição de ADP (400 μ M). C – Controlo; Exc0h – Grupo de ratinhos sacrificados imediatamente após a realização do protocolo; Exc48h – Grupo de ratinhos sacrificados 48h após a realização do protocolo.

Relativamente aos valores de potencial transmembranar mitocondrial obtidos após energização com substratos para o complexo I (malato+piruvato) registaram-se reduções estatisticamente significativas no potencial máximo de energização entre o grupo Exc0h e os restantes grupos Exc48h e C bem como nos valores de potencial de repolarização após adição de ADP do grupo Exc0h comparativamente com o grupo C. Os valores dos grupos C e Exc48h demonstraram-se bastante semelhantes não se registando deste modo variações. Os resultados relativos à despolarização são equivalentes entre todos os grupos do estudo. Quanto aos valores da *lag phase*, estes também se revelaram semelhantes entre os três grupos

Os valores do potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias energizadas com succinato na presença de rotenona são apresentados na Tabela V.

Tabela V. Efeito de um protocolo agudo de exercício excêntrico, na variação do potencial transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias do músculo esquelético dos ratinhos, energizadas com substratos para o complexo II.

	Energizadas com Succinato $\Delta\Psi$ (-mV)	ADP Depolarização $\Delta\Psi$ (-mV)	Repolarização $\Delta\Psi$ (-mV)	Lag Phase (s)
C	214.23 ± 2.17	190.60 ± 3.33	213.76 ± 3.33	48.28 ± 3.41
Exc0h	214.03 ± 3.28	189.05 ± 3.26	214.48 ± 3.22	46.25 ± 2.74
Exc48h	213.09 ± 2.64	182.03 ± 3.06	212.63 ± 2.68	52.27 ± 2.56

Os valores apresentados correspondem à média ± erro-padrão da média dos diferentes valores de potencial transmembranar máximo, de mitocôndrias energizadas com substrato para o complexo II succinato (10mM) e rotenona (4 μ M). A despolarização foi iniciada após a adição de ADP (400 μ M). C – Controlo; Exc0h – Grupo de ratinhos sacrificados imediatamente após a realização do protocolo; Exc48h – Grupo de ratinhos sacrificados 48h após a realização do protocolo.

Relativamente aos valores de potencial transmembranar máximo obtidos após energização com succinato e inibição do complexo I com rotenona, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos em análise. Os valores de energização e de repolarização demonstraram ser muito semelhantes nos três grupos.

Na Tabela VI e VII, apresentam-se, para o grupo de controlo (C) e para os ratinhos sacrificados imediatamente após o protocolo de exercício excêntrico (Exc0h), os resultados do efeito de um estímulo “in vitro” de anóxia-reoxigenação em parâmetros respiratórios mitocondriais.

Tabela VI. Efeito de um estímulo “in vitro” de anóxia-reoxigenação (A/R) na actividade respiratória de mitocôndrias do músculo esquelético energizadas com substratos para o complex I (malato + piruvato).

	Estado 3 nmolO ₂ /mg prot/min		Estado 4 nmolO ₂ /mg prot/min		ICR		ADP/O	
	Antes A/R	Depois A/R	Antes A/R	Depois A/R	Antes A/R	Depois A/R	Antes A/R	Depois A/R
C	248.69 ± 14.82	210.45 ± 10.58 #	31.01 ± 2.31	42.40 ± 1.15 #	8.24 ± 0.88	5.22 ± 0.24 #	2.31 ± 0.20	2.14 ± 0.23
Exc0h	181.61 ± 5.32 *	170.06 ± 6.93 *	34.93 ± 1.34	45.53 ± 1.92	5.22 ± 0.27 *	3.76 ± 0.26 *	2.16 ± 0.09	1.93 ± 0.46

* p<0.05, Exc0h vs C

p<0.05, Depois vs Antes

Como se pode verificar da tabela, o estímulo “in vitro” afectou significativamente o estado 3, estado 4 e ICR das mitocôndrias do grupo de controlo mas não das mitocôndrias do grupo Exc0h. Adicionalmente, as diferenças observadas entre os dois grupos nos parâmetros estado 3 e ICR antes do protocolo “in vitro” persistiram depois do protocolo. Pelo contrário, no estado 4 e no ADP/O não existem diferenças significativas entre os dois grupos.

A análise da magnitude do efeito do estímulo “in vitro” de anoxia-reoxigenação (tabela VII) confirma que as mitocôndrias isoladas dos ratinhos controlo foram mais afectadas por este estímulo de stress suplementar que as mitocôndrias isoladas do grupo Exc0h.

Tabela VII. Magnitude do efeito do estímulo “in vitro” de anóxia-reoxigenação (A/R) na actividade respiratória de mitocôndrias do músculo esquelético energizadas com substrato para o complexo I (malato + piruvato).

	Estado 3	Estado 4	ICR	ADP/O
C	1.33	3.12	4.31	0.57
Exc0h	0.93	1.91	2.83	0.36

6 – DISCUSSÃO

6.1 – DISCUSSÃO DA METODOLOGIA

O conhecimento científico preza pela apuração e constatação. Tem como intuito explicar de modo racional aquilo que se está a observar. Não se contenta com explicações sem provas concretas e os seus alicerces estão na metodologia e na racionalidade. Análises são fundamentais no processo de construção e síntese que o permeia, isso, aliado às suas demais características, faz do conhecimento científico quase uma antítese do empírico. Cada vez mais, o conhecimento está ao alcance de todos, tornando-se mais acessível devido aos avanços científicos e tecnológicos.

Pretendeu-se com este estudo aprofundar o conhecimento sobre o impacto do exercício, nomeadamente o exercício com predomínio de contracções excêntricas na funcionalidade de mitocôndrias do músculo esquelético. Para isto recorreu-se às análises clínicas para determinar alguns marcadores de inflamação/lesão muscular esquelética, bem como à análise de parâmetros respiratórios e de potencial de membrana de mitocôndrias energizadas com substratos para os complexos I e II. Adicionalmente, para melhor elucidar acerca do impacto do exercício excêntrico na funcionalidade mitocondrial, utilizou-se um estímulo mitocondrial extra de anóxia-reoxigenação (A/R) “in-vitro”.

A viviseção é o acto de dissecar um animal vivo com o propósito de realizar estudos de natureza anatomo-fisiológica, ou seja com motivações científico-pedagógicas (Machado 1989). É de consenso científico que a maioria dos testes feitos em animais ainda é absolutamente necessário, e os laboratórios devem adequar os seus testes sob rígidos códigos de bioética para manterem-se aptos ao uso de animais vivos em testes. Em Portugal, esta técnica é regulamentada, juntamente com outros métodos de experimentação animal, pela Portaria nº 1131/97 de 7 de Novembro, versada sobre a protecção dos animais utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos. Esta legislação prevê que a experimentação em animais deve ser executada exclusivamente por pessoas competentes e em animais devidamente anestesiados. Os defensores dos 3Rs, *Replacement*, *Reduction* and

Refinement (substituição, redução e refinamento) encontram na obra de Russel e Burch seu principal fundamento. O livro “*The Principle of Human Experimental Technique*” de Russell and Burch (1959) foi o ponto de partida para os 3Rs, que também influenciaram a legislação relativa aos animais de laboratório e constituem as linhas de orientação para a experimentação animal (Weihe 1985). O uso de animais em estudos científicos ainda é indispensável em muitos casos, mas isso é feito hoje de acordo com normas éticas internacionalmente aceites. A utilização dos animais em pesquisas vem sendo discutida desde o século 18. Em 1789, o filósofo inglês Jeremy Bentham (1748-1832), um dos primeiros pensadores a se preocupar com o bem estar dos animais, já dizia: “A questão não é se os animais podem raciocinar ou falar, mas se podem sofrer” (Editorial Enciclopédia 1986). Quase um século depois, em 1865, o fisiologista francês Claude Bernard (1813-1878) defendia o direito de fazer experiências em animais e vivissecção: “Eu penso que temos esse direito, total e absolutamente. Seria estranho se reconhecessemos o direito de usar os animais para serviços caseiros e alimentação, mas proibíssemos seu uso para o ensino de uma das ciências mais úteis para a humanidade. Experiências devem ser feitas tanto no homem quanto nos animais. Os resultados obtidos em animais podem ser todos conclusivos para o homem, quando sabemos como experimentar adequadamente” (Editorial Enciclopédia 1986).

