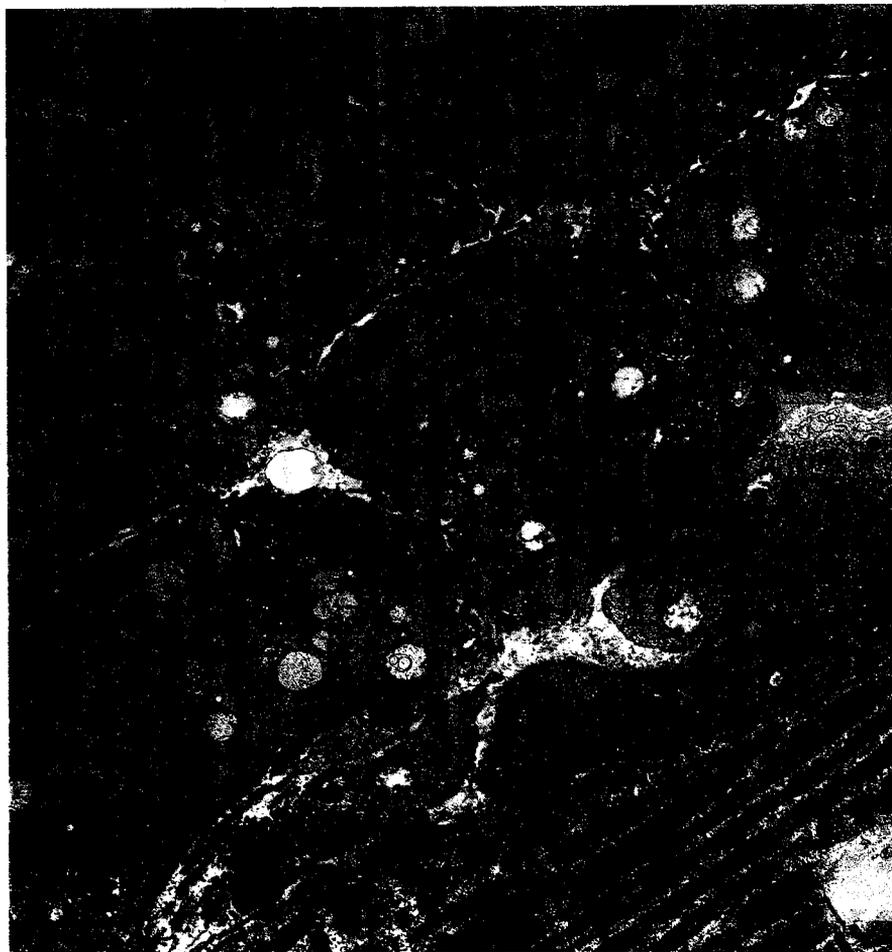


# LESÕES CELULARES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO FÍSICO



**José Alberto Ramos Duarte**

**UNIVERSIDADE DO PORTO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**1993**

Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física  
Universidade do Porto



***Lesões Celulares do Músculo Esquelético  
Induzidas pelo Exercício Físico***

Dissertação apresentada às provas de doutoramento no ramo de Ciências do Desporto, especialidade de Biologia do Desporto, nos termos do Artº 6 nº 2 alínea c do Decreto-Lei nº 388/70 de 18 de Agosto.

José Alberto Ramos Duarte

Maio de 1993

**À Maria João**

**À Mafalda**

**Ao Prof. Doutor José Soares**

**Ao Prof. Doutor H.-J. Appell**

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho, apesar do seu carácter individual, teria sido impossível sem a colaboração e estímulo de várias pessoas. Dessa forma, gostaria de expressar o meu agradecimento e gratidão:

Ao Prof. Doutor José Soares e ao Prof. Doutor H.-J. Appell, pelos ensinamentos, pelo estímulo constante e, sobretudo, pela educação científica que me deram ao longo destes anos de trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Doutora Maria de Lurdes Bastos, pelos conhecimentos bioquímicos transmitidos, pela simpatia com que sempre me recebeu e pelas facilidades concedidas na utilização do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Ao Dr. Félix de Carvalho, pelos conselhos e pela disponibilidade constante para me orientar e ajudar nas tarefas laboratoriais.

Às técnicas Mady Euler e Margot Maskus, do Institute for Experimental Morphology, da German Sport University, pela assistência na preparação das amostras para microscopia óptica e electrónica.

Ao Dr. Faria dos Santos (Produtos Farmacêuticos Diamant Ltda.) pela bibliografia e pelo princípio activo que gentilmente cedeu.

Ao José Maia, ao João Paulo, ao Jorge Mota e ao José Soares, para além da ajuda na análise estatística dos resultados e na revisão final do trabalho, pela amizade que nos une.

A todos os restantes colegas e amigos desta Faculdade, nos quais se incluem o Paulo Santos, o José Augusto, o Pedro Sarmiento e a Eunice Lebre, pelas sugestões, preocupação e apoio constantes.

## Índice

1. Introdução.....	11
2. Miopatia do exercício.....	17
2.1. Factores condicionantes.....	18
2.2. Quadro anatomico-patológico.....	19
2.3. Etiologia.....	21
2.4. Fisiopatologia.....	24
2.4.1. Degeneração intrínseca.....	26
2.4.1.1. Cálcio sarcoplasmático e miopatia do exercício.....	31
2.4.1.1.1. Material e métodos.....	41
2.4.1.1.2. Resultados.....	45
2.4.1.1.3. Discussão dos resultados.....	51
2.4.1.2. Stress oxidativo e miopatia do exercício.....	59
2.4.1.2.1. Material e métodos.....	67
2.4.1.2.2. Resultados.....	70
2.4.1.2.3. Discussão dos resultados.....	73
2.4.2. Degeneração extrínseca.....	77
2.4.2.1. Material e métodos.....	84
2.4.2.2. Resultados.....	88
2.4.2.3. Discussão dos resultados.....	102
2.5. Conclusões.....	113
3. Referências.....	116

## 1. Introdução

A actividade física deve ser encarada como uma agressão orgânica, particularmente para o tecido muscular esquelético, já que perturba, ainda que transitoriamente, a normal homeostasia das fibras musculares (90, 91, 315, 335, 351). Compreende-se assim que, conseqüente à prática de exercícios físicos, seja habitual a observação, quer de numerosas anomalias histológicas musculares (para refs. ver 9, 19), quer de inúmeras alterações sanguíneas, habitualmente designadas no seu conjunto por **resposta de fase aguda**, e que constituem bons indicadores (49, 51, 115) da presença de uma reacção inflamatória tecidual, induzida pela agressão muscular (17, 39, 299, 306).

Nos indivíduos saudáveis, a etiologia das lesões musculares motivadas pela actividade física é variável com o tipo de exercício (116). Exercícios muito violentos, de grande intensidade e curta duração e/ou que envolvam contacto físico, originam frequentemente lesões devido a contusões externas ou à aplicação de forças musculares excessivas (70, 262). Este tipo de alterações estruturais tem um aparecimento quase imediato (153) e consiste habitualmente em dilacerações e/ou rupturas de pequenas veias, das fibras musculares e/ou do tecido conjuntivo que as suporta, com frequente formação de hematomas (70).

Exercícios físicos inabituais e/ou extenuantes, de intensidade

moderada, mas prolongados no tempo, e aqueles que envolvem elevada percentagem de contracções excêntricas, também originam lesões musculares mas cuja etiologia é, no entanto, ainda pouco conhecida (9, 19, 88, 98, 208, 225).

É este tipo específico de lesões musculares não traumáticas, motivadas pelo exercício físico, o objecto central deste trabalho. Tal como Salminen & Vihko (267), Soares e Duarte (298), Asayama e Kato (20) e Duarte (88), designaremos esse conjunto de alterações histológicas por **Miopatia do Exercício**; se o termo "miopatia" parecer ser abusivo, o seu carácter necrótico, catabólico e inflamatório, apesar de transitório, justifica a designação. Da mesma forma, muitas das alterações funcionais e morfológicas musculares de origem endócrina, metabólica ou medicamentosa são também designadas por miopatias, apesar de transitórias e reversíveis (20, 141).

Na génese das anomalias estruturais e funcionais da miopatia do exercício parecem estar factores de natureza metabólica e mecânica, sendo a participação de cada um condicionada pelo tipo de exercício efectuado (para refs. ver 9, 88, 208). A fisiopatologia de todo este processo é, contudo, muito complexa e multi-factorial dado que, em última análise, a agressão muscular ocorre a nível bioquímico, o que torna muito difícil determinar não só o local exacto da sua actuação, como também os mecanismos responsáveis pela propagação das lesões e pelas suas manifestações histológicas

(88, 91, 298, 299). De facto, os estudos morfológicos das lesões da miopatia do exercício são habitualmente conjugados com estudos bioquímicos (262), já que estas alterações histológicas apenas se tornam microscopicamente aparentes algum tempo após a agressão celular (8, 148, 255). A exagerada elevação sanguínea de numerosos compostos sarcoplasmáticos relativamente ao volume total de tecido muscular portador de anomalias histológicas (329), demonstra claramente a insuficiência dos meios microscópicos para a detecção global das lesões celulares.

Curiosamente, a reacção das fibras e do tecido muscular a diversas categorias de estímulos lesivos parece ser idêntica (54), sendo as manifestações morfológicas dos processos de **degeneração intrínseca**, **extrínseca** e de **regeneração** musculares (55) semelhantes a diferentes tipos de agressões (54, 55). Compreende-se, assim, que as alterações histológicas musculares associadas à prática de exercícios físicos, sejam idênticas a muitas outras patologias musculares, tais como as distrofias, as miopatias inflamatórias (88, 91, 225) e as necroses isquémicas (292, 307). Como neste tipo de patologias a perda da homeostasia celular ao cálcio tem sido responsabilizada pela origem das lesões musculares (44, 101, 202, 343, 357), é provável que ela esteja também na origem da miopatia do exercício, dado que têm sido descritas alterações no metabolismo do cálcio em músculos sujeitos a exercícios exaustivos (34, 46, 87, 314). Existem portanto numerosas

evidências de que a perda da homeostasia celular ao cálcio pode originar ou contribuir para o aparecimento das anomalias estruturais musculares induzidas pelo exercício físico (para refs. ver 15, 19, 45).

Contudo, esta questão parece ser ainda mais complexa e controversa, já que, por um lado, estudos recentes sugeriram diferentes etiologias ou fisiopatologias para as várias lesões histológicas (9, 299) e, por outro, foi observado, *in vitro*, um mecanismo de lesão miofibrilar rápida dependente do íão cálcio, mas relacionado directamente com a presença de compostos reactivos de oxigénio (CRO) (94).

Diversos autores (164, 192, 198, 283, 359) têm demonstrado que a actividade física representa uma importante agressão oxidativa para o organismo, em geral, e para o tecido muscular, em particular. A origem desta agressão também é motivo de controvérsia, pois, para além das ubiquinonas mitocondriais (37, 185) e da fosfolipase A2 (PLA2) (94, 96), também a xantina-oxidase (XO) endotelial, pode ser apontada como uma provável fonte muscular de CRO quando, por oxidação de grupos tiol ou por proteólise, passa a utilizar o oxigénio como receptor de electrões (241, 344, 349). Por enquanto persiste a dúvida se: (a) estas alterações bioquímicas celulares serão uma consequência directa do estímulo agressivo e da consequente reacção celular, ou (b) resultarão indirectamente da acção dos leucócitos que infiltram o tecido muscular (338).

Por outro lado, caso resultem da acção directa do estímulo lesivo, (a) poderá ser a perda da homeostasia celular ao cálcio que está na origem da formação de CRO ou, pelo contrário, (b) poderão ser estes compostos, devido à peroxidação lipídica do sarcolema e das membranas do retículo sarcoplasmático, os responsáveis pelos aumentos sarcoplasmáticos acentuados daquele ião (85, 171).

Da mesma forma, ainda não está demonstrada uma relação directa entre os CRO e as lesões estruturais e ultra-estruturais musculares induzidas pelo exercício. Caso haja alguma relação, o papel da XO também não está ainda estabelecido, uma vez que, no tecido muscular esquelético, os estudos que valorizaram, por métodos directos, a acção desta enzima na génese dos CRO foram realizados com protocolos de isquemia/reperfusão (192, 214, 295, 339), situação que parece não ocorrer durante a actividade física em indivíduos e em animais de laboratório saudáveis (30, 31, 167, 226).

Este trabalho teve por objectivo responder a algumas destas questões.

