

 **Universidade do Porto**

Faculdade de Ciências do
Desporto e de Educação Física

Contribuição dos Mecanismos de Degeneração Intrínseca e Extrínseca na Atrofia Muscular Esquelética por Imobilização

**Alfredo Sandro Rosino
Pereira de Castro**

M **de 2000**



Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física

Universidade do Porto

Contribuição dos Mecanismos de Degeneração Intrínseca e Extrínseca na Atrofia Muscular Esquelética por Imobilização

Dissertação apresentada com vista à
obtenção do grau de Mestre em Ciência
do Desporto área de especialização de
Desporto de Recreação e lazer

Alfredo Sandro Rosino Pereira de Castro

Outubro de 2000

À memória dos meus bisavós
Judite 24.04.1907 - 10.01.2000
Augusto 03.05.1903 - 15.06.1979

Agradecimentos

Um trabalho desta natureza implica a colaboração e a disponibilidade de algumas pessoas. Assim gostaria de deixar aqui expresso o meu profundo agradecimento e consideração :

- Ao Senhor Professor Doutor José Alberto Duarte, pela decisão de aceitar orientar este trabalho, pelos ensinamentos científicos e metodológicos fundamentais para a sua concretização, pelas constantes revisões, pela constante disponibilidade e amizade demonstradas;

- À Senhora Doutora Maria João pela realização das análises laboratorias;

- À Dona Celeste pela simpatia com que ajudou na procura de bibliografia e pela ajuda na realização da parte experimental;

- A todos os amigos e colegas que de alguma forma me incentivaram e apoiaram ao longo deste trabalho;

- Aos meus pais, avós, tios e restantes familiares, pelo apoio e por tudo que sou hoje;

- A Ana, pelo carinho, preocupação e apoio constantes.

Resumo

Este estudo teve por objectivo avaliar o contributo dos mecanismos de degeneração intrínseca e extrínseca no processo de atrofia muscular esquelética por imobilização.

A amostra foi constituída por 24 ratinhos da estirpe Charles River, do sexo masculino, mantidos em condições normais de laboratório, com peso compreendido entre os 35,7 e 40,2 g e com 12 semanas de idade. Os animais foram pesados e divididos em quatro grupos, de acordo com o tempo de imobilização a que os seus membros posteriores direitos foram sujeitos: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias. Este procedimento foi efectuado sob anestesia com éter etílico, tendo-se imobilizado o membro posterior direito dos ratinhos, com ligaduras gessadas, por forma a manter a articulação tibio-társica em posição neutral (90°). No final do tempo estipulado para cada grupo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, após remoção da ligadura gessada, foram ainda pesados. Em seguida, foram removidos e pesados os músculos soleus dos membros imobilizados e dos membros contra-laterais. Nos músculos extraídos, após pesagem, para além de uma análise qualitativa estrutural e ultra-estrutural foram ainda avaliadas as proteínas totais bem como a actividade das seguintes enzimas: Lactato Desidrogenase, Piruvato Kinase, Isocitrato Desidrogenase, Transaminase Glutâmico-Oxaloacetica, β -Glicuronidase e Mieloperoxidase. Os resultados analíticos foram relativizados aos da pata contralateral, que serviu de controlo.

O peso total dos ratinhos, diminuiu até às 48 h de imobilização, tendendo a estabilizar após este período. O peso total do músculo imobilizado, diminuiu durante todo o período de imobilização, de forma mais acentuada até às 48 horas e mais ligeiramente após este período. As proteínas totais musculares diminuíram em termos absolutos; no entanto, quando relativizadas ao peso total do músculo, estas mantiveram-se inalteráveis até às 24 horas, aumentando após este período. A actividade β -Glicuronidase, apresentou um incremento em duas fases distintas: uma mais intensa até às 48 h de imobilização e outra mais ligeira após este momento. O aumento da actividade da Mieloperoxidase também apresentou duas fases distintas durante a imobilização: a primeira, menos acentuada, até às 48 horas e a segunda, mais intensa, após este período. A actividade das enzimas Lactato Desidrogenase, Piruvato Kinase e Transaminase Glutâmico-Oxaloacetica tenderam a aumentar durante o período de imobilização. A actividade da Isocitrato Desidrogenase tendeu a diminuir a partir das 24 horas de imobilização. Pela análise morfológica qualitativa, para além das inúmeras evidências de degeneração intrínseca e extrínseca nos músculos imobilizados, foi também possível observar sinais de regeneração muscular, mesmo ainda durante o decorrer da imobilização.

Os resultados obtidos sugerem a existência de duas fases no processo de atrofia muscular esquelética por imobilização: a primeira, mais intensa, decorre aparentemente até às 48 horas e coincide com as evidências morfológicas e bioquímicas de degeneração intrínseca, enquanto que a segunda, após as 48 horas, mais ligeira, parece coincidente com o processo de degeneração extrínseca.

Palavras chave: Atrofia muscular esquelética, Imobilização, Peso do músculo, Degeneração intrínseca, Degeneração extrínseca

Índice

Dedicatória.....	II
Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Índice de quadros.....	VI
Índice de fotografias.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
1.- Introdução.....	1
2.- Atrofia muscular esquelética por desuso.....	4
2.1.- Modelos experimentais.....	12
2.2.- Alterações estruturais e ultra-estruturais.....	17
2.2.1.- Fisiopatologia.....	19
2.3.- Alterações funcionais e bioquímicas associadas.....	28
3.- Parte experimental.....	32
3.1.- Material e métodos.....	32
3.2.- Apresentação dos Resultados.....	36
3.3.- Discussão.....	50
3.4.- Conclusões.....	60
4.- Bibliografia.....	62
5.- Anexos.....	78

Índice de gráficos

Gráfico 1. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação do peso total dos ratinhos, nos diferentes momentos de avaliação.	36
Gráfico 2. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação do peso músculo soleus imobilizado, nos diferentes momentos de avaliação.	37
Gráfico 3. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação das proteínas totais musculares, nos diferentes momentos de avaliação.	38
Gráfico 4. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Piruvato Kinase, nos diferentes momentos de avaliação.	39
Gráfico 5. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Lactato Desidrogenase, nos diferentes momentos de avaliação.....	40
Gráfico 6. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Isocitrato Desidrogenase, nos diferentes momentos de avaliação.	41
Gráfico 7. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Transaminase Glutâmico-Oxaloacetica, nos diferentes momentos de avaliação.....	42
Gráfico 8. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da β -Glicuronidase, nos diferentes momentos de avaliação.	43
Gráfico 9. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Mieloperoxidase, nos diferentes momentos de avaliação.	44

Índice de figuras

Figura 1 - Fotografía de microscopia óptica do músculo soleus do membro contralateral, de um animal do grupo das 48 horas.....	45
Figura 2 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro contralateral, de um animal do grupo das 72 horas.....	45
Figura 3 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h.....	45
Figura 4 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24.....	45
Figura 5 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h.....	46
Figura 6 - Fotografía de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h.....	46
Figura 7 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado de, um animal do grupo das 48h.....	46
Figura 8 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 48h.....	46
Figura 9 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado de um animal do grupo das 48h.....	47
Figura 10 - Fotografía de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado de, um animal do grupo das 48h.....	47
Figura 11 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h.....	47
Figura 12 - Fotografía de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h.....	47
Figura 13 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h.....	48
Figura 14 - Fotografía de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h.....	48
Figura 15 - Fotografía de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 7d.....	49
Figura 16 - Fotografía de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 7d.....	49

Lista de abreviaturas

- Å - Angstrom
- AMED - Atrofia Muscular Esquelética por Desuso
- AMP - Adenosina Monofosfato
- ADP - Adenosina Difosfato
- ATP - Adenosina Trifosfato
- ATPase - Adenosina Trifosfatase
- β-G - β-Glicuronidase
- Ca²⁺ - íão cálcio
- CK - Cretina Kinase
- CRO - Compostos Reactivos de Oxigénio
- C - centígrados
- d - dias
- g - gramas
- h - horas
- IDH - Isocitrato Desidrogenase
- l - litro
- LDH - Lactato Desidrogenase
- M - Média
- mm² - milímetros quadrados
- µm - micrometros
- MPO - Mieloperoxidase
- PGE₂ - Prostaglandina
- PGI₂ - Prostaciclina
- PK - Piruvato Kinase
- PLA₂ - Fosfolipase A₂
- RS - Retículo Sarcoplasmático
- sd - desvio padrão
- TGO - Transaminase Glutâmico-Oxaloacetica
- u/l - unidades por litro

1. Introdução

A incidência de lesões na actividade desportiva tem aumentado nos últimos anos devido às grandes exigências físicas que essa actividade pressupõe (Horta, 1995). A maioria destas lesões localizam-se nos membros e, em grande parte dos casos, o tratamento implica imobilização, para facilitar a sua recuperação. Está experimentalmente demonstrado que esta imobilização induz atrofia muscular esquelética, por desuso, por redução da funcionalidade do sistema muscular (Appell, 1990; Thomason e Booth, 1990; Baldwin, 1995; Bloomfield, 1997).

Apesar das inúmeras investigações efectuadas, até hoje pouco é conhecido sobre a base fisiopatológica da Atrofia Muscular Esquelética por Desuso (Soares et al. 1993). Segundo Appel (1990), as fibras musculares desenvolvem determinadas adaptações crónicas, morfológicas e bioquímicas que, na situação de desuso por imobilização muscular, se tornam desnecessárias e até mesmo agressivas, já que alteram a homeostasia celular em determinados locais do sarcoplasma (Hill e LaVia, 1980). Após a agressão, as fibras iniciam o processo de autodestruição, com lise das miofibrilas, do sarcoplasma, do sarcolema e do retículo sarcoplasmático e disrupção das mitocôndrias (Phillips e Knighton, 1990), processo habitualmente designado por *degeneração intrínseca* (para refs. ver Duarte, 1993). Segundo Duarte (1993), este processo destrutivo, aparentemente activado pela perda de homeostasia celular ao ião cálcio, será idêntico ao descrito para a célula em geral e envolve: activação da Fosfolipase A₂ (PLA₂), aumento da actividade lisossómica, activação das calpaínas, perda do gradiente prototónico

mitocôndrial e formação de Composto Reactivos de Oxigénio (CRO) (para refs. ver Duarte 1993).

Com a lesão tecidual inicial, surge a resposta inflamatória que tem como funções, a limpeza e remoção do tecido danificado, a eliminação de elementos tóxicos ao tecido e a preparação para a regeneração tecidual (MacIntyre et al., 1995). De facto, com o aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo tecidual, os neutrófilos e monócitos, por mecanismos quimiotáxicos, migram para os locais lesados, para remoção do tecido necrótico (MacIntyre et al., 1995; Smith e Pyne, 1997). Com esta função, os leucócitos, além de promoverem a reparação, podem também contribuir para o agravamento das lesões teciduais, através da produção de CRO (Kiriakides, et al., 1999; Masashi et al., 1999; Pietarinen-Runtti et al., 2000), provenientes da actividade da NADPH-oxidase e da libertação extracelular de enzimas lisossómicas (Smith e Pyne, 1997).

O que deveria ser, teoricamente, um processo de recuperação tecidual, poderá, pela sua natureza catabólica, ter um papel bastante importante no desenvolvimento e/ou agravamento da atrofia muscular por desuso (MacIntyre et al., 1995), podendo contribuir, assim, para o exagero do quadro morfológico e funcional (Soares et al. 1994). Este processo degenerativo, mediado pela resposta inflamatória, é habitualmente denominado de *degeneração extrínseca* (para refs. ver Duarte, 1993).

Porque ainda não é conhecido o papel relativo destes mecanismos (de degeneração intrínseca e extrínseca) no processo de atrofia muscular esquelética por desuso, ao longo do tempo de imobilização, este trabalho teve por objectivos estudar a importância daqueles dois mecanismos na

indução e evolução da atrofia muscular por desuso, nos primeiros sete dias de imobilização, no músculo soleus de ratinhos Charles River. A imobilização, por ligadura gessada, situação que mais se adequa aos problemas das lesões desportivas, foi efectuada em posição neutral e os músculos soleus, após remoção, foram estudados bioquímica e morfológicamente.

2. Atrofia Muscular Esquelética

O sistema muscular esquelético no ser humano desenvolveu-se para, entre outras funções, suportar o peso do corpo numa posição vertical, numa postura erecta. Os músculos antigravitacionais da zona lombar, abdómen, anteriores da coxa e pernas são especialmente importantes na manutenção dessa postura (Bloomfield, 1997).

A funcionalidade desse sistema, segundo Appell (1986a), está dependente da manutenção da actividade proprioceptiva e da inervação motora, da carga mecânica que permita a realização de ciclos estiramento-encurtamento e da mobilização articular. Quando algum destes factores é alterado, o músculo esquelético vai, forçosamente, adaptar-se às novas condições impostas (Appell, 1986a, 1990; Petit e Gioux, 1993).

Alterações dessa funcionalidade surgem, por exemplo, durante o tratamento de lesões dos membros, por imobilização, após traumatismos ou cirurgias (Booth e Gollnick, 1982; Appell, 1990; Jänkala et al., 1997; Clarke et al., 1998; Appell et al., 2000), ou após traumatismos na coluna vertebral com a consequente lesão da medula espinal (Tägerud et al., 1984; Booth et al., 1992; Gomes e Booth, 1998). A redução da actividade, observada com o avanço da idade ou com o abandono da alta competição (Booth e Gollnick, 1982; Booth et al., 1994), bem como o próprio acamamento por doença prolongada, são outros exemplos com importantes repercussões nessa funcionalidade (Booth et al., 1992; Bloomfield, 1997; Ferrando et al., 1997; Leblanc et al., 1997). Mais recentemente, também a ausência de gravidade, durante a permanência no espaço (Booth e Gollnick, 1982; Clarke et al., 1998;

Stein et al., 1993, 1996, 1997, 2000), demonstrou ter graves repercussões na integridade funcional e estrutural muscular esquelética. Todas estas situações descritas ocorrem com alguma frequência ao ser humano, motivando o aparecimento da Atrofia Muscular Esquelética por Desuso (AMED). Dos modelos experimentais descritos na literatura, a imobilização é o que mais se coaduna com os problemas que surgem no desporto, sendo essa a razão porque será mais focada neste trabalho. No entanto, sempre que tal seja necessário, fazer-se-ão também referências a estudos envolvendo outros modelos experimentais.

Por questões éticas e deontológicas, em casos clínicos, a AMED é quantificada, principalmente, através da comparação dos perímetros do membro atrofiado e o membro normal, verificando-se qual a redução do volume do membro em causa (Grande et al., 1999). Este método não parece ser o mais preciso visto negligenciar o facto do perímetro/volume do membro atrofiado poder ser influenciado pela quantidade de tecido conjuntivo e de tecido adiposo ou ainda pelo edema tecidual subjacente ao processo atrofico; as mesmas desvantagens podem ser apontadas à tomografia computadorizada ou aos ultrasons (Appell, 1990; Kannus et al., 1992).

Nos modelos de investigação com animais de laboratório, a possibilidade de estudo do músculo na sua totalidade, permite um maior aprofundamento da investigação e, conseqüentemente, a obtenção de mais e melhores resultados (Booth et al., 1992). Resultados acerca das variações do *peso muscular* podem ser obtidos através de estudos em animais de laboratório. Contudo, eles poderão estar sujeitos aos mesmos factores de erro relatados para a avaliação do perímetro muscular em humanos, ou seja, não é possível

determinar a variação do tecido conjuntivo ou da extensão do edema tecidual; para além destas desvantagens, também a recolha muscular pode ser de difícil execução (Appell, 1990).

A perda de peso nos músculos atrofiados ocorre de forma similar, em termos temporais, com a diminuição da força muscular. Deste modo, a maior perda parece verifica-se nos primeiros dias de imobilização, após os quais os declínios são menos acentuados (Kannus et al., 1992a). Ibebunjo e Martyn, (1999) encontraram no músculo *tibial anterior* de ratos, uma diminuição de peso de 68% ao fim de 7 dias de imobilização, enquanto que no final da experiência (28 dias) a perda atingiu os 61%.

Independentemente do modelo animal utilizado, segundo Appell (1990), o método mais exacto para a comparação de resultados entre os investigadores, é, provavelmente, a medição da área ou do diâmetro das fibras em secções transversais; em humanos, este procedimento só pode ser efectuado através de biópsias per-cutâneas por agulha ou realizados durante a cirurgia.

Quando efectuamos comparações entre resultados obtidos com músculos de humanos ou animais, vários são os factores condicionantes a ter em consideração (Wills et al., 1982). Estes factores podem influenciar o grau de atrofia bem como o período de tempo necessário para a sua recuperação após a imobilização.

Um importante factor condicionante é o *comprimento do músculo na altura da imobilização*. Este aspecto tem, contudo, pouca aplicação ao nível da prática clínica, uma vez que a maioria das articulações são imobilizadas na posição neutra, não se encontrando os músculos nem alongados nem

encurtados (Appell, 1986a). No entanto, foi demonstrado que quando o músculo é imobilizado nas posições neutra ou encurtada, o grau de atrofia é maior do que na posição alongada (Bloomfield, 1997; Booth et al., 1992; Kannus et al., 1992b; Sancesario et al., 1992). Booth et al. (1992) chegaram a sugerir que quando o músculo é imobilizado na posição alongada pode mesmo verificar-se hipertrofia muscular. Num trabalho efectuado por Booth et al. (1996) foram imobilizados os membros posteriores de ratos por um período de 7 dias; um dos grupos ficou com os membros em dorsiflexão (*soleus* em posição alongada) enquanto que o outro ficou com os membros em flexão plantar (*soleus* em posição encurtada); quando comparados os pesos dos músculos em causa não se verificou qualquer alteração no primeiro grupo enquanto que no segundo se constatou uma redução de 55% no peso do *soleus*. Num outro estudo, Petit et al. (1993) imobilizaram o músculo *peroneus longus* de gatos nas posições neutra e encurtada. Quando comparado o peso do músculo do membro imobilizado com o da pata contralateral, a percentagem de redução foi de 88% ao fim de 2 semanas, 61% no final da 5ª semana e 61% ao fim de 8 semanas, na posição neutra. Contudo, na posição encurtada, a percentagem de variação do peso foi de 84%, 55%, e 64%, respectivamente, para os mesmos períodos de tempo. Estes dois estudos vêm, de alguma forma, sugerir a influência da posição dos músculos na altura da imobilização como condicionante do grau de atrofia muscular por desuso.

O sexo e a idade, (Kannus et al., 1992b) constituem outros factores condicionantes, influenciando o grau de atrofia muscular esquelética e o tipo de fibras afectadas. A influência da imobilização em sujeitos imaturos, parece ser maior nas fibras tipo II, que presumivelmente precisam de maiores cargas

diárias para a sua maturação, visto ser este o tipo de fibra responsável pela grande capacidade de gerar força no músculo esquelético (Appell, 1990). Para Fisher et al. (1998) e Komalainen et al. (1999), os sujeitos do sexo feminino parecem ser menos afectados pela atrofia muscular; os estrogéneos são sugeridos como os principais responsáveis por este efeito protector na manutenção da massa muscular durante a imobilização.

O tempo de imobilização é outro dos factores condicionantes da intensidade da atrofia muscular induzida por imobilização. Quanto maior for o tempo de imobilização maior será, conseqüentemente, o grau de atrofia. Apesar de ser durante a primeira semana de imobilização que ocorre a maior percentagem alterações teciduais, a atrofia muscular vai-se acentuando enquanto a imobilização é mantida, embora de forma mais suave após os sete primeiros dias (Appell, 1986b; Kannus et al., 1992).

No animal de laboratório, *o tipo predominante de fibra muscular* do músculo imobilizado, pode também condicionar os resultados já que, segundo Appell (1990) e Kannus et al. (1992), as fibras tipo I e tipo II podem reagir de modo diferente à imobilização. Estes autores verificaram, na literatura, a existência de resultados dispares. De facto, em algumas investigações a atrofia atingiu principalmente as fibras tipo do I, noutras as do tipo II e, em alguns estudos não se registaram diferenças entre ambas. No entanto, Appell (1986a, 1990), Thomason e Both (1990) e Jänkälä et al. (1997) sugerem que as fibras tipo I sejam mais susceptíveis à atrofia por imobilização. O facto dos músculos antigravitacionais (compostos na sua maior parte por fibras tipo I) serem mais vulneráveis à atrofia do que os restantes (constituídos em grande proporção por fibras tipo II), sugere que as fibras tipo I sejam mais vulneráveis

à AMED (Kannus et al., 1992). Outra evidência da atrofia preferencial das fibras tipo I após imobilização, foi indicada pelos resultados obtidos com uma isoenzima da miosina, que demonstraram não existir alteração na sua componente rápida, enquanto que a sua componente lenta sofreu um declínio contínuo e significativo com o tempo de imobilização (Templeton et al., 1984). Existe assim uma forte possibilidade da imobilização poder influenciar a transformação das fibras do tipo I em fibras do tipo II ou, pelo menos, alterar as suas características contrácteis (Appell, 1986a, 1990; Thomason e Booth, 1990; Jänkälä et al., 1997).