Dada o reconhecido mérito e a importância que a prática de exercício físico assume na sociedade actual, enquanto factor de prevenção de uma série de doenças e agente coadjuvante da terapêutica de um conjunto significativo de patologias, a opção de realizar este protocolo experimental é justificada pela importância em analisar de que forma o exercício físico, nomeadamente com contracções excêntricas, se repercute no organismo, com a atenção direccionada para as mitocôndrias. As amostras foram de ratinhos, uma vez que amostras humanas só seriam possíveis se os voluntários estivessem disponíveis e dispostos a realizar este protocolo de exercício e de seguida uma biopsia muscular. Para além de que, a recolha de amostra em humanos para este tipo de estudos não seria considerada totalmente fiável dado que alguns estudos (Clarkson and Hubal 2002b) sugerem que a técnica de biopsia

muscular, só por si, é também indutora de lesão e, por isso, um adicional contributo para o exacerbar da lesão induzida pelo exercício. Outra razão para a escolha dos ratinhos em vez de humanos tem a ver com o facto de a amostra do tecido extraído, no caso de humanos, poderia não ser significativamente representativa da lesão induzida pelo exercício tendo em vista a grande superfície do músculo, e ainda o tecido extraído poderia não corresponder à localização exacta da lesão. Sendo assim, no caso dos ratinhos todo o músculo em questão é retirado o que evita o erro de não conseguir retirar a zona afectada. Houve necessidade de extrair diferentes grupos musculares do ratinho, de forma a obter uma amostra de massa muscular significativa, visto o grande número de parâmetros mitocondriais a analisar no ensaio anteriormente descrito. Retiraram-se os músculos quadricípete e gêmeos dos membros traseiros, bem como o músculo espinotrapézio, sendo este um músculo com características metabólicas similares às encontradas no músculo quadricípete em humanos. No ratinho este músculo tem como funções estabilizar a omoplata e absorver o impacto dos membros dianteiros durante a corrida em plano descendente (Hahn et al. 2007). Importa salientar que, uma vez que a fracção mitocondrial utilizada para a determinação de parâmetros neste estudo foi isolada de diferentes músculos com distintas características bioquímicas, os resultados aqui encontrados não deveram ser extrapolados para cada um dos músculos individualmente (Magalhaes et al. 2007). Utilizou-se este protocolo, que envolve um período de corrida contínua a uma velocidade média de 16m/min em tapete rolante com uma inclinação de 16º negativos e de duração prolongada (Lynch et al. 1997a), pois este tipo de protocolos tem sido referido na literatura como sendo indutor de lesão muscular esquelética (Homonko and Theriault 2000). A utilização de animais do mesmo sexo, neste caso, masculino, tem a justificação homogeneizar os resultados. De facto, animais do sexo feminino apresentam níveis de estrogénio que estão descritos como terem um efeito de protecção no tecido muscular face a estímulos inductores de stress oxidativo (Camper-Kirby et al. 2001). A alimentação, é outra variável que, segundo alguns autores (Blumberg et al. 1994; Brooks et al. 1992) pode influenciar a capacidade antioxidante dos animais/humanos. Efectivamente, deficiências nutricionais em compostos antioxidantes podem influenciar o

controlo das análises bioquímicas celulares e orgânicas de stress oxidativo, induzidas pela realização de exercício físicos. Uma vantagem no uso de animais, é que esta variável está bem controlada, ao contrário, nos humanos em que é mais difícil uniformizar um regime alimentar para todos os sujeitos que fazem parte do protocolo.

Durante o exercício do protocolo, o ritmo de corrida dos ratinhos foi controlado, tentando com esta exigência metodológica, uniformizar a intensidade do esforço para todos os ratinhos (Alessio 1993; Gabriel et al. 1992; Lovlin et al. 1987; Tiidus and Ianuzzo 1983). Os exercícios foram realizados com uma corrida sem paragem com duração de 120 minutos. A existência de 2 grupos experimentais (Exc0h e Exc48h), é justificado por ser nestes momentos que é sugerido existirem variações mais significativas nos indicadores estudados.

6.2 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como referido previamente, o objectivo deste estudo foi analisar o impacto da realização de exercício com predomínio de contracções excêntricas em indicadores de agressão/lesão muscular bem como na funcionalidade mitocondrial. Para tal, foi necessária a realização de um protocolo experimental que consistia num único momento de corrida em plano descendente num tapete rolante com inclinação de 16º negativos. Até hoje, do nosso conhecimento, muito poucos trabalhos se debruçaram sobre o efeito de protocolos de exercício excêntrico na funcionalidade mitocondrial do músculo esquelético.

Está bem documentado que o exercício excêntrico induz microtraumatismo musculares, fadiga e sensação retardada de desconforto muscular (Clarkson and Hubal 2002b; Nosaka et al. 2002). Este facto tem sido comprovado histologicamente (Hesselink et al. 1996) e com recurso a marcadores indirectos de lesão muscular, como o CK (Hirose et al. 2004) ou marcadores inflamatórios como algumas citocinas (Thompson et al. 2004).

Numa perspectiva global, os resultados obtidos, sugerem que o protocolo de exercício aplicado induziu alterações na homeostasia celular, bem como na

funcionalidade mitocondrial que se repercutiram se forma significativa imediatamente após o exercício mas foram completamente atenuados 48 horas depois.

Outros estudos com animais e humanos demonstraram que após exercício com predomínio de contracções excêntricas verificam-se aumentos significativos nos valores de CK, Mb (Clarkson et al. 2006) e IL-6. Indicadores como aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), IL-1 β (Chen and Hsieh 2001), proteína C reactiva (CRP) e factor de necrose tumoral (TNF- α) (Stewart et al. 2007) não foram analisados neste estudo devido à escassez da amostra de sangue, visto se tratar de ratinhos de pequena estatura. Os resultados obtidos neste estudo relativamente à actividade da CK e Mb evidenciam a saída de proteínas do citoplasma celular para a corrente sanguínea devido provavelmente à lise das membranas celulares e, concomitantemente, sugerem a ocorrência de lesão muscular esquelética induzida pelo exercício excêntrico. Efectivamente, a realização de exercício excêntrico pode provocar a lise das membranas das fibras musculares por sobrecarga mecânica (Lee and Clarkson 2003), por elevado stress sobre a fibra, bem como por eventual ocorrência de fenómenos de stress oxidativo associados à produção acrescida de ERON. Globalmente, inúmeros estudos (Miliás et al. 2005) sugerem uma hipótese mecânica associada ao stress e à sobrecarga tensional sobre as miofibrilas e uma hipótese metabólica associada à falência energética e ao stress oxidativo como explicações concertadas para a ocorrência de lesão induzida pelo exercício excêntrico (Walsh et al. 2001).