Na primeira fase experimental (**2.4.1.1. - Cálcio sarcoplasmático e miopatia do exercício**) foi verificada a influência de um bloqueador dos canais lentos de cálcio, a nifedipina (274), na intensidade das lesões da miopatia do exercício. Numa segunda fase (**2.4.1.2. - Stress oxidativo e miopatia do exercício**), foi

quantificado indirectamente o stress oxidativo muscular motivado pelo exercício, através da determinação muscular das concentrações de glutathiona reduzida (GSH), bem como a influência da administração prévia de vitamina E nas variações agudas desse tripeptídeo muscular. Na última fase experimental (**2.4.2. - Degeneração extrínseca**), foi avaliada a influência da administração de alopurinol, um inibidor da XO (241), e de colchicina, um inibidor da polimerização microtubular (72) e, conseqüentemente, da funcionalidade leucocitária (340), sobre a intensidade do stress oxidativo muscular e sobre as alterações histológicas musculares induzidas pela actividade física aguda.

## 2. Miopatia do exercício

Alterada a homeostasia das fibras musculares e ultrapassada a capacidade de adaptação celular (90, 91, 148), começam a surgir transitoriamente nos músculos exercitados, alterações estruturais e ultra-estruturais (9, 119, 156, 262, 299, 338), acompanhadas ou sucedidas por alterações bioquímicas sanguíneas (48, 58, 65, 67, 227, 300, 316) e urinárias (242, 245, 352), pela sensação retardada de desconforto muscular (47, 64, 89, 119, 124, 137, 189, 285), pela diminuição da força máxima não atribuível à fadiga muscular (183, 227) e pelo aumento da captação muscular de produtos radio-activos (206, 229, 324).

Estas anomalias histológicas, induzidas pelos mais diversos tipos de exercício físico (13, 14, 19, 24, 88, 98, 103, 208), bem como os sinais e sintomas acompanhantes, são limitados no tempo (121, 293, 346) e no espaço (187, 262, 266, 329), restringindo-se apenas a um pequeno grupo de músculos, dependente do exercício realizado.

Nos animais de laboratório, os músculos mais atingidos são os extensores, relativamente aos flexores (187) e são as fibras oxidativas aquelas que revelam lesões mais intensas (17, 156, 187, 266). No Homem, apesar do padrão de distribuição das lesões pelos vários músculos poder ser idêntico ao do animal (13, 346), as fibras mais afectadas parecem ser as do tipo II (293),

particularmente as do tipo IIb (118, 121, 125).

## **2.1. Factores condicionantes**

No animal de laboratório, a intensidade do quadro anatomo-patológico não depende só do modelo animal utilizado (156, 277), do seu tipo de alimentação (178), do estado de inervação dos seus músculos (156), do espaço onde o animal se desenvolveu (127) e, provavelmente do seu sexo (5, 6, 25). A extensão das lesões, bem como a percentagem de fibras portadoras de alterações histológicas, também se relacionam, positivamente, com a intensidade e duração do exercício (210, 212, 262, 263, 266, 329), com a percentagem de contracções excêntricas efectuadas (17, 238, 299) e, negativamente, com o nível de treino (263, 268, 278). Relativamente à influência positiva (41, 78, 359) ou negativa (262) da idade do animal na intensidade das lesões, os dados da literatura são ainda contraditórios.

Alguns destes factores também parecem influenciar a resposta tecidual do músculo humano ao exercício mas, com excepção de certos trabalhos de natureza histológica (118, 122, 168, 188, 205, 230, 237), a maioria dos autores que usaram o Homem como modelo experimental, estudaram apenas evidências indirectas de lesão muscular. Desta forma, os resultados dos estudos que relacionaram os diferentes factores condicionantes com (a) a

intensidade dos sintomas clínicos (64, 67, 99, 137, 142, 231, 280, 281, 316), (b) as alterações funcionais musculares (66, 67, 99, 142, 167, 211, 227, 270, 285, 286), (c) a actividade plasmática de várias enzimas sarcoplasmáticas (10, 11, 48, 58, 64, 67, 99, 137, 150, 160, 172, 227, 280, 281, 300), (d) a concentração de 3-metil-histidina na urina (104, 242) e (e) a captação muscular de produtos radio-activos (229), não devem ser extrapolados para o quadro anatomo-patológico, uma vez que não avaliaram directamente a resposta tecidual à agressão induzida pelos exercícios efectuados.

## **2.2. Quadro anatomo-patológico**

Apesar da descrição das lesões histológicas nem sempre ser concordante, em consequência das diferentes metodologias utilizadas (88), o quadro anatomo-patológico parece ser idêntico no Homem e no animal de laboratório (9, 13, 14, 15, 63, 98, 208, 348) e é variável com o tempo decorrido após a finalização do exercício físico (178, 187, 205, 268, 293, 299, 346). É composto por lesões sub-letais e/ou letais, com posterior necrose segmentar, de carácter focal (9, 205, 266, 299), atingindo pequenos segmentos das fibras musculares e por invasão tecidual de leucócitos, particularmente de monócitos (17, 88, 299).

À microscopia de luz, este quadro anatomo-patológico apresenta irregularidades do padrão estriado (9, 119, 121, 122, 124,

125 230, 299), vacuolização sarcoplasmática (88, 132), núcleos picnóticos (132) e em posição central (17, 188, 294, 329) em mais de 3% das fibras observadas (88, 92), palidez de coloração ao ácido periódico de Schiff (73, 88 293, 346), áreas de necrose segmentar (237, 264, 299) e invasão leucocitária (17, 294, 329, 338).

Em microscopia electrónica são descritas numerosas alterações, tais como a disrupção e a extensão das linhas Z para as bandas I adjacentes (9, 121, 122, 125, 235, 188, 205), a disrupção do sarcolema (17, 125), a diminuição da largura das bandas I (88), a presença de lisossomas secundários (9, 88, 121), o aparecimento de "swelling" mitocondrial (212, 235, 237) com algumas mitocôndrias portadoras de grânulos para-cristalinos (121), a dilatação do retículo sarcoplasmático (88, 212, 346), o alargamento do espaço intermiofibrilar (88, 237), a lise focal das miofibrilas com preservação do padrão estriado (205, 346), a diminuição da densidade de volume do glicogénio inter-fibrilar (174, 237), a evidência de fibroblastos e de células satélite com francos sinais de activação (88, 132) e o aumento acentuado do número de vesículas citoplasmáticas nas células endoteliais adjacentes às fibras lesadas (88, 346).

Contrastando com as lesões agudas de origem traumática, este estado patológico do músculo esquelético é caracterizado pela sua natureza retardada (9, 88, 178), com a máxima exuberância entre o 1º e o 3º dia após a finalização do exercício (17, 111, 147, 168, 178, 187, 209), seguindo-se o processo de reparação muscular, por

aproximadamente 1 a 3 semanas (15, 268).

### 2.3. Etiologia

Estas alterações histológicas são consequência de um uso muscular excessivo ou inabitual (9, 19), o qual provavelmente motivaria não só um aumento tensional nos elementos contrácteis e elásticos (9, 13, 14, 21, 120, 134, 208), mas também um aumento do metabolismo e da temperatura muscular (133, 134, 212, 232, 269), com a consequente lesão estrutural.

A existência: (a) de uma relação directa entre a intensidade do exercício e a intensidade dos sintomas e sinais acompanhantes (212, 262, 279, 316), (b) de uma semelhança aparente, quantitativa e temporal, com os fenómenos de lesão e de regeneração induzidos por isquemia (292, 307) e por hipertermia (42, 157), (c) de uma maior incidência de rabdomiólise em indivíduos destreinados quando realizam exercícios físicos em ambientes quentes (181) e (d) do efeito protector de enzimas anti-oxidantes nas lesões observadas após exercício (359), sugere uma **origem metabólica** para estas alterações histológicas motivadas pela actividade física aguda.

Com base em algumas destas observações e nos seus dados experimentais, Salminen & Vihko (268) sugeriram que as lesões descritas resultam de alterações metabólicas e electrolíticas motivadas pelo exercício, as quais induziriam o aparecimento de

edema intra e extra-celular (39, 285, 286), com aumento da pressão hidrostática tecidual (123) e dificuldade de perfusão tecidual, originando, assim, uma situação de isquemia muscular em tudo semelhante à verificada no síndrome do compartimento tibial anterior (341).

Opondo-se aos resultados de Fridén et al. (123), e consequentemente à teoria isquémica, estão as observações de Newham & Jones (226) e de Binkhorst et al. (31), que demonstraram não existir qualquer variação da pressão hidrostática muscular após exercício, em compartimentos musculares mais complacentes, e as de Binkhorst et al. (30) que não encontraram qualquer anomalia morfológica capilar indicadora de obstrução do fluxo durante o exercício. Também os resultados de Abraham (2), Newham et al. (231) e de Jones et al. (167), não revelando qualquer aumento da actividade eléctrica em repouso nos músculos com evidências indirectas de lesão, contrariam as observações de deVries (82, 83) e a sua "teoria espástica". De facto, ao constatar um aumento da actividade eléctrica nos músculos em repouso previamente exercitados (82, 83), deVries (83) defendia que o quadro clínico consequente à realização de exercícios físicos exaustivos tinha uma etiologia metabólica, de carácter isquémico, induzida por uma vasoconstricção arterial.

O tecido muscular esquelético é relativamente tolerante à isquemia quando comparado com o músculo cardíaco (Para refs. ver

86, 327), sendo necessários períodos bastante longos de interrupção de fluxo para motivar o aparecimento de lesões necróticas celulares (165). Da mesma forma, o facto das contracções excêntricas, relativamente às concêntricas e isométricas:

(a) terem um metabolismo aeróbio (16, 21, 29, 182, 270, 279) e anaeróbio (16, 182, 279, 302) mais reduzido;

(b) gerarem, para a mesma força muscular, uma maior força por fibra muscular activada, em virtude do menor número de unidades motoras recrutadas (1, 21, 29, 139, 182, 228);

(c) poderem promover maiores elevações da temperatura muscular (223, 270);

(d) originarem lesões musculares mais intensas (9, 17, 88, 230, 299) e proporcionais à tensão muscular desenvolvida (210), vem colocar em causa a origem metabólica e sugerir uma **etiologia mecânica** para estas alterações histológicas. Estas observações vieram reforçar a teoria de Walmsley et al. (342) que defendia a exclusividade da componente excêntrica, por sobrecarga mecânica, na indução destas lesões.

Se, aparentemente, estes dados parecem questionar a etiologia metabólica das lesões da miopatia do exercício, resultados recentes vieram, contudo, reforçar a importância desse tipo de sobrecarga na génese dessas alterações estruturais (9, 88, 299). De acordo com as observações destes autores, o quadro anatomo-patológico observado em murganhos, sujeitos a diferentes protocolos de corrida em tapete

rolante, foi variável de acordo com a sobrecarga, metabólica ou mecânica, a que os animais foram sujeitos, sugerindo diferentes origens para as diferentes lesões descritas. Também a constatação de uma maior percentagem de fibras lesadas, bem como da exclusividade de algumas dessas anomalias estruturais nos animais sobrecarregados metabolicamente, sugere uma origem metabólica para aquele tipo de lesões (88).

#### **2.4. Fisiopatologia**

Quando as células de um órgão ou tecido são agredidas, são activadas determinadas vias de degradação celular que promovem a proteólise e a lipólise das suas estruturas (para refs. ver 15, 19), motivando o aparecimento de alterações funcionais, estruturais e ultra-estruturais, com repercussões na viabilidade celular (148). Apesar desta constatação, os resultados da literatura referentes à fisiopatologia da resposta celular à agressão são bastante contraditórios (para refs. ver 77, 109, 110), não estando ainda definidos os mecanismos responsáveis pela ultrapassagem do ponto crítico de perda da viabilidade das células (195). É provável que existam mecanismos comuns de resposta celular à lesão (318), dado que não deixa de ser surpreendente a similaridade com que os diferentes tipos de células, de origem animal e vegetal, respondem às mais diversas agressões (71).

Ao nível do tecido muscular esquelético, também os estímulos lesivos, letais ou sub-letais, independentemente da sua origem, motivam o início dos fenómenos de degradação celular, processo designado por **degeneração intrínseca** das fibras (55, 244). As fibras agredidas iniciam uma autodestruição, lisando as miofibrilas e promovendo disrupção das mitocôndrias, do sarcolema e do retículo sarcoplasmático (55, 244). As anomalias histológicas musculares motivadas por este processo, apesar de apresentarem algumas características próprias, relacionadas com a diferenciação celular, constituem um bom exemplo da acentuada analogia morfológica verificada na resposta dos diferentes tecidos à agressão em geral (88). O facto da resposta morfológica muscular induzida pelos diferentes tipos de estímulos lesivos ser também análoga (54, 116, 244), reforça ainda mais a hipótese dos mecanismos bioquímicos de degradação intrínseca serem comuns às diferentes agressões (13, 14, 101, 221, 141, 225).