Também algumas *contramedidas ou pré-tratamentos*, parecem ser um factor condicionante da intensidade da atrofia muscular por imobilização.

Appell (1986b) sugere que a aplicação prévia de um plano de *treino* (de resistência muscular ou de "endurance") possa minimizar o efeito da atrofia por imobilização. Num estudo por ele realizado, imobilizou dois grupos de ratos, por um período 7 dias, um dos quais havia sido sujeito a um programa de treino de "endurance" na semana imediatamente anterior à imobilização. No grupo que não havia sido sujeito a treino, o grau de atrofia ao nível do diâmetro das fibras foi de 35%, enquanto que no grupo treinado a atrofia foi apenas de 5%.

Booth et al. (1997) sugerem que a administração de *substâncias anabólicas* (tais como hormona de crescimento), conjuntamente com o treino, podem prevenir ou pelos reduzir o grau de atrofia.

Também a *estimulação eléctrica*, por períodos curtos de tempo, parece ajudar na manutenção da massa muscular, reduzindo, assim, os efeitos da atrofia por imobilização (Goldspink & Goldspink, 1985).

Uma vez que o stress oxidativo parece ter um papel importante no estabelecimento e desenvolvimento da atrofia muscular por imobilização (Kondo et al., 1992a, 1992b, 1993a 1993b), a administração de *substâncias antioxidantes* poderá, assim, ter um papel protector nessas condições. De facto, Appell et al. (1997) imobilizaram os membros posteriores de ratos por um período de oito dias, na posição neutral, e dividiram os animais em dois grupos, a um dos quais foi administrado Vitamina E. No final da experiência, o grupo ao qual foi administrado a Vitamina E apresentava menor grau de atrofia comparativamente ao grupo controlo.

Também a perda de homeostasia celular ao ião cálcio parece ter uma importância fundamental na etiologia da atrofia muscular. Talvez por essa razão a administração de *bloqueadores dos canais lentos de cálcio*, parece diminuir o grau de atrofia muscular durante a imobilização (Soares et al., 1993). De facto, Soares et al. (1993) imobilizaram os membros posteriores de ratos e, dividiram-nos em dois grupos: a um grupo foi administrado Nifedipina um bloqueador dos canais lentos de cálcio, enquanto que ao outro grupo nenhuma substância foi administrada. No final da investigação o sujeito à acção da Nifedipina apresentou menor atrofia na área das fibras.

As grandes diferenças que se verificam nas comparações entre os diversos investigadores, parecem dever-se sobretudo ao facto das metodologias empregues na recolha de resultados serem francamente divergentes. Para se poderem comparar resultados de uma forma fiável será necessário, então, que os vários investigadores realizem estudos onde as diferentes variáveis (tipo de fibras observadas, músculos utilizados, duração

da imobilização, método de desuso e amostra) sejam as mesmas. Caso estes requisitos não se satisfaçam é de esperar que os resultados sejam diferentes de autor para autor (Appell, 1990).

2.1. Modelos experimentais

Tendo em conta os factores de que depende a funcionalidade do sistema musculoesquelético (Appell, 1986a), vários modelos experimentais têm sido utilizados, quer em humanos quer em animais de laboratório, para melhor se perceber os mecanismos da atrofia muscular esquelética.

No entanto, o conhecimento actual sobre os eventos e os mecanismos da AMED, é fundamentalmente baseado nos resultados obtidos em estudos realizados com animais de laboratório. Esta situação não é surpreendente do ponto de vista ético (Appell, 1990). De facto, nas investigações com humanos usando métodos não invasivos, só se pode obter resultados através da medição do perímetro ou do volume dos membros e pela tomografia computadorizada. Estudos mais aprofundados com humanos, já com repercussões e éticas e deontológicas, só serão possíveis através de métodos mais invasivos, obtidos através de biópsias ou cirurgia. Mesmo assim, o uso de animais permite colher mais e melhor informação, do que a obtida através das biópsias em humanos, devido às grandes variações interindividuais observadas nos humanos (Appell, 1990).

De seguida focam-se alguns dos modelos utilizados bem como as suas vantagens e desvantagens.

✓ *Imobilização*

Este modelo é o que se mais aproxima das situações clínicas que ocorrem no desporto, visto ser a forma utilizada no tratamento habitual das mesmas. Do ponto de vista experimental, a imobilização pode ser conseguida por dois

métodos: através de ligaduras (bandas ou gesso) ou através da técnica de "pinning" (Appell, 1990).

As ligaduras gessadas permitem o estudo quer em humanos, quer em animais, sendo considerado um método experimental excelente pois, para além de induzir grandes percentagens de atrofia muscular em pouco tempo de imobilização (Booth et al., 1982), existem também bastantes trabalhos para se poderem comparar resultados.

Segundo Booth et al.(1992), este método parece induzir atrofia de forma similar em ambos os tipos de fibras (quer nas tipo I, quer nas tipo II), o mesmo não acontecendo noutros modelos, particularmente no da hipogravidade. Uma outra vantagem parece residir na ausência de contracções isotónicas durante a imobilização. Para além disso, permite a imobilização da articulação em vários ângulos, fixando os músculos nas posições neutra, alongada ou relaxada, podendo deste modo condicionar o grau de atrofia muscular (Booth et al., 1992).

Como principais desvantagens apresentam-se a dificuldade de remoção da ligadura, a privação de contracções isotónicas (no caso de se querer exercitar durante a imobilização) e o facto de permitir a realização de contracções isométricas (Booth et al., 1992).

A técnica de "pinning" é um modelo, utilizado apenas no modelo animal de laboratório, iniciado por Solandt et al., em 1943, e posteriormente modificado por Fischbach e Robins, em 1969. A imobilização é conseguida, através da inserção percutânea de agulhas, uma através do calcâneo até à parte distal da tibia e outra da parte distal do fémur até à parte proximal da

tíbia, fixando a articulações num determinado ângulo pretendido (Ibebunjo e Martyn, 1999).

Esta técnica produz as mesmas condições que as ligaduras gessadas e, não só permite a observação dos membros durante a imobilização, como também previne eventuais alterações da corrente sanguínea por deficiente colocação das ligaduras (Appell, 1990).

✓ *Desinervação e Tenotomia*

Segundo Appell (1990), estes modelos são utilizados para redução da actividade do músculo, através do bloqueio dos impulsos aferentes, evitando a ocorrência, no caso da *desinervação*, dos reflexos musculares; com a *tenotomia*, o músculo é diminuído artificialmente no seu comprimento habitual. Ainda para o mesmo autor, os resultados obtidos por estes dois métodos não devem ser comparados com os obtidos na imobilização, situação em que os músculos mantêm a sua normal inervação bem como o seu comprimento durante o período de desuso por imobilização.

A desinervação é o método que permite, de forma aproximada, avaliar as consequências neuro-musculares das lesões medulares ou da coluna vertebral ocorridas em humanos; contudo, a sua utilização só pode ser efectuada no modelo animal, visto que uma vez induzida não se consegue voltar a inervar eficazmente o músculo (Booth e Golnick, 1982).

✓ *Hipogravidade*

Os modelos de *suspensão de membros e/ou do corpo e o acamamento*, têm sido utilizados para simular situações de gravidade zero, experimentada durante os vôos espaciais ou nas situações onde a carga mecânica induzida sobre o músculo é reduzida.

A suspensão é um método predominantemente utilizado em animais (Anzil et al., 1991; Thompson e Shoeman, 1998; Ingalls et al., 1999; Fraysse et al., 2000), mas também experimentado em humanos (Berg et al., 1991; Bloomfield, 1997; Gamrin, 1997).

A suspensão de membros é mais utilizado do que a suspensão total do corpo; neste modelo, o animal é suspenso pela cauda ou por tracção da coluna, não permitido, assim, o contacto dos membros posteriores com o solo; os membros anteriores, contudo, mantêm-se em contacto com o solo permitindo, assim, o livre acesso à gaiola (Fraysse et al., 2000). Este método foi introduzido por Morey em 1979 e modificado por Templeton em 1984.

No homem, este modelo foi desenvolvido por Tesch et al., em 1991, e consiste na manutenção de um membro suspenso, à custa de um arnês posto à cinta e ligado a um sapato modificado. O ângulo do joelho mantêm-se entre os 90 e os 120° e é mantido enquanto os sujeito se deslocam apoiados em "canadianas". O sapato da perna contralateral está elevado em 50 mm na sola para prevenir qualquer apoio e permitir uma posição de relaxe à perna suspensa e assim limitar a activação muscular deste membro (Berg et al., 1991).

Menos utilizado tem sido o modelo de suspensão total do corpo, utilizado em animais e desenvolvido por Musacchia et al., em 1980; neste caso, o animal é suspenso por meio de um arnês com a patas em contacto com o solo.

Ambos os métodos têm como desvantagens uma atrofia menos acentuada das fibras tipo II, quando comparadas com a imobilização, e permite a realização de contracções isotónicas, embora com pouca carga (Thomason e Booth, 1990). Como vantagens, permite o treino durante a imobilização, pois

é fácil libertar os animais e voltar a suspendê-los (Booth al., 1992), e a ausência de stress nos animais, sugerido pela ausência de úlceras gástricas e hipertrofia adrenal (Templeton et al., 1984).

Neste método, as mudanças verificadas são bastante aproximadas do que se verifica durante os vôos espaciais, sendo por este motivo apropriado para a investigação nesta área. No entanto, os seus resultados não deverão ser comparados aos da imobilização, uma vez que este modelo permite a realização de contracções dinâmicas, embora com pouca carga mecânica. Contudo, apesar do grau de atrofia ser diferente, as alterações estruturais observadas são idênticas em ambos os modelos (Appell, 1986b, Sancesario et al., 1992; Kauhanen et al., 1993; Krippendorf et al., 1999).

2.2. Alterações estruturais e ultra-estruturais

Em consequência da imobilização, inúmeras alterações musculares, podem ser observadas a nível estrutural ou ultra-estrutural (Kannus et al., 1992a).

Segundo Kannus et al. (1998a) o conteúdo muscular de *tecido conjuntivo* tende a aumentar com o tempo de imobilização muscular. Este aumento parece verificar-se quer no endomísio, quer no perimísio. O aumento deste tecido pode influenciar quer o processo degenerativo, quer o processo regenerativo, uma vez que pode reduzir o fornecimento sanguíneo às fibras musculares, devido ao alargamento das barreiras de difusão entre os capilares e as fibras musculares (Appell, 1990).

Apesar da *densidade capilar* (capilares/mm²) tender a aumentar nos músculos sujeitos ao desuso, a média de capilares por fibra tende a diminuir (Thomason e Booth, 1990). De facto, Kannus et al. (1998a) verificaram uma diminuição de 35% na capilarização (n.º de capilares/1000 células), após 3 semanas de desuso. O aumento da densidade capilar será, então, apenas explicado pela redução do diâmetro das fibras atingidas pelo processo atrófico.

As alterações encontradas à microscopia electrónica têm reconhecido uma certa concordância entre os diversos investigadores (Appell, 1986b, 1990; Riley et al., 1990; Anzil et al., 1991; Sancesario et al., 1992; Kauhanen, 1993; Krippendorf et al., 1994). Entre as alterações encontradas, particularmente nas fibras tipo I, encontram-se a desintegração das fibrilas, a disrupção das

linhas Z e do sistema sarcotubular, bem como a lesão mitocôndrial (Appell, 1986b).

O mesmo autor descreve a presença de núcleos hipercromáticos, de fibras com tamanho e forma irregular, de degeneração vacuolar e a ausência de miofibrilas perinucleares. Kauhanen et al. (1993) encontraram dilatação mitocôndrial, desorganização miofibrilar e o aparecimento de vacuolos citoplasmáticos ao fim de 48 horas de imobilização.

Também a dissolução das miofibrilas pode ser observada nas fibras lesadas, deixando largos espaços interfibrilares que se preenchem de sarcoplasma e os núcleos centrais tendem a aparecer nestas fibras. Estas alterações parecem estender-se durante a primeira semana às fibras tipo II, embora afectem mais severamente as tipo I (Appell, 1986b).

A presença de vacuolos autofágicos, sugerindo a existência de actividade autofágica no músculo atrofiado (Appell, 1990), também tem sido descrita.

Durante a primeira semana os leucócitos invadem o espaço interfibrilar. Foram descritos macrófagos, monócitos e granulócitos, nas vizinhanças de fibras fragmentadas, que parecem estar envolvidos na remoção de segmentos necróticos das fibras. Estas alterações degenerativas, em termos temporais, são acompanhadas ou seguidas de regeneração muscular ainda durante o período de imobilização (Appell, 1986b).

2.2.1. Fisiopatologia

Apesar das alterações morfológicas musculares esqueléticas, bem como das suas principais consequências funcionais e bioquímicas induzidas pela imobilização, já estarem descritas (Thomason e Booth, 1990; Kannus et al., 1992), a sua etiologia e fisiopatologia continuam ainda por esclarecer.

No entanto, como a reacção das fibras e do tecido muscular a diversas categorias de estímulos lesivos parece ser idêntica (para refs. ver Duarte, 1993), então, provavelmente, também as manifestações morfológicas de degeneração intrínseca, extrínseca e de regeneração muscular devam ser semelhantes aos diferentes tipos de lesões (Carlson e Faulkner, 1983). Compreende-se, assim, que as alterações histológicas musculares associadas ao desuso, possam ser idênticas a muitas patologias musculares, tais como as distrofias, as miopatias inflamatórias, as necroses esquémicas (para refs. ver Duarte, 1993) e à miopatia do exercício (Duarte, 1993; Mota, 1995; Pereira, 1996).

Assim, quando as células de um tecido ou órgão são agredidas, qualquer que seja a sua origem, são activadas determinadas vias de degradação celular (Armstrong, 1990; Armstrong et al., 1991), tendo, frequentemente, como consequência, o aparecimento de alterações funcionais, estruturais e ultra-estruturais, influenciando até a própria viabilidade da célula (Hill e LaVia, 1980).

Na fibra muscular esquelética a perda da homeostasia ao metabolismo do ião cálcio (Ca^{2+}), é considerada, por alguns, como um dos mecanismos possíveis pela perda de viabilidade segmentar ou total da célula (Armstrong, 1990; Armstrong et al., 1991, 1993; Byrd, 1992). Os trabalhos de Soares et al.

(1993), constituem um forte argumento em favor desta teoria do Ca^{2+} ; de facto, se o aumento das concentrações de Ca^{2+} pode, no meio intracelular, despoletar estes mecanismos de degradação celular/lesão muscular então, a administração de um bloqueador dos canais lentos de cálcio, poderá, pelo menos, atenuando a sua entrada maciça no citosol, reduzir as alterações estruturais após imobilização (Soares et al., 1993). A originar esta mudança na homeostasia celular ao Ca^{2+} , parecem estar envolvidos diversos mecanismos, salientando-se como exemplos, a perda de integridade do sarcolema e/ou a alteração na sua permeabilidade (Armstrong, 1990; Armstrong et al., 1991), a disfunção do Reticulo Sarcoplasmático (RS) (Byrd, 1992) e a produção exagerada de CRO, motivando o aparecimento de uma situação de stress oxidativo tecidual (Armstrong et al., 1991; Byrd, 1992; Kondo et al., 1992, 1993; Ji, 1995).

A ocorrência de qualquer um destes mecanismos perturbadores promove o aumento das concentrações de cálcio no meio intracelular, activando, hipoteticamente desta forma, os processos de degeneração intrínseca da célula, nomeadamente por:

- a) activação das proteases neutras (Busch et al., 1972; Cullen e Fulthorpe, 1982; Sorichter et al., 1999), nomeadamente das calpaínas (Cullen et al., 1979; Sorichter et al., 1999), que podem contribuir para a degradação das linhas Z ou dos componentes dos filamentos contrácteis;
- b) activação da fosfolipase A_2 (PLA_2), localizada no sarcolema (Armstrong, 1990; Armstrong et al., 1991), que para além da função protectora das membranas celulares (Fawthrop et al., 1991) tem, na

- sua acção enzimática, da qual resultam os fosfolípidos e o ácido araquidónico, um efeito detergente sobre as membranas celulares, podendo contribuir para a difusão de compostos sarcoplasmáticos para o interstício (Brazeau e Fung, 1990);
- c) incrementos na produção de CRO, induzindo situações de stress oxidativo com todas as consequências nefastas a nível proteico, glicídico e lipídico (Baracos et al., 1986; Duarte, 1993);
 - d) perda do gradiente protónico mitocôndrial (Byrd, 1992) com a desacoplação da fosforilação oxidativa, contribuindo para o agravamento na incapacidade de produção de ATP, particularmente para as bombas de cálcio (Duarte, 1993);
 - e) activação da função lisossómica (Duarte, 1993; Appell et al., 2000), provocando degradação das proteínas miofibrilares pelas enzimas proteolíticas existentes nesses organelos (Schwartz e Byrd, 1977).

Os efeitos nocivos do desuso muscular no *turnover* proteico tem sido avaliado principalmente através da imobilização e suspensão. Este desuso induz um estado catabólico muscular como fica demonstrado pelo balanço negativo do nitrogénio, pelo aumento dos níveis de ureia sanguínea e pelo aumento da excreção da ureia e amónia (Appell, 1990). A alteração da homeostasia do ião cálcio, porque afecta o equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica (Appell et al., 1994), poderá ter um papel preponderante neste turnover. Para os mesmos autores este desequilíbrio deve-se inicialmente à redução da síntese proteica. Um decréscimo, de 35% na síntese proteica, foi observado nas primeiras 6 horas de imobilização no músculo

esquelético de ratos (Booth et al., 1997; Kannus et al., 1992); este facto parece coincidir com a diminuição da capacidade respiratória mitocondrial, também observável nas primeiras horas de imobilização (Appell, 1990). Este decréscimo não parece dever-se ao mRNA visto que as suas concentrações não parecem diminuir nos primeiros dias de imobilização (Appell, 1990). Appell, (1990) e Kannus et al. (1992) constataram que esta perda proteica que se verifica por desuso, fica a dever-se, em grande parte, à diminuição das proteínas miofibrilares, parecendo atingir mais as fibras do tipo I comparativamente às do tipo II.

Thomason e Booth (1990) e Cohen et al. (1999), observaram a actividade aumentada das enzimas lisossómicas nos músculos esqueléticos em desuso. Para Appell (1990), o aumento destas enzimas pode ter uma influência importante no iniciar da atrofia muscular ao provocar a degradação proteica.

A situação de stress oxidativo, também tem sido associada a este fenómeno de auto destruição muscular motivada pelo desuso (Kondo et al., 1992b; Appell et al., 1997). Esta situação surge quando se alteram as relações proporcionais entre os compostos oxidantes e antioxidantes celulares e, por isso, a produção excessiva de CRO ultrapassa a capacidade neutralizadora do sistema antioxidante (Kanter, 1994).

Se a formação desajustada de CRO está realmente na origem da lesão celular, ou se é uma consequência dos próprios mecanismos de degeneração intrínseca celular, é uma questão que continua por esclarecer (Duarte, 1993; Ji, 1995). Por um lado, a produção exagerada de CRO pode, por disfunção das bombas de cálcio e lise das membranas do RS aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular e originar a posterior degeneração celular (Kondo et al., 1992b;

Duarte, 1993). Por outro lado, também a perda de homeostasia celular ao Ca^{2+} pode estar na origem da produção anormal de CRO (Armstrong et al., 1991; Kondo et al., 1993b).

De igual modo, a produção exagerada de CRO pode resultar da activação dos leucócitos que infiltram o tecido, na medida em que estes compostos são produzidos e utilizados pelos neutrófilos, monocitos e macrófagos, durante o processo inflamatório (Duarte et al., 1994; MacIntyre et al., 1995; Smith e Ryne, 1997).

Também a PLA_2 muscular, uma enzima determinante na fase de degeneração intrínseca das lesões celulares, poderá ser uma fonte de produção de CRO (para refs. ver Armstrong, 1990). De facto, esta enzima quando activada pelos altos níveis de cálcio intracelular, utiliza os fosfolípidos das membranas para produzir ácido araquidónico e, conseqüentemente, dá origem a prostaglandinas e leucotrienos, com produção concomitante de CRO (Armstrong, 1990; Duarte, 1993).