No nosso estudo, no entanto, a cinética da CK após exercício é distinta comparativamente ao que é habitualmente descrito em humanos. De facto, contrariamente ao que tem sido recorrentemente descrito em humanos (Clarkson et al. 2006), a actividade máxima da CK no plasma atingiu, no nosso estudo, o ponto mais alto imediatamente após o exercício. Quarenta e oito horas após o exercício (Exc48h), os valores da CK retornaram aos valores pré-exercício. A tendência dos nossos dados vai, no entanto, de encontro aos resultados obtidos em outros estudos realizados com animais. Por exemplo, um estudo realizado em ratinhos por Carmichael et al. (2005) reportou aumentos significativos na CK às 24 horas e decréscimos significativos às 48

horas após exercício. Num outro estudo mais recente também com ratinhos, Davis et al. (2007) apresentam resultados de CK que atingem o seu pico às 24 horas e também têm decréscimos significativos às 48 horas. Já num outro estudo, Uchiyama et al. (2006) observaram aumentos da CK imediatamente após o exercício, com pico nos 30 minutos seguintes, e diminuição progressiva para valores basais a partir das 2h. Porém, no trabalho de Lynch (1997b), que realiza um protocolo de corrida em plano descendente, de certa forma semelhante ao nosso estudo, obteve resultados bem diferentes do nosso, pois os valores de CK eram iguais no grupo de controlo, no grupo 24h e no grupo 48h após o exercício. A discrepância de resultados deste trabalho comparativamente ao nosso trabalho pode ser justificado, pelo facto, de apesar das semelhanças de protocolo, a duração e a velocidade são diferentes, bem como a estirpe de animais utilizada não ser a mesma. Pode assim verificar-se que a CK tem uma cinética diferente em animais comparativamente aos humanos apresentado assim o seu pico mais precocemente. Porém, considerando que a medição dos níveis da CK correspondem à sua actividade e não à sua concentração, outros factores que influenciam a actividade das enzimas no sangue podem explicar esta grande variabilidade (Lee and Clarkson 2003).

Por outro lado, um estudo realizado em humanos adultos para verificarem o efeito do exercício excêntrico (em cicloergómetro) na funcionalidade do metabolismo oxidativo, Walsh et al. (2001) não obtiveram alterações nos marcadores de lesão muscular, nomeadamente na actividade da CK após o exercício. Os autores justificam os resultados obtidos pelos efeitos pouco lesivos que o impacto do exercício em cicloergómetro tem nas fibras musculares comparativamente com corrida em plano descendente, com impacto mais elevado.

Os resultados do presente estudo relativos à Mb, em que se verificou que a concentração mais elevada foi obtida no grupo de ratinhos Exc0h, estando desta forma de acordo com a maioria dos resultados obtidos em outros estudos que envolvem exercício aparecendo o seu pico poucas horas após o exercício (Clarkson et al. 2006). A explicação para este facto, como já foi referido na revisão, é devido ao seu baixo peso molecular, que permite um

rápido deslocamento para a circulação (Sayers and Clarkson 2003). Os valores de Mb, no nosso trabalho, para o grupo de ratinhos Exc48h já apresentavam concentrações semelhantes aos valores basais ao comparar com o grupo de controlo (C). Estes resultados vão de encontro, mais uma vez, aos descritos pela literatura mesmo nos estudos que envolvem humanos sujeitos a exercício indutor de lesão muscular (para refs ver Sorichter et al. 1999), e acaba por ser concondante com o que foi referido atrás, sobre o seu baixo peso molecular, acabando assim por responder pela sua curta permanência em níveis alterados, já que é rapidamente filtrada e eliminada pelos rins. Existem, no entanto, alguns estudos realizados em humanos que demonstram que o pico da Mb ocorre numa fase mais tardia após o exercício indutor de lesão muscular, mas as diferenças metodológicas poderão estar na origem desta discrepância de resultados. Um exemplo será o estudo de Childs et al. (2001) em que a Mb se apresentou significativamente elevada dois, três e quatro dias após lesão provocada por um protocolo de exercício excêntrico voltando a valores basais 7 dias após o exercício. Pelo contrário, um estudo mais recente, vai de encontro à maioria dos estudos em relação à cinética da Mb, evidenciando-se o pico do valor da concentração plasmática de Mb 1 hora após a realização do exercício (French et al. 2008).

No caso do IL-6, os resultados obtidos neste estudo sugerem a ocorrência de uma resposta inflamatória associada à lesão induzida pelo exercício excêntrico. Efectivamente, o IL-6 é considerado um marcador de inflamação (Stewart et al. 2007) com características pró ou anti-inflamatórias conforme a situação e tem sido descrito que o seu valor é aumentado poucas horas após o exercício (Chen and Hsieh 2001). Os nossos resultados parecem assim estar de acordo com os obtidos em outros estudos (Davis et al. 2007; Petersen et al. 2001). Estudos anteriores sugerem, no entanto, que o incremento de IL-6 induzido pelo exercício se associa à ocorrência de lesão muscular. No entanto, importa referir que outros estudos têm, igualmente, sugerido que o incremento de IL-6 é também uma consequência directa da actividade contráctil (concêntrica ou excêntrica) e não só propriamente da lesão, estando, no entanto, associado aos mecanismos de reparação da lesão. Importa, igualmente salientar que os trabalhos com humanos sujeitos a

exercício excêntrico ou extenuante têm demonstrado incrementos significativamente mais elevados do que os obtidos no nosso estudo. Petersen et al. (2001) demonstraram que indivíduos submetidos a um protocolo de corrida em plano descendente incrementaram os níveis plasmáticos de IL-6 cerca de 20 vezes. Tendo em consideração os sinais evidentes de lesão expressos pela magnitude do incremento da CK e da Mb, a discrepância com os nossos dados puder-se-á dever a diferenças metodológicas, nomeadamente pelo facto de no nosso estudo serem analisados ratinhos.

A funcionalidade mitocondrial pode ser avaliada através da análise de parâmetros respiratórios como o estado 3, estado 4, ICR e o ADP/O em mitocôndrias energizadas com substratos para os diferentes complexos. No presente estudo foram utilizados malato, piruvato e succinato na presença de rotenona como forma de energizar o complexo mitocondrial I e II, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho, de uma forma geral, evidenciam um decréscimo da funcionalidade mitocondrial “in vitro”. Efectivamente, a fosforilação oxidativa foi negativamente afectada, no grupo Exc0h comparativamente com os restantes grupos como é evidente no decréscimo do estado 3 e do do índice de controlo respiratório, bem como no potencial máximo de membrana após energização com substrato para o complexo I. O ADP é considerado o principal estimulador da fosforilação oxidativa e das vias glicolíticas de produção de energia (Benard and Rossignol 2008). Uma possível explicação para o decréscimo de funcionalidade mitocondrial observado no nosso estudo após exercício excêntrico pode estar relacionada, entre outros factores, com uma diminuição do fornecimento de substratos para a cadeia transportadora de electrões, uma vez que a taxa máxima de respiração mitocondrial estimulada por ADP pode reflectir a disponibilidade de NADH e FADH₂ para fornecimento de electrões. De facto, em algumas circunstâncias, como por exemplo a estimulação pró-oxidante “in vitro” (Nulton-Persson and Szweda 2001) ou stress oxidativo acrescido “in vivo” (Magalhaes et al. 2005), tem sido demonstrada disfunção reversível da actividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs, tal como a succinato desidrogenase, a α -cetoglutarato desidrogenase ou a aconitase, com consequências na diminuição dos níveis de NADH e FADH₂. No entanto, a

diminuição de substratos para a cadeia transportadora provavelmente afectaria a eficácia dos complexos com igual magnitude e, por isso, esta explicação não parece suficiente para justificar as diferenças de funcionalidade encontradas nas mitocôndrias quando energizadas com substratos para o complexo I ou complexo II. Desta forma, o decréscimo da actividade de alguns dos complexos enzimáticos da cadeia, por exemplo por oxidação proteica mediada por radicais livres (Yen et al. 1996) ou por peroxidação das moléculas de cardiolipina da membrana interna mitocondrial (Paradies et al. 2002), poderão ser apontadas como possíveis razões para explicar o decréscimo específico do estado 3 após energização com malato e piruvato. Efectivamente, os complexos enzimáticos mitocondriais, em particular o complexo I, possuem grupos ferro-enxofre que podem ser oxidativamente modificados ou desactivados pela interacção com radicais resultando, conseqüentemente, na redução da sua actividade e no comprometimento da potência do estado 3. Apesar da determinação da actividade enzimática do complexo I e do complexo II não ter sido realizada neste estudo, o maior número de grupos ferro-enxofre do complexo I relativamente ao complexo II (Yen et al. 1996), poderá, pelo menos em parte, justificar a diferença de resultados.