O processo de **degeneração extrínseca**, mediado pela resposta inflamatória e a consequente infiltração leucocitária (49, 305, 306), parece ser coincidente com a divisão e transformação das células satélite em mioblastos (244, 306), principalmente (276) nas regiões adjacentes às fibras portadoras de qualquer tipo de lesão, observável ou não em microscopia óptica (78, 275). Apesar das células satélite serem logo activadas com o aparecimento das alterações estruturais ou funcionais do sarcolema (55), os sinais microscópicos dessa

activação são somente identificados algumas horas depois (244). As células satélite que evoluíram para mioblastos podem agora fundir-se à fibra adjacente ou evoluir para miotúbulos e, dessa forma, para fibras adultas com posterior re-inervação (272, 273). Nas fibras agredidas, a migração central dos núcleos nas áreas lesadas, ou adjacentes a estas, faz também parte do processo de **regeneração muscular** (272). Caso a integridade das membranas basais tenha sido poupada pela agressão (55, 154), uma a três semanas depois, as fibras inicialmente lesadas apresentam já um aspecto normal (17, 116, 168, 187, 275), com exceção da presença de alguns núcleos centrais (268).

Em última análise, todas as anomalias histológicas descritas são perfeitamente explicadas pelos processos de degeneração, intrínseco e extrínseco às fibras (56), e de regeneração tecidual, contínuo e/ou descontínuo (151), motivados pela incapacidade das fibras em restabelecer a constância do seu meio interno (148) em determinados locais do seu sarcoplasma (15).

#### **2.4.1. Degeneração intrínseca**

Os resultados dos múltiplos trabalhos que estudam o fenómeno de lesão e morte celular em diferentes tecidos (para refs. ver 71, 107, 109, 110, 112), têm contribuído para o conhecimento dos mecanismos bioquímicos de degeneração intrínseca das fibras

musculares (19). A maioria dos estudos nesta área têm utilizado principalmente os hepatócitos (71, 107, 108, 112, 194, 195, 233, 271, 303, 313), apesar de existirem já bastantes trabalhos a usar fibras musculares cardíacas (309, 317, 327) e esqueléticas (38, 93, 94, 95, 96, 213).

Em consequência da observação do paradoxo do cálcio, fenómeno verificado pela primeira vez no coração e mais tarde no tecido renal (239, 317, 327), a atenção dos diversos estudos sobre lesão e morte celular começou a centrar-se na homeostasia celular do ião cálcio (93, 94, 95, 96, 107, 108, 271, 303, 313, 318), tendo sido descritos, em diferentes tecidos, elevadas concentrações daquele ião durante os processos de necrose (para refs. ver 77, 109, 110) e apoptose celulares (para refs. ver 71, 112). Se estas concentrações anormais de cálcio estão, de facto, na origem (271) ou se são apenas a consequência (195) das alterações funcionais e morfológicas das membranas da célula consequentes aos fenómenos de lesão e/ou morte celular (303), é ainda uma questão por esclarecer.

O facto do metabolismo celular do ião cálcio estar dependente de determinados compartimentos, tais como a membrana plasmática, o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e o núcleo, cuja integridade morfológica e/ou funcional parece ser decisiva para a vitalidade celular (para refs. ver 71), vem dar ainda mais importância à hipótese do cálcio; Gunter e Pfeiffer (135) chegam

mesmo a imputar mais de 95% das situações de morbidade celular à falência dos mecanismos responsáveis pela manutenção dos baixos níveis de cálcio intra-celular.

Numerosos trabalhos vieram, no entanto, pôr em causa a teoria do cálcio na gênese da lesão e morte celular, nomeadamente os estudos em hepatócitos efectuados quer por Okuda et al. (239), demonstrando que as baixas concentrações de cálcio extra-celular podem favorecer a morte dos hepatócitos, quer por Lemasters et al. (194, 195) e Nieminen et al. (233), evidenciando o aparecimento de morte celular na ausência de quaisquer alterações de concentração do ião cálcio intra-celular.

Estes resultados, que aparentemente invalidam a teoria do cálcio, não excluem, no entanto, a responsabilidade desse ião na lesão e morte celular uma vez que: (a) 60 a 80% do conteúdo celular em cálcio se encontra ligado à face extra-celular da membrana, podendo assim ocorrer alterações citoplasmáticas significativas no metabolismo do cálcio sem que as concentrações totais daquele ião se alterem (35), (b) a perda da homeostasia celular àquele ião pode não ser o fenómeno determinante para o estabelecimento de lesões celulares irreversíveis (287), apesar de poder induzir esse fenómeno (94) e (c) é possível a existência de outros mecanismos de morte celular, dependentes e independentes do ião cálcio (71, 109, 110, 303).

De facto, existem hoje bastantes evidências que atribuem a um conjunto de substâncias, os denominados CRO (27), também

eles relacionados com o metabolismo celular do ião cálcio (77), um importante papel na mediação de várias formas de lesão tecidual (113). Se os CRO estão na origem ou se são consequência dos mecanismos de lesão celular e tecidual é uma questão que continua por esclarecer (136, 247).

Todas as células que utilizam o oxigênio como uma fonte energética sintetizam constantemente este tipo de compostos (289, 290). Em situações de homeostasia, a produção de CRO é inofensiva para as células, uma vez que estas possuem mecanismos, enzimáticos e não-enzimáticos, que as protegem desses compostos (para refs. ver 77, 207, 284, 290). Nessas situações, a produção e a remoção dos CRO encontra-se num equilíbrio débil (62) que é facilmente modificado com a agressão celular (290). Inúmeros locais sub-celulares têm sido responsabilizados pela formação dos CRO, nos quais se incluem as membranas do citoplasma, do retículo endoplasmático, dos lisossomas e do núcleo, e as mitocôndrias, os peroxisomas e o citosol (para refs. ver 20, 77, 117).

Por definição, as células são sujeitas a uma situação de "stress oxidativo" (o qual, por sua vez, motiva uma agressão oxidativa) quando, relativamente à situação homeostática, a relação pro-oxidante/anti-oxidante celular se eleva (289, 290). Estas situações de stress oxidativo parecem estar envolvidas na fisiopatologia da lesão celular motivada por diferentes etiologias, tais como isquemia/reperfusão (113, 253), radiações, agentes tóxicos,

deficiências nutricionais (77) e estados inflamatórios e infecciosos (146, 349).

Os CRO podem motivar lesão celular pela indução de modificações covalentes nas proteínas ou ácidos nucleicos (77) e pela peroxidação lipídica, com as consequentes alterações na arquitectura e na funcionalidade das membranas celulares (108, 113, 234, 330). Estas membranas, citoplasmáticas e dos organelos, são particularmente sensíveis aos CRO devido à grande quantidade de ácidos gordos poli-insaturados presentes nos fosfolípidos (22). A disrupção das membranas lisossómicas com libertação das enzimas hidrolíticas é disso um bom exemplo (61). Os CRO afectam também negativamente a actividade de várias enzimas (68, 330), entre as quais se destacam as ATPases transportadoras de cálcio (85, 349) e de sódio/potássio (130), com todas as alterações iónicas nefastas daí consequentes (309, 310).

Se a perda da homeostasia celular ao ião cálcio pode, aparentemente, motivar a produção de CRO, estes compostos podem também estar na origem dessa desregulação iónica (85, 171, 191). Estes dois fenómenos parecem interligados, podendo contribuir simultaneamente para a indução de lesão e/ou morte celular (71, 77, 109, 110). Assim, depleções acentuadas das concentrações hepáticas de GSH são seguidas pela perda celular da homeostasia ao cálcio, pelo aparecimento de produtos consequentes do fenómeno de peroxidação lipídica e, a nível morfológico, pela formação de "blebs" (77).

#### 2.4.1.1. Cálcio sarcoplasmático e miopatia do exercício

Nas fibras musculares, estrutural e funcionalmente normais, as concentrações totais do íon cálcio livre pouco diferem daquelas encontradas no fígado, rim e tecido cerebral (35). As baixas concentrações sarcoplasmáticas deste íon, cerca de 10000 vezes inferiores às quantificadas no espaço extra-celular (24, 35), são determinantes para uma eficiente funcionalidade da célula (53). Alterações súbitas e transitórias (19) dessas concentrações funcionam como um segundo mensageiro para a comunicação intra-celular (131, 250, 258, 325), desempenhando um importante papel na regulação de numerosos processos (144, 353), dos quais se salientam a síntese (170) e a degradação proteica (26, 105, 190).

Da mesma forma que nos restantes tecidos (71), a perda da homeostasia celular ao íon cálcio, com as consequentes alterações metabólicas celulares, tem sido referida, por diversos autores, como um dos mecanismos intrínsecos indutores de lesão muscular, comum a muitos estímulos lesivos (13, 44, 101, 158, 221). Na base deste princípio estão os inúmeros trabalhos efectuados no tecido muscular, *in vivo* e *in vitro*, cujos resultados têm demonstrado:

(a) elevadas concentrações do íon cálcio nas fibras musculares necrosadas (26, 44);

(b) que concentrações intra-celulares sustentadas do íon cálcio activam a PLA2 e promovem lesão dos miofilamentos (94,

96) provavelmente por activação das calpaínas (105, 158, 190);

(c) elevadas concentrações do ião cálcio no sarcoplasma de fibras lesadas no Homem (32, 321, 322, 357) e no animal (321, 322) portadores de distrofias musculares;

(d) atenuação das lesões musculares motivada por agentes ionóforos do cálcio (96);

(e) alterações funcionais sarcolemas induzidas pelo aumento das concentrações do ião cálcio no meio extra-celular (38);

(f) atenuação dessas alterações funcionais pela remoção do ião cálcio extra-celular (159) ou pela inibição da PLA2 (38);

(g) diminuição das anomalias morfológicas, em animais portadores de distrofias musculares congénitas, pela paratiroidectomia (158);

(h) acumulação de cálcio radioactivo pelos músculos deficientes em selénio, antecedendo as manifestações histológicas e bioquímicas (158);

(i) que a administração de agentes bloqueadores dos canais lentos de cálcio atenuam as alterações funcionais do sarcolema (158);

(j) diminuição do catabolismo das fibras musculares com a remoção do ião cálcio extra-celular (105);

(k) que a inibição da ATPase transportadora do ião cálcio do retículo sarcoplasmático motiva o aparecimento de lesões

nos miofilamentos (93).

Estes processos destrutivos, aparentemente activados pelo ião cálcio, seriam idênticos aos descritos para a célula em geral e envolveriam: (a) a perda do gradiente protónico mitocondrial (44), (b) a activação das calpaínas (76, 357, 358), (c) a activação da PLA2 (94, 96, 159), (d) o aumento da função lisossómica (26), e (e) a formação de CRO (93, 94).

No entanto, a constatação de que as concentrações sarcoplasmáticas do ião cálcio livre pouco diferem entre as fibras musculares estruturalmente normais em contracção e aquelas com alterações morfológicas em repouso (19), pode suscitar algumas dúvidas sobre a importância do ião cálcio na génese dessas lesões. Os resultados de Duncan (93) vieram, contudo, esclarecer a questão. De acordo com este autor, a indução da lesão muscular não depende da intensidade dos picos de concentração do ião cálcio, mas sim da sua duração no sarcoplasma.

Da mesma forma que nas distrofias musculares e miopatias inflamatórias (8, 141, 158), é muito provável que a perda da homeostasia celular ao ião cálcio esteja implicada na fisiopatologia das lesões da miopatia do exercício. Esta suposição é baseada não só na similaridade das lesões da miopatia do exercício com aquelas observadas *in vitro* e motivadas pela alteração do metabolismo desse ião (93, 94), mas também no conhecimento de que os diferentes mecanismos das fibras musculares responsáveis pela homeostasia do

ião cálcio podem ser influenciados durante a actividade física (para refs. ver 19, 180). O exagero tensional, as alterações de pH sarcoplasmático, o aumento de temperatura, as alterações funcionais dos canais de cálcio e a formação de CRO, são exemplos de factores que, durante ou após o exercício físico, podem condicionar esses mecanismos (19, 45, 98) e, conseqüentemente, as concentrações do ião cálcio livre no sarcoplasma.

Os trabalhos de Bonner et al. (34), demonstrando uma elevada concentração de iões cálcio nas mitocôndrias, reflexo da sua elevação sarcoplasmática (135, 282) em fibras portadoras de lesões motivadas pelo exercício exaustivo, e os de Amelink et al. (7), demonstrando que o dantroleno, um inibidor da libertação desse ião pelo retículo sarcoplasmático, reduz as lesões musculares motivadas pelo exercício físico, vieram reforçar a hipótese do ião cálcio estar implicado nos mecanismos de degeneração intrínseca das fibras musculares. Essas alterações nas concentrações do ião cálcio sarcoplasmático poderão resultar não só da perda da integridade e/ou da alteração da permeabilidade, quer do sarcolema (17, 215), quer da membrana do retículo sarcoplasmático (7, 180), induzidas por sobrecarga mecânica e/ou metabólica (9, 299), mas também das alterações funcionais das ATPases transportadoras de cálcio (45, 46, 314).