Esta formação exagerada e desequilibrada de CRO, induzindo condições celulares de stress oxidativo, motiva alterações na estrutura e funcionalidade da célula com modificação nas proteínas funcionais e nos ácidos nucleicos, com evidentes repercussões, por exemplo, na síntese proteica (Duarte, 1993; Ji, 1995). Para além disso, os CRO induzem peroxidação lípidica dos fosfolípidos das membranas, com conseqüente alteração na arquitectura e na funcionalidade do sarcolema e da membrana dos diferentes organelos (Kondo et al., 1992b; Kanter et al., 1993; Sen et al., 1994; Tiidus e Houston, 1995). Como se isto não bastasse, os CRO afectam ainda negativamente a actividade

de várias enzimas, entre as quais as ATPase transportadoras de cálcio e de sódio/potássio (Jenkens, 1988; Duarte, 1993; Ji, 1995).

Os estudos de Kondo et al. (1992b), Tiidus e Houston (1995), Appell et al. (1997), constituem um importante argumento quanto à participação do stress oxidativo na indução das alterações celulares por desuso.

É habitual a presença de leucócitos nos músculos em desuso (Appell, 1986b). Esta presença é consequência de uma resposta tecidual, com repercussões sistémicas, que consiste na reacção inflamatória. É provável que a infiltração leucocitária possa influenciar o processo de AMED (Soares et al., 1994).

A reacção inflamatória caracteriza-se pelo movimento de fluídos, proteínas plasmáticas e leucócitos, para os tecidos lesados. O objectivo desta resposta é promover a limpeza do tecido danificado, eliminar eventuais invasores microbianos e preparar os tecidos para a recuperação (Gleeson et al., 1995; MacIntyre et al., 1995).

A resposta sistémica é tipicamente considerada a primeira resposta do organismo à lesão, e é caracterizada pela rápida mudança na corrente sanguínea e da permeabilidade muscular e activação, mobilização e imigração de neutrófilos e monócitos para os tecidos lesados. O estabelecimento do processo inflamatório é caracterizado pela presença a nível celular de linfócitos (B, T e T citotóxicos) e de macrófagos originados dos monócitos que se infiltraram nos tecidos, ao fim de 3 dias (Gallin, 1989; Duarte, 1993; MacIntyre, 1995).

A resposta inflamatória, com repercussões a nível local e sistémico, é um fenómeno complexo, mediado por inúmeras substâncias, libertadas pelas

células lesadas e pelas células endoteliais dos capilares adjacentes. Estas substâncias activam, amplificam e propagam o processo inflamatório (para refs. ver Pereira, 1996).

De entre as várias substâncias e compostos que participam, de forma directa ou indirecta, neste processo, salientam-se os mediadores inflamatórios propriamente ditos e os factores quimiotácticos associados (Sprengler et al., 1992).

A regulação do fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular, a activação e a mobilização do sistema imunológico específico e não específico para a zona lesada, é controlada pelos mediadores inflamatórios propriamente ditos. Entre estes podem-se contar: os aminoácidos vasoactivos (histamina e bradicinina), os factores de complemento (C3a e C5a), o factor de activação plaquetária, as linfocinas (interferons), os produtos do ácido araquidónico (prostaglandinas nomeadamente a Prostaciclina (PGI₂) e a Prostaglandina E₂ (PGE₂), bem como leucotrienos C₄, D₄ e E₄) e as citocinas (interleucina-1 e factor de necrose tumoral). Já os factores quimiotácticos associados (fibronectina, factor de complemento C5a e leucotrieno B₄), atraem os leucócitos para os locais em causa (Robbins, 1974; Duarte, 1993; MacIntyre et al., 1995; Pederson e Bruunsgaard, 1995; Smith e Pyne, 1997). Estas substâncias, produzidas nos locais afectados, difundem-se através dos capilares adjacentes, aumentando a adesão leucocitária às paredes endoteliais e promovendo, subsequentemente, a migração dos leucócitos para os tecidos em degeneração (Gallin, 1989; Northoff et al., 1995).

A presença de leucócitos, nomeadamente dos neutrófilos, nos locais lesados, é co-responsável na amplificação e propagação da reacção

inflamatória (Almekinders e Almekinders, 1992; Pederson e Bruunsgaard, 1995; Smith e Pyne, 1997). Durante a fagocitose, estes leucócitos libertam CRO, proteases e outras enzimas como a elastase e colagenase, factores quimiotáticos, activadores do sistema de complemento, e citocinas (interleucina-1, interleucina-6, Interleucina-8 e factor de necrose tumoral), contribuindo para aumentar a degradação proteolítica e agravar o próprio processo inflamatório (Gallin, 1989; Duarte, 1993; Duarte et al., 1994; Pizza et al., 1995). Os compostos granulocíticos dos neutrófilos contém enzimas hidrolíticas e polipeptídeos antimicrobianos. Os granulos azurófilos contém mieloperoxidase e enzimas proteolíticas, como a elastase, enquanto que os granulos específicos contém lactoferrina, lisozima e colagenase. A presença destes no plasma, indica ocorrência de desgranulação celular e, deste modo, activação dos neutrófilos (Smith e Pyne, 1997; Niess et al., 1999).

Também os monócitos e os macrófagos parecem ter um papel "pivot", na resposta específica e não específica do sistema imunitário (MacIntyre et al., 1995). Os monócitos, após se infiltrarem no tecido, alteram o seu fenótipo imunológico e o seu reportório funcional e diferenciam-se em macrófagos (MacIntyre et al., 1995; Bousquet et al., 1996). Tal como os neutrófilos, os monócitos e macrófagos também são capazes de produzir CRO e proteases (Henson e Johnston Jr., 1987; Northoff et al., 1995) sendo considerados a maior fonte de citocinas. Por tudo isto, são uma parte integrante do processo de recuperação e reparação celular, sendo a sua presença essencial na regeneração esquelética após lesão (MacIntyre et al., 1995).

Os macrófagos parecem também estar presentes no tecido muscular normal, embora não se saiba exactamente a sua função (MacIntyre et al.,

1995; Ceddia e Woods, 1999). Para Ceddia e Woods (1999), eles parecem ser a primeira linha de defesa contra invasões microbianas e contra estímulos fagocíticos e citotóxicos que ponham em causa a integridade intracelular, actuando no início da resposta imunitária.

Os linfócitos, os eosinófilos e os mastócitos também parecem actuar na resposta inflamatória. Os linfócitos parecem estar interligados aos monócitos e macrófagos. Os primeiros, após activação, produzem interferon, que constitui um dos estimuladores dos monócitos e macrófagos. Por sua vez, estes últimos produzem monocinas, influenciando a função das células B e T (Robbins, 1974; MacIntyre et al., 1995).

É crível que o processo inflamatório possa, numa primeira fase, ter um papel de manutenção e expansão da lesão muscular, devido à formação de CRO, de enzimas proteolíticas e material citotóxico.

As alterações patológicas são seguidas pela regeneração do tecido, na qual as células satélite têm papel preponderante. Estas células parecem contribuir para a reparação dos segmentos das fibras destruídas ou para a formação de novas fibras (Soares et al., 1994). Não estão ainda determinados com rigor os estímulos responsáveis pela sua activação; no entanto, quer o derramamento de componentes sarcoplasmáticos das fibras lesadas, quer a libertação de factores quimiotácticos pelos macrófagos, parecem ser co-responsáveis por esta activação (Appell, 1986b).

2.3. Alterações funcionais e bioquímicas associadas

Apesar do músculo esquelético ter uma elevada capacidade plástica (Soares et al., 1992), apresenta algumas alterações, quer funcionais, quer bioquímicas, associadas ao processo de AMED.

A *diminuição da força* é uma dessas alterações funcionais musculares e segue o padrão temporal típico da imobilização: as grandes mudanças ocorrem durante os primeiros dias de desuso; com prolongamento do tempo de imobilização esta capacidade funcional continua a diminuir mas de forma mais ligeira (Kannus et al., 1992). Segundo Appell (1986a) a força durante a primeira semana de imobilização diminui cerca de 1 a 6%. Esta perda parece dever-se, em grande parte, à diminuição do tamanho do músculo e da tensão por unidade da área do mesmo (Booth, 1987).

Segundo Miles et al. (1994) tanto a força isométrica como a dinâmica (concêntrica e excêntrica) diminuem durante a AMED, parecendo ser a primeira a mais afectada. Estas evidências verificaram-se num estudo realizado em 12 homens cujos pulsos foram imobilizados e suspensos por um período 9 dias. No final da experiência, a força isométrica apresentou uma maior perda comparativamente à componente dinâmica dos mesmos músculos.

Os músculos mais afectados pela diminuição da força parecem ser os extensores comparativamente aos flexores e os dos membros inferiores comparativamente aos membros superiores (Bloomfield, 1997).

A atrofia muscular por desuso, seja por imobilização seja por suspensão, resulta na diminuição do tempo de contracção, do meio tempo de

relaxamento, da tensão máxima tetânica e da contracção máxima (Thomason e Booth, 1990; Diffie et al., 1991; Ansved, 1992; Ibejunjo e Martyn, 1999).

Este facto parece ser consequência do conteúdo das isoformas de miosina (Appell, 1990; Diffie et al., 1991). O quadro funcional sugere que para além do enfraquecimento dos músculos, existe uma susceptibilidade da transformação da isoforma de miosina lenta em miosina rápida. (Appell, 1990)

Diffie et al. (1991), com o intuito de estudarem as alterações das propriedades contrácteis dos músculos *soleus* e *plantaris* induzidas pelo desuso, suspenderam ratos por um período de 4 semanas. Os resultados demonstraram uma diminuição do tempo de contracção, do meio tempo de relaxamento, da tensão máxima tetânica e da tensão máxima contráctil. Na análise do conteúdo das isoformas de miosina, o *soleus* de controlo apresentava valores de 91% de miosina lenta, de 7% de miosina intermédia e de 2% de miosina rápida. Após as 4 semanas de suspensão o conteúdo tinha-se modificado, apresentando valores mais baixos de miosina lenta (desceu para 80%) e valores mais altos de miosina intermédia e rápida (13% e 7% respectivamente). Este estudo vem sugerir a mudança das características das fibras lentas a rápidas como consequência do desuso.

A actividade eléctrica dos músculos durante a atrofia muscular diminui drasticamente (Appell, 1990; Kannus et al., 1992). Segundo Guth (1969) a *diminuição actividade eléctrica* surge sem que ocorram alterações na actividade da acetilcolinesterase da junção neuromuscular. Assim as alterações sinápticas periféricas não parecem ser responsáveis pela redução electrofisiológica dos membros afectados (Appell, 1990).

Os resultados sobre a *fadiga muscular*, como característica funcional, são controversos. Thomason e Booth (1990), numa revisão sobre a atrofia muscular induzida pelo modelo de hipogravidade, sugerem que o aparecimento da fadiga nos músculos com predominância de fibras tipo I não sofre alterações, enquanto que nos músculos compostos predominantemente por fibras tipo II, mantinha-se ou podia aumentar com o decorrer da actividade. Miles et al. (1994), não encontraram alterações na indução de fadiga muscular com o decorrer do exercício, ao nível dos músculos do flexor do pulso, após 9 dias de imobilização/suspensão. Booth (1987), defende que a fadiga muscular pode surgir mais rapidamente nos músculos atrofiados, devido à diminuição da capacidade de oxidar ácidos gordos.

A *actividade das enzimas oxidativas*, de uma forma geral, tende a diminuir, quer em termos absolutos quer quando expressa por unidade de peso (Appell, 1986a, 1990; Jiang et al., 1992; Kannus et al., 1992a; Ohira et al., 1992; Yoshioka et al., 1992). Quando avaliadas após desuso, a actividade da *succinato desidrogenase* expressa por área de fibra (Jiang et al., 1992; Ohira et al., 1992) e da *citrato sintase* (Kannus et al., 1992a), apresentam menor actividade nos músculos atrofiados

Pelo contrário, a *actividade das enzimas glicolíticas parece manter-se inalterável* nos músculos imobilizados. A *fosfofrutokinase* expressa por g de músculo (Yoshioka et al., 1992), a *lactatodesidrogenase* (Kannus et al., 1992a; Cohen, 1999), bem como a *α -glicerofosfato desidrogenase* quando expressa por área de fibra (Jiang et al., 1992; Ohira et al., 1992) mantiveram-se inalteráveis.

Quanto aos *fosfatos energéticos*, como a creatina fosfato, o ATP, o ADP e o AMP, bem como o glicogénio, apresentam valores inalteráveis (Appell, 1996b, 1990; Gamrin, 1998) ou ligeiramente diminuídos (Thomason e Booth, 1990; Kannus et al., 1992a) nos músculos sujeitos à atrofia por desuso, seja por imobilização seja por suspensão.

O aumento da actividade da CK no sangue é vastamente usada em termos clínicos e aceite como um bom marcador de lesão muscular (Cros et al., 1999; Kauhanen et al., 1993). A actividade da CK no plasma aumenta drasticamente desde as primeiras horas de imobilização, atingindo o seu valor máximo por volta das 24 horas, mantendo-se elevada por mais 24-48 horas (Kauhanen et al., 1993; Leivo et al. 1998).

Quando estes autores imobilizaram os joelhos de coelhos por forma a verificar a atrofia muscular do *vastus lateralis profundus*, verificaram que a actividade da CK no grupo de controlo variava entre as 400-1800 u/l, enquanto que no grupo imobilizado, os animais apresentavam valores bastante elevados, após as 12 horas de imobilização atingindo os valores máximos perto das 24 horas (13000 u/l). Como esta enzima é muito abundante no citosol das fibras do músculo esquelético, estes resultados sugerem, em conformidade com as alterações descritas anteriormente que as membranas destas células perdem a sua permeabilidade selectiva.

3. Parte experimental

3.1. Material e métodos

A amostra foi constituída por 24 murganhos da estirpe Charles River, do sexo masculino, com peso que compreendida entre os 35,7g e os 40,2 g e com 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em condições ambientais de laboratório, com temperatura média de 21° C, com uma variação cíclica de 12 h/luz e 12h/escuro, e tiveram livre acesso à comida e à água.

Após anestesia com Éter Etílico, procedeu-se à pesagem dos animais, numa balança Cobos® Precision, com aproximação às 0,01g. De seguida procedeu-se à imobilização do membro posterior direito, com ligaduras gessadas, por forma a manter a articulação do tornozelo imobilizado em posição neutral (90°). Em todos os animais a perna esquerda serviu de grupo controlo.

Após imobilização, os ratinhos foram divididos em 4 grupos (seis ratinhos por grupo): grupo 24 horas (24h), grupo 48 horas (48h), grupo 72 horas (72h) e grupo 7 dias (7d). A denominação dos grupos deveu-se ao tempo de imobilização a que cada um foi sujeito.

Todos os animais dos diferentes grupos foram, ao fim de 24, 48, 72 horas e sete dias de imobilização, sacrificados por deslocamento cervical. Após o sacrifício, retiram-se as ligaduras gessadas dos membros e procedeu-se à pesagem dos animais.

Para eliminação de factores externos, o protocolo experimental teve lugar sempre à mesma hora/parte do dia. Desta forma quer a imobilização

quer o sacrifício foram levados a cabo sempre a meio da manhã (entre as 10 horas e as 11 horas e 30 minutos); assim, tentou-se eliminar influências hormonais cicardianas sobre os resultados obtidos.

Após a extracção dos músculos *soleus* direito e esquerdo, com quantificação do seu peso numa balança digital Kern® 870 com aproximação às 0,00001g, estes foram seccionados transversalmente em duas partes. Uma porção foi congelada a -70° C, para posterior análise bioquímica, e a outra foi submetida a tratamento para análise morfológica.

A porção destinada a análise morfológica foi seccionada em cubos de 1 mm de aresta e fixada durante 4 horas em glutaraldeído (2,5% de glutaraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio a 2 M, pH 7.2-7.4). Estes cubos foram posteriormente lavados em solução tampão, durante uma hora, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1 % durante 2 horas e lavados novamente em solução tampão, durante trinta minutos. Em seguida, as amostras sofreram desidratação progressiva, sob a acção de concentrações crescentes de álcool etílico, durante 3 horas, e impregnação com epon durante 4 horas. O óxido de propileno foi o composto utilizado na transição desidratação/impregnação. O corte das amostras foi realizado após a fase de inclusão de 2 dias. Todos os procedimentos foram realizados a uma temperatura de 4° C, com excepção da fase de inclusão, que foi executada em estufa a uma temperatura de 60° C. Foram utilizados dois tipos de cortes: (1) os semi-finos, com espessura de 1 µm, destinados a observação de microscopia óptica e (2) os ultra-finos, com uma espessura de 500 Å, destinado à observação em microscopia electrónica.

Os cortes ultra-finos foram contrastados com uma solução aquosa saturada de acetato de uranilo (durante 30 minutos) e com uma solução de citrato de chumbo (durante 15 minutos), tendo-se procedido a lavagens no início e no final de cada um destes procedimentos. Os cortes semi-finos foram colocados por aquecimento (2 a 3 minutos) e corados com azul toluidina até fumegar.

Para o estudo em microscopia de luz foi utilizado um fotomicroscópio Nikon® Alphaphot z ys2, com camera de vídeo digital Sony® CCD-Iris acoplada e as imagens foram tratadas através do programa Imaging da Kodak® para o Microsoft® Windows. Para a análise ultra-estrutural, foi utilizado um microscópio electrónico *Jeol 100 cx II TEM* a 60 Kvolts. As fotografias obtidas, serviram para avaliação qualitativa, através das alterações estruturais e ultra-estruturais encontradas.

A porção remanescente dos músculos destinada a análise bioquímica, foi homogeneizada mecanicamente, em 2 ml de solução tampão de tris-serina-borato com pH 7,4. O homogeneizado total foi utilizado para quantificar os seguintes parâmetros:

1. Proteínas totais, determinadas por espectrofotometria, através de Kit comercial (690 A da Sigma Diagnostics®);
2. Lactato Desidrogenase (LDH), determinada por espectrofotometria, através de Kit comercial (153 A da Sigma Diagnostics®);
3. Isocitrato Desidrogenase (IDH), determinada por espectrofotometria, através de Kit comercial (340 LD A da Sigma Diagnostics®);
4. Piruvato Kinase (PK), determinada por espectrofotometria, através de Kit comercial (126047 da Boehringer Mannheim);

5. TGO muscular, determinada com a utilização do Reflotron® Analyser (Boehringer Mannheim GmbH Diagnostics); para a referida análise foram utilizadas palhetas Reflotron® TGO;

6. Mieloperoxidase (MPO), determinada por espectrofotometria, através de Kit comercial (MPO-EIA™ (Catalogo n.º 21013D) da Bioxytech®);

7. β-Glicuronidase (βG) determinada por espectrofotometria, através de Kit comercial (325 A da Sigma Diagnostics®).

A actividade das enzimas estudadas foi relativizada ao peso proteico total do músculo. As proteínas totais musculares de cada músculo foram ainda relativizadas ao peso total do referido músculo.

Os resultados dos diferentes parâmetros musculares são apresentados em termos percentagem de variação relativa ao músculo contralateral que serviu de controlo para cada animal; a percentagem de variação para cada parâmetro foi obtida pela seguinte formula:

$$\% \text{ de Variação} = (\text{Valor imobilizado} / \text{Valor contralateral}) \times 100$$

As percentagens de variação do peso do soleus foi calculada em relação ao músculo controlo. O peso total dos ratinhos, foi comparado com valores obtidos antes da imobilização (0h).

Para tratamento dos dados foram utilizadas, como medidas estatísticas descritivas, a média e o desvio padrão. As diferenças entre as médias foram testadas através de variância unidimensional (ANOVA) para medidas repetidas, para um nível de significância estabelecido em 5%.