O aumento do estado 4 é indicativo de um aumento de fuga de prótons pela membrana interna. Os resultados do presente estudo sugerem assim um estado de desacoplamento mitocondrial aumentado. A eventual ocorrência de condições acrescidas de stress oxidativo com conseqüências nefastas na funcionalidade membranar, poderá, pelo menos em parte, justificar estes resultados.

Observamos neste trabalho, em conseqüência da diminuição do estado 3 e do aumento do estado 4, alterações significativas no índice de controlo respiratório (ICR) às 0h após exercício nas mitocôndrias energizadas com substratos para ambos os complexos, o que sugere inequivocamente que o consumo de O₂ ficou desacoplado relativamente à síntese de ATP. Sendo o ICR utilizado para analisar a funcionalidade e integridade estrutural das mitocôndrias, é sugerido que o exercício excêntrico parece estimular o desacoplamento da respiração mitocondrial, bem como a inibição da fosforilação oxidativa.

O nosso trabalho evidencia uma diminuição da funcionalidade mitocondrial logo após a realização do exercício (Exc0h) em contraste, um estudo realizado por Molnar et al. (2006) sugere que o exercício excêntrico não afecta significativamente a funcionalidade mitocondrial relativamente aos parâmetros respiratórios convencionais. No caso particular deste estudo, importa referir que existem algumas diferenças, quer na estirpe de animal utilizado, quer entre os protocolos, os quais podem justificar a discrepância entre os resultados. Por exemplo, a inclinação do tapete e a duração utilizadas no nosso trabalho são significativamente superiores comparativamente às utilizadas no trabalho de Molnar et al. (2006). Estas diferenças acarretam, certamente, um grau diferenciado de impacto metabólico e de stress mecânico nos músculos exercitados e poderão justificar o facto de no trabalho de Molnar et al. (2006) os valores de CK obtidos após o exercício serem somente o dobro dos pré-exercício, enquanto no nosso trabalho foram evidentes incrementos da CK da ordem das 10 vezes. Num outro trabalho realizado com humanos, e mais uma vez, ao contrário dos resultados obtidos no nosso trabalho, Walsh et al. (2001) sugerem que a respiração máxima estimulada por ADP permaneceu inalterada após a realização de um protocolo de exercício excêntrico em cicloergómetro. Tal como sugerido pelos próprios autores, uma possível justificação para a discrepância dos resultados pode ser que o exercício em questão induza menor impacto mecânico e lesivo que a corrida em plano descendente. De facto, as actividades da CK e da β -glucoronidase, dois marcadores de lesão muscular, não apresentaram diferenças significativas entre os valores obtidos antes e após o exercício excêntrico o que atesta do baixo impacto do exercício utilizado neste estudo.

Para analisar a função mitocondrial, é igualmente importante estudar as variações que ocorrem nos valores do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$). Alguns estudos têm demonstrado que uma certa estabilidade do potencial transmembranar mitocondrial é essencial para manter a integridade celular (para refs ver Abreu et al. 2000). Sendo assim, uma lesão a nível mitocondrial devido a stress oxidativo, tem sido demonstrado estar associado a um decréscimo do potencial mitocondrial transmembranar e à depleção celular de ATP, bem como à morte celular (para refs ver Abreu et al. 2000). Até à data

e para o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que as variações do potencial transmembranar serão avaliadas após exercício excêntrico. Os resultados obtidos, em mitocôndrias isoladas, estão de acordo com os resultados dos parâmetros respiratórios, isto é, a capacidade de formar potencial com substratos para o complexo I é inferior após a realização do exercício excêntrico. Esta diminuição do potencial transmembranar, para além das razões já mencionadas anteriormente, pode ser atribuída a um aumento pontual da expressão de proteínas desacopladoras (UCP), especificamente as UCP3. Efectivamente, um aumento da expressão destas proteínas, mesmo após exercícios de curta duração, tem sido mencionado em vários estudos (Para refs ver Ascensao and Magalhaes 2006). Como exemplo, um trabalho realizado por Zhou et al. (2000) em ratos submetidos a 200 minutos de corrida em tapete rolante sugere um incremento de 7 vezes na expressão de UCP3 mRNA e de 5,6 vezes no seu conteúdo proteico. Este facto parece evidenciar que o exercício agudo parece ter consequências funcionais imediatas na regulação genética das UCP3 (Noland et al. 2003). Adicionalmente, está descrito que a duração e a intensidade do exercício parece influenciar a regulação transcripcional destes genes (Hildebrandt et al. 2003).

De uma forma geral, os resultados deste trabalho parecem demonstrar que o exercício excêntrico induz lesão muscular e, conseqüentemente, uma disfunção da funcionalidade mitocondrial. No entanto, importa referir que, contrariamente às expectativas colocadas à priori, a perda de homeostasia tecidual e de funcionalidade mitocondrial foi evidente imediatamente após o exercício excêntrico conseguindo ser revertida para o valores basais 48 horas após. A discrepância temporal na ocorrência das alterações induzidas pelo exercício habitualmente descrita em humanos vs. ratinhos sugere que face a estímulos lesivos para a musculatura esquelética os ratinhos apresentam uma capacidade de recuperação muito mais célere que os humanos. Assim sendo, estudos no âmbito da lesão muscular induzida pelo exercício devem considerar de forma atenta os tempos de recolha e de análise dos diferentes parâmetros, uma vez que os utilizados em humanos não parecem coincidentes com a cinética do impacto no modelo animal.

Proposemos-nos, ainda, realizar um ensaio de stress “in vitro” somente com mitocôndrias isoladas dos ratinhos dos grupos C e Exc0h. Com este ensaio pretendemos aprofundar o estudo da resposta das mitocôndrias isoladas a condições de stress acrescido. Efectivamente, o ensaio de anóxia-reoxigenação “in vitro” realizado em mitocôndrias isoladas tem sido considerado como um estimulador bem estabelecido e controlado de stress oxidativo (Du et al. 1998; Du et al. 1999) que permite a exclusão de outros sistemas de defesa anti-oxidantes citosólicos. De facto, a produção de ERON é central ao mecanismo de anóxia-reoxigenação (Du et al. 1998; Du et al. 1999). Assim sendo, seria expectável que as mitocôndrias do grupo Exc0h, já afectadas pelo stress imposto pelo exercício excêntrico como evidenciámos anteriormente, fossem mais afectadas do que as mitocôndrias isoladas dos ratinhos controlo. No entanto, os resultados evidenciam precisamente o inverso. Os parâmetros respiratórios analisados demonstram que as mitocôndrias do grupo controlo foram mais afectadas que as do grupo Exc0h após o estímulo da anóxia-reoxigenação. Ou seja, este ensaio “in vitro” conduziu a alterações significativas em alguns dos parâmetros mitocondriais estudados, nomeadamente no estado 3, estado 4 e no ICR, no grupo de controlo mas não no grupo Exc0h.