A elevação da temperatura muscular, observada durante a actividade física (40, 134, 180), altera a fluidez dos lípidos do

sarcolema e das membranas dos vários organelos (19), motivando o aparecimento de alterações funcionais (45). Entre estas alterações, contam-se a diminuição da captação do ião cálcio pelo retículo sarcoplasmático (155) e o aumento da permeabilidade àquele ião pelo sarcolema (19). Está também descrita uma disfunção mitocondrial com desacopulação da fosforilação oxidativa (40), diminuindo, dessa forma, a produção por unidade de tempo de adenosina trifosfato (ATP). Tendo em consideração o papel tampão desempenhado pelas mitocôndrias nas concentrações do cálcio citosólico (282), elevações sarcoplasmáticas deste ião são inicialmente atenuadas pela captação iónica destes organelos (135). As concentrações de cálcio na matriz mitocondrial são determinantes para o controlo de numerosos processos metabólicos destes organelos (140, 355) e, quando elevadas, tendem também a desacopular a fosforilação oxidativa (140, 135, 213, 360). Coincidindo com os fenómenos descritos, Tian & Yang (314) observaram, no músculo soleus do rato após exercício físico, um aumento do cálcio na matriz mitocondrial e uma diminuição não só das concentrações de ATP mas também da actividade da ATPase transportadora do ião cálcio.

Sendo o consumo muscular de ATP proporcional à intensidade do esforço desenvolvido (40, 90, 133), seria de esperar que exercícios extenuantes induzissem diminuições das concentrações desse composto nas fibras musculares. Se alguns dos resultados da

literatura não corroboram esta opinião (193), outros descrevem, após o exercício físico, diminuições das concentrações de ATP (297) e de fosfocreatina (59) nos homogeneizados musculares. Também em estudos com ressonância magnética nuclear (354), foram observadas elevações das concentrações de adenosina difosfato (ADP) nos músculos activos. Mesmo que as concentrações de ATP nos homogeneizados musculares possam ser normais, nada exclui a existência de focos de depleção desse composto em determinadas zonas das fibras, principalmente nos locais de maior degradação de ATP por unidade de tempo (152). Esta possibilidade é reforçada pelo facto de existir alguma dificuldade de difusão rápida das moléculas de ATP e de ADP entre os locais de produção e os de degradação, consequência das dimensões relativamente grandes dessas moléculas e da pequena quantidade de água livre sarcoplasmática (para refs. ver 133). Estas variações nas concentrações destes compostos, com ou sem diminuição da energia livre resultante da degradação do ATP, podem afectar negativamente a funcionalidade das ATPases transportadoras de cálcio (180). De facto, após um exercício intenso de curta duração em ratos, Bonner et al. (34) verificaram uma diminuição da captação máxima do ião cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Diminuições desta captação iónica, proporcionais à duração do exercício físico, foram também observadas por Byrd et al. (46), sendo mais intensas nas fibras lentas. As alterações funcionais do retículo sarcoplasmático são

aparentemente coincidentes com o aparecimento das alterações morfológicas deste organelo (45), que integram o quadro ultra-estrutural da miopatia do exercício (88).

Tendo em consideração a exagerada produção de CRO durante a actividade física (para refs. ver 3, 20, 162, 163, 249), para além da peroxidação lipídica que estes compostos podem motivar, com alterações da permeabilidade das membranas ao ião cálcio (24, 85, 171), com a sua conseqüente difusão do interstício ou do retículo para o citosol, os CRO podem também oxidar os grupos tiol das ATPases transportadoras de cálcio diminuindo a funcionalidade destas enzimas (45, 180), da mesma forma que o observado experimentalmente no tecido muscular estriado cardíaco (85, 171).

Também durante a actividade física exaustiva se verifica a acumulação de metabolitos ácidos no sarcoplasma, com conseqüentes reduções do pH muscular (219, 260, 261) cujos valores, diferindo de autor para autor, parecem depender do tipo de exercício e da técnica de determinação utilizada (169, 259). Além das repercussões negativas sobre a actividade de numerosas enzimas das diferentes vias catabólicas fornecedoras de energia (40), a diminuição do pH reduz também a actividade das ATPases transportadoras do ião cálcio na membrana do retículo sarcoplasmático e a afinidade desse ião para a troponina C (90, 91, 331, 351), ficando assim criadas condições para a elevação da concentração do ião cálcio livre no sarcoplasma (40, 90, 91, 351).

Da mesma forma que o verificado nas células cardíacas, é provável que a redução do pH sarcoplasmático possa também alterar a distribuição dos lípidos e das proteínas sarcolemais com perda da interacção do sarcolema com o cito-esqueleto das células (para refs. ver 331), motivando alterações morfológicas e funcionais desta membrana provavelmente induzidas pela acção das calpaínas previamente activadas pelo cálcio (98).

A agressão tensional do sarcolema, das membranas do retículo sarcoplasmático e da membrana basal, também parece ocorrer com o aumento da actividade contráctil, particularmente com as contracções excêntricas (120, 200). De facto, durante uma contracção deste tipo os níveis de força desenvolvidos podem ultrapassar entre 50 a 100% os valores tensionais observados durante uma contracção isométrica (19). Para além deste exagero tensional, nas contracções excêntricas o alongamento dos sarcómeros não é uniforme, existindo sarcómeros, quer com hiper-estiramento, quer com reduzidas alterações dimensionais relativas à situação de repouso (69, 120). As alterações do padrão estriado observadas após a finalização do exercício, no Homem (119, 121, 124, 125) e no animal de laboratório (9, 17, 88, 299), podem também ser explicadas, para além da acção das calpaínas (105, 190, 357), pela grande sobrecarga mecânica a que alguns sarcómeros ficam assim sujeitos. Atendendo às variações de espessura das linhas Z verificadas nos diferentes tipos de fibras (128, 273), a maior

frequência com que estas anomalias ocorrem nas fibras do tipo II (118, 121, 125, 293), reforça a origem tensional para estas alterações do padrão estriado. Considerando também que a maior parte da tensão passiva tem origem no sarcolema quando o comprimento dos sarcômeros ultrapassa os 140-150% do comprimento em repouso (19), as lesões desta membrana podem ocorrer em regiões adjacentes a estes sarcômeros hiper-alongados, criando-se assim condições para a difusão do ião cálcio do interstício para o sarcoplasma. Assim, a elevação no plasma de numerosos compostos sarcoplasmáticos pode ser explicada por esta sobrecarga mecânica com a consequente disrupção sarcolemal (17, 227, 300). Também os resultados de Duan et al. (87), descrevendo elevadas concentrações do ião cálcio na matriz mitocondrial em músculos de ratos sujeitos a exercício excêntrico, pouco ou nada atenuadas pela acção do verapamil, reforçam a probabilidade de ocorrer perda da integridade do sarcolema com a actividade física. Com os trabalhos de McNeil & Khakee (215) estas suspeitas foram confirmadas. De facto, estes autores demonstraram claramente que essas soluções de continuidade ocorrem no sarcolema das fibras do *triceps surae* mesmo em ratos sedentários, sofrendo, como seria de esperar, um agravamento significativo com o exercício físico.

Os resultados de Duan et al. (87) parecem-nos muito importantes pois, ao demonstrarem que os agentes quelantes do ião cálcio atenuam significativamente as lesões musculares observadas,

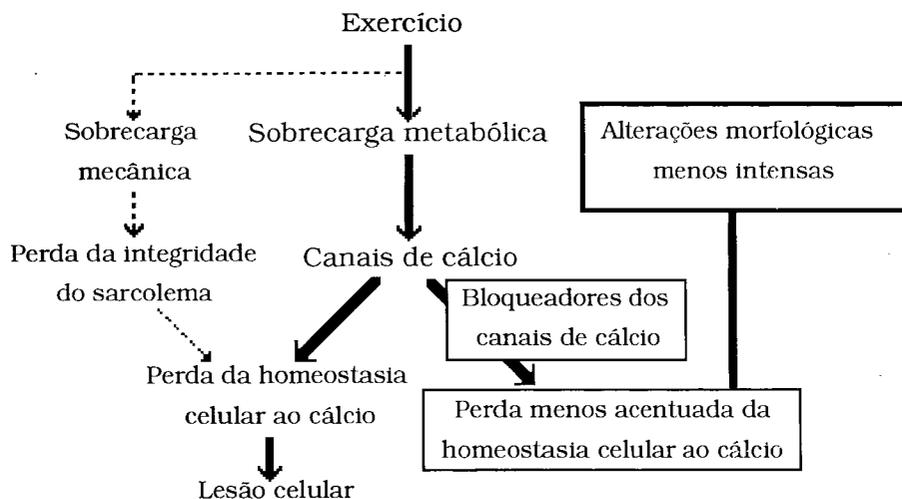
vêm reforçar ainda mais a teoria do íão cálcio na gênese das lesões de miopatia do exercício. No entanto, estes autores contrariam alguns resultados da literatura, ao sugerirem que os canais lentos de cálcio não são determinantes para a elevação desse íão no citosol. De facto, em situações de intensa actividade muscular, há indicações de que os canais lentos de cálcio, localizados nos túbulos T (33) podem contribuir para a elevação das concentrações do íão cálcio no sarcoplasma (129).

#### **Hipótese a estudar:**

A hipótese que colocamos (Fig. 1) é a de que em situações de agressão mecânica para a fibra (88, 299), as soluções de continuidade do sarcolema (215) ou das membranas do retículo sarcoplasmático motivadas pela exagerada tensão (19), permitem a difusão fácil do íão cálcio para o sarcoplasma, não sendo em nada atenuada pelos agentes bloqueadores dos canais lentos desse íão. No entanto, quando a agressão é predominantemente metabólica (88, 299), os canais lentos de cálcio podem contribuir decisivamente para as elevações de cálcio sarcoplasmático (129) e, dessa forma, para as alterações histológicas musculares motivadas por um exercício físico inabitual e/ou exaustivo.

Para testarmos esta hipótese verificámos a acção de um bloqueador dos canais lentos de cálcio, a nifedipina (252), na

exuberância do quadro histológico motivado por um exercício físico exaustivo, metabolicamente agressivo para o músculo (9, 88, 299).



**Figura 1** - Esquema representativo da hipótese formulada.

#### 2.4.1.1.1. Material e métodos

Foram utilizados 32 murganhos da estirpe Charles River CD1, machos, com 11/12 semanas de idade e com um peso de 25/30 gramas. Os animais tiveram livre acesso à água e à alimentação, e foram mantidos à atmosfera normal, com uma temperatura de 21/25 graus centígrados e com uma variação cíclica de 12 horas luz/12 horas escuro. Os animais foram distribuídos por quatro grupos (8 animais/grupo): grupo controlo (C), grupo nifedipina (N), grupo exercício (EX) e grupo exercício+nifedipina (EX+N).

Os animais do grupo C, para além da actividade normal em gaiola (com uma área de 10x20 cm) não fizeram qualquer exercício nem foram submetidos à administração de qualquer droga. Nos 3 dias anteriores ao seu sacrifício, os animais dos grupos N e EX+N foram sujeitos à acção da nifedipina, 1mg/Kg/dia, *per os* (220). Este fármaco (*Adalat*®, Bayer AG) foi diluído na água fornecida aos animais com base na observação prévia de que cada animal sujeito ao exercício físico proposto ingere, entre 13 a 15 ml/água/dia, enquanto que os murganhos não exercitados ingerem cerca de 10 a 11 ml/água/dia. Os animais dos grupos EX e EX+N foram sujeitos a exercício físico em tapete rolante, em plano horizontal, a uma velocidade de 1000 m/hora (correspondente a 80% da sua velocidade máxima para esta situação), durante 60 minutos. A administração de nifedipina aos murganhos do grupo EX+N teve início 23 horas antes da realização do protocolo de corrida.

Antes da realização dos protocolos de esforço, os animais realizaram um período de corrida (10 minutos) com velocidade reduzida por forma a permitir uma adaptação prévia à situação experimental. Em qualquer das situações experimentais, o exercício foi executado com uma constante estimulação táctil das caudas dos animais. O tapete rolante utilizado para a realização do protocolo de corrida, da marca AVIONICS, foi previamente adaptado às necessidades de utilização impostas pelos animais através da delimitação de uma área de corrida, de forma rectangular (40x80

cm), a qual foi conseguida com a acopulação de paredes verticais de madeira à estrutura do tapete (88).

Todos os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, 48 horas após a finalização dos protocolos de corrida e/ou logo após a finalização da administração de nifedipina. Foi executada em seguida uma toracotomia, com exposição do músculo cardíaco, seguida por uma injeção intra-ventricular esquerda de 3 ml de gluteraldeído a 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio a 2 M, pH 7.2 - 7.4. Após este passo foi retirado o músculo soleus esquerdo e preparado para observação em microscopia óptica e electrónica segundo as técnicas descritas por Duarte (88).