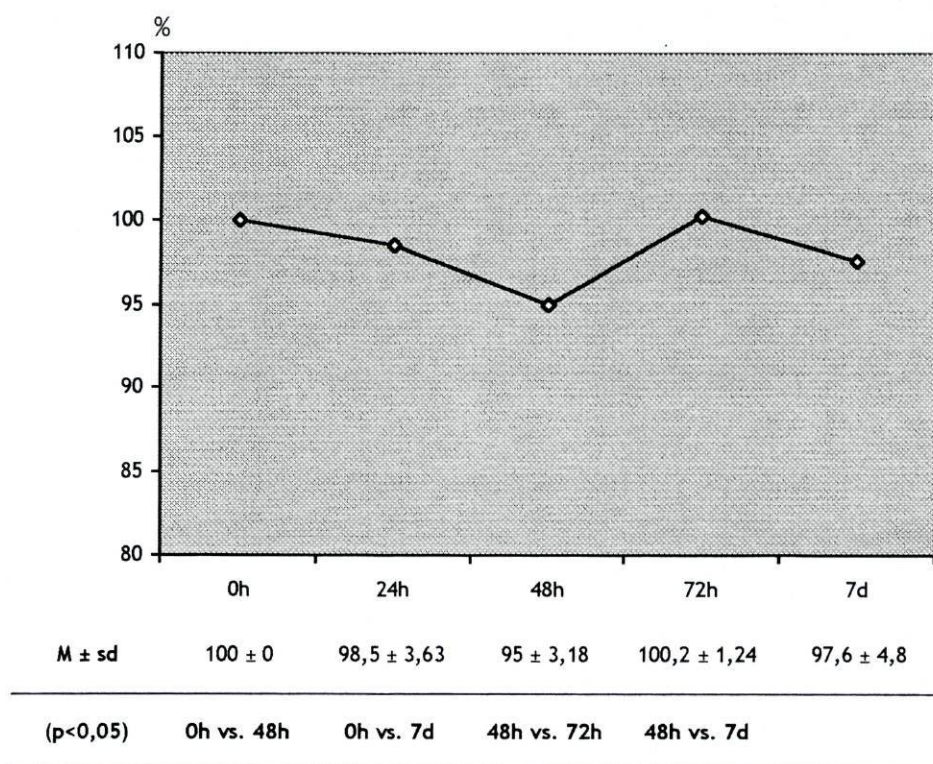
3.2. Resultados

Todos os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de variação, de acordo com a formula atrás descrita. O valor de controlo foi assumido como 100%. Os resultados absolutos seguem em anexo.

Peso dos animais e dos músculos soleus

No gráfico 1, estão indicadas as médias e respectivos desvios-padrão da % de variação do peso total dos ratinhos, nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 1. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação do peso total dos ratinhos, nos diferentes momentos de avaliação.

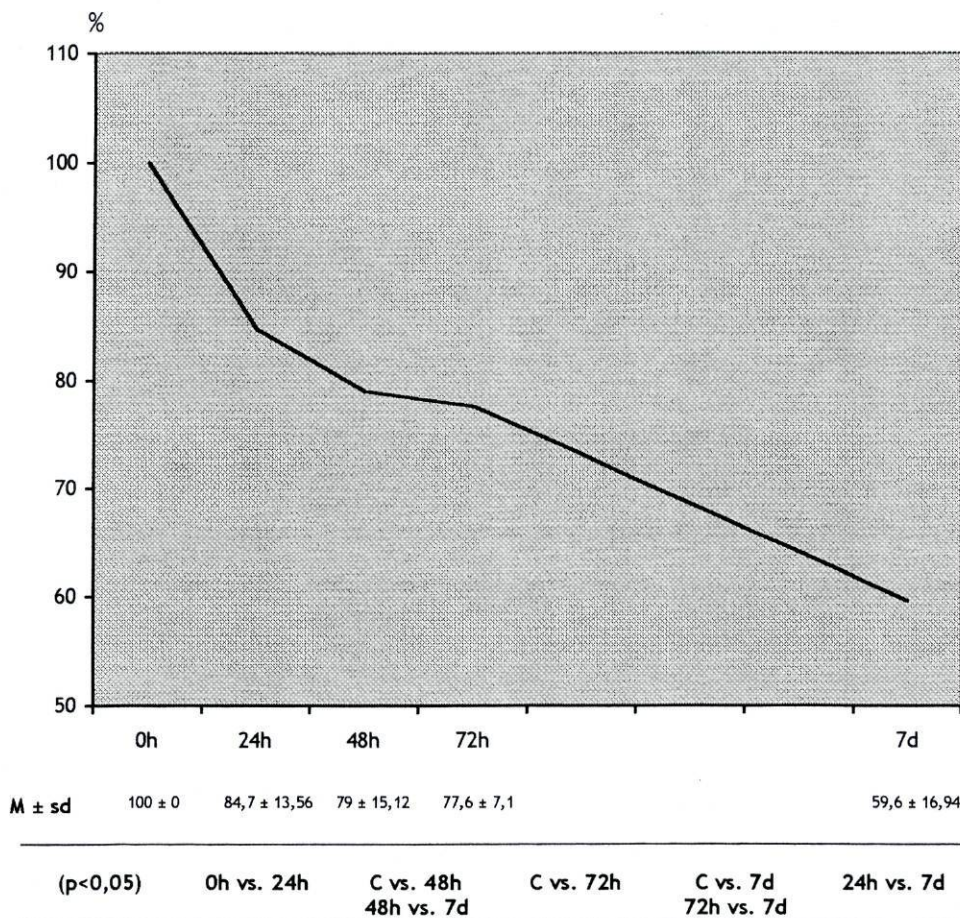


Pela análise do gráfico 1, verifica-se que os animais reduziram o seu peso em relação aos valores das 0h, excepto para o grupo das 72 horas, que o normalizou. As diminuições verificadas nos grupos das 48h e 7d, foram estatisticamente significativas ($p<0,05$), comparativamente ao peso dos

animais no início do protocolo; a maior diminuição de peso verificou-se às 48 horas de imobilização.

O gráfico 2 apresenta o perfil evolutivo das médias e respectivos desvios-padrão da % de variação do peso do músculo soleus imobilizado, nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 2. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação do peso músculo soleus imobilizado, nos diferentes momentos de avaliação.



Pela observação do gráfico, verifica-se que o músculo soleus imobilizado diminui o seu peso, com valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), em todos os períodos de avaliação comparativamente ao mesmo músculo do membro contralateral. Com o evoluir do tempo de imobilização observou-se uma diminuição acentuada do peso dos músculos, tendo os maiores decréscimos sido verificados ao fim de 24 horas imobilização (15,3 %). Entre

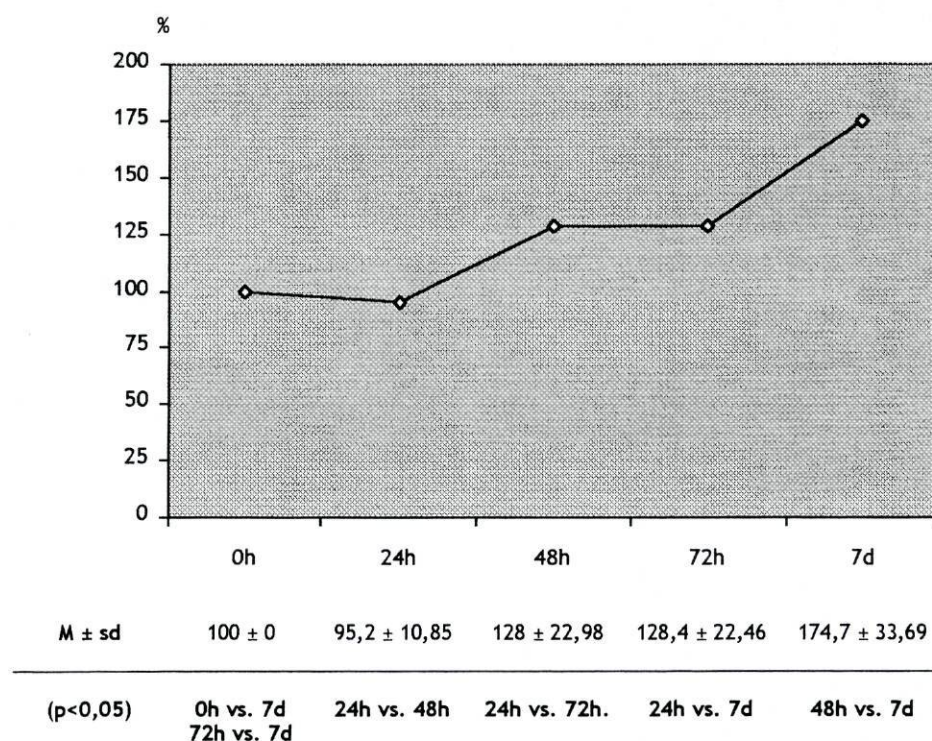
as 72 horas e os 7 dias (18,0 %) de imobilização, a perda de peso rondou os 18 %. Contudo, como entre estes dois últimos momentos de avaliação passaram 4 dias, a diminuição de peso diária foi, em média, de 4,5 %/dia. Entre as 24 e as 48 horas de imobilização a diminuição de peso foi de 5,7 %.

De acordo com o gráfico, parecem existir dois períodos com diferentes velocidades de perda de peso muscular: o primeiro até às 24 horas e o segundo a partir daí.

Parâmetros bioquímicos musculares

No gráfico 3, estão assinaladas as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação das proteínas totais relativizadas ao peso do músculo, nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 3. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação das proteínas totais musculares, nos diferentes momentos de avaliação.

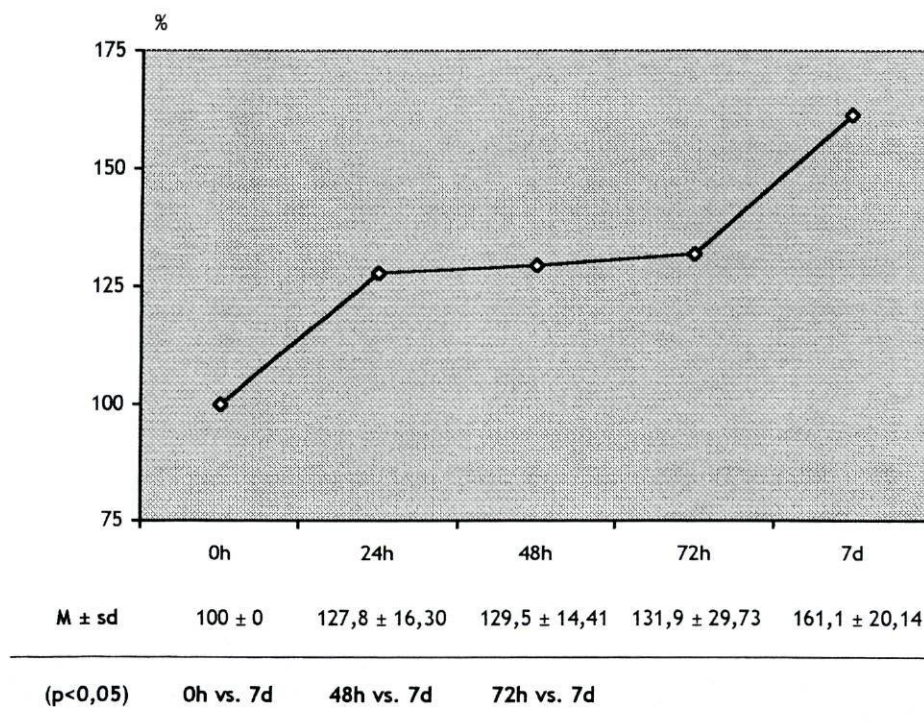


As proteínas totais quando relativizadas o peso do músculo, sofrem poucas alterações até às 24 horas, aumentando progressivamente nos dias

subsequentes. Este aumento só é estatisticamente significativo ($p < 0,05$), ao fim de 7 dias de imobilização. Os maiores aumentos verificam-se entre as 24 horas e as 48 horas, e entre as 72 horas e os 7 dias de imobilização.

No gráfico 4, estão assinaladas as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da PK, nos diferentes momentos de avaliação.

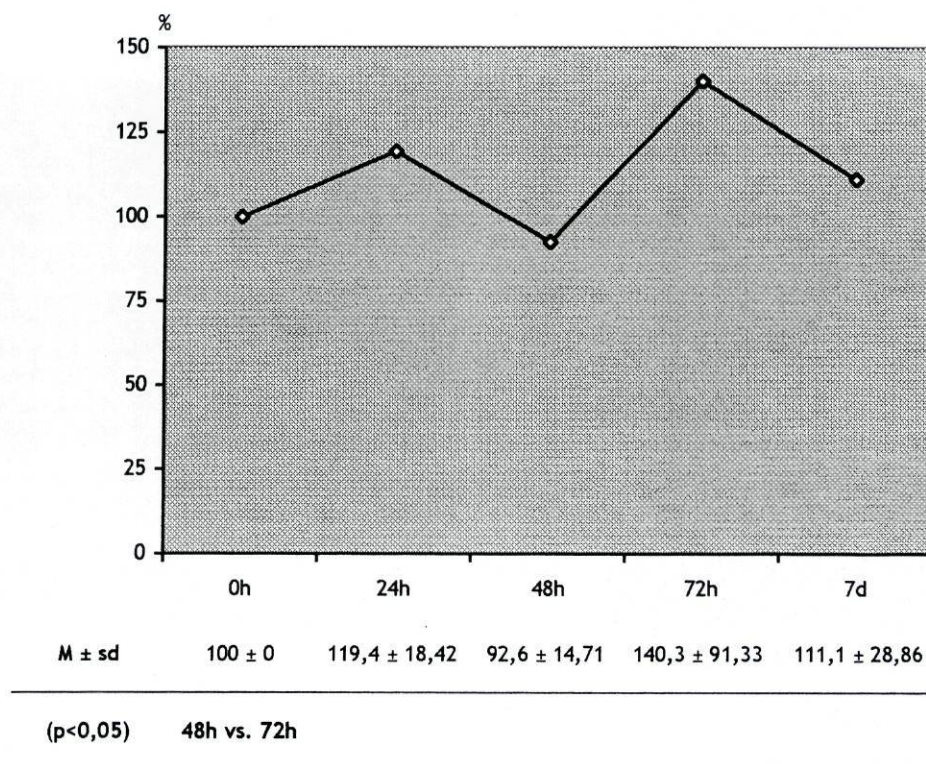
Gráfico 4. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação da actividade da Piruvato Kinase (PK), nos diferentes momentos de avaliação.



A actividade enzimática muscular da PK, apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no grupo 7d, relativamente ao músculo controlo. Durante as primeiras 72 horas de imobilização a actividade desta enzima, poucas alterações sofreu, verificando-se um aumento significativo entre as 72 horas e os sete dias.

No gráfico 5, pode observar-se as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da LDH, nos diferentes momentos de avaliação.

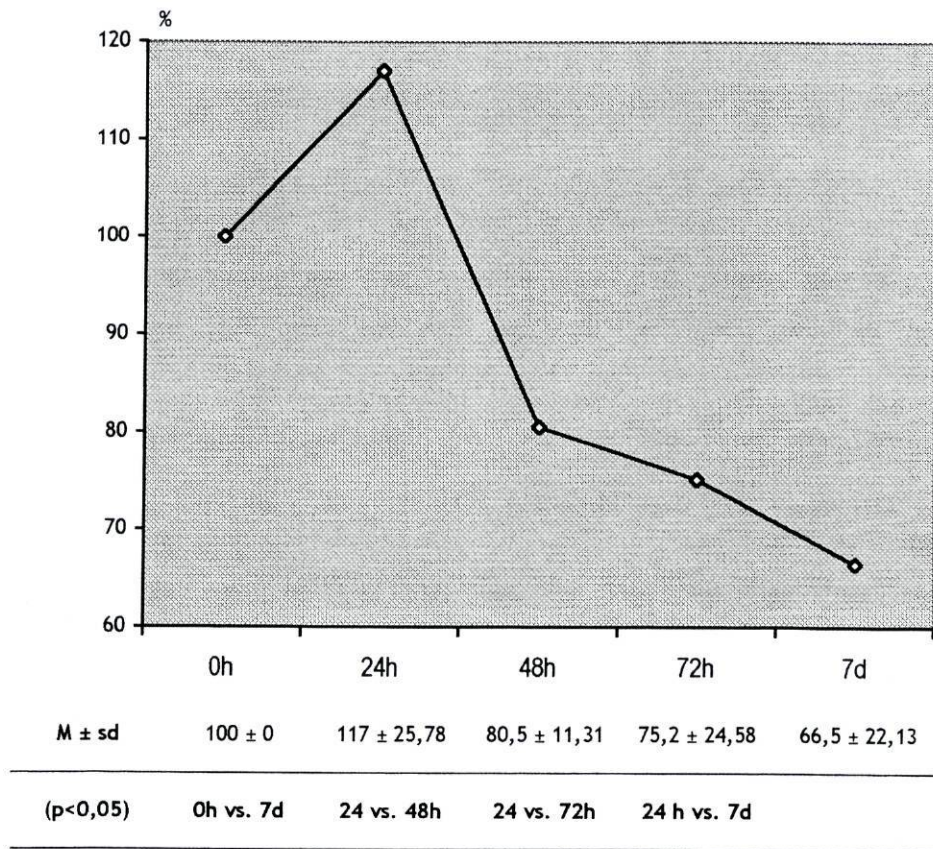
Gráfico 5. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação da actividade da Lactato Desidrogenase (LDH), nos diferentes momentos de avaliação.



Pela análise do gráfico, verifica-se que a actividade muscular, desta enzima não apresenta variações estatisticamente significativas, comparativamente ao membro contralateral. Contudo, a tendência é para um aumento da sua actividade com o tempo de imobilização. Constatou-se, um aumento significativo ($p < 0,05$) entre as 48h e 72h.

No gráfico 6, estão representadas as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da IDH, nos diferentes momentos de avaliação.

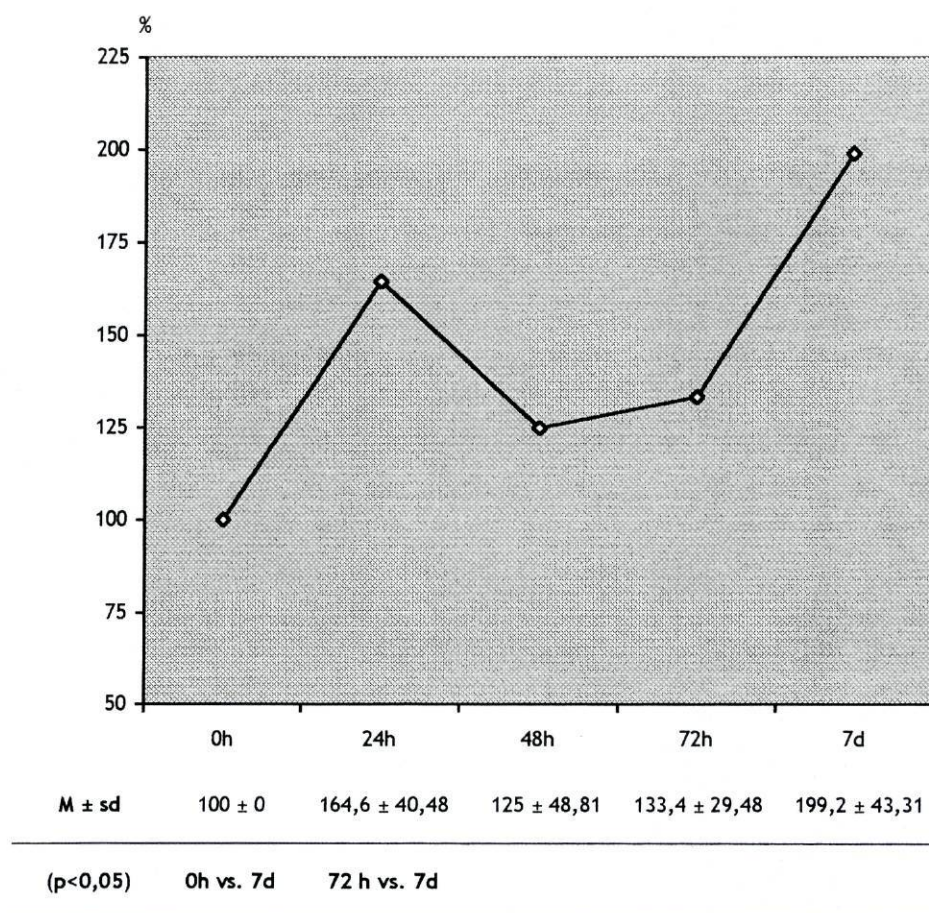
Gráfico 6. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Isocitrato Desidrogenase (IDH), nos diferentes momentos de avaliação.



Pela análise do gráfico 6, observa-se que a IDH muscular, tende a diminuir a sua actividade com o tempo de imobilização excepto para o grupo das 24h. O decréscimo da actividade desta enzima ($p < 0,05$), iniciou-se após 24 horas e manteve-se até aos 7 dias.

O gráfico 7, mostra as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Transaminase Glutâmico-Oxaloacética (TGO), nos diferentes momentos de avaliação.