Num estudo realizado por Ascensão et al. (2006b) com mitocôndrias cardíacas de ratos sujeitos a treino de resistência, os autores demonstraram que o treino minimizou o efeito nefasto da A/R no aumento do estado 4, na diminuição do estado 3, ICR e ADP/O. Segundo os autores, algumas potenciais explicações para esta tolerância recaem na indução de proteínas de choque térmico (HSP), nomeadamente nas HSP60 e nas HSP70, bem como na sobrerregulação de enzimas antioxidantes mitocondriais. Importa no entanto salientar que contrariamente ao nosso trabalho (protocolo de exercício agudo), Ascensão et al. (2006b) utilizaram um modelo de treino crónico. Este aspecto associado ao facto de os tecidos em análise serem distintos nos dois trabalhos (tecido cardíaco vs. tecido muscular esquelético) sugere que poderão existir diferentes mecanismos envolvidos no processo de protecção da funcionalidade mitocondrial ao estímulo de stress “in vivo” após os respectivos protocolos de exercício. Contudo, os mesmos autores reportaram ainda num outro trabalho

que as mitocôndrias cardíacas isoladas de ratos tratados com doxorubicina, um fármaco indutor de disfunção mitocondrial, toleraram melhor os efeitos de um protocolo de A/R comparativamente com as mitocôndrias controlo (Ascensao et al. 2006a). Estes resultados, conjuntamente com os do presente trabalho, parecem sugerir que ambos os estímulos (doxorubicina e exercício agudo com predomínio de contracções excêntricas) induzem um efeito semelhante ao pré-condicionamento e/ou eventualmente um limiar de afecção contra/perante os efeitos “in vitro” da A/R.

No entanto, um trabalho realizado recentemente por Paulsen et al. (2007) sugere uma rápida acumulação de HSP de baixo peso molecular, nomeadamente de HSP27 e de alpha-β-cristalina no músculo esquelético de humanos após exercício excêntrico agudo. Sabendo que Jin et al. (2008) demonstraram que um estímulo de stress (isquemia-reperfusão) motivou a sobreexpressão das alpha-β-cristalina no músculo cardíaco e, concomitantemente, o aumento da sua acumulação a nível mitocondrial, com repercussões na protecção deste organelo face a condições de stress oxidativo, é possível que também no músculo esquelético, mecanismos semelhantes sejam induzidos pelo exercício excêntrico. A ser verdade, o protocolo de exercício excêntrico teria induzido uma sobreexpressão citosólica destes chaperones com migração para a mitocôndria, protegendo-a do stress suplementar induzido pelo estímulo “in vitro” de A/R. Estudos futuros serão, no entanto, necessários, para confirmar esta hipótese e consolidar o conhecimento inerente a esta particularidade da funcionalidade mitocondrial associada ao exercício excêntrico.

No contexto geral, e como o conhecimento não tem limites, respostas encontradas fazem sempre despertar novas dúvidas. Acabam sempre por existir novas perguntas a faltar respostas, e no nosso caso não é excepção. Assim sendo, achamos, cientificamente pertinente estudar o impacto do exercício excêntrico em fracções musculares individualizadas e/ou nas diferentes subpopulações mitocondriais (fracção subsarcolemal e intermiofibrilar). Aprofundar o impacto deste modelo de exercício na actividade dos diferentes complexos da cadeia transportadora de electrões, bem como determinar a influência da disfunção mitocondrial induzida pelo exercício excêntrico

exaustivo com predomínio de contracções excêntricas na activação de mecanismos de morte celular, nomeadamente, na apoptose.

7 - CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos neste trabalho foi possível de retirar as seguintes conclusões:

- o protocolo de exercício excêntrico utilizado neste trabalho foi adequado para induzir lesão e consequente disfunção mitocondrial no músculo esquelético de ratinhos;
- a lesão e subsequente inflamação muscular esquelética foi comprovada com marcadores indirectos, nomeadamente aumento da actividade plasmática de creatina quinase e das concentrações plasmáticas de mioglobina e interleucina-6;
- a cinética da actividade da creatina quinase é significativamente distinta da descrita em humanos, apresentado o seu pico imediatamente após o exercício;
- o exercício excêntrico induziu disfunção mitocondrial com particular efeito deletério no complexo I da cadeia transportadora de electrões;
- quarenta e oito horas após o exercício os ratinhos já não evidenciam sinais de lesão muscular nem de disfunção mitocondrial o que sugere uma ocorrência temporal dos eventos da lesão e da inflamação induzida pelo exercício, bem como da capacidade de recuperação distinta da descrita em humanos;
- o estímulo "in vitro" de A/R não afectou significativamente as mitocôndrias isoladas no grupo Exc0h sugerindo a existência de um limiar de deterioração das mitocôndrias e/ou um efeito de pré-condicionamento perante/contra a A/R, respectivamente.

Assim sendo, os resultados alcançados neste estudo, em especial os parâmetros mitocondriais, fortalecem perspectivas inovadoras sobre o efeito do exercício excêntrico na bioenergética mitocondrial do músculo esquelético de ratinhos. Em suma, podemos concluir que o exercício excêntrico induz lesão e uma resposta inflamatória associada com, consequências momentaneamente nefastas na funcionalidade das mitocôndrias musculares esqueléticas.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott-Diagnostics (2005) STAT Mioglobina. In: 02K43 (ed)
- Abbott-Diagnostics (2006) Creatine kinase. In: 07D63 (ed)
- Abreu RM, Santos DJ, Moreno AJ (2000) Effects of carvedilol and its analog BM-910228 on mitochondrial function and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1022-1030
- Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA (2003) Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol* 88: 99-107
- Adhihetty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ, Hood DA (2005) Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C994-C1001
- Adhihetty PJ, O'Leary MF, Chabi B, Wicks KL, Hood DA (2007) Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 1143-1151
- Alessio HM (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 218-224
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70: 200-214
- Armstrong RB (1984) Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 16: 529-538
- Armstrong RB (1990) Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 22: 429-435
- Armstrong RB, Warren GL, Warren JA (1991) Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* 12: 184-207
- Ascensao A, Ferreira R, Oliveira PJ, Magalhaes J (2006a) Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation. *Cardiovasc Toxicol* 6: 159-172
- Ascensao A, Magalhaes J (2006) Exercise and mitochondrial function in striated muscle. In: Moreno AJ, Oliveira PJ, Palmeira MC (eds) *Mitochondrial Pharmacology and Toxicology*. Transworld Research Network, Kerala, pp. 237-270
- Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ, Duarte JA (2006b) Endurance training limits the functional alterations of heart rat mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. *Int J Cardiol* 109: 169-178
- Astrand PO (1992) J.B. Wolffe Memorial Lecture. "Why exercise?" *Med Sci Sports Exerc* 24: 153-162

- Bailey DM, Erith SJ, Griffin PJ, Dowson A, Brewer DS, Gant N, Williams C (2007) Influence of cold-water immersion on indices of muscle damage following prolonged intermittent shuttle running. *J Sports Sci* 25: 1163-1170
- Bar P, Amelink G, Jackson M, Jones D, Bast A (1990) Aspects of exercise-induced muscle damage. In: Hermans G (ed). Elsevier Science Publishers, pp. 1143-1148
- Beaton LJ, Allan DA, Tarnopolsky MA, Tiidus PM, Phillips SM (2002) Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 34: 798-805
- Benard G, Rossignol R (2008) Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10: 1313 - 1342
- Benda C (1898) *Archive Anatomische Physiologie*. 73: 393 - 398
- Bereiter-Hahn J, Voth M (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission mitochondria. *Microsc Res Tech* 27: 198 - 219
- Bhayana V, Henderson AR (1995) Biochemical Markers of Myocardial Damage. *Clin Biochem* 28 (1): 1 - 29
- Blumberg J, Clarkson P, Goldfarb A, Jenkins R, Ji L (1994) Exercise, nutrition and free radicals: what's the connection? - roundtable. *Sports Science Exchange* 5
- Booth FW, Chakravarthy MV, Gordon SE, Spangenburg EE (2002) Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol* 93: 3-30
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408: 39-42
- Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF, Stuart JA (1999) The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6: S4-11
- Brooks G, Gillam I, Kanter M, Packer L (1992) Antioxidants and the elite athlete. ACSM, Dallas, pp. 1-22
- Brown SJ, Child RB, Donnelly AE, Saxton JM, Day SH (1996) Changes in human skeletal muscle contractile function following stimulated eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol* 72: 515 - 521
- Byrd SK (1992) Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 24: 531-536
- Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA (2001) Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 88: 1020-1027

Cannon JG, Fielding RA, Fiatarone MA, Orencole SF, Dinarello CA, Evans WJ (1989) Increased interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol* 257: R451-455