Após serem extraídos, os músculos foram seccionados em cubos de 1 mm de aresta e fixados durante 4 horas em gluteraldeído (2.5% de gluteraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio a 2 M, pH 7.2 - 7.4). Foram posteriormente lavados em solução tampão, durante 1 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 que durou 2 dias. Todos os procedimentos foram realizados a uma temperatura de 4°

C, com exceção da fase de inclusão, que foi executada em estufa a uma temperatura de 60° C. Foram realizados dois tipos de corte: (1) os semi-finos, com uma espessura de 1 µm, destinados à observação em microscopia óptica e (2) os ultra-finos, com uma espessura de 500 Å, destinados 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 colados por aquecimento (2 a 3 minutos) e corados com azul de toluidina até fumegar, ou sujeitos ao ácido periódico a 0.5% (2 minutos) e ao reagente de Schiff até este se tornar vermelho escuro, tendo-se corado posteriormente com o azul de metileno.

Para o estudo em microscopia de luz foi utilizado um fotomicroscópio óptico da marca *Leitz Dialux 20*. As fotografias, obtidas com filmes de sensibilidade 32 ASA (*Panatomic X*), foram realizadas com as dimensões de 10x15 cm. O microscópio electrónico (*Jeol 100 cx II TEM*) foi utilizado a 60Kvolts. A dimensão das fotografias obtidas foi de 18.5x13 cm.

Para a quantificação das lesões, foi determinada a incidência das anomalias celulares nos quatro grupos, pelo cálculo da média da percentagem de fibras lesadas relativamente ao número total de

fibras observadas em microscopia de luz. A observação em microscopia electrónica teve por objectivo analisar qualitativamente as alterações histológicas observadas em microscopia óptica.

Os dados foram tratados estatisticamente através da média (M) e do desvio padrão (sd). As diferenças de médias foram testadas a partir da ANOVA I. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

#### 2.4.1.1.2. Resultados

O Quadro 1 ilustra a média da percentagem de fibras lesadas em cada grupo.

**Quadro 1** - Percentagem de fibras lesadas e portadoras de lesões específicas nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Fibras lesadas	IPE	NC	VAC	NECR
C (1)	0	0	0.7 (±1.30)	0	0
N (2)	0	0	0.6 (±1.60)	0	0
EX (3)	51.0 (±10.37)	16.0 (±2.98)	35.2 (±11.65)	33.3 (±10.64)	9.1 (±5.30)
EX+N (4)	38.2 (±6.90)	7.1 (±3.40)	7.8 (±3.70)	33.6 (±6.90)	2.5 (±1.80)
(p<0.05)	1 vs. 3 2 vs. 4 3 vs. 4	1 vs. 3 2 vs. 4 3 vs. 4	1 vs. 3 2 vs. 4 3 vs. 4	1 vs. 3 2 vs. 4	1 vs. 3 2 vs. 4 3 vs. 4

Os valores são médios (± desvio padrão); IPE - irregularidades do padrão estriado; NC - núcleos centrais; VAC - vacuolização sarcoplasmática; NECR - necrose segmentar.

Nos cortes observados nos grupos C e N não foram encontradas alterações do padrão morfológico normal. Apesar de terem sido encontrados núcleos centrais em 0.7% das fibras do grupo C e 0.6% das do grupo N, não foram verificadas vacuolizações sarcoplasmáticas nem quaisquer irregularidades no padrão estriado. Também não foram encontrados focos de necrose nem qualquer tipo de célula infiltrativa nos dois grupos. As fibras musculares das lâminas coradas com ácido periódico de Schiff possuíam uma tonalidade homogênea. Na análise ultra-estrutural, não foram notadas quaisquer alterações.

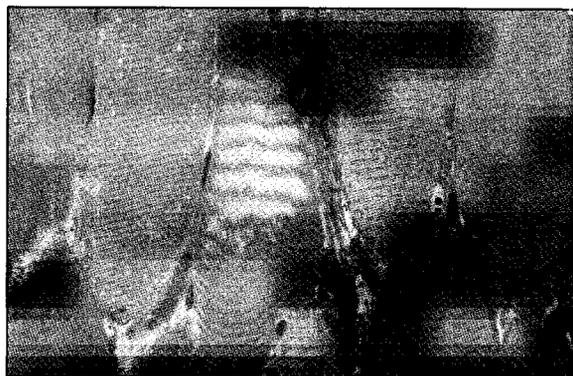
Nos animais do grupo EX e EX+N a anomalia estrutural mais evidente consistiu na vacuolização sarcoplasmática difusa (Figs. 2, 3).



**Figura 2** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX. É notória a vacuolização sarcoplasmática difusa das fibras (x590).

Esta anomalia, verificou-se em 33.3% do total das fibras observadas no grupo EX e em 33.6% do grupo EX+N. Nas lâminas

coradas com ácido periódico de Schiff, as fibras vacuolizadas dos dois grupos apresentaram uma tonalidade mais pálida do que aquela verificada nas fibras não afectadas por esta alteração. Com ampliações iguais ou superiores a 168x, foram visíveis irregularidades do padrão estriado (Figs. 3, 4), em 16.0% das fibras estudadas no grupo EX e em 7.6% das fibras do grupo EX+N. Estas anomalias consistiam num alargamento das bandas isotrópicas e anisotrópicas com esbatimento da coloração muscular com o azul de toluidina, frequentemente intercalada por áreas mais escuras onde a largura das bandas isotrópicas se encontrava diminuída, apesar das dimensões das bandas anisotrópicas permanecerem constantes (Fig. 4).



**Figura 3** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX. De notar a vacuolização sarcoplasmática difusa e as irregularidades do padrão estriado (x590).

Nos animais do grupo EX, o número de núcleos centrais, em algumas áreas dispostos em cadeia (Figs. 5, 6), foi elevado, afectando uma média de 35.2% das fibras estudadas, contrastando

com os 8.7% de fibras encontradas no grupo EX+N.



**Figura 4** - Fotografia de microscopia óptica, do músculo soleus de um animal do grupo EX, ilustrando uma área de irregularidades do padrão estriado, ora com diminuição ora com alargamento das bandas I (x925).



**Figura 5** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX, demonstrando, para além da vacuolização sarcoplasmática difusa, uma cadeia de núcleos centrais (x740).

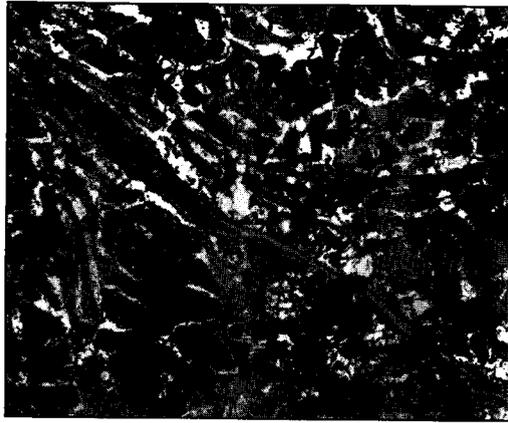
Áreas de necrose segmentar, com a conseqüente infiltração de mononucleares e de alguns polimorfonucleares (Fig. 6), foram identificadas em maior percentagem de fibras nos animais do grupo EX do que naqueles do grupo EX+N. A percentagem média do

número total de fibras lesadas foi significativamente superior no grupo EX.



**Figura 6** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX+N. De realçar a presença de uma fibra com um núcleo central adjacente a uma área com infiltração de polimorfonucleares e mononucleares (x590).

Na análise ultra-estrutural dos grupos EX e EX+N, foi notória a existência de fibras com um maior espaço inter-fibrilar bem como a presença de mitocôndrias dilatadas ("swelling"), de matriz pálida e com irregularidades das suas cristas (Fig. 7), que parecem ser a origem da vacuolização sarcoplasmática observada em microscopia de luz. As irregularidades do padrão estriado, observadas em microscopia óptica, parecem resultar de alterações na estrutura das linhas Z, das quais salientamos a disrupção, o esbatimento e a extensão do material dessas linhas para as bandas I adjacentes (Fig. 8).



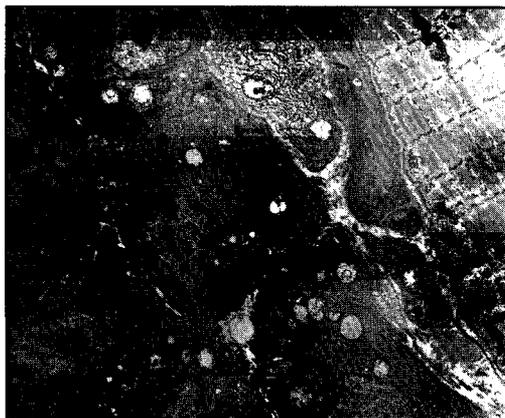
**Figura 7** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX, ilustrando um aumento do espaço inter-miofibrilar, a presença de "swelling" mitocondrial e a vacuolização das células endoteliais (x1900).



**Figura 8** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX. De realçar a presença de alterações estruturais das linhas Z, de "swelling" mitocondrial e de vacuolização endotelial (x1200).

Em algumas áreas, periféricas às zonas de anomalias das linhas Z, foi notório o encurtamento longitudinal dos sarcómeros, por diminuição longitudinal das bandas I. Mioblastos e áreas de necrose segmentar, infiltradas por mononucleares e

polimorfonucleares, foram também evidentes (Fig. 9).



**Figura 9** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+N, demonstrando a infiltração tecidual de fagócitos. Para além dos mioblastos, é ainda visível um fibroblasto com evidentes sinais de activação e alguns detritos celulares (x1200).

#### **2.4.1.1.3. Discussão dos resultados**

Com este protocolo experimental procurámos induzir predominantemente uma sobrecarga metabólica nos músculos exercitados (9, 299), por forma a reduzir o mais possível qualquer perda da integridade do sarcolema ou do retículo sarcoplasmático de origem mecânica. Assim, caso surja perda da homeostasia celular ao cálcio, é provável que ela resulte, principalmente, da incapacidade relativa das bombas de cálcio em bombear o ião para as cisternas do retículo e/ou para o interstício (45, 91), conjugada com a entrada para o sarcoplasma de cálcio pelos canais lentos (129). Se o exercício realizado induzisse uma grande sobrecarga

mecânica para as fibras, as probabilidades de surgirem perdas da integridade do sarcolema e/ou da membrana do retículo eram grandes em consequência das elevadas tensões a que estas membranas ficariam sujeitas (17, 19). Com a formação destas soluções de continuidade, o cálcio difundir-se-ia, sem limitações, do interior do retículo sarcoplasmático ou do interstício para o sarcoplasma, motivando elevações sarcoplasmáticas sustentadas desse íão, pouco ou nada atenuadas pelos bloqueadores dos canais lentos de cálcio, conforme o observado por outros autores (87).

O sacrifício dos animais efectuado apenas às 48 após o protocolo de corrida é justificado não só pelos resultados de Duarte (88), Soares et al. (299) e de Appell et al. (9), que descrevem um quadro anatomo-patológico mais intenso dois dias após o exercício físico em animais sobrecarregados metabolicamente, mas também porque, cerca de 3 dias após a agressão, as manifestações histológicas de regeneração muscular começam a acentuar-se, sobrepondo-se às manifestações morfológicas de lesão (153, 154, 272).

Contrariamente ao verapamil (87), a nifedipina não teve acção lesiva sobre o tecido muscular, como é demonstrado pela reduzida percentagem de fibras portadoras de núcleos centrais e pela ausência de lesões nos animais do grupo N. Também a percentagem média de fibras portadoras de núcleos centrais nos animais do grupo controlo, inferior a 3%, é concordante com o

descrito na literatura (92).

As alterações morfológicas observadas foram substancialmente diferentes no que se refere à incidência e intensidade das lesões encontradas em cada um dos grupos de animais exercitados. Na origem destas observações deverá estar a administração de nifedipina, já que os factores que condicionam a intensidade das lesões da miopatia do exercício foram controlados e tiveram uma participação semelhante para os dois grupos. As lesões observadas nos grupos EX e EX+N são idênticas às descritas na literatura, quer para os animais de laboratório (9, 299), quer para o Homem (147, 121, 122, 125, 346).

Interpretando a presença de núcleos centrais como um bom indicador de lesão e regeneração musculares (55) e considerando a diferença significativa na percentagem média de fibras portadoras desta alteração entre os grupos EX e EX+N, pode induzir-se que o exercício efectuado tenha sido mais agressivo para os animais do grupo EX do que para os do grupo EX+N. A mesma conclusão pode ser tirada com base na percentagem total de fibras musculares portadoras de anomalias morfológicas. A conjugação destes resultados com o facto das lesões encontradas poderem ser explicadas bioquimicamente pelas elevações do ião cálcio no citosol (93, 94), sugere que a perda da homeostasia celular ao cálcio seja a responsável pelas alterações estruturais observadas.