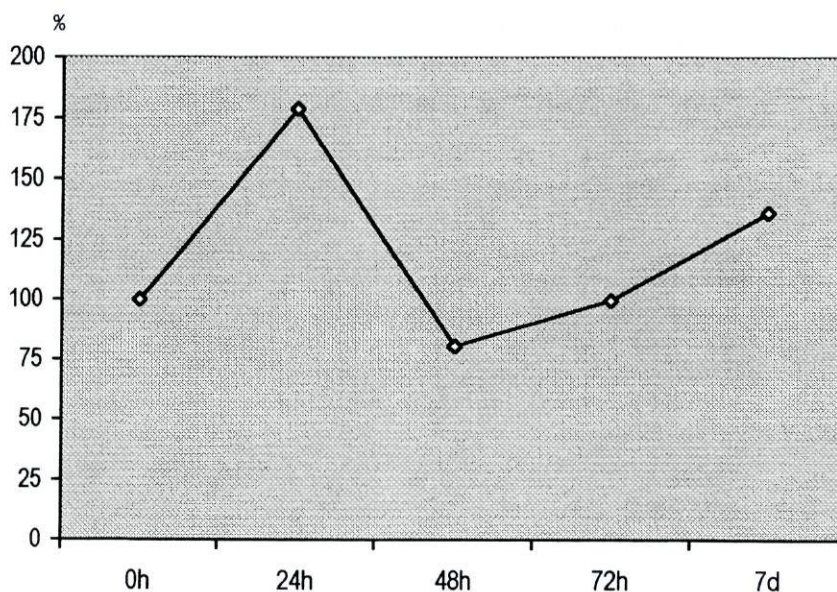
Gráfico 7. Média e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da Transaminase Glutâmico-Oxaloacética (TGO), nos diferentes momentos de avaliação.



Observa-se que a actividade da TGO muscular (gráfico 7), tende a apresentar valores mais elevados ($p < 0,05$) com o tempo de imobilização; o aumento verificado ao fim de 7 dias de imobilização foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). O maior aumento na actividade desta enzima observou-se, entre as 72 horas e os 7 dias.

O gráfico 8, assinala as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da β -G, nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 8. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação da actividade da β -Glicuronidase (β -G), nos diferentes momentos de avaliação.



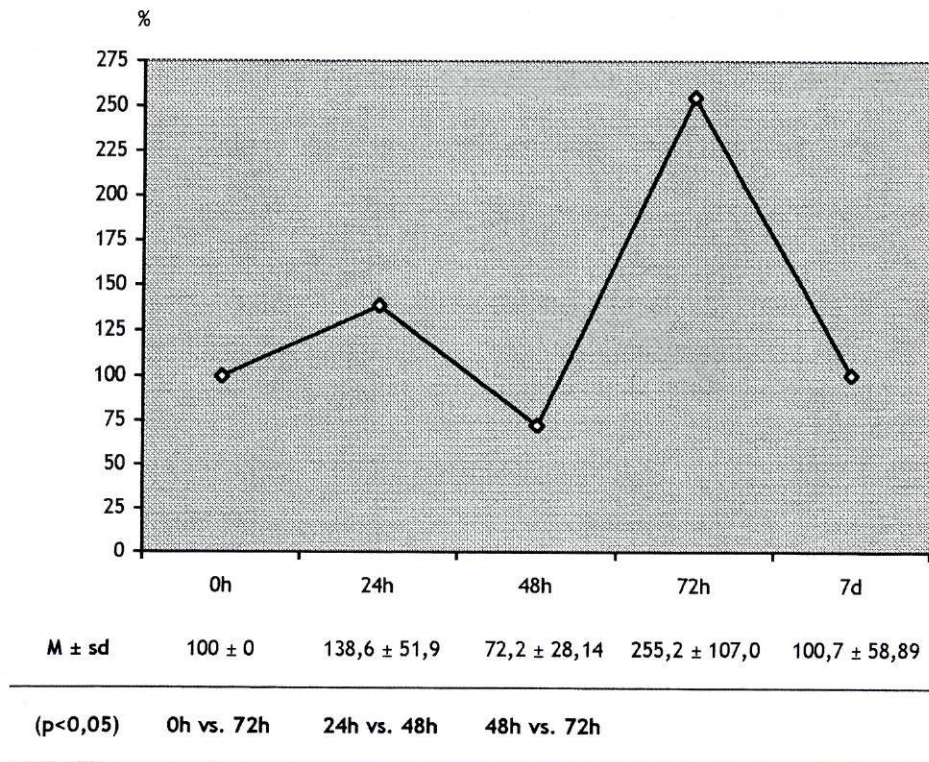
M \pm sd	100 \pm 0	178,9 \pm 56,27	80,5 \pm 27,52	99,7 \pm 4,92	136,2 \pm 98,90
------------	-------------	-------------------	------------------	-----------------	-------------------

(p<0,05)	0h vs. 24h	24h vs. 48h	24h vs. 72h	48h vs. 7d
----------	------------	-------------	-------------	------------

Pela observação do gráfico 8, verifica-se que os valores da β -Glicuronidase muscular, apresentam-se ao fim de 24 horas de imobilização significativamente elevados ($p < 0,05$). Após as 24 horas, a actividade desta enzima diminui até às 48 horas, sofrendo novo aumento significativo entre as 48 horas e os 7 dias.

No gráfico 9, estão representadas as médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade da MPO, nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 9. Média (M) e respectivos desvios-padrão (sd) da percentagem de variação da actividade da Mieloperoxidase (MPO), nos diferentes momentos de avaliação.



A actividade enzimática muscular da MPO, apresenta valores elevados às 72h de imobilização ($p < 0,05$). Entre as 24 e as 48 horas de imobilização, a actividade desta enzima sofreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$), aumentando significativamente ($p < 0,05$), no período compreendido entre as 48 e as 72 horas imobilização.

Análise morfológica qualitativa

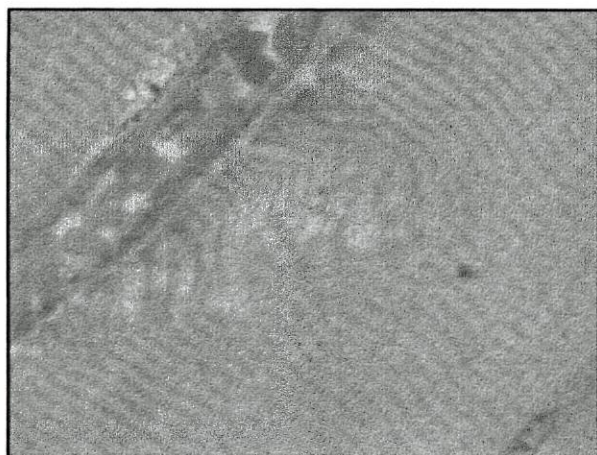


Figura 1 - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus do membro contralateral, de um animal do grupo das 48 horas. É notória alguma vacuolização sarcoplasmática e alteração do padrão estriado (x2000).

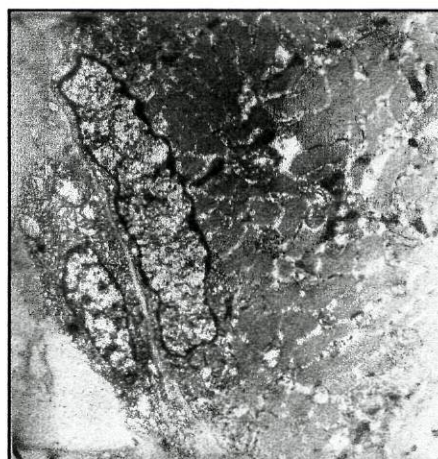


Figura 2 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro contralateral, de um animal do grupo das 72 horas. Onde se observa ligeiro edema intermiofibrilar, algum "swelling" mitocondrial e aparente zona de hipercontração das proteínas contrácteis. É possível observar um fibroblasto com sinais de possível activação (x14100).

A análise estrutural e ultra-estrutural dos músculos do membro contralateral, demonstrou a existência de alguns sinais tradutores de lesão muscular, tais como, vacuolização sarcoplasmática, alteração do padrão estriado (fig.1), edema intermiofibrilar, "swelling" mitocondrial e, aparentemente, zonas de hipercontração das proteínas contrácteis. Foi ainda possível observar alguns fibroblastos com sinais de activação (fig.2).

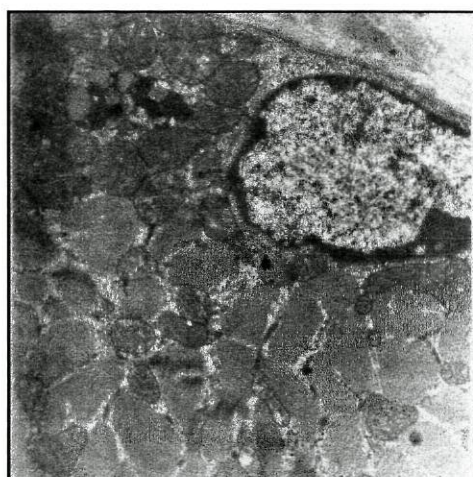


Figura 3 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h. É possível observar lisossomas secundários, algum edema intermiofibrilar e mitocôndrias e miofibrilas aparentemente preservadas (x24000).

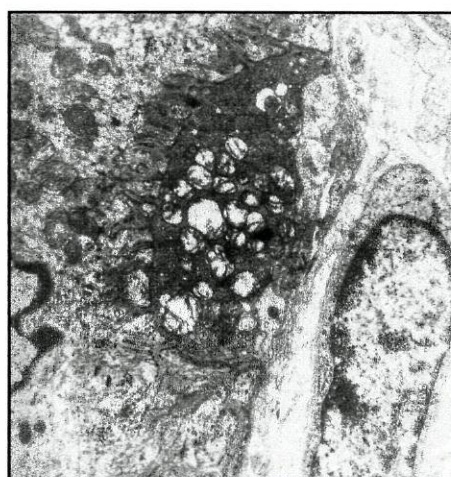


Figura 4 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h. É visível uma junção neuro-muscular com degenerescência mitocondrial e grande acumulação de vesículas sinápticas. Na fibra muscular é observável algum "swelling" mitocondrial (x24000).

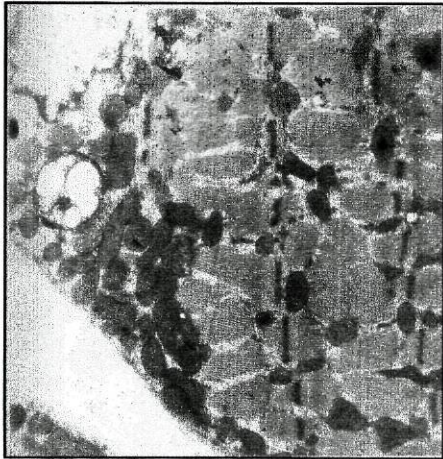


Figura 5 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h, ilustrando a presença de lisossomas secundários. As mitocôndrias apresentam-se íntegras e há vestígios de edema intracelular (x24000).

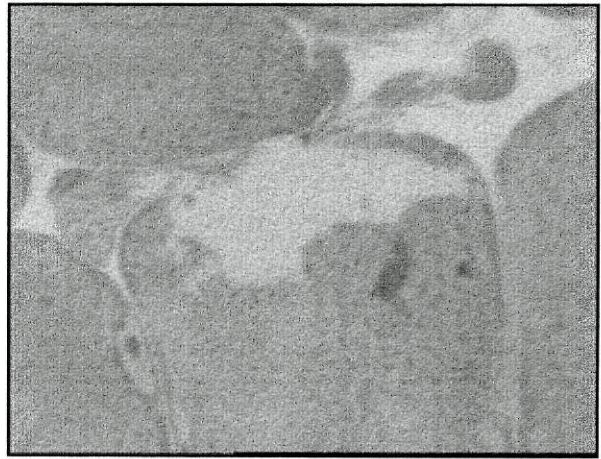


Figura 6 - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 24h. É possível observar algumas fibras com sinais de necrose e vacuolização sarcoplasmática (x2000).

A análise estrutural nos músculos soleus, imobilizados por um período de 24 horas, evidenciou alguns núcleos centrais, algumas fibras com sinais de necrose e vacuolização sarcoplasmática (fig.6). Na análise ultra-estrutural, o mesmo grupo, revelou a presença de lisossomas secundários e de algum edema intermiofibrilar (fig. 3, 5). De uma forma geral as mitocôndrias e as miofibrilas foram preservadas (fig. 3). Foi possível observar, degenerescência mitocondrial e acumulação de vesículas sinápticas na junção neuro muscular, nas fibras próximas da junção neuro-muscular, observou-se algum "swelling" mitocondrial (fig.4).

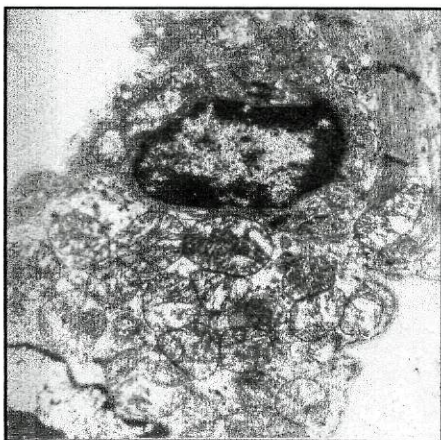


Figura 7 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado de, um animal do grupo das 48h, ilustrando "swelling" mitocondrial, edema intracelular, vacuolização sarcoplasmática (sugerindo vacuolos autossômicos) e a presença de abundante retículo sarcoplasmático rugoso nas áreas peri-nucleares. É ainda observável um lisossoma secundário (x24000).

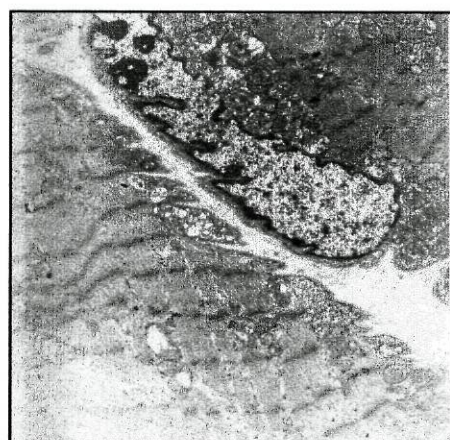


Figura 8 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 48h. É visível algum "swelling" mitocondrial, pregueamento do sarcolema e do núcleo. O padrão estriado encontra-se alterado com zonas de hipercontração (x14100).



Figura 9 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado de um animal do grupo das 48h. É observável padrão estriado irregular com aparente destruição das proteínas contrácteis, "swelling" mitocondrial e edema intermiofibrilar (x24000).

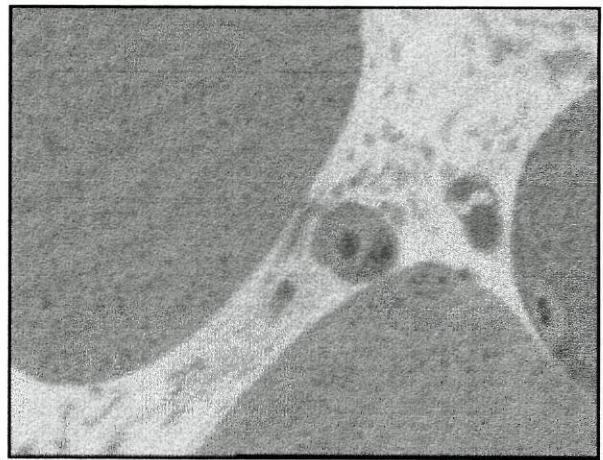


Figura 10 - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado de, um animal do grupo das 48h, É visível vacuolização sarcoplasmática e edema intracelular (x2000).

Às 48 horas de imobilização a nível estrutural, foi possível observar o acentuar das alterações verificadas no grupo das 24 horas. Na observação ultra-estrutural, para além das alterações mencionadas no grupo das 24h, foi notória a alteração do padrão estriado com zonas de hipercontracção e a presença de zonas de destruição das proteínas contrácteis (fig. 7,8,9). É ainda visível algum "swelling" mitocondrial (fig. 7,8,9), pregueamento do sarcolema e do núcleo (fig. 8), a presença de abundante retículo sarcoplasmático rugoso e vacuolização sarcoplasmática (fig. 7).

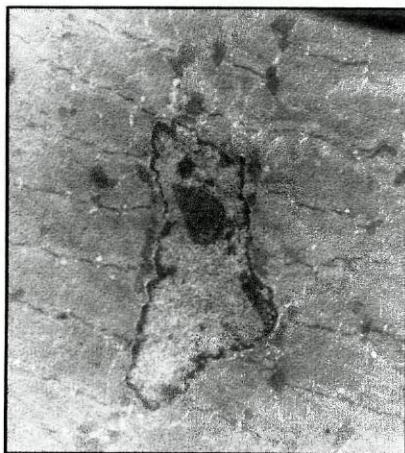


Figura 11 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h, demonstrando a presença de núcleo central, com grande nucléolo evidente, sugerindo síntese proteica acentuada. É possível observar ainda abundante retículo sarcoplasmático rugoso (x24000).



Figura 12 - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h. É possível observar a presença de padrão estriado alterado, de núcleos centrais, de fibras jovens e alguma vacuolização sarcoplasmática (x2000).

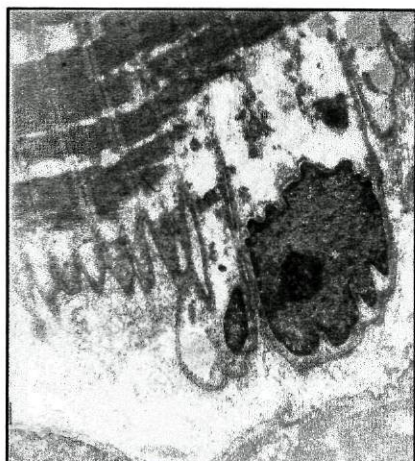


Figura 13 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h. Onde é notório o pregueamento do sarcolema, edema intersticial e intracelular e abundantes fibras de colagénio no espaço intersticial. Observa-se ainda um núcleo central com nucléolo evidente, sugerindo síntese proteica acentuada. Nas zonas peri-membranares existe vacuolização (lipídica?), bem como é evidente um lisossoma secundário (x24000).

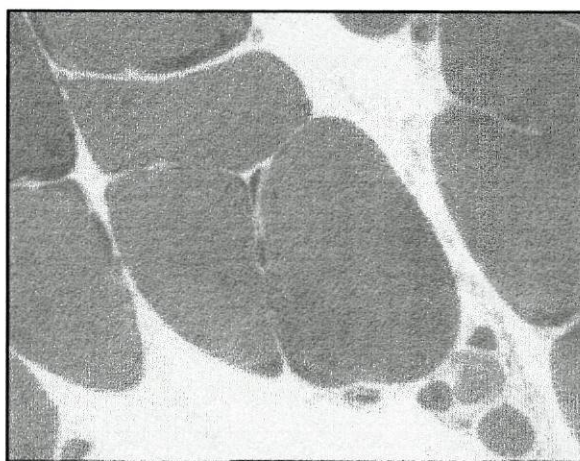


Figura 14 - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 72h. É notório o alargamento acentuado de espaço intersticial, provavelmente por edema, a presença de fibras anguladas, a alteração do padrão estriado, alguma vacuolização e a presença de células intersticiais, aparentemente leucócitos (x2000).

Na análise estrutural dos músculos do grupo imobilizado 72 horas, é visível o alargamento acentuado do espaço intersticial, provavelmente por edema, a presença de fibras jovens (fig.12) e de fibras anguladas bem como alteração do padrão estriado (fig.14). A presença de núcleos centrais e alguma vacuolização sarcoplasmática foi notória, bem como de numerosas células intersticiais (aparentemente leucócitos) (fig.14). Pela análise ultra-estrutural, foi possível observar o pregueamento do sarcolema, edema intracelular e intersticial com presença de abundantes fibras de colagénio (fig. 13). Foi ainda notória a presença de núcleos centrais, com nucléolos evidentes e de abundante retículo sarcoplasmático rugoso, sugerindo síntese proteica acentuada (fig. 11, 13), bem como acentuada vacuolização nas zonas peri-membranares e presença de lisossomas secundários (fig. 13).

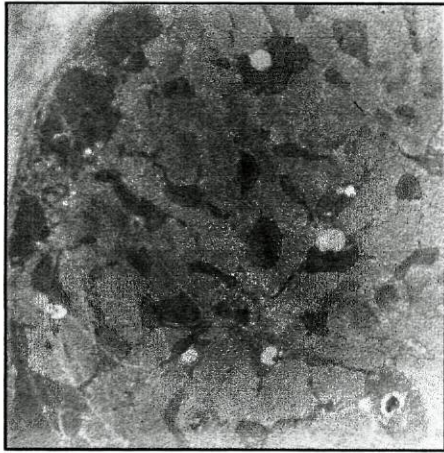


Figura 15 - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 7d. É notória uma grande acumulação de corpúsculos residuais, a presença de mitocôndrias preservadas e ausência de edema intermiofibrilar. Observa-se ainda vacúolos sarcoplasmáticos nas proximidades das mitocôndrias e algum retículo sarcoplasmático rugoso (x24000).