Caquet R (2004a) Creatina Quinase. In: Editores C (ed) *Guia Prático de Análises Clínicas*, pp. 165-166

Caquet R (2004b) Lactato Desidrogenase. In: Editores C (ed) *Guia Prático de Análises Clínicas*

Caquet R (2004c) Mioglobina. In: Editores C (ed) *Guia Prático de Análises Clínicas*, pp. 348 -349

Carmichael MD, Davis JM, Murphy EA, Brown AS, Carson JA, Mayer E, Ghaffar A (2005) Recovery of running performance following muscle-damaging exercise: relationship to brain IL-1beta. *Brain Behav Immun* 19: 445 - 452

Carvalho J, Duarte J, Soares J (1993) Miopatia do exercício. Breve revisão da literatura. *Horizonte* 10: 95-100

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100: 126 - 131

Chen J, Gollnick PD (1994) Effect of exercise on hexokinase distribution and mitochondrial respiration in skeletal muscle. *Pflugers Arch* 427: 257-263

Chen JJ, Yu BP (1994) Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 17: 411-418

Chen TC (2003) Effects of a second bout of maximal eccentric exercise on muscle damage and electromyographic activity. *Eur J Appl Physiol* 89: 115-121

Chen TC, Hsieh SS (2001) Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. *Med Sci Sports Exerc* 33: 1732-1738

Child R, Brown S, Day S, Donnelly A, Roper H, Saxton J (1999) Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci (Lond)* 96: 105-115

Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C (2001) Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med* 31: 745-753

Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406: 415-418

- Clarkson P, Kearns A, Rouzier P, Rubin R, Thompson PD (2006) Serum Creatine Kinase Levels and Renal Function Measures in Exertional Muscle Damage. *Med Sci Sports Exerc* 38: 623 - 627
- Clarkson PM (1992) Exercise-induced muscle damage--animal and human models. *Med Sci Sports Exerc* 24: 510-511
- Clarkson PM, Hubal MJ (2002a) Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* 81: S52-69
- Clarkson PM, Hubal MJ (2002b) Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* 81 (11): 52 - 69
- Clarkson PM, Nosaka K, Braun B (1992) Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 24: 512-520
- Clarkson PM, Sayers SP (1999) Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 24: 234-248
- Clebis NK, Natali MR (2001) Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. *Rev Bras Ciên e Mov* 9: 47 - 53
- Close GL, Ashton T, McArdle A, Maclaren DP (2005a) The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142: 257-266
- Close GL, Kayani A, Vasilaki A, McArdle A (2005b) Skeletal muscle damage with exercise and aging. *Sports Med* 35: 413-427
- Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA (1993) Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol* 264: 383 - 389
- Connor MK, Bezborodova O, Escobar CP, Hood DA (2000) Effect of contractile activity on protein turnover in skeletal muscle mitochondrial subfractions. *J Appl Physiol* 88: 1601-1606
- Coyle EF (2000) Physical activity as a metabolic stressor. *Am J Clin Nutr* 72: 512S-520S
- Curi R, Lagranha C, Hirabara S, Folador A, Tchaikovski O, Fernandes L, Pellegrinotti I, Pithon-Curi T, Procopio J (2003) Uma etapa limitante para a oxidação de ácidos graxos durante o exercício aeróbio: o ciclo de Krebs. *R Bras Ci e Mov* 11: 87-94
- Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP (2007) Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292
- Di Meo S, Venditti P (2001) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10: 125-140

- Dirks A, Leeuwenburgh C (2002) Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R519-527
- Dirks AJ, Leeuwenburgh C (2004) Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic Biol Med* 36: 27 - 39
- Dolezal BA, Potteiger JA, Jacobsen DJ, Benedict SH (2000) Muscle damage and resting metabolic rate after acute resistance exercise with an eccentric overload. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1202-1207
- Du G, Mouithys-Mickalad A, Sluse FE (1998) Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med* 25: 1066-1074
- Du G, Willet K, Mouithys-Mickalad A, Sluse-Goffart CM, Droy-Lefaix MT, Sluse FE (1999) EGb 761 protects liver mitochondria against injury induced by in vitro anoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med* 27: 596-604
- Duarte J, Soares J (1990) Sensação retardada de desconforto muscular. Etiologia, fisiopatologia, tratamento e prevenção. *Rev Port Med Desp* 8: 155-162
- Duarte JA, Appell HJ, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM (1993) Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* 14: 440-443
- Duarte JA, Magalhaes JF, Monteiro L, Almeida-Dias A, Soares JM, Appell HJ (1999) Exercise-induced signs of muscle overuse in children. *Int J Sports Med* 20: 103-108
- Duchen MR, Valdeolmillos M, O'Neill SC, Eisner DA (1990) Effects of metabolic blockade on the regulation of intracellular calcium in dissociated mouse sensory neurones. *J Physiol* 424: 411-426
- Editorial Enciclopédia LL, Rio de Janeiro) (1986) Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira. pp. 539 - 542
- Edwards R (1988) Hypotheses of peripheral and central mechanisms underlying occupational muscle pain and injury. *Eur J Appl Physiol* 57: 275 - 281
- Estabrook R (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol* 10: 41-47
- Evans WJ (2000) Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 72: 647S-652S
- Evans WJ, Cannon JG (1991) The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. *Exerc Sport Sci Rev* 19: 99-125
- Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions* 5: 94-111

- Fernstrom M, Tonkonogi M, Sahlin K (2004) Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. *J Physiol* 554: 755-763
- Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG (1993) Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 265: R166-172
- Fitts RH, Balog EM (1996) Effect of intracellular and extracellular ion changes on E-C coupling and skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* 156: 169-181
- Frahm T, Mohamed SA, Bruse P, Gemünd C, Oehmichen M, Meissner C (2005) Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mech Ageing Dev* 126: 1192 - 1200
- French DN, Thompson KG, Garland SW, Barnes CA, Portas MD, Hood PE, Wilkes G (2008) The effects of contrast bathing and compression therapy on muscular performance. *Med Sci Sports Exerc* 40: 1297 - 1306
- Fridén J, Lieber RL (1992) Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 24: 521-530
- Fridén J, Sfakianos PN, Hargens AR (1986) Muscle soreness and intramuscular fluid pressure: comparison between eccentric and concentric load. *J Appl Physiol* 61: 2175-2179
- Fridén J, Sjöström M, Ekblom B (1981) A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia* 37: 506 - 507
- Fridén J, Sjöström M, Ekblom B (1983) Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med* 4: 170 - 176
- Gabriel H, Schwarz L, Steffens G, Kindermann W (1992) Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sports Med* 13: 359-366
- Gleeson M, Almey J, Brooks S, Cave R, Lewis A, Griffiths H (1995) Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71: 137-142
- Gollnick PD, Bertocci LA, Kelso TB, Witt EH, Hodgson DR (1990) The effect of high-intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflugers Arch* 415: 407-413
- Griparic L, van der Blik AM (2001) The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* 2: 235 - 244
- Gunst JJ, Langlois MR, Delanghe JR, De Buyzere ML, Leroux-Roels GG (1998) Serum creatine kinase activity is not a reliable marker for muscle damage in conditions associated with low extracellular glutathione concentration. *Clin Chem* 44 (5): 939 - 943

- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285-296
- Hahn SA, Ferreira LF, Williams JB, Jansson KP, Behnke BJ, Musch TI, Poole DC (2007) Downhill treadmill running trains the rat spinotrapezius muscle. *J Appl Physiol* 102: 412 - 416
- Halliwell B, Gutteridge JM (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York
- Hamaoka T, McCully K, Katsamura T, Shimomutsu T, Chance B (2000) Noninvasive measures of muscle metabolism. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O (eds) Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier science B.V., Basel, pp. 485-509
- Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, Richter EA (1997) Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol* 498 (Pt 1): 239-248
- Hesselink MK, Keizer HA, Borghouts LB, Schaart G, Kornips CF, Sliker LJ, Sloop KW, Saris WH, Schrauwen P (2001) Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *Faseb J* 15: 1071-1073
- Hesselink MK, Kuipers H, Geurten P, Van Straaten H (1996) Structural muscle damage and muscle strength after incremental number of isometric and forced lengthening contractions. *J Muscle Res Cell Motil* 17: 335 - 341
- Hildebrandt AL, Pilegaard H, Neufer PD (2003) Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1021-1027
- Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, Suzuki K (2004) Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev* 10
- Homonko DA, Theriault E (2000) Downhill running preferentially increases CGRP in fast glycolytic muscle fibers. *J Appl Physiol* 89: 1928-1936
- Hood DA (2001) Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1137-1157
- Hoppeler H (1986) Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7: 187-204.
- Hoppeler H, Fluck M (2003) Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 35: 95-104
- Hough T (1902) Ergographic studies in muscle soreness. *Am J Physiol* 7: 76 - 92
- Ji LL (1995) Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med* 18: 1079-1086

- Jin JK, Whittaker R, Glassy MS, Barlow SB, Gottlieb RA, Glembotski CC (2008) Localization of phosphorylated alphaB-crystallin to heart mitochondria during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: 337 - 344
- Jones C, Allen T, Talbot J, Morgan DL, Proske U (1997) Changes in the mechanical properties of human and amphibian muscle after eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 76: 21 - 31
- Jones D, Bigland-Ritchie B (1986) Electrical and contractil changes in muscle fatigue. In: Saltin B (ed) *Biochemistry of exercise VI. Human Kinetics, Champaign, IL*, pp. 377-391
- Joseph AM, Ljubicic V, Menzies K, Kazak L, Uguccioni G, Hood DA (2008) Mitochondrial biogenesis in exercise and disease.
- Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol* 49: 105-121
- Kasper CE, Talbot LA, Gaines JM (2002) Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues* 13: 237-247
- Kellis E, Baltzopoulos V (1995) Isokinetic eccentric exercise. *Sports Med* 19: 202-222
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15 - 18
- Krieger DA, Tate CA, McMillin-Wood J, Booth FW (1980) Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol* 48: 23-28
- Kroemer G (2003) The mitochondrial permeability transition pore complex as a pharmacological target. An introduction. *Curr Med Chem* 10: 1469 - 1472.
- Lee J, Clarkson PM (2003) Plasma creatine kinase activity and glutathione after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 35: 930-936
- Lieber RL, Thornell LE, Fridén J (1996) Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *J Appl Physiol* 80: 278 - 284
- Ljubicic V, Adhihetty PJ, Hood DA (2004) Role of UCP3 in state 4 respiration during contractile activity-induced mitochondrial biogenesis. *J Appl Physiol* 97: 976-983
- Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN (1987) Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56: 313-316
- Lowe DA, Warren GL, Ingalls CP, Boorstein DB, Armstrong RB (1995) Muscle Function and Protein Metabolism after Initiation of Eccentric Contraction-Induced Injury. *J Appl Physiol* 79: 1260 - 1270

- Lynch GS, Fary CJ, Williams DA (1997a) Quantitative measurement of resting skeletal muscle $[Ca^{2+}]_i$ following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell Calcium* 22: 373 - 383
- Lynch GS, Fary CJ, Williams DA (1997b) Quantitative measurement of resting skeletal muscle Ca^{2+} , following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell Calcium* 22: 373 - 383
- Machado JP (1989) Grande Dicionário de Língua Portuguesa. Sociedade de Língua Portuguesa. Euroformação, p. 569
- MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM, Szasz IJ, McKenzie DC (1996) Presence of WBC, decreased strength, and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 80: 1006-1013
- MacIntyre DL, Reid WD, McKenzie DC (1995) Delayed muscle soreness. The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med* 20: 24-40
- Magalhaes J (1996) Exercícios físicos inabituais e exaustivos em crianças. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física Porto
- Magalhaes J, Ascensao A, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Duarte JA (2005) Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99: 1247-1253
- Magalhaes J, Ferreira R, Neuparth MJ, Oliveira PJ, Marques F, Ascensao A (2007) Vitamin E prevents hypobaric hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*
- Malm C (2001) Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol Scand* 171: 233-239
- Malm C, Lenkei R, Sjödin B (1999) Effects of eccentric exercise on the immune system in men. *J Appl Physiol* 86: 461 - 468
- Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld PA, Meister A (1991) Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9360-9364
- McArdle A, Jackson MJ (2000) Exercise, oxidative stress and ageing. *J Anat* 197 Pt 4: 539-541
- McCully K, Shellock FG, Bank WJ, Posner JD (1992) The use of nuclear magnetic resonance to evaluate muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 24: 537-542
- McHugh MP, Connolly DA, Eston RG, Gleim GW (1999) Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. *Sports Med* 27 (3): 157 - 170

- McNeil PL, Khakee R (1992) Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol* 140: 1097 - 1109
- Miles MP, Clarkson PM (1994) Exercise-induced muscle pain, soreness, and cramps. *J Sports Med Phys Fitness* 34: 203-216
- Miliás GA, Nomikos T, Fragopoulou E, Athanasopoulos S, Antonopoulou S (2005) Effects of eccentric exercise-induced muscle injury on blood levels of platelet activating factor (PAF) and other inflammatory markers. *Eur J Appl Physiol*: 504 - 513
- Molnar AM, Servais S, Guichardant M, Lagarde M, Macedo DV, Pereira-Da-Silva L, Sibille B, Favier R (2006) Mitochondrial H₂O₂ production is reduced with acute and chronic eccentric exercise in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 8: 548-558
- Monteiro P, Oliveira PJ, Goncalves L, Providencia LA (2003) Mitochondria: role in ischemia, reperfusion and cell death. *Rev Port Cardiol* 22: 233-254
- Moore LG, Zamudio S, Zhuang J, Droma T, Shohet RV (2002) Analysis of the myoglobin gene in Tibetans living at high altitude. *High Alt Med Biol* 3: 39-47
- Morgan DL (1990) New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophysics Journal* 57: 209 - 221
- Morgan DL, Gregory JE, Proske U (2004) The influence of fatigue on damage from eccentric contractions in the gastrocnemius muscle of the cat. *J Physiol* 561: 841 - 850
- Newham DJ (1988) The consequences of eccentric contractions and their relationship to delayed onset muscle pain. *Eur J Appl Physiol* 57: 353 - 359
- Newham DJ, Jones DA, Clarkson PM (1987) Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. *J Appl Physiol* 63: 1381-1386
- Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RH (1983) Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci* 61: 109 - 122
- Nguyen HX, Tidball JG (2003) Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol* 547: 125 - 132
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3: 35-40
- Noland RC, Hickner RC, Jimenez-Linan M, Vidal-Puig A, Zheng D, Dohm GL, Cortright RN (2003) Acute endurance exercise increases skeletal muscle uncoupling protein-3 gene expression in untrained but not trained humans. *Metabolism* 52: 152-158
- Nosaka K, Clarkson PM (1996) Variability in serum creatine kinase response after eccentric exercise of the elbow flexors. *Int J Sports Med* 17: 120 - 127
- Nosaka K, Newton M, Sacco P (2002) Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports* 12: 337-346

- Novelli GP, Adembri C, Gandini E, Orlandini SZ, Papucci L, Formigli L, Manneschi LI, Quattrone A, Pratesi C, Capaccioli S (1997) Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 173: 206-209
- Nulton-Persson AC, Szweda LI (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276: 23357-23361
- O'Reilly KP, Warhol MJ, Fielding RA, Frontera WR, Meredith CN, EVANS WJ (1987) Eccentric exercise-induced muscle damage impairs muscle glycogen repletion. *J Appl Physiol*: 252 - 256
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2002) Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286: 135-141
- Paulsen G, Vissing K, Kalkhovde JM, Ugelstad I, Bayer ML, Kadi F, Schjerling P, Hallén J, Raastad T (2007) Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: 844 - 853
- Peake J, Nosaka K, Suzuki K (2005) Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev* 11: 64 - 85
- Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98: 1154-1162
- Petersen EW, Ostrowski K, Ibfelt T, Richelle M, Offord E, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK (2001) Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: 1570 - 1575
- Pizza FX, Mitchell JB, Davis BH, Starling RD, Holtz RW, Bigelow N (1995) Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sports Exerc* 27: 363-370
- Polster BM, Fiskum G (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem* 90: 1281-1289
- Powers S, Sen CK (2000) Physiological antioxidants and exercise training. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O (eds) *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Elsevier science B.V., Basel, pp. 221-242
- Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C (1999) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 31: 987-997
- Powers SK, Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58: 1025-1033
- Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA (2002) Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 27: 349-395