As alterações nas linhas Z e nas bandas I verificadas em

microscopia electrónica e as irregularidades do padrão estriado observadas em microscopia óptica podem, em parte (9, 88), ser justificadas pela hipercontração dos sarcómeros (94, 95) e pela prévia activação das calpaínas que se encontram na proximidade das miofibrilas (17, 44, 52, 105, 190). O facto destas anomalias terem diminuído a sua incidência nos animais do grupo EX+N, relativamente aos do grupo EX, reforça essa hipótese. O facto dessa disrupção miofibrilar também poder ser motivada pela agressão mecânica (88, 120), considerando que em condições fisiológicas não é possível sobrecarregar exclusivamente o músculo de forma metabólica (298), poderá explicar a presença das irregularidades do padrão estriado nos animais do grupo EX+N. A disfunção das ATPases transportadoras de cálcio (46), conjugada ou não com a exagerada libertação desse ião pelo retículo sarcoplasmático (7), com a consequente activação das calpaínas (105, 190), poderá ser uma outra explicação possível para a presença das irregularidades do padrão estriado nos animais sujeitos ao bloqueio dos canais lentos de cálcio.

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 (213, 360). No entanto, este tipo de lesão parece ter uma origem diferente das restantes alterações morfológicas descritas. De facto, contrariamente às irregularidades do padrão estriado, estas

alterações mitocondriais não foram atenuadas pela nifedipina. Da mesma maneira, enquanto que o "swelling" mitocondrial teve uma distribuição generalizada dentro da fibra e ocorreu em fibras pálidas à coloração pelo ácido periódico de Schiff, as irregularidades do padrão estriado tiveram uma distribuição focal em fibras de coloração normal com aquele ácido. Considerando que as irregularidades do padrão estriado foram atenuadas pela nifedipina e que esta sua acção poderá estar relacionada com o metabolismo celular do ião cálcio, é de supôr que outro mecanismo fisiopatológico independente do cálcio possa ter estado na origem das alterações mitocondriais. A formação exagerada de CRO poderia justificar essas alterações morfológicas (217). Pensamos, no entanto, ser uma explicação pouco provável já que, devido ao seu efeito anti-oxidante e à sua acumulação nas membranas celulares (274), a nifedipina deveria ter exercido alguma protecção nos animais do grupo EX+N, traduzida pela menor percentagem de fibras atingidas por essa anomalia, facto que não se verificou. A possibilidade destas alterações mitocondriais resultarem de um erro técnico de fixação (235) é de excluir, uma vez que: (a) a fixação foi executada pelo método de perfusão, (b) os animais dos diferentes grupos foram submetidos ao mesmo protocolo de extracção e de preparação das amostras, (c) esta alteração foi exclusiva dos murganhos exercitados, (d) foram as mitocôndrias sub-sarcolemais as mais afectadas e (e) nas fotografias onde é evidente o "swelling"

mitocondrial, são encontradas inúmeras mitocôndrias intercaladas com morfologia normal.

Independentemente da sua acção de bloqueador dos canais lentos de cálcio, a nifedipina pode actuar sobre outros mecanismos celulares, também eles relacionados com o ião cálcio (para refs. ver 106, 224, 274). Para além de um possível efeito anti-oxidante com inibição da peroxidação lipídica (274, 326), os bloqueadores dos canais de cálcio parecem também influenciar a regulação da calmodulina, das ATPases transportadoras de cálcio e dos canais de cálcio do retículo e das mitocôndrias a nível cardíaco (224). Considerando que essas acções são irrelevantes quando comparadas com a principal acção farmacológica da nifedipina (274), a hipótese deste fármaco ter diminuído a incidência das lesões no grupo EX+N por esses mecanismos adicionais ao bloqueio dos canais lentos de cálcio não deve ser muito valorizada.

Para além destes mecanismos relacionados directamente com o metabolismo do ião cálcio, a acção da nifedipina sobre as lesões musculares poderá também ter resultado do efeito atenuante da força muscular motivada pelos fármacos bloqueadores dos canais lentos de cálcio (19, 33), exigindo um maior recrutamento de fibras musculares, tal como o sugerido por Duan et al. (87) para o verapamil. Consequentemente, o mesmo trabalho muscular ficaria distribuído por um maior número de fibras activas e cada fibra seria assim menos sobrecarregada, quer mecânica, quer

metabolicamente.

Devido à sua acção farmacológica de bloqueio dos canais de cálcio, a nifedipina tem também algum efeito anti-inflamatório (274), já que as baixas concentrações citoplasmáticas do ião cálcio bloqueiam a desgranulação mastocitária e inibem o quimiotactismo, a diapedese, a fagocitose e a desgranulação leucocitária (254). A nifedipina influencia também negativamente, quer a transformação dos monócitos em macrófagos, quer a fagocitose e a formação de CRO pelos neutrófilos (para refs. ver 274). De facto, os focos de infiltração leucocitária observados à microscopia óptica foram significativamente inferiores nos animais do grupo EX+N relativamente aos do grupo EX. No entanto, a menor incidência de anomalias estruturais observadas nas fibras musculares do grupo EX+N poderá ser uma importante justificação para essa menor invasão de leucócitos.

O excesso de ião cálcio no citosol, provavelmente motivado pela sua excessiva libertação do retículo sarcoplasmático (7), conjugado com a diminuição funcional das ATPases transportadoras de cálcio (45, 46), poderá ser uma explicação aceitável para justificar as anomalias morfológicas observadas nos dois grupos de animais exercitados. A justificação para a menor percentagem de fibras portadoras de irregularidades do padrão estriado no grupo EX+N não residiria no metabolismo do cálcio mas sim na menor sobrecarga mecânica a que cada fibra activada foi sujeita. A distribuição do mesmo trabalho muscular por um maior número de

fibras, hipoteticamente ocorrida no grupo EX+N (7, 87, 90), diminuiria não só a sobrecarga mecânica mas também a sobrecarga metabólica exercida sobre cada fibra activa. Apesar de poder ser menor relativamente ao grupo EX, a sobrecarga metabólica aplicada a cada fibra muscular dos animais do grupo EX+N seria ainda suficiente para diminuir a funcionalidade das ATPases do reticulo para captar cálcio. De facto, a funcionalidade dessas ATPases parece ser mais influenciada pela duração do que pela intensidade do exercício efectuado (45), criando-se assim condições (44, 213, 360) para a ocorrência de "swelling" mitocondrial nos dois grupos de animais exercitados.

Apesar desta explicação, e considerando que o número total de fibras lesadas nos animais do grupo EX foi cerca de 1,3 vezes superior ao do grupo EX+N, torna-se difícil justificar a maior frequência, desproporcionada, de fibras necrosadas e de áreas de infiltração leucocitária, verificadas no grupo EX, cerca de 3,64 vezes superior às observadas no grupo EX+N. Ou não foram observadas à microscopia electrónica numerosas lesões musculares, particularmente do sarcolema (17, 215), devido às suas reduzidas dimensões ou, da mesma forma que Stauber et al. (306), Cannon et al. (49, 51) e Walker et al. (338), temos de admitir alguma responsabilidade da reacção inflamatória na génese e/ou no aumento da intensidade das lesões musculares descritas, ainda que esse contributo possa ser ligeiro quando comparado com o fenómeno de degeneração intrínseca.

#### 2.4.1.2. Stress oxidativo e miopatia do exercício

Existem cada vez mais evidências demonstrando que os CRO são importantes mediadores em múltiplas formas de lesão tecidual (para refs. ver 113, 345), nas quais se incluem as do músculo esquelético (158). Relativamente a este tecido, as observações de:

(a) alterações musculares estruturais e funcionais motivadas por deficiências alimentares de vitamina E e selênio, descritas em muitas espécies animais (20, 62) e da sua semelhança com as alterações estruturais das distrofias musculares (158);

(b) um aumento da actividade plasmática de enzimas sarcoplasmáticas em ratos deficientes em vitamina E (62);

(c) uma elevação muscular de marcadores indirectos de peroxidação lipídica observada em animais de laboratório portadores de distrofias musculares (240);

(d) que a peroxidação lipídica do sarcolema motivada pelo stress oxidativo parece contribuir para as elevações sarcoplasmáticas do ião cálcio verificadas nos animais susceptíveis à hipertermia maligna (97),

sugerem que os CRO, tal como para o tecido muscular cardíaco (85, 171, 191), poderão estar na origem das alterações estruturais e funcionais do músculo esquelético resultantes das mais variadas agressões (para refs. ver 158). A situação de stress oxidativo, por

oxidação dos grupos tiol das proteínas funcionais e/ou por peroxidação lipídica (68, 77, 113, 207, 234, 284, 330), pode alterar, quer a morfologia, quer a funcionalidade do sarcolema e das restantes membranas celulares (61, 217, 234), contribuindo para as alterações funcionais (3, 162, 171) e estruturais das fibras musculares (para refs. ver 309, 312). Contudo, a hipótese dos CRO serem apenas uma consequência desses estados de lesão tecidual não foi ainda excluída (158, 247).

Relativamente à agressão muscular motivada pelo exercício, há já numerosas evidências, directas (79, 185) e indirectas (164, 196, 197, 267, 304), da existência de stress oxidativo muscular com o aumento da actividade física. De facto, pela técnica de ressonância magnética nuclear, foi descrito um aumento da produção mitocondrial de CRO, não só em fibras musculares isoladas sujeitas a contracções tetânicas (185), mas também no músculo esquelético logo após a realização de exercícios físicos extenuantes (79).

Contudo, devido à rapidez com que os CRO reagem com as substâncias químicas que os rodeiam, a detecção directa desses compostos torna-se extremamente difícil (136, 247, 284). Por essa razão, alguns dos autores que estudam a situação de stress oxidativo muscular consequente ao aumento da actividade contráctil (para refs ver 3, 162) têm quantificado os produtos finais, ou as substâncias intermediárias, resultantes do processo de peroxidação lipídica induzida pelos CRO, considerando essas substâncias como

indicadores indirectos da agressão oxidativa (para refs. ver 3, 247).

Assim, pela medição de malonaldeído tecidual ou excretado na urina, Salminen e Vihko (267), Alessio e Goldfarb (4) e Jenkins et al (164) constataram, de uma forma indirecta, a elevação da taxa de peroxidação lipídica no músculo esquelético do murganho e do rato após a actividade física. Da mesma forma, em humanos sujeitos a exercício físico, foi observada não só uma elevação daquele composto no plasma (172, 203), relacionada directamente com as concentrações de enzimas sarcoplasmáticas no plasma (172) e com a intensidade do exercício efectuado (203), mas também uma elevação acentuada de pentano no gás expirado (84).

A quantificação destes compostos, aldeídos e hidrocarbonetos voláteis, resultantes da peroxidação lipídica, deve ser interpretada, no entanto, de uma forma muito cautelosa, tendo em conta os numerosos factores que condicionam a sua formação e excreção (para refs ver 158, 162). Também os trabalhos de Davies et al. (79) que utilizaram a ressonância magnética nuclear para medir directamente os CRO no músculo esquelético, são passíveis de crítica pelo facto do tecido muscular analisado não ter sido imediatamente congelado (158).

A quantificação da actividade de algumas enzimas musculares anti-oxidantes após um programa de treino (4, 192, 198, 265, 267) também poderá dar alguma informação relativa à situação de stress oxidativo muscular motivado pela actividade física aguda (20).

Contudo, todos esses trabalhos são altamente criticáveis. De facto, Alessio & Goldfarb (4) e Laughlin et al. (192), ao quantificarem a actividade da superóxido dismutase nos homogeneizados musculares, não tiveram em consideração as diferentes formas dessa enzima presente nos diversos compartimentos celulares (162, 163, 166). Do mesmo modo, os trabalhos que quantificaram a actividade da catalase (4, 192, 198, 265, 267) fizeram-no com a utilização da espectrofotometria, a qual é um método que possui uma baixa sensibilidade para quantificar a actividade dessa enzima no músculo esquelético (20).

Numerosos trabalhos têm analisado as concentrações de GSH e glutathiona oxidada (GSSG) no músculo esquelético após actividade física (para refs. ver 162, 249). Tendo em consideração que o tecido muscular esquelético parece ser muito mais dependente da GSH para a neutralização dos CRO do que o fígado e o rim (20), a medição das concentrações de GSH e GSSG e/ou da actividade das enzimas relacionadas com a sua homeostasia, deverá ser o melhor meio de quantificação indirecta do stress oxidativo neste tecido (166, 284, 323).

Assim, nos trabalhos de Lew et al. (196, 197), Pyke et al. (248) e Lew & Quintanilha (198), a demonstração de uma acentuada redução das concentrações de GSH e de uma elevação das concentrações de GSSG no músculo esquelético após actividade física, constitui um bom indicador da ocorrência de stress oxidativo

durante e/ou logo após o exercício. Também os trabalhos que quantificam a actividade da glutathione peroxidase (192, 198, 267, 283), da glutathione reductase (198, 265, 267, 283) e da glutathione transferase (283) no músculo esquelético após um programa de treino, ao evidenciarem uma elevação da actividade daquelas enzimas estão, indirectamente, a demonstrar que o exercício físico agudo agride oxidativamente os músculos analisados (20). Nesses programas de treino, as maiores variações daquelas enzimas e das concentrações de glutathione total são observadas nos músculos vermelhos (265, 283), o que está de acordo com o tipo predominante de metabolismo utilizado por esses músculos (138, 162).