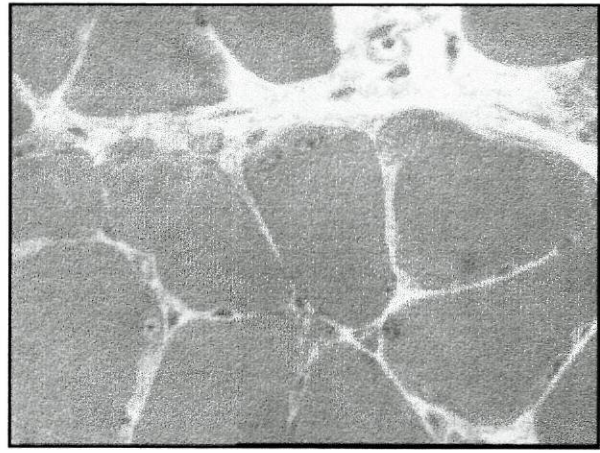


Figura 16 - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus do membro imobilizado, de um animal do grupo das 7d. É possível observar grande variação do tamanho das fibras, algumas das quais anguladas, alargamento do espaço intersticial, provavelmente por aumento do tecido conjuntivo, núcleos centrais evidentes e numerosos e a presença de fibras musculares jovens (x2000).

Na análise estrutural dos músculos dos membros imobilizados por um período de 7 dias, é possível observar-se núcleos centrais evidentes e volumosos e alargamento do espaço intersticial, provavelmente por aumento do tecido conjuntivo (quer do endomísio quer do perímio). As fibras apresentavam variações no seu tamanho, observando-se algumas fibras jovens e outras anguladas (fig. 17). Pela análise ultra-estrutural foi possível verificar grande acumulação corpúsculos residuais, mitocôndrias preservadas (fig. 15), ausência de edema intermiofibrilar e abundante retículo sarcoplasmático rugoso (fig.15). Era ainda visível algum edema intracelular (fig. 16).

3.3. Discussão

A escolha do modelo animal utilizado para a realização do nosso estudo prendeu-se com dois tipos de razões. A primeira ficou a dever-se a questões éticas e deontológicas, já que a recolha deste tipo de resultados no homem apenas pode ser obtida por biópsias per-cutâneas ou por cirurgia. A segunda deveu-se ao facto dos estudos com animais de laboratório permitirem a obtenção de resultados em quantidade e em qualidade, para posterior análise e comparação, para além de que existem mais trabalhos no modelo animal para comparação.

Optámos por realizar este protocolo com animais do mesmo sexo, porque as diferenças inter-sexuais poderão actuar como factores condicionantes na obtenção de resultados na AMED (Kannus et al., 1992a). A escolha de machos prendeu-se com o facto das fêmeas serem menos afectadas pela atrofia muscular, provavelmente devido ao efeito protector dos estrogénios na manutenção da massa muscular (Fischer et al., 1998; Komalainen et al., 1999).

Também a idade dos sujeitos pode ser um factor condicionante no desenvolvimento da AMED (Kannus et al., 1992a); por este facto optámos pela realização do protocolo experimental em ratinhos Charles River maturos, com idade idêntica. De facto com ratos jovens imaturos, os resultados poderiam ser alterados pelo processo de crescimento, já que o aumento de peso muscular é maior do que noutros grupos etários. Da mesma forma, os ratinhos mais idosos poderiam, pela sua idade mais avançada, ter a sua actividade

diária menos intensa, e por isso sentirem menos o desuso por imobilização (Ansved, 1994).

De entre os modelos de investigação utilizados para avaliação da AMED, a imobilização foi o escolhido. A escolha justifica-se, pelo facto de ser a própria imobilização o factor determinante da atrofia muscular esquelética nos desportistas que padecem ou padeceram de lesões musculares esqueléticas ou osteo-articulares e que necessitaram de tratamento conservativo ou cirúrgico.

Para atenuar as diferenças inter-individuais, optou-se pela comparação dos resultados obtidos no membro imobilizado com os do membro contralateral. Este processo, no entanto, mostrou-se menos efectivo do que o previsto, dado que a análise qualitativa morfológica, sugere que alguns músculos dos membros contralaterais apresentaram sinais sugestivos de lesão tecidual, tais como edema intermiofibrilar, "swelling" mitocondrial e zonas de hipercontração das proteínas contrácteis. Estas lesões podem ter surgido, por um lado, devido ao novo padrão de marcha adquirido, tendo em consideração que o outro membro se encontrava imobilizado. Por outro, o acréscimo de peso adquirido pela ligadura gessada, acompanhado pelo facto desse membro não ajudar no transporte do peso da parte traseira do corpo, poderá trazer uma maior sobrecarga mecânica e metabólica no membro contralateral. Uma vez que alguns músculos dos membros contralaterais, apresentaram sinais de lesão tecidual, a comparação dos resultados obtidos poderá ter sido atenuada, pela possível diminuição do peso muscular dos membros contralaterais.

O tempo máximo de imobilização escolhido (sete dias), deve-se ao facto das principais alterações funcionais e morfológicas provocadas pela imobilização, ocorrerem durante este período (Soares et al., 1994; Appell et al., 2000).

A imobilização dos membros em posição neutral (90°), justifica-se pelo facto, de situações clínicas, ser esta a sua posição habitual de imobilização.

A realização de quatro momentos de avaliação, variando entre as 24 horas e os sete dias, é justificado pelo carácter mais imediato ou mais retardado da resposta dos diferentes indicadores, e pela importância de não perder, eventualmente, variações significativas nestes indicadores em dados momentos da imobilização. Procurámos ainda, com este procedimento, analisar o perfil evolutivo destas repercussões locais, por forma a compreender qual o papel desempenhado pela degeneração intrínseca e extrínseca, na origem e no desenvolvimento da AMED.

Pela análise dos resultados obtidos no nosso estudo, verificou-se uma diminuição do peso total dos ratinhos, em todos os períodos de avaliação, excepto ao fim de 72 horas de imobilização. Esta diminuição, segundo Ansved (1995) e Cohen et al. (1999), parece dever-se ao *stress* causado pelo desconforto das ligaduras gessadas. Esta situação de stress, pelas alterações hormonais que induz, poderá provocar nos animais uma elevação do catabolismo tecidual e/ou uma diminuição da ingestão calórica, justificando assim os resultados encontrados. Segundo Ansved (1995), estes dois factores pouco contribuirão para atrofia muscular observada nos músculos imobilizados, uma vez que os músculos das patas contralaterais não apresentaram alterações significativas no seu peso.

Estes resultados apresentaram-se de acordo com os estudos de Ansved (1995), Jänkälä et al. (1997) e Han et al. (1999), onde o peso dos animais em causa também sofreu diminuições, embora só no estudo de Han et al. (1999) os valores foram mais aproximados aos nossos. Estes últimos autores constaram uma diminuição do peso em 4 % ao fim de 24 horas, 8% ao fim de 3 dias e 5 % ao fim de 7 dias de imobilização. Nos estudos de Ansved (1995) e Jänkälä et al. (1997), os valores verificados foram bastante superiores aos encontrados no nosso estudo, mas perfeitamente justificados pelas diferentes metodologias utilizadas, quer no tempo de imobilização, quer no número de membros imobilizados dos ratinhos.

A utilização do peso do músculo, como indicador de atrofia muscular, parece-nos um modelo válido, uma vez que o músculo soleus é de fácil acesso, pode ser removido integralmente e as variações do seu peso, durante a imobilização, são paralelas às alterações funcionais e estruturais induzidas por essa situação experimental (Appell, 1990; Kannus et al., 1992a). O peso dos músculos imobilizados diminuiu em todos os períodos de avaliação, tendo essa diminuição sido maior nos dois primeiros dias de imobilização (15,3 % nas primeiras 24 horas e 5,7 % nas segundas 24 horas de imobilização). Apartir das 48 horas, a evolução da perda de peso foi mais suave, visto que entre este momento e o sétimo dia de imobilização a diminuição verificada atingiu apenas os 18%, o que perfaz 4,5 % em média por dia. A diminuição do peso do músculo, verificado no nosso estudo, parece ter duas fases distintas: uma mais acentuada que decorreu até às 48 horas, onde se verificou uma redução total de 21 % e outra mais ligeira, apartir das 48 horas, onde o peso diminuiu 19,4 % em 5 dias.

Para além de pequenas diferenças, justificadas pelas diferentes metodologias utilizadas, estes valores encontram-se em sintonia com os de Han et al. (1999), os de Ibebunjo et al. (1999) e os de Cros et al. (1999).

As proteínas musculares, em termos absolutos, diminuíram em todos os períodos de avaliação, quando comparadas com as proteínas da pata contralateral (valores em anexo). Esta diminuição, segundo Appell (1986b) e Booth et al. (1992), é justificada inicialmente pela diminuição da síntese proteica, que se apresenta reduzida desde a partir das 6 horas de imobilização. Nesta fase inicial, o aumento do catabolismo proteico parece, segundo os mesmos autores, não contribuir para este distúrbio no "turnover" proteico, visto que só após o primeiro dia de imobilização a degradação proteica aumenta significativamente. Contudo, quando relativizadas ao peso muscular, as proteínas nos músculos imobilizados mantiveram-se inalteráveis durante as primeiras 24 horas, quando comparadas com os resultados da pata contralateral. Esta manutenção do conteúdo proteico relativo, explica-se pelo facto da redução do peso do músculo ser da mesma ordem de grandeza que a diminuição das proteínas musculares. Estes resultados encontram-se de acordo com os de Cros et al. (1999), que verificaram, através do método de suspensão, também não haver alteração do conteúdo proteico dos músculos em desuso. No entanto, no nosso estudo até às 48 horas observou-se um ligeiro incremento sofrendo, a partir das 72 horas um aumento estatisticamente significativo. Este aumento observado a partir das 24 horas pode ser justificado, quer pela reacção inflamatória, com passagem de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial quer, em menor grau, pela regeneração muscular que entretanto decorre, manifestada pela presença de

núcleos centrais com núcleolos evidentes, sugerindo síntese proteica acentuada, bem como pela presença de fibras jovens.

Estes resultados, à semelhança dos do peso muscular total, sugerem a existência de dois períodos nítidos na fisiopatologia da atrofia muscular por desuso. Contudo, aqui, é difícil distinguir o momento de separação entre os dois. Provavelmente entre as 24 e as 72 horas serão coincidentes.

A nível ultra-estrutural foi possível observar alterações do padrão estriado, com zonas de hipercontração e destruição das proteínas contrácteis. Estas alterações podem ser justificadas pela perda da homeostasia celular ao Ca^{2+} , com consequente activação das calpaínas (Duarte, 1993). Também a presença de lisossomas secundários, sugerindo actividade lisossómica acentuada, vem reforçar aquela hipótese, tendo em atenção que a perda de homeostasia ao cálcio a nível celular, tem um papel importante na estimulação da actividade lisossómica (Appel et al., 1993; Ingalls et al., 1999). Também o "swelling" mitocondrial, observado em microscopia electrónica, com a consequente vacuolização descrita à microscopia de luz, poderá ser explicado pelo excesso de iões cálcio no sarcoplasma bem como pela produção exagerada de CRO (Duarte, 1993). Segundo Appell et al. (2000) a disfunção das mitocondrial pode ser responsável pela perda de massa muscular no início da atrofia, devido à diminuição da produção de energia disponível para a síntese proteica.

Na análise ultra-estrutural às 24 horas observou-se ainda, degenerescência mitocôndrial e acumulação de vesículas sinápticas na junção neuromuscular sugerindo uma possível degenerescência desta da junção. A perda de funcionalidade da junção neuromuscular, induzindo uma diminuição

da actividade eléctrica do músculo, pode ser um dos mecanismos responsáveis pela diminuição da força observada durante o processo de atrofia muscular (Deschenes et al., 1994b).

Analizadas as alterações morfológicas durante as primeiras 48 horas de imobilização, a perda de homeostasia ao íão cálcio (Appel et al., 1993; Appell et al., 2000) e/ou a produção exagerada de CRO (Kondo et al., 1992b, 1993b), poderão estar na origem da atrofia muscular esquelética.

Às 72 horas, alguns sinais de lesão muscular são ainda notórios; contudo, torna-se mais evidente o alargamento do espaço intersticial provavelmente devido, principalmente ao edema intersticial e, em menor grau, à presença de fibras de colagénio.

A presença de fibras jovens (Appell, 1986b), de núcleos centrais com núcleolos evidentes, sugerindo síntese proteica acentuada (Duarte, 1993) e de retículo sarcoplasmático rugosos abundante (Appell, 1986b), são sinais evidentes de que a regeneração muscular já se iniciou, ainda durante a imobilização. A observação de numerosas células intersticiais, aparentemente leucócitos, significará que o processo de degeneração extrínseca, mediado pelo processo inflamatório poderá já estar a decorrer. Foi ainda visível acentuada vacuolização nas zonas peri-membranares e presença de lisossomas secundários, sugerindo que o processo de degeneração intrínseca ainda decorre.

Ao fim de 7 dias de imobilização, vários sinais de regeneração muscular eram evidentes, salientando-se os núcleos centrais volumosos, as fibras jovens e anguladas, as mitocôndrias preservadas e a ausência de edema intermiofibrilar. O alargamento do espaço intersticial foi notório

provavelmente pelo aumento do tecido conjuntivo, (quer do endomísio, quer do perímio). Como sinais remanescentes do processo de degeneração intrínseca, particularmente do aumento actividade lisossómica, era possível, nesta fase observar grande acumulação de corpúsculos residuais.

Após as 48 horas, o processo de degeneração extrínseca parece ser de grande importância na manutenção e agravamento da lesão muscular, devido ao papel preponderante que o processo inflamatório parece ter por altura das 72 horas, justificada pela presença de leucócitos na análise morfológica. Este processo inflamatório poderá ter perpetuado por mais tempo a lesão muscular, quer pela produção de CRO, quer pela libertação de enzimas proteolíticas (Smith e Pyne, 1997). Para além da degeneração extrínseca, também a regeneração muscular parece ocorrer após as 48 horas de imobilização.

Pela análise da actividade da β -G, foi também possível observar duas fases de aumento da actividade desta enzima. A primeira, mais intensa, ocorrendo durante as primeiras 24 horas de imobilização, foi coincidente com a vacuolização sarcoplasmática (provavelmente vacuolos autossómicos) e a presença de lisossomas secundários. A segunda fase, menos intensa, verificou-se após as 72 horas de imobilização, podendo ser justificada pelo aumento da infiltração dos leucócitos, também observável na análise morfológica qualitativa .

A MPO foi utilizada como marcador de actividade leucocitária. Esta enzima proteolítica está contida nos granulos azurófilos dos neutrófilos e o aumento da sua actividade indica desgranulação dos neutrófilos e, conseqüentemente, a sua activação (Smith e Pyne, 1997; Niess et al., 1999). A

análise dos resultados obtidos com a MPO, aparenta também ter duas fases distintas. A primeira ocorre até 24 horas de imobilização, com um aumento ligeiro da actividade desta enzima, sugerindo pouca ou nenhuma actividade leucocitária nesta fase. Após as 48 horas, ocorre a segunda fase na qual se verifica um aumento significativo da actividade da MPO, sugerindo uma grande activação leucocitária, mais propriamente dos neutrófilos. A análise deste resultados, sugere que a degeneração extrínseca com a sua resposta inflamatória, tem a sua fase de desenvolvimento, provavelmente após as 48 hora de imobilização.

As enzimas LDH e PK foram utilizadas como marcadoras musculares do metabolismo glicolítico. Estas enzimas apresentaram durante o período de imobilização, um comportamento ligeiramente diferente apesar da tendência ser para um aumento das suas actividades musculares. O aumento da actividade destas enzimas, pressupõe uma elevação relativa do metabolismo glicolítico. Uma razão para este aumento, pode residir na possível transformação das características contrácteis das fibras; de facto, pela análise das isoformas de miosina, Diffie et al. (1991), verificaram alteração nas propriedades contrácteis do músculo, tendo as fibras passado a ter maior percentagem de isoforma de miosina rápida após o desuso e em relação aos valores iniciais.

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se que a actividade da IDH começa a diminuir após as 24 horas de imobilização, embora sem significado estatístico. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Booth (1987) e Appell (1986a) para as enzimas oxidativas. A diminuição da actividade desta enzima pareceu evoluir paralelamente à degenerescência

mitocondrial, observada na análise morfológica qualitativa, tal como sugerido por Appell (1990). De facto, verificou-se que até às 24 horas de imobilização, as mitocôndrias mantinham de uma forma geral, uma estrutura preservada. Na avaliação efectuada após esse momento, foi visível o aparecimento e o exagero progressivo do "swelling" mitocondrial, sinal evidente de que as mitocôndrias começaram a perder a sua funcionalidade, podendo assim justificar a diminuição da actividade da IDH. Apesar de ao fim de 7 dias, as mitocôndrias já se encontrarem aparentemente preservadas, o facto de apresentarem um menor volume (Appell, 1990), pode perfeitamente explicar os valores ainda reduzidos da actividade da enzima IDH observados ao fim de uma semana de imobilização.

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se que actividade da TGO tende a aumentar, durante todo período de imobilização nos músculos sujeitos ao desuso, atingindo ao sétimo dia de imobilização valores estatisticamente significativos, relativamente aos músculos do membro contralateral. O incremento da actividade desta enzima nos músculos imobilizados pode ser tradutor de um aumento relativo do metabolismo proteico.

3.4. Conclusões

A análise dos resultados obtidos permite-nos retirar as seguintes conclusões:

1) o peso ratinhos diminuíram durante as primeiras 48 horas de imobilização, aparentando recuperar a partir deste momento; o *stress* causado pelas ligaduras poderá ser a justificação para essa situação.

2) o peso do músculo imobilizado diminuiu durante todos os períodos de avaliação, aparentando a existência de duas fases distintas: uma mais acentuada até às 48 horas de imobilização e outra mais ligeira após este momento

3) as proteínas totais (em termos absolutos) dos músculos dos membros imobilizados diminuíram, comparativamente aos músculos da pata contralateral, durante todos os períodos de avaliação;

4) as proteínas totais, quando relativizadas ao peso do músculo, mantiveram-se estabilizadas até às 24 horas de imobilização, seguindo-se um aumento progressivo até ao final da imobilização;

5) as actividades das enzimas glicolíticas apresentaram comportamentos diferentes durante os vários períodos de avaliação. Enquanto a LDH, manteve nos músculo imobilizados, níveis de actividade quase inalteráveis com ligeira tendência para o seu aumento, relativamente aos músculos do membro contralateral, a PK tendeu a aumentar com o evoluir da imobilização, atingindo valores significativos ao fim de 7 dias de imobilização; uma causa possível explicação, poderá ser a mudança nas características contrácteis das fibras;

6) a actividade da IDH nos músculos imobilizados, tendeu a diminuir após as 24 horas de imobilização, apresentando níveis de actividade significativamente reduzidos ao fim de 7 dias de imobilização, relativamente aos músculos do membro contralateral;

7) a diminuição da actividade desta enzima em termos temporais (24 para as 48 horas), pareceu coincidir com as alterações estruturais das mitocôndrias, podendo ser esta a razão para a diminuição da actividade das enzimas oxidativas;

8) a actividade da TGO nos músculos imobilizados tendeu a apresentar níveis de actividade superiores aos músculos da pata contralateral, atingindo valores significativos ao sétimo dia de imobilização, sugerindo uma elevação relativa do metabolismo proteico;

9) a actividade da β -Glicuronidase nos músculos imobilizados, apresentou duas fases distintas: uma mais acentuada até às 48 horas e outra mais ligeira após este período;

10) actividade da mieloperoxidase nos músculos sujeitos à imobilização, também apresentou duas fases distintas: a primeira, mais ligeira, ocorreu até às 48 horas, enquanto a segunda, mais intensa, ocorreu após as 48 horas;

11) na perda de massa muscular verificada na fase mais intensa, até às 48 horas, parece estar principalmente envolvido o processo designado por *degeneração intrínseca*. No entanto desconhece-se a etiologia que desencadeia este processo;

12) a *degeneração extrínseca* provavelmente só terá influência numa 2ª fase, uma vez que a resposta inflamatória só se torna evidente entre as 48 e as 72 horas.