- Proske U, Allen TJ (2005) Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 33 (2): 98 - 104
- Proske U, Morgan DL (2001) Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol* 537: 333-345
- R&D-Systems (2007) Human IL-6. In: D6050 (ed)
- Ramellia GP, Joncourtb F, Luetschgc J, Weisd J, Tolnaye M, Burgunderf JM (2006) Becker muscular dystrophy with marked divergence between clinical and molecular genetic findings: case series. *Swiss Med WKLY* 136: 189 - 193
- Reid MB (2001) Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90: 724-731
- Richter C (1997) Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. *Biosci Rep* 17: 53-66
- Rodenburg JB, de Boer RW, Schiereck P, van Echteld CJ, Bar PR (1994) Changes in phosphorus compounds and water content in skeletal muscle due to eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68: 205-213
- Rodriguez-Sinovas A, García-Dorado D, Pina P, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J (2005) Effect of sarcolemmal rupture on myocardial electrical impedance during oxygen deprivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: 1396 - 1403
- Russell AP, Somm E, Praz M, Crettenand A, Hartley O, Melotti A, Giacobino JP, Muzzin P, Gobelet C, Deriaz O (2003a) UCP3 protein regulation in human skeletal muscle fibre types I, IIa and IIx is dependent on exercise intensity. *J Physiol* 550: 855-861
- Russell AP, Wadley G, Hesselink MK, Schaart G, Lo S, Leger B, Garnham A, Kornips E, Cameron-Smith D, Giacobino JP, Muzzin P, Snow R, Schrauwen P (2003b) UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. *Pflugers Arch* 445: 563-569
- Sacco P, Jones, D. A., (1992) The protective effect of damaging eccentric exercise against repeated bouts of exercise in the mouse tibialis anterior muscle. *Exp Physiol* 77: 757 - 760
- Sacheck JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB (2003) Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 34: 1575-1588
- Salminen A (1985) Lysosomal changes in skeletal muscles during the repair of exercise injuries in muscle fibers. *Acta Physiol Scand Suppl* 539: 1-31
- Salminen A, Komulainen J, Ahomaki E, Kainulainen H, Takala T, Vihko V (1983) Effects of endurance training on alkaline protease activities in rat skeletal muscle. *Acta physiol Scand* 119: 261 - 265

- Sargeant AJ, Dolan P (1987) Human muscle function following prolonged eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56: 704-711
- Sayers SP, Clarkson PM (2001) Force recovery after eccentric exercise in males and females. *Eur J Appl Physiol* 84: 122-126
- Sayers SP, Clarkson PM (2003) Short-term immobilization after eccentric exercise. Part II: creatine kinase and myoglobin. *Med Sci Sports Exerc* 35: 762-768
- Scheffler I (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1: 3-31
- Schwane JA, Johnson SR, Vandenakker CB, Armstrong RB (1983) Delay-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. *Med Sci Sports Exerc* 15: 51 - 56
- Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE (2004) Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *Faseb J* 18: 1150-1152
- Sjostrom M, Friden J (1984) Muscle soreness and muscle structure. *Med Sci Sports Exerc* 17: 169 - 186
- Sjöström M, Fridén J, Ekblom B (1987) Endurance, what is it? Muscle morphology after an extremely long distance run. *Acta Physiol Scand* 130: 513 - 520
- Skulachev VP (1999) Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* 20: 139-184
- Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, Bass JJ (2000) Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell and tissue research* 302: 235 - 241
- Smith LL (1991) Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exerc* 23: 542 - 551
- Soares J, Duarte J (1989) Miopatia do exercício. Etiologia, fisiopatologia e factores de prevenção. *Rev Port Med Desp* 7: 187-200
- Sorichter S, Koller, A., Haid, C. et al. (1995) Light concentric exercise and heavy eccentric muscle loading: effects on CK, MRI and markers of inflammation. *Int J Sports Med* 16: 288 - 292
- Sorichter S, Puschendorf B, Mair J (1999) Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev* 5: 5-21
- Stauber W, Clarkson P, Fritz V, Evans W (1990) Extracellular matrix disruption and pain after eccentric muscle action. *JAppl Physiol* 69: 868 - 874
- Stauber WT (1989) Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev* 17: 157-185

Stewart LK, Flynn MG, Campbell WW, Craig BA, Robinson JP, Timmerman KL, McFarlin BK, Coen PM, Talbert E (2007) The Influence of Exercise Training on Inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein. *Med Sci Sports Exerc* 39: 1714-1719

Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, Bourgeois JM, Hogben C, Tarnopolsky MA (2000) Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 89: 2325-2332

Takahashi M, Hood DA (1996) Protein import into subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria. Differential import regulation in distinct subcellular regions. *J Biol Chem* 271: 27285-27291

Talag TS (1973) Residual muscular soreness as influenced by concentric, eccentric, and static contractions. *Res Q Exerc Sport* 44: 458 - 469

Taylor RP, Ciccolo JT, Starnes JW (2003) Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide. *Cardiovasc Res* 58: 575-581

Tee JC, Bosch AN, Lambert MI (2007) Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 37: 827 - 836

Thompson D, Bailey DM, Hill J, Hurst T, Powell JR, Williams C (2004) Prolonged vitamin C supplementation and recovery from eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol* 92: 133-138

Tiidus PM, Iannuzzo CD (1983) Effects of intensity and duration of muscular exercise on delayed soreness and serum enzyme activities. *Med Sci Sports Exerc* 15: 461-465

Tompkins DG (1977) Exercise myopathy of the extensor carpi ulnaris muscle. Report of a case. *J Bone Joint Surg* 59A: 407 - 408

Tonkonogi M, Harris B, Sahlin K (1998) Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J Physiol* 510 (Pt 1): 279-286

Tonkonogi M, Sahlin K (1997) Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. *Acta Physiol Scand* 161: 345-353

Tonkonogi M, Sahlin K (2002) Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 30: 129-137

Tonkonogi M, Walsh B, Tiivel T, Saks V, Sahlin K (1999) Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflugers Arch* 437: 562-568

Uchiyama S, Tsukamoto H, Yoshimura S, Tamaki T (2006) Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *Pflugers Arch* 452: 109-116

Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275: 16258-16266

Videira A (1994) Mitocôndrias. In: Azevedo C (ed) *Biologia celular*. Lidel - Edições Técnicas, Porto, pp. 215-227

Wallace KB, Eells JT, Madeira VM, Cortopassi G, Jones DP (1997) Mitochondria-mediated cell injury. Symposium overview. *Fundam Appl Toxicol* 38: 23-37

Walsh B, Tonkonogi M, Malm C, Ekblom B, Sahlin K (2001) Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans. *Med Sci Sports Exerc* 33: 436-441

Weihe WH (1985) Use and misuse of an imprecise concept: alternative methods in animal experiments. *Lab Anim* 19: 19 - 26

Yaffe MP (1999) Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol* 1: 149 - 150

Yang H, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G (1997) Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat* 190: 613 - 622

Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK (1996) The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 98: 1253-1260

Yeung EW, Bourreau JP, Allen DG, Ballard HJ (2002) Effect of eccentric contraction-induced injury on force and intracellular pH in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* 92: 93-99

Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, Vallega G, Pilch PF (2000) UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E622-629

Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176