Uma das origens celulares dessa formação exagerada de CRO durante a actividade física parece ser mitocondrial (19, 103, 162, 249). De facto, aproximadamente 2 a 5% do total de oxigénio utilizado pelas mitocôndrias é metabolizado pelas ubiquinonas (20, 24), originando CRO com grande poder oxidativo (234) ou com grande poder redutor (136). A taxa de formação mitocondrial de CRO é, dessa forma, proporcional à quantidade de oxigénio consumido pelas mitocôndrias por unidade de tempo (162). Assim, durante a actividade física, com a elevação acentuada do consumo muscular de oxigénio por unidade de tempo (40, 176), é alterado o débil equilíbrio que existia entre a produção e a inactivação dos CRO, dando origem a uma situação de stress oxidativo tecidual

(289, 290). Os resultados de Lovlin et al. (203), obtidos pela determinação de malonaldeído, e os Koren et al. (185), obtidos por ressonância magnética nuclear, corroboram esta hipótese.

Em analogia ao verificado nas situações de isquemia/reperfusão muscular (75, 201, 336), parece aceitável especular que a XO do endotélio muscular (161, 192, 214) possa também ter alguma participação na exagerada produção tecidual de CRO motivada pela actividade física e, desse modo, contribuir para a situação de stress oxidativo observada (para refs. ver 3, 162, 163, 249). A XO é uma enzima intra-celular altamente versátil, encontrada em vários tecidos (241), entre os quais, o tecido muscular esquelético (161, 192). Apesar da designação, a XO, *in vivo*, e em condições homeostáticas, actua quimicamente como uma desidrogenase (145, 241, 344), utilizando a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo como receptor de electrões (241). No entanto, quando sujeita a determinadas condições (241, 344), que parecem ocorrer durante o exercício físico, a XO pode transformar-se numa oxidase oxigénio-dependente (241, 312, 344), ficando criadas condições para a formação de radicais superóxido e de peróxido de hidrogénio (349). Alguns trabalhos têm demonstrado, de forma indirecta, um aumento da actividade desta enzima no músculo esquelético exercitado (23, 145).

A PLA2 muscular, activada pelo exercício físico (15), poderá ser outra fonte de CRO (136). Esta enzima, localizada no sarcolema,

na membrana dos diferentes organelos, no sarcoplasma e no interior dos lisossomas (para refs. ver 19), utiliza os fosfolípidos das membranas para a produção de ácido araquidónico e, conseqüentemente, por acção da lipo-oxigenase e da ciclo-oxigenase, dá origem a prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (136). Se, por um lado, a PLA2 tem algum papel protector nas membranas celulares pela remoção dos hidroperóxidos resultantes da peroxidação lipídica (112), por outro, os lisofosfolípidos e o ácido araquidónico resultantes desta acção enzimática, têm um efeito detergente nas membranas celulares podendo, assim, contribuir para as alterações na homeostasia celular ao ião cálcio (158) e para a libertação de compostos sarcoplasmáticos para o interstício (38). Conjuntamente com os lisofosfolípidos e o ácido araquidónico, também os CRO originados da formação de prostaglandinas e leucotrienos (86, 96, 117, 136) poderão agravar estas alterações funcionais ou estruturais do sarcolema, da mesma forma que o sugerido para o músculo cardíaco (227). Durante e/ou após o exercício físico há evidências do aumento da actividade da PLA2 (para refs. ver 19). Symons et al. (308) demonstraram a acumulação de PGE2 no músculo esquelético após um breve período de electro-estimulação. Também em situação de estimulação mecânica passiva, Vandenburg et al. (328) observaram nas fibras musculares um aumento da produção de prostaglandina E2 e da proteólise tecidual. Estes trabalhos corroboram os resultados de

Baracos et al. (26) e Rodman & Goldberg (256), provavelmente em consequência da activação da PLA2 pelo ião cálcio.

Conforme será referenciado no capítulo seguinte (2.4.2 - Degeneração extrínseca) os leucócitos que infiltram o tecido podem ser também uma importante fonte muscular de CRO, contribuindo dessa forma para a situação de stress oxidativo originada pela actividade muscular (359).

Apesar dos inúmeros trabalhos que apontam para a ocorrência muscular de uma situação de stress oxidativo durante e/ou logo após o exercício físico (para refs. ver 3, 162, 163, 249), não está ainda bem definido o tempo que o tecido muscular necessita para restabelecer o equilíbrio oxidante/anti-oxidante verificado em situações de homeostasia das fibras. Pressupondo que as mitocôndrias serão a principal fonte celular de CRO (113, 185), seria de esperar que o stress oxidativo terminasse com a finalização do exercício. Apesar de não terem utilizado nenhum marcador da presença de CRO, os resultados de Zerba et al. (359), contudo, sugerem que a formação exagerada de CRO pode permanecer no musculo durante os 3 primeiros dias após a realização do exercício físico.

#### **Hipótese a estudar:**

**Considerando as restantes fontes teciduais de CRO, para além**

**das ubiquinonas mitocondriais, a hipótese que colocamos é a de que a situação de stress oxidativo muscular se pode prolongar muitas horas (ou dias) após o término do exercício físico.**

Para testarmos essa hipótese sujeitamos murganhos a exercício físico exaustivo, nos quais medimos as concentrações de GSH no músculo soleus, imediatamente, 48 horas e 96 horas após a finalização do exercício. Tendo em atenção a fuga de GSSG do citosol para o plasma (248) com as consequentes alterações da relação GSH/GSSG, optámos por dosear apenas as variações agudas das concentrações de GSH (para refs. ver 251). Considerando ainda que as variações das concentrações de GSH poderão ser motivadas por outras causas que não apenas a formação exagerada de CRO (para refs. ver 218, 323, 284), um grupo de animais exercitados foi submetido à administração de vitamina E pois, de acordo com Jackson & Edwards (158), caso essas variações agudas sejam motivadas pela presença de CRO, elas serão muito mais ténues na presença de vitamina E.

#### **2.4.1.2.1. Material e métodos**

Foram utilizados 72 murganhos da estirpe Charles River CD1, machos, com 12 semanas de idade e com um peso de 25/30 gramas. Os animais tiveram livre acesso à água e à alimentação, e

foram mantidos à atmosfera normal, com uma temperatura de 21/25 graus centígrados e com uma variação cíclica de 12 horas luz/12 horas escuro.

Os animais foram distribuídos por cinco grupos: grupo controlo (C, n=8), grupo controlo+veículo (C+V, n=8), grupo vitamina E (VITE, n=8), grupo exercício (EX, n=24) e grupo exercício+vitamina E (EX+VITE, n=24).

Para além da actividade normal em gaiola, os animais do grupo C não realizaram qualquer tipo de exercício nem foram sujeitos à administração de qualquer fármaco ou veículo respectivo. Cada animal do grupo VITE recebeu, nas 6 semanas que antecederam o seu sacrifício, 10 mg/Kg/dia (347) de vitamina E (sob a forma de acetato de  $\alpha$ -tocoferol, *Sigma Chemical CO.* St. Louis, USA), dissolvida em 0.01 ml de óleo de soja estéril, por via intra-peritoneal, em injeção única diária; igual procedimento foi seguido para os animais do grupo EX+VITE exceptuando o início da administração de vitamina E que teve lugar 6 semanas antes da realização do protocolo de corrida. Os murganhos do grupo C+V foram submetidos à administração, pela mesma via, de 0.01 ml de óleo de soja/dia nas 6 semanas que antecederam o seu sacrifício, também em injeção única diária.

Os animais dos grupos EX e EX+VITE foram submetidos a uma corrida em tapete rolante durante 60 minutos, com 0° de inclinação a uma velocidade de 1000 m/h (correspondendo a cerca

de 80% da velocidade máxima dos animais para essa situação) com uma constante estimulação táctil das suas caudas. Antes de realizarem o protocolo de esforço, os animais foram sujeitos a um período de corrida (10 minutos) com velocidade reduzida, de forma a permitir uma adaptação prévia à situação experimental. O tapete rolante, da marca *AVIONICS*, foi previamente adaptado às necessidades de utilização impostas pelos animais através da delimitação de uma área de corrida, de forma rectangular (40x80 cm), a qual foi conseguida com a acopulação de paredes verticais de madeira à estrutura do tapete (88). Em cada grupo exercitado, os animais foram sacrificados às 0 (n=8), 48 (n=8) e 96 horas (n=8) após a finalização da corrida.

A todos os animais, sacrificados por deslocamento cervical entre as 9 e as 11 horas, foi retirado o músculo soleus direito, para determinação dos níveis de GSH de acordo com o método descrito por Bousquet et al. (36).

Todos os músculos, após terem sido pesados em balança *Mettler* (AE 163) com aproximação às centésimas de miligrama, foram homogeneizados de forma mecânica, num homogeneizador de vidro automático (*Heidolph, tipo R2R 1*), em 2ml de ácido perclórico a 5% (*Merck, Darmstadt, Germany*). Após centrifugação a 3000 r.p.m., durante 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado por um filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  (*Milipore*) e injectado automaticamente (*Gilson, modelo 231-401*) no sistema de "High Performace Liquid Chroma-

tography" (HPLC) com detecção electroquímica.

O sistema de HPLC era constituído por numa bomba (*Gilson, modelo 302*) ligada a um manómetro (*Gilson, modelo 802 C*) e a uma coluna de aço inoxidável de 10 µm ODS2 (*Spherisorb HPLC*) de 25 cm x 4,6 mm. O detector electroquímico (*Gilson, modelo 141*) funcionou a uma voltagem de +1.25 V; um integrador (*Varian, modelo 4290*) monitorizou a corrente produzida.

A fase móvel utilizada foi constituída por 99% de ácido mono-cloro-acético (pH 3 com hidróxido de sódio) e 1% de metanol. Os padrões de GSH (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) foram preparados em ácido perclórico a 5%.

Os dados foram tratados estatisticamente através da média (M) e do desvio padrão (sd). As diferenças de médias foram testadas a partir da ANOVA I. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

#### **2.4.1.2.2. Resultados**

As concentrações de GSH no músculo soleus dos animais dos grupos C e EX estão ilustradas no Quadro 2 e as dos grupos C+V, VITE e EX+VITE no Quadro 3.

**Quadro 2** - Concentrações de GSH no músculo soleus ( $\mu\text{mol/g}$ ) em diferentes momentos de observação.

	<b>C</b>		<b>EX</b>	
	(1)	0h (2)	48h (3)	96h (4)
<b>M</b>	<b>1.41</b>	<b>0.61</b>	<b>0.74</b>	<b>1.31</b>
sd	$\pm 0.131$	$\pm 0.137$	$\pm 0.179$	$\pm 0.119$
( $p < 0.05$ )	<b>1 vs. 2;</b>	<b>1 vs. 3;</b>	<b>2 vs. 4;</b>	<b>3 vs. 4</b>

Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão).

**Quadro 3** - Concentrações de GSH no músculo soleus ( $\mu\text{mol/g}$ ) em diferentes momentos de observação.

	<b>C+V</b>	<b>VITE</b>		<b>EX+VITE</b>	
			0h	48h	96h
<b>M</b>	<b>1.43</b>	<b>1.52</b>	<b>1.23</b>	<b>1.45</b>	<b>1.47</b>
sd	$\pm 0.157$	$\pm 0.241$	$\pm 0.201$	$\pm 0.330$	$\pm 0.189$

Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão).