4. Bibliografia

- ALESSIO, H. (1993): Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 218-224.
- ALMEKINDERS, H.; ALMEKINDERS, S. (1992): Immune function in exercise-induced injuries. In: *Exercise and Disease*. Watson, R.; Eisinger, M. (Eds.) CRC Press. USA. pp. 149-158.
- ANASTASI, G.; MAGAUDDA, L.; PISANI, A.; GENOVESE, F.R.; SANTORO, G.; TRIMARCHI, F.; TRIPOLI, M.C. (1993): Atrophy of the soleus muscle in the albino rat induced by immobilization. *Ital. J. Anat. Embryol.* 98: 81-103.
- ANZIL, P.A.; SANCESARIO, G.; MASSA, R.; BERNARDI, G. (1991): Myofibrillar disruption in the rabbit soleus muscle after one-week hindlimb suspension. *Muscle Nerve* 14: 358-369.
- ANSVED, T. (1995): Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol. Scand.* 154: 291-302.
- APPELL, H.-J. (1990): Muscular atrophy following immobilization. A review. *Sports Med.* 10: 42-58.
- APPELL, H.-J. (1986a): Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int. J. Sports Med.* 7: 1-5.
- APPELL, H.-J. (1986b): Morphology of immobilized skeletal muscle and effects of a pre-and postimmobilization training program. *Int. J. Sports Med.* 7: 6-12.
- APPELL, H.-J.; DUARTE, A.R.; SOARES, J.M.C. (2000): Muscle atrophy following immobilization. In: *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*. Fahley, T.A. (Ed.). Internet Society For Sport Science: [Http://Sportsci.Org](http://Sportsci.Org). (In Press)
- APPELL, H.-J.; DUARTE, A.R.; SOARES, J.M.C. (1997a): Supplement of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int. J. Sports Med.* 18(3): 157-160.
- APPELL, H.-J.; GLÖSER, S.; DUARTE, A.R.; ZELLNER, A.; SOARES, J.M.C. (1997b): Skeletal muscle damage during tourniquet-induced ischemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery? *Eur. J. Appl. Physiol.* 67: 342-347.
- APPELL, H.-J.; FORSBERG, S.; HOLLMAN, W. (1988): Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int. J. Sports Med.* 9: 297-299.
- APPELL, H.-J.; SOARES, J.M.C. (1990): *Adaptação muscular ao exercício físico*. Livros horizonte, Lda. Lisboa.

- ARMSTRONG, R.B. (1990): Initial events in exercise-induced injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22: 429-435.
- ARMSTRONG, R.B.; DUAN, C.; DELP, M.D.; HAYES, D.A.; GLENN, G.M.; ALLEN, G.D. (1993): Elevations in rat soleus muscle (Ca^{2+}) with passive stretch. *J. Appl. Physiol.* 74: 2990-2997.
- ARMSTRONG, R.B.; WARREN, G.L.; WARREN, J.A. (1991): Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. *Sports Med.* 12: 184-207
- ATOMI, Y. (1992): Decreased $\alpha\beta$ -crystallin in soleus muscle atrophy and role of $\alpha\beta$ -crystallin in muscle. In: *Muscle Atrophy*. Sato, Y.; Poortmans, J.; Hashimoto, I.; Oshida, I. (Eds.). Integration of medical and sports sciences. Med. Sport Sci. Basel, Karger. 37: 171-192.
- BALDWIN, K.M. (1996): Effect of spaceflight on the functional, biochemical and metabolic properties of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: 983-987.
- BALDWIN, K.M.; WHITE, T.P.; ARNAUD, S.B.; EDGERTON, V.R.; KRAEMER, W.J.; KRAM, R.; RAAB-CULLEN, D.; SNOW, C.M. (1996): Musculoskeletal adaptations to weightless and development of effective countermeasures. *Med. Sci. Sports Exerc.* 10: 1247-1253.
- BALDWIN, K.M.; HERRICK, R.E.; MCCUE, S.A. (1993): Substrate oxidation capacity in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J. Appl. Physiol.* 75: 2466-2470.
- BARACOS, V.E.; GREENBERG, R.E.; GOLDBERG, A.L. (1986): Influence of calcium and other divalent cations on protein turnover in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 250: E702-E710.
- BERG, H.E.; DUDLEY, G.A.; HÄGGMARK, T.; OHLESÉN, H.; TESCH, P.A. (1991): Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *J. Appl. Physiol.* 70: 1882-1885.
- BEST, T.M.; FIEBIG, R.; CORR, D.T.; BRICKSON, S.; JI, L. (1999): Free activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 87: 74-82.
- BISHOP, N.C.; BLANNIN, A.K.; WALSH, N.P.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. (1999): Nutritional aspects of immunosuppression in athletes. *Sports Med.* 28: 151-176.
- BIGARD, A.X.; MERINO, D.; LIENHARD, F.; SERRURIER, B.; GUEZENNEC, C.Y. (1997): Quantitative assessment of degenerative changes in soleus muscles after hindlimb suspension and recovery. *Eur. J. Appl. Physiol.* 75: 380-387.
- BLOOMFIELD, S.A. (1997): Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29: 197-206.

- BODINE-FOWLER, S.C., ROY, R.R., RUDOLPH, W., HAQUE, N., KOZLOVSKAYA, I.B., EDGERTON, V.G. (1992): Spaceflight and growth effects on muscle fibers in the rhesus monkey. *J. Appl. Physiol.* 73: 82S-89S.
- BOOTH, F.W. (1987): Physiologic and biochemical effects of immobilization on muscle. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 219: 15-20.
- BOOTH, F.W.; CRISWELL, D.S. (1997): Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. *Int. J. Sports Med.* 18: S265-S269.
- BOOTH, F.W., LOU, W., HAMILTON, M.T., YAN, Z. (1996): Cytochrome c mRNA in skeletal muscle of immobilized limbs. *J. Appl. Physiol.* 81: 1941-1945.
- BOOTH, F.W., WEEDEN, S.H. TSENG, B.S. (1994): Effect of aging on human skeletal muscle and motor function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 556-560.
- BOOTH, F.W., LINDERMAN, J.K., KIRBY, C.R. (1992): Molecular mechanisms of muscle disuse atrophy (and strategies of prevention). In: *Muscle atrophy*. Sato, Y.; Poortmans, J.; Hashimoto, I.; Oshida, Y. (Eds.). Integration of medical and sports sciences. Med. Sport Sci. Basel, Karger. 37: 142-149.
- BOOTH, F.W.; GOLLNICK, P.D. (1983): Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15: 415-420.
- BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; MERCIER, J.; PRÉFAUT, C. (1996): Monocytes, exercise and inflammatory response. In: *Exercise Immunology Review*. Shephard, R. (Ed.). Human Kinetics Publisher, inc. 2: 35-44.
- BRAZEAU, G.A.; FUNG, H.L. (1990): Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J. Pharmacol. Sci.* 79:393-397.
- BRICOUT, V.-A.; SERRURIER, B.D.; BIGARD, A.X.; GUEZENNEC, C.Y. (1999). Effects of hindlimb suspension and androgen treatment on testosterone receptors in rat skeletal muscles. *Eur. J. Appl. Physiol.* 79: 443-448.
- BURY, T.B.; PIRNAY, F. (1995): Effect of prolonged exercise on neutrophil myeloperoxidase secretion. *Int. J. Sports Med.* 16: 410-412.
- BYRD, S.K. (1992): Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 24: 531-536.
- CAIOZZO, V.J.; BAKER, M.J.; HERRICK, R.E.; TAO, M.; BALDWIN, K.M. (1994): Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.* 76: 1764-1773.
- CAMPIONE, M.; AUSONI, S.; GUEZENNEC, C.Y.; SCHIAFFINO, S. (1993): Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 74: 1156-1160.

CARLSON, R.M.; FAULKNER, J.A. (1983): The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15: 187-197.

CARMELI, E.; ZEEV, H.; LIVNE, E.; LICHTENSTEIN, I.; KESTELBOIM, C.; SILBERMANN, M.; REZNICK, A.Z. (1993): Effect of growth hormone on gastrocnemius muscle of aged rats after immobilization: biochemistry and morphology. *J. Appl. Physiol.* 75: 1529-1535.

CASE, D.; BAER, J.T.; SUBBIAH, M.T.R. (1999): The effect of prolonged exercise on lipid peroxidation in eumenorrhic female runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 1390-1393.

CEDDIA, M.A.; WOODS, J.A. (1999): Exercise suppresses macrophage antigen presentation. *J. Appl. Physiol.* 87: 2253-2258.

CHI, M.M.-Y.; CHOKSI, R.; NEMETH, P.; KRASNOV, I.; ILYINA-KAKUEVA, E.; MANCHESTER, J.K.; LOWRY, O.H. (1992): Effects of microgravity and tail suspension on enzymes of individual soleus and tibial anterior fibers. *J. Appl. Physiol.* 73: 66S-73S.

CHUNG, S.-C.; GOLDFARB, A.H.; JAMURTAS, A.Z.; HEDGE, S.U.; LEE, J. (1999): Effect of exercise during the follicular and luteal phases on indices of oxidative stress in healthy women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 409-413.

CLARKE, M.S.F.; BAMMAN, M.M.; FEEBACK, D.L. (1998): Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release during bed rest. *J. Appl. Physiol.* 85: 593-600.

CLARKSON, P.M. (1992): Exercise-induced muscle damage - animal and human models. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 510-511.

COHEN, I.; BOGIN, E.; CHECHICK, A.; RZETELNY, V. (1999): Biochemical alterations secondary to disuse atrophy in the rats serum and limb tissues. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 119: 410-417.

CROS, N.; MULLER, J.; BOUJU, S.; PIÉTU, G.; JACQUET, C.; LÉGER, J.J.; MARINI, J.-F.; DECHESNE, C.A. (1999): Upregulation of m-creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am. J. Physiol.* 276: R308-R316.

CULLEN, M.J.; APPLEYARD, S.T.; BINDOFF, L. (1979): Morphological aspects of muscle breakdown and lysosomal activation. *Ann. NY Acad. Sci.* 317: 440-464.

DEKKERS, J.C.; VANDOORNEN, J.P.; KEMPER, H.C.G. (1996): The role of oxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercised-induced muscle damage. *Sports Med.* 21: 213-238.

DESCHENES, M.R.; MARESH, C.M.; KRAEMER, W.J. (1994a): The neuromuscular junction: structure, function and its role in the excitation of muscle. *J. Strength Cond. Res.* 8: 103-109.

DESCHENES, M.R.; COVAULT, J.; KRAEMER, W.J.; MARESH, C.M. (1994b): The neuromuscular junction: muscle fiber type differences, plasticity and adaptability to increased and the decreased activity. *Sports Med.* 17: 358-372.

DESPLANCHES, D. (1997): Structural and functional adaptations of skeletal muscle weightless. *Int. J. Sports Med.* 18: S259-S264.

DESPLANCHES, D.; MAYET, M.H.; ILYINA-KAKUEVA, E.I.; SEMPORE, B.; FLANDROIS, R. (1990): Skeletal muscle adaptation in rats flown on cosmos 1667. *J. Appl. Physiol.* 68: 48-52.

DIECKSTALL, P.; SCHULZE, W.; NOACK, W. (1995): Immobilization damage. *Sportverletzung Sportschaden* 9 : 35-43.

DIFFFE, G.M.; CAIOZZO, V.J.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. (1991): Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am. J. Physiol.* 260: C528-C534.

DUBOUCHAUD, H.; GRANIER, P.; MERCIER, J.; LE PEUCH, C.; PRÉFAUT, C. (1996): Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. *J. Appl. Physiol.* 80: 416-421.

DUARTE, J.A. (1993): Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico. Dissertação apresentada às provas de doutoramento. Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física. Universidade do Porto.

DUARTE, J.A.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; SOARES, J.M.C.; APPELL, H.-J. (1994): Do invading leukocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery. *Eur. J. Appl. Physiol.* 68: 48-53.

DUARTE, J.A.; SOARES, J.M.C.; APPELL, H.-J. (1992): Nifedipine diminishes exercise-induced muscle damage in mouse. *Int. J. Sports Med.* 13: 274-277.

DUARTE, J.A.R.; SOARES, J.M.C. (1991): Etiologia da fadiga muscular: alguns factores condicionantes. *Rev. Port. Med. Desp.* 9: 165-174.

EDGERTON, V.R.; ZHOU, M.-Y.; OHIRA, Y.; KLITGAARD, H.; JIANG, B.; BELL, G.; HARRIS, B.; SALTIN, B.; GOLLNICK, P.D.; ROY, R.R.; DAY, M.K.; GREENISEN, M. (1995): Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 78: 1733-1739.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B. (199?): Activity- and inactivity-related muscle adaptation in the animal kingdom. *In: Muscle adaptation.* pp. 435-444.

- FAWTHROP, D.J.; BOOBIES, A.R.; DAVIES, D.S. (1991): Mechanisms of cell death. *Arch. Toxicol.* 65: 437-444.
- FERRANDO, A.A.; TIPTON, K.D.; BAMMAN, M.M.; WOLFE, R.R. (1997): Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest. *J. Appl. Physiol.* 82: 807-810.
- FISHER, S.F.; HASSER, E.M.; BROWN, M. (1998): Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 85: 1316-1321.
- FISCHER, B.D.; BARACOS, V.E.; SHNITKA, T.K.; MENDRYK, S.W.; REID, D.C. (1990): Ultrastructural events following acute trauma. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22: 185-193.
- FRIDÉN, J.; LIEBER, R.L. (1992): Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 521-530.
- GALLIN, J. (1988): Inflammation. In: *Fundamental Immunology*. Paul, W. (Ed.). Second Edition. pp. 721-733.
- GAMRIN, L.; BERG, H.E.; ESSÉN, P.; TESCH, P.A.; HULTMAN, E.; GARLICK, P.J.; MCNURLAN, M.A.; WERNERMAN, J. (1998): The effect of unloading on protein synthesis in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 163: 369-377.
- LEESON, M; ALMEY, J.; BROOKS, S.; CAVE, R.; GRIFFITHS, H. (1995): Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 71: 137-142.
- GOLDSPINK, D.F.; GOLDSPINK, G. (199?): The role of passive stretch in retarding muscle atrophy. In: *Electric stimulation and neuromuscular disorders*. Nix, W.A.; Vrbová, G. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo. pp. 91-100
- GOMES, R.R.; BOOTH, F.W. (1998): Expression of acetylcholine receptor mRNAs in atrophying and nonatrophying skeletal muscles of old rats. *J. Appl. Physiol.* 85: 1903-1908.
- GRANDE, N.R.; SANTOS, M. (1999): Limb immobilization and intimal hyperplasia- an echo-doppler study in man. *Surg. Radiol. Anat.* 21: 23-28.
- GUYTON, A.C. (1984): *Tratado de Fisiologia Médica*. Editora Internacional Lda, 6ª Edição.
- HADDAD, F.; HERRICK, R.E.; ADAMS, G.R.; BALDWIN, K.M. (1993): Myosin heavy chain expression in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J. Appl. Physiol.* 75: 2471-2477.
- HAN, X.-Y.; WANG, W.; MYLLYLÄ, R.; VIRTANEN, P.; KARPAKKA, J.; TAKALA, T.E.S. (1999): mRNA levels for α -subunit of prolyl 4-hydroxylase and fibrillar collagens in immobilized rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 87: 90-96.

- HAYWARD, R.; FERRINGTON, D.A.; KOCHANOWSKI, L.A.; MILLER, L.M.; JAWORSKY, G.M.; SCHNEIDER, C.M. (1999): Effects of dietary protein on enzyme activity following exercise-induced muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31: 414-420.
- HENSON, P.; JOHNSTON JR., B. (1987): Tissue injury in inflammation. *J. Clin. Invest.* 79: 669-674.
- HERBISON, G.J.; JAWEED, M.M.; DITUNNO, J.F. (1978): Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 59: 301-205.
- HESLINGA, J.W.; KRONNIE, G.; HUIJING, P.A. (1995): Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 70: 49-57.
- HILL, R.B.; LAVIA, M.F. (1980): *Principles of pathobiology*. Third edition Oxford University Press, inc. New York. Oxford.
- HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. (1991): Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 801-810.
- IBEBUNJO, C.; MARTYN, J.A.J. (1999): Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. *Crit. Care Med.* 27: 275-285.
- INGALLS, C.P.; WARREN G.L.; ARMSTRONG R.B. (1999): Intracellular Ca²⁺ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J. Appl. Physiol.* 87: 386-390.
- INMAN, C.L.; WARREN G.L.; HOGAN H.A.; BLOOMFIELD S.A. (1999): Mechanical loading attenuates bone loss due immobilization and calcium deficiency. *J. Appl. Physiol.* 87: 189-195.
- JÄNKÄLÄ, H.; HARJOLA, V.-P.; PETERSON, N.E.; HÄRKÖNEN, M. (1997): Myosin heavy chain mRNA transform to faster isoforms in immobilized skeletal muscle: a quantitative PCR study. *J. Appl. Physiol.* 82: 977-982.
- JARVINEN, M.J.; LEHTO, M.U. (1993): The effects of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med.* 15: 78-89.
- JENKINS, R.R. (1988): Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 5: 156-170.
- JI, L.L. (1995): Oxidative stress during exercise: implications of antioxidants nutrients. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 1079:1086.
- JIANG, B.; OHIRA, Y.; ROY, R.R.; NGUYEN, Q.; ILYINA-KAKUEVA, E.I.; OGANOV, V.; EDGRTON, V.R. (1992): Adaptation of fibers in fast-twitch

muscles of rats to spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 73: 585-655.

KANDARIAN, S.C.; BOUSHEL, R.C.; SCHULTE, L.M. (1991): Elevated interstitial fluid volume in rat soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.* 71: 910-914.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; JÄRVINEN, T.; JÄRVINEN, M. (1998a): Effects of immobilization and subsequent low- and high-intensity exercise on morphology of rat calf muscles. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 8: 160-171.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; JÄRVINEN, T.L.N.; KVIST, M.; VIENO, T.; JÄRVINEN, T.A.H.; NATRI, A.; JÄRVINEN, M. (1998b): Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 84: 1418-1424.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. (1992a): The effect of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. *Acta Physiol. Scand.* 144: 387-394.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; RENSTRÖM, P.; JÄRVINEN, M.; KVIST, M.; LEHTO, M.; VUORY, L. (1992b): The effects of training, immobilization and remobilization on musculoskeletal tissue. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2: 100-118.

KANTER, M.M.; NOLTE, L.A.; HOLLOSZY, J.O. (1993): Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J. Appl. Physiol.* 74: 965-969.

KARPAKKA, E.S.; VÄÄNÄNEN, K.; ORAVA, S.; TAKALA, T.E.S. (1990): The effects of preimmobilization training immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.* 11: 484-488.

KASPER, C.E. (1995): Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 79: 607-614.

KAUHUNEN, S.; LEIVO, I.; MICHELSSON, J.-A. (1993): Early muscle changes after immobilization. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 297: 44-50.

KAUHUNEN, S.; LEIVO, I.; PETTILÄ, M.; MICHELSSON, J.-A. (1996): Recovery of skeletal muscle after immobilization of rabbit hindlimb. *APMIS* 104: 797-804.

KRIPPENDORF, B.B.; RILEY, D. (1994): Temporal changes in sarcomere lesions of rat adductor longus muscles during hindlimb reloading. *The Anat. Rec.* 238: 304-310.

KOMULAINEN, J.; KOSKINEN, S.O.A.; KALLIOKOSKI, R.; TAKALA, T.E.S.; VIHKO, V. (1999): Gender differences in skeletal muscle fiber damage after eccentrically biased downhill running in rats. *Acta Physiol. Scand.* 165: 57-63.

KOMULAINEN, J.; TAKALA, T.E.S.; VIHKO, V. (1995): Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats. *Int. J. Sports Med.* 16: 150-154.

KONDO, H.; NISHINO, K.; ITOKAWA, I. (1994): Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. *FEBS Lett.* 349: 169-172.

KONDO, H.; MIURA, M.; ITOKAWA, Y. (1993a): Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch.* 422: 404-406.

KONDO, H.; MIURA, M.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; HORI, S.; ITOKAWA, Y. (1993b): Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am. J. Physiol.* 265: E839-E844.

KONDO, H.; MIURA, M.; KODAMA, J.; AHMED, S.M.; ITOKAWA, Y. (1992a): Role of iron in oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch.* 421: 295-297.

KONDO, H.; MIURA, M.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; ITOKAWA, Y. (1992b): Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am. J. Physiol.* 265: E583-E590.

KÖNIG, D.; WEINSTOCK, C.; KEUL, J.; NORTHOFF, H.; BERG, A. (1998): Zinc, iron, magnesium status in athletes - influence on the regulation of exercised-induced stress and immune function. *Exercise Immunology Review*. Human kinetics Publishers, inc. 4: 2-21.

KTREZSHMAR, M.; MÜLLER, D.; HÜBSCHER, J.; MARIN, E.; KLINGER, W. (1991): Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int. J. Sports Med.* 12: 218-222.

KYRIAKIDES, C.; AUSTEN, W. Jr.; WANG, Y.; FAVUZZA, J.; KOBZIK, L.; MOORE, F.D.Jr.; HECHTMAN, H.B. (1999): Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex. *Am. J. Physiol.* 277: C1263-C1268.

LEBLANC, A.; ROWE, H.; WEST, S.; SHACKELFORD, L.; SCHNEIDER, V. (1997): Muscle atrophy during long duration bed rest. *Int. J. Sports Med.* 18: S283-S284.

LEIVO, I.; KAUKANEN, S.; MICHELSSON, J.-A. (1998): Abnormal mitochondria and sarcoplasmic changes in rabbit skeletal muscle induced by immobilization. *APMIS* 106: 1113-1123.

LINDBOE, C.F.; PLATOU, C.S. (1984): Effect of immobilization of short duration on the muscle fiber size. *Clin. Physiol.* 4: 183-188.

LUHTI, J.M.; GERBER, C.; CLAASSEN, H.; HOPPELER, H. (1989): The injured and immobilized muscle cell: ultrastructural observations. *Sportverletzung Sportschaden* 3: 58-61.

MACINTYRE, D.L.; REID, W.D.; LYSTER, D.M.; SZASZ, I.J.; MCKENZIE, D.C. (1996): Presence of WBC, decreased strength, and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. *J. Appl. Physiol.* 80: 1006-1013.

MACINTYRE, D.L.; REID, W.D.; MCKENZIE, D.C. (1995): Delayed muscle soreness: the inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med.* 20: 24-40.

MANFREDI, T.G.; FIELDING, R.A.; O'REILLY, K.P.; MEREDITH, C.N.; LEE, H.Y.; EVANS, W.J. (1991): Plasma creatine activity and exercise-damage in older men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 1028-1034.

MASASHI, K.; RICHARD, L.F.; WEBSTER, R.O.; DAHMS, T.E. (1999): Role of neutrophils in xanthine/xantine-oxidase induced oxidant injury in isolated rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 87: 2319-2325.

MCARDLE, A.; EDWARDS, R.H.T.; JACKSON, M.J. (1994): Release of creatine kinase and prostaglandin E₂ from regenerating skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 76: 1274-1278.

MCCULLY, K.; SHELOCK, F.G.; BANK, W.J. (1992): The use of nuclear magnetic to evaluate muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 537-542.

MILES, M.P.; CLARKSON, P.M.; BEAN, M.; AMBACH, K.; MULROY, J.; VINCENT, K. (1994): Muscle function at wrist following 9 d of immobilization and suspension. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 615-623.

MIU, B.; MARTIN, T.P.; ROY, R.R.; OGANOV, V.; ILYINA-KAKUEVA, E.; MARINI, J.F.; LEGER, J.J.; BODINE-FOWLER, S.C.; EDGERTON, V.R. (1990): Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, cosmos 1887. *FASEB J.* 4: 64-72.

MOHSENIN, V. (1991): Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidation stress: role of antioxidation defenses. *J. Appl. Physiol.* 70: 1456-1462.

MORGAN, D.L.; ALLEN, D.G. (1999): Early events in stretch-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 87: 2007-2015.

MOTA, A.P.S. (1995): Estudo comparativo dos indicadores indirectos de lesão muscular induzida pelo exercício em crianças e adultos. Dissertação apresentada às Provas de Mestrado em Ciência do Desporto, Área de especialização de Desporto para Crianças e Jovens . Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física. Universidade do Porto.

MÜNS, G. (1993): Effect of long-distance running on polymorphonuclear neutrophil phagocytic function of the upper airways. *Int. J. Sports Med.* 15: 96-99.

MUSACCHIA, X.J.; STEFFEN, J.M.; FELL, R.D.; DOMBROWSKI, M.J.; OGANOV, V.W.; ILYINA-KAKUEVA, E.I. (1992): Skeletal muscle atrophy in response to 14 day of weightlessness: vastus medialis. *J. Appl. Physiol.* 73: 44S-50S.

NICKS, D.K.; BENEKE, W.M.; KEY, R.M.; TIMSON, B.F. (1989): Muscle fiber size and number following immobilization atrophy. *J. Anat.* 163: 1-5.

NISS, A.M.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. (1999): Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exercise Immunology Review*. Human Kinetics Publishers, inc. 5: 22-56.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; CURI, R. (2000): Phosphatidylcholine participates in the interaction between macrophages and lymphocytes. *Am. J. Physiol.* 278: C554-C560.

NONAKA, I.; MIYZAWA, M.; SUKEGAWA, T.; YONEMOTO, K.; KATO, T. (1997): Muscle fiber atrophy and degeneration induced by experimental immobility and hindlimb suspension. *Int. J. Sports Med.* 18: S292-S294.

NORTHOFF, H.; ENKEL, S.; WEINSTOCK, C. (1995): Exercise injury and immune function. *Exercise immunology review*. Human Kinetics Publishers, inc. 1: 1-25.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P.M. (1994): Effect of eccentric exercise on plasma enzyme activities previously elevated by eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 69: 492:497.

OHIRA, Y.; JIANG, B.; ROY, R.R.; OGANOV, V.; ILIYNA-KAKUENA, E.; MARINI, J.F.; EDGERTON, V.R. (1992): Rat soleus muscle fiber response to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 73: 51S-57S.

OKI, S.; DESAKI, J.; TAGUSHI, Y.; MATSUDA, Y.; SHIBATA, T.; OKUKURA, H. (1999): capillary changes with fenestration in the contralateral soleus muscle of the rat following unilateral limb immobilization. *J. Orthop. Sci.* 4: 28-31.

PEREIRA, J.F.M.P. (1996): Exercícios físicos inabituais e exaustivos em crianças: influência do tipo predominante de contracções em indicadores indirectos de stress oxidativo e de agressão/lesão muscular esquelética. Dissertação apresentada às Provas de Mestrado em Ciência do Desporto, Área de especialização de Desporto para Crianças e Jovens . Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física. Universidade do Porto.

PETIT, J.; GIOUX, M. (1993): Properties of motor units after immobilization of cat peroneus longus muscle. *J. Appl. Physiol.* 74:1131-1139.

PHILLIPS, G.D.; KNIGHTON, D.R. (1990): Skeletal muscle regenerates. *Wounds* 2: 82-94.

PICQUET, F.; STEVENS, L.; BUTLER-BROWNE, G.S.; MOUNIER, Y. (1998): Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscle at two development stages. *J. Muscle Res. Cell Motil* 19: 743-755.

PIETARINEN-RUNTI, P.; LAKARI, E.; RAIVIO, K.O.; KINNULA, V.L. (2000): Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol.* 278: C118-C125.

PIZZA, F.X.; MITCHELL, J.B.; DAVIS, B.H.; STARLING, R.D.; HOLTZ, R.W.; BIGELOW, N. (1995): Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 363-370.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. (1999): Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31:987-997.

PRICE, C.P.; ALBERTI, R.G.M.M. (1979): Biochemical Assessment of liver function. In: *Liver and biliary disease: Pathobiology, diagnosis and management*. Wright, R.; Alberti, K.; Karran, S.; Millward-Sadler, G. (Eds.). N. B. Saunder Company, Ltd. pp. 381-416.

RABASSEDA, X. (1997): Safety profile of nimesulide: ten years of clinical experiences. *Drugs of today*. Vol. 33 Suppl. I

REZVANI, M.; ORNATSKY, O.I.; CONNOR, M.K.; EISENBERG, H.A.; HOOD, D.A. (1996): Dystrophin, visculin and aciculin in skeletal muscle subject to chronic use and disuse. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: 79-84.

RIBEIRO, R.J.T. (1998): Administração oral de creatina: Adaptações bioquímicas no músculo esquelético e tecido hepático. Dissertação apresentada às Provas de Mestrado em Ciência do Desporto, Área de especialização de Trino de Alto Rendimento. Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física. Universidade do Porto.

RILEY, D.A.; SLOCUM, G.R.; BAIN, J.L.W.; SEDLAK, F.R.; SOWA, T.E.; MELLENDER, J.W. (1990): Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.* 69: 58-66.

RILEY, D.A.; BAIN, J.L.W.; THOMSON, J.L.; FITTS, R.H.; WIDRICK, J.J.; TRAPPE, S.W.; TRAPPE, T.A.; COSTILL, D.L. (2000): Decrease thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 88: 567-572.

RINCÓN, E.O. (1994): Physiology and biochemistry: influence of exercise on phagocytosis. *Int. J. Sports. Med.* 15: S172-S178.

ROBBINS, S.L. (1974): *Patologia estrutural e funcional*. Editora Interamericana. Rio de Janeiro. Brasil

RODRIGUEZ, B.; BARRIGA, C.; DELA FUENTE, M. (1991); Phagocytic function of blood neutrophils in sedentary young people after physical exercise. *Int. J. Sports Med.* 12: 276-280.

RUSSELL, B.; DIX, D.J.; HALLER, D.L.; JACOBS-EL, J. (1992): Repair of injured skeletal muscle: a molecular approach. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 24: 189-196.

SANCESARIO, G.; MASSA, R.; ANZIL, A.P.; BERNARDI, G. (1992): Active muscle length reduction progressively damage soleus in hindlimb-suspended rabbits. *Muscle Nerve* 15: 1002-1015.

SCHWARTZ, W.N.; BIRD, J.C.W. (1977): Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *Biochem. J.* 167: 811-820.

SEN, C.K. (1995): Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79: 675-686.

SEN, C.K.; ATALAY, M.; HÄNNINEN O. (1994): Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J. Appl. Physiol.* 77: 2177-2187.

SEN, C.K.; MARIN, E.; KRETZSCHMAR, M.; HÄNNINEN O. (1992): Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 73: 1265-1272.

SHERLOCK, S. (1981): *Diseases of the liver and biliary system.* 6th Edition. Blackwell Scientific Publications. pp. 21-23, 84-91, 102-111, 304-315.

SMITH, H.K.; PLYLEY, M.J.; RODGERS, C.D.; MCKEE, N.H. (1997): Skeletal muscle damage in rat hindlimb following single or repeated daily bouts of downhill exercise. *Int. J. Sports Med.* 18: 94-100.

SMITH, H.K.; PYNE, D.B. (1997): Exercise training and neutrophil function. *Exercise immunology review.* Human Kinetics Publishers, inc. 3: 96-117.

SMITH, H.K.; TELFORD, R.D.; MASON, I.B.; WEIDEMANN, M.J. (1990): Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int. J. Sports Med.* 11: 179-187.

SOARES, J.M.C.; CARVALHO, J.; APPELL, H.-J.; DUARTE, J.A. (1994): Efeito dos bloqueadores dos canais lentos de Ca^{2+} na atrofia do músculo jovem, perspectivas da sua aplicação no músculo envelhecido. In: *Physical activity and health in elderly.* Eds. A. Marques, A. Gaya e J.M. Constantino, European group for research into elderly and physical activity e Câmara Municipal de Oeiras. pp:173-179.

SOARES, J.M.C.; DUARTE, J.A.; CARVALHO, J.; APPELL, H.-J. (1993): The possible role of intracellular Ca^{2+} accumulation for the development of immobilization atrophy. *Int. J. Sports Med.* 14: 437-439.

SOARES, J.M.C.; DUARTE, J.A.R. (1994). *Plasticidade muscular: adaptação morfológica e funcional do músculo esquelético ao exercício*. Direcção Geral dos Desportos.

SOARES, J.M.C.; DUARTE, A.R.; APPELL, H.-J. (1993): *Atrofia muscular: Mecanismos morfológicos e funcionais*. Direcção Geral dos Desportos.

SORICHTER, S.; PUSCHENDORF, B.; MAIR, J. (1999): Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as marker fiber injury. *Exercise immunology review*. Human Kinetics Publishers, inc. 5: 5-21.

SPRENGLER, H.; JACOBS, C.; NAIN, M.; GRESSNER, A.; PRINZ, H.; WESEMANN, W.; GEMSA, D. (1992): Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 63: 188-195.

ST. PIERRE, B.A.; TIDBALL, J.G. (1994): Differential response of macrophage subpopulation to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 77: 290-297.

STEIN, T.P.; LESKIW, M.J. (2000): Oxidant damage during and after spaceflight. *Am. J. Physiol.* 278: E375-E382.

STEIN, T.P.; SCHLUTER, M.D. (1997): Human skeletal muscle protein breakdown during spaceflight. *Am. J. Physiol.* 272: E688-E695.

STEIN, T.P.; GAPRINDASHVILI, T. (1994): Spaceflight and protein metabolism, with special reference to humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 806S-819S.

STEIN, T.P.; LESKIW, M.J.; SCHLUTER, M.D. (1993): Effect of spaceflight on human protein metabolism. *Am. J. Physiol.* 264: E825-E828.

SUZUKI, K.; NAGANUMA, S.; TOTSUKA, K.-J.; MOCHIZUKI, M.; SHIRAIISHI, M.; NAKAJI, K.; SUGAWARA, K. (1996). Effects of exhaustive endurance exercise and its one-week daily repetition on neutrophil count and functional status in untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17: 205-212.

SYMON, J.D.; THEODOSSY, S.J.; LONGHURST, J.C.; STEBBINS, C.L. (1991): Intramuscular accumulation of prostaglandins during static contraction of the cat triceps surae. *J. Appl. Physiol.* 71: 1837-1842.

TÄGERUD, S.; LIBELIUS, R. (1984): Lysosomes in skeletal muscle following denervation. *Cell Tissue Res.* 236: 73-79.

TAILLANDER, D.; BIGARD, X.; DESPLANCHES, D.; ATTAIX, D.; GUEZENNEC, C.Y.; ARNAL, M. (1993): Role of protein intake on protein synthesis and fiber distribution in the unweighted soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 75: 1226-1232.

TAKEKURA, H.; KASUGA, N.; KITADA, K.; YOSHIOKA, T. (1996): Morphological changes in the triads and sarcoplasmic reticulum of rat slow and fast muscle

fibers following denervation and immobilization. *J. Muscle Res. Cell Motil* 17: 391-400.

THOMASON, D.B.; MORRISON, P.R.; OGANOV, V.; ILYINA-KAKUEVA, E.; BOOTH, F. W.; BALDWIN, K.M. (1992): Altered actin myosin expression on muscle during exposure to microgravity. *J. Appl. Physiol.* 73: 90S-93S.

THOMASON, D.B.; BOOTH, F. W. (1990): Atrophy of soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.* 68: 1-12.

THOMSON, L.V.; SHOEMAN, J.A. (1998): Contractile function of single fibers after hindlimb unweighting in investigation in aged rats. *J. Appl. Physiol.* 84: 229-235.

TIDBALL, J.G.; QUAN, D.M. (1992): Reduction in myotendinous junction surface area of rats subject to 4-day spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 73: 59-64.

TIIDUS, P.M.; HOUSTON, M.E. (1994): Antioxidant and oxidative enzyme adaptation to vitamin E deprivation and training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 354-359.

TIPTON, C.M.; HARGENS, A. (1996): Physiologic adaptations and countermeasures associated with long-duration spaceflights. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: 974-976.

VAN DALEN, C.J.; WINTERBOURN, C.C.; SENTHILMOHAN, R.; KETTLE, A.J. (2000): Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 275: 11638-11644.

VINCENT, H.K.; VINCENT, K.R. (1997): The effect of training status on the serum creatine kinase response, soreness and muscle function following resistance exercise. *Int. J. Sports Med.* 18: 431-437.

VIJAYAN, K.; THOMSON, J.L.; RILEY, D.A. (1998): Sarcomere lesion damage occurs mainly in slow fibers of reloaded rat adductors longus muscles. *J. Appl. Physiol.* 85: 1017-1023.

WATERMAN-STORER, C.M. (1991): The cytoskeleton of skeletal muscle: is it affected by exercise? A brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 1240-1249.

YOSHIOKA, T.; TAKEKURA, H.; YAMASHITA, K. (1992): Effect of endurance training on disuse muscle atrophy induced by body suspension in rats. In: *Muscle atrophy*. Sato, Y.; Poortmans, J.; Hashimoto, I.; Oshida, Y. (Eds.). Integration of medical and sports sciences. Med. Sport Sci. Basel, Karger. 37: 150-161.

ZEMKOVA, H.; TEISINGER, J.; ALMON, R.R.; VEJSADA, R.; HNIK, P.; VYSKOCIL, F. (1990): Immobilization atrophy and membrane properties in rat skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch.* 416: 126-129.

ZACHAROVÁ, G.; KNOTKOVÁ-URBANCOVÁ, H.; HNÍK, P.; SOUKUP, T. (1997): Nociceptive atrophy of the rat soleus muscle induced by bone fracture: morphometric study. *J. Appl. Physiol.* 82: 552-557.

ZWACKA, R.M.; HIANG, Y.; HALLDORSON, J.; SCHOSSBERG, H.; DUDUS, L.; ENGELHARDT, J.F. (1997). CD4+ T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory response in mouse liver. *J. Clin. Invest.* 100:279-189.

Anexos

Médias e respectivos desvios padrão do peso total dos ratinhos, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
O horas	38,7 ± 2,18	37,2 ± 3,18	38,2 ± 1,78	38,2 ± 1,87
Final da imobilização	39,3 ± 2,34	39,15 ± 2,03	38,3 ± 1,98	39,1 ± 1,76
% variação	98,5 ± 3,63	95 ± 3,18	100,2 ± 1,24	97,6 ± 4,8

Médias e respectivos desvios padrão do peso total do músculo soleus (mg), valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	5,7 ± 1,0	6,3 ± 1,3	5,6 ± 0,51	4,7 ± 1,29
Contralateral	6,8 ± 0,4	7,8 ± 0,35	7,0 ± 0,62	8,0 ± 0,87
% variação	84,7 ± 13,56	79 ± 15,12	77,6 ± 7,1	59,6 ± 16,84

Médias e respectivos desvios padrão das proteínas totais (mg), valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	1,12 ± 0,26	0,97 ± 0,32	1,4 ± 0,13	1,26 ± 0,16
Contralateral	1,38 ± 0,12	1,02 ± 0,18	1,44 ± 0,25	1,43 ± 0,22
% variação	72,1 ± 13,56	84,5 ± 38,13	98,9 ± 16,24	88,5 ± 5,82

Médias e respectivos desvios padrão das proteínas totais, valores relativizados ao peso do músculo e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,30 ± 0,07
Contralateral	0,20 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,17 ± 0,03
% variação	95,2 ± 10,85	128 ± 22,98	128,4 ± 22,46	174,7 ± 33,69

Médias e respectivos desvios padrão da actividade da PK, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	3962,4 ± 1295,39	8175,7 ± 3029,2	2717,6 ± 964,19	3833,7 ± 1283,44
Contralateral	3064,0 ± 815,52	7298,4 ± 3264,69	2125,1 ± 761,37	2933,1 ± 2325,55
% variação	127,8 ± 16,3	129,5 ± 14,4	131,9 ± 29,48	161,1 ± 20,1

Médias e respectivos desvios padrão da actividade da LDH, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	833,1 ± 539,25	1088,2 ± 291,77	736,3 ± 31,91	635,0 ± 130,37
Contralateral	766,5 ± 165,48	1175,1 ± 391,07	524,4 ± 209,08	571,6 ± 136,37
% variação	119,4 ± 18,4	92,6 ± 14,71	140,3 ± 91,33	111,1 ± 28,86

Médias e respectivos desvios padrão da actividade da LDH, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	54,4 ± 18,57	66,9 ± 52,9	28,7 ± 6,59	31,4 ± 2,49
Contralateral	48,5 ± 16,97	83,1 ± 60,33	38,2 ± 15,83	47,3 ± 24,83
% variação	117 ± 25,78	80,5 ± 11,31	75,2 ± 24,6	66,5 ± 22,1

Médias e respectivos desvios padrão da actividade da TGO, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	0,46 ± 0,27	0,96 ± 0,12	0,44 ± 0,09	0,61 ± 0,09
Contralateral	0,28 ± 0,08	0,48 ± 0,03	0,33 ± 0,08	0,32 ± 0,09
% variação	164,6 ± 40,48	125 ± 48,81	133,4 ± 29,48	199,2 ± 43,31

Médias e respectivos desvios padrão da actividade da β -G, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	0,0009 \pm 0,0002	0,001 \pm 0,0004	0,0001 \pm 0,0001	0,0001 \pm 0,0001
Contralateral	0,0003 \pm 0,0002	0,001 \pm 0,0007	0,0001 \pm 0,0001	0,0002 \pm 0,0002
% variação	178,9 \pm 56,27	80,5 \pm 27,52	255,2 \pm 107,0	136,2 \pm 98,9

Médias e respectivos desvios padrão da actividade da β -G, valores absolutos e % de variação

	24h	48h	72h	7d
Imobilizado	3,33 0,77	6,38 \pm 3,36	34,54 \pm 4,7	24,6 \pm 24,92
Contralateral	2,40 \pm 0,45	8,85 \pm 3,73	13,53 \pm 7,41	28,95 \pm 26,35
% variação	138,6 \pm 51,9	72,2 \pm 28,14	255,2 \pm 107,0	100,7 \pm 58,89