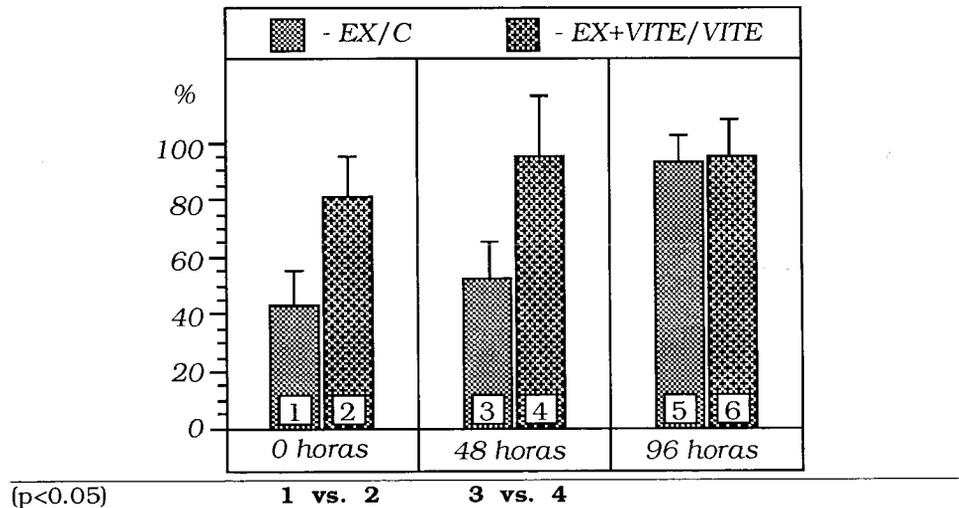
Os resultados do grupo C+V não diferiram daqueles encontrados no grupo C. As concentrações de GSH no grupo VITE foram superiores aos do grupo C, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa. No grupo EX foi verificada uma redução significativa, relativamente ao grupo controlo, das concentrações musculares de GSH nos animais sacrificados às 0 horas após a finalização do exercício; 48 horas após, os valores de GSH ainda se apresentavam significativamente reduzidos quando comparados aos do grupo C. A recuperação quase total das

concentrações de GSH só foi observada nos animais sacrificados às 96 horas após a finalização do exercício físico.

As alterações temporais das concentrações de GSH no grupo EX+VITE foram análogas às do grupo Ex. Contudo, no grupo EX+VITE, relativamente ao grupo VITE, nenhuma dessas variações observadas após a finalização do exercício teve significado estatístico.

No Gráfico 1 estão ilustradas as variações percentuais das concentrações de GSH nos grupos EX e EX+VITE, relativamente aos respectivos valores em repouso (grupos C e VITE), às 0, 48 e 96 horas após a finalização do exercício. É de salientar as diferenças estatisticamente significativas observadas entre os animais dos dois grupos exercitados sacrificados às 0 e às 48 horas.

**Gráfico 1** - Relação percentual, entre os grupos EX/C e EX+VITE/VITE, das concentrações de GSH nos diferentes momentos de observação.



Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão); EX/C - grupo exercício/grupo controlo; EX+VITE/VITE - grupo exercício+vitamina E/grupo vitamina E.

### 2.4.1.2.3. Discussão dos resultados

Foi utilizada uma corrida com intensidade moderada, mas com um tempo prolongado de forma a recrutar o maior número possível de fibras, para assim atenuar os erros da determinação da GSH no homogeneizado muscular, inerentes a todos os doseamentos bioquímicos efectuados em homogeneizados teciduais.

De acordo com os resultados de Warren et al. (347), os níveis de vitamina E no músculo soleus de ratos que receberam idêntica quantidade dessa vitamina durante 6 semanas, por via oral, foram cerca de 3 a 4 vezes superiores aos verificados nos respectivos animais controlo. Apesar da vitamina E ter sido administrada por via intra-peritoneal neste trabalho, admitimos que os valores musculares de vitamina E sejam superiores aos do grupo C e aproximados às concentrações descritas por Warren et al. (347).

Para a quantificação de GSH, a metodologia utilizada neste trabalho possui sensibilidade e especificidade elevadas (Bastos, resultados não publicados). Desta forma, e contrariamente ao verificado com a espectrofotometria, técnica utilizada por outros autores (196, 197, 248, 265, 267, 283), os restantes compostos celulares portadores de grupos tiol, entre os quais a cisteína, não interferem na determinação de GSH.

A não determinação dos valores musculares de GSSG prende-se com os resultados de Pyke et al. (248) e de Sen et al. (283),

que demonstraram claramente a acentuada redução da glutathiona muscular total motivada pelo exercício físico, consequência provável da elevada "permeabilidade" das membranas citoplasmáticas à GSSG, tendendo esta a difundir-se para o plasma (para refs. ver 249, 251, 284, 323). Tendo em consideração as principais funções celulares da GSH (284, 323), uma diminuição aguda e acentuada da concentração desse tripeptídeo poderá ser interpretada como um bom indicador de agressão oxidativa tecidual (236, 251), particularmente se essa redução for atenuada pela presença de um agente anti-oxidante (158).

No grupo C, os valores de GSH muscular são muito superiores aos descritos por Salminen & Vihko (265, 267), Lew et al. (196, 197) e Sen et al. (283) para os animais controlo. Estas diferenças de concentração podem ser justificadas pelas diferentes constituições bioquímicas dos músculos analisados. De facto, neste trabalho utilizámos o soleus, um músculo muito homogêneo, constituído quase exclusivamente por fibras vermelhas (18), onde o metabolismo oxidativo predomina e as defesas anti-oxidantes se encontram bem desenvolvidas (138, 162, 192). Em oposição, os trabalhos de Salminen & Vihko (265, 267) e Lew et al. (196, 197) utilizaram uma amostra muscular heterogénica em termos de composição de fibras musculares brancas e vermelhas e, conseqüentemente, com uma menor defesa anti-oxidante (138, 162). Esta justificação é reforçada se considerarmos que o metabolismo

dos cardiomiócitos é predominantemente oxidativo (40) e que os nossos resultados de GSH no grupo C, comparativamente aos de Salminen e Vihko (265, 267), de Lew et al. (196, 197) e de Sen et al. (283), são os que mais se aproximam dos valores de GSH descritos para o músculo estriado cardíaco (60, 186).

Nos animais exercitados, o facto da descida percentual de GSH muscular observada imediatamente após a finalização do esforço de corrida, ter sido significativamente mais acentuada na relação EX/C do que na EX+VITE/VITE, constitui um bom indicador de stress oxidativo motivado pelo exercício. Este argumento é ainda mais reforçado pelo facto da descida de GSH observada imediatamente após o exercício, nos grupos EX e EX+VITE, coincidir com a descrita por Lew et al. (196, 197) e Pyke et al. (248), que a relacionaram com a sua transformação em GSSG.

No grupo EX, a recuperação quase completa dos valores de GSH observada apenas às 96 horas, poderia ser explicada pela re-síntese demorada de GSH no músculo (284). Os resultados de Sen et al. (283) apontam nesse sentido ao descreverem, imediatamente após um exercício exaustivo, uma diminuição da actividade da  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase no músculo, no fígado e no pulmão de ratos. Contudo, Chen et al. (60) demonstraram que os níveis hepáticos e pulmonares de GSH podem passar de uma situação de cerca de 80% de depleção para uma de 6%, em menos de 24

horas. Esta constatação foi verificada em animais jovens, com idade idêntica aos utilizados neste trabalho. Da mesma forma, e segundo os resultados de Deneke et al. (80), a síntese de GSH celular, *in vitro*, parece ser relativamente rápida, necessitando menos de 24 horas para se verificarem concentrações de 180% daquelas observadas em condições homeostáticas. Também o facto de nos animais do grupo EX+VITE a depleção percentual de GSH ter sido significativamente inferior à do grupo EX, vem reforçar a hipótese de que 48 horas após a finalização do exercício existe ainda uma contínua produção exagerada de CRO nos músculos exercitados.

Se não parece haver dúvidas quanto à origem nas mitocôndrias e na via da PLA2 (para refs. ver 19) dessa formação exagerada de CRO, durante e/ou logo após a finalização do exercício, o papel da XO e dos leucócitos que infiltram o tecido na situação de stress oxidativo muscular ainda não está determinado e será o objecto central da próxima fase experimental.

#### 2.4.2. Degeneração extrínseca

Durante ou após a realização de um exercício físico intenso, é comum a observação de numerosas alterações sanguíneas, tais como o aumento da concentração das proteínas plasmáticas (311), a mobilização e activação leucocitária (114, 257, 301), incluindo linfócitos T citotóxicos (114, 175, 306) "T-helper" e T-supressores (179) e a alteração funcional do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (114, 115, 204). O aumento plasmático das concentrações de neoptirina (301), de interleucina-1 (49, 50, 102, 104, 199, 288) e interleucina-6 (301), da proteína-C-reativa, da haptoglobina (103, 311) e da actividade do interferon (288, 334), fazem também parte deste quadro laboratorial. Para além destas alterações sanguíneas, foram também observados na urina o factor de necrose tumoral e os receptores da interleucina-2, constituindo assim marcadores indirectos da sua presença no plasma (301).

Todas estas adaptações sistémicas agudas compõem a **resposta de fase aguda** e constituem bons indicadores (49, 102, 115) da presença de uma resposta inflamatória tecidual (9, 17, 39, 103, 306), envolvendo reacções neurológicas, vasculares, humorais e celulares no local lesionado, que têm por objectivo a cura e a reconstituição desse tecido (148, 255).

A leucocitose, de grau variável com a intensidade do exercício e com o tipo predominante de contracções realizadas (102),

observada logo após a finalização do exercício (301) e que resulta, principalmente, da desmarginalização destas células (103) motivada pelas alterações hormonais agudas (40, 81), é seguida por uma redução progressiva do número de monócitos (114) e de neutrófilos circulantes (257). Esta diminuição poderá ser explicada pela contínua aderência dessas células ao endotélio capilar muscular com posterior diapedese e infiltração tecidual (257), consequência dos vários compostos quimiotáticos (148) libertados, quer pelas fibras lesadas (356) e pelas células endoteliais (243, 345, 349), quer pela degradação do colagénio (246). Relativamente a estes produtos resultantes da degradação do colagénio, apesar dos resultados de Wheat et al. (352) questionarem, por meios indirectos, a ocorrência de lesões do tecido conjuntivo de suporte, a lesão deste tecido foi já demonstrada por meios directos (126, 305).

Um a três dias após o exercício, a resposta inflamatória nos músculos agredidos parece estar completamente estabelecida (15, 177), com alguns polimorfonucleares (17, 88) e numerosos mononucleares dispersos pelo endomísio e no interior de algumas fibras lesadas (116, 305). Estas células mononucleares incluem principalmente macrófagos, originados dos monócitos que infiltraram o músculo, e alguns linfócitos B, T e linfócitos T citotóxicos (306, 356), originando um infiltrado celular semelhante ao descrito nas miopatias inflamatórias (12, 100), apesar dessa invasão linfocitária, motivada pelo exercício, nem sempre ser observada (305). Apesar

disso, a elevação plasmática dos marcadores específicos e inespecíficos da estimulação imunológica, confirma a activação deste sistema, mesmo em situações em que o exercício não é exaustivo nem inabitual (301). O facto das fibras agredidas poderem expôr determinados antigéneos, até aí estranhos ao sistema imunológico, poderá justificar a activação e participação linfocitária tanto nas miopatias inflamatórias (101) como nas lesões consequentes ao exercício (114).

A nível muscular, com excepção do tipo predominante dos leucócitos invasores (9, 17, 305, 306), a resposta inflamatória aguda, motivada pela agressão do exercício físico, parece ser idêntica ao modelo padrão (148), estando descritos desgranulação mastocitária (305, 306), elevação do catabolismo muscular (63, 102, 104, 328), aumento da permeabilidade vascular (306) com edema tecidual (31, 39, 121, 123) e presença de factores do complemento, de fibrinogénio e de albumina nas zonas lesadas (305, 306).

Além destas alterações estruturais e funcionais tecidulares, observa-se também a acumulação de prostaglandinas, particularmente da E<sub>2</sub> (308, 328) e da F<sub>2</sub> $\alpha$  (328), de leucotrienos (19, 103) e de citocinas, incluindo a interleucina-1 (49) e do factor de necrose tumoral (102), um aumento da actividade das proteases lisossómicas (119, 262) e a presença de CRO e/ou produtos resultantes da sua acção (4, 162).

Estes diferentes compostos encontrados nos homogeneizados de

músculos lesados podem ter origem nas próprias fibras agredidas como resultado do processo de degeneração intrínseca (54), nas células endoteliais dos capilares adjacentes (103, 146, 349) e também nos leucócitos que invadem o tecido (15, 51). Estas últimas células estão programadas para removerem o tecido lesado por vários mecanismos, que incluem, por exemplo, a fagocitose e a libertação de substâncias para o espaço intersticial (148), tais como enzimas hidrolíticas (103, 312, 350), CRO (146, 162, 349), componentes do sistema do complemento, ácido araquidónico, prostaglandinas e leucotrienos (116, 312), citocinas (102) e factor de activação plaquetária (254).

Cada um destes compostos possui diferentes acções no músculo esquelético agredido:

(a) os componentes do sistema do complemento (148, 312) e os leucotrienos parecem ter um papel importante no recrutamento de leucócitos, perpetuando assim a resposta inflamatória e podendo aumentar a área de lesão tecidual (312);

(b) a prostaglandina E2 aumenta a taxa de catabolismo das fibras musculares adjacentes (116, 256), estimulando a função lisossómica muscular (26); contudo, nos 3 primeiros dias após a finalização do exercício (262), são as células inflamatórias que invadem o tecido as que mais contribuem para esta elevação da actividade enzimática lisossómica (262, 332, 333);

(c) a interleucina-1 e o factor de necrose tumoral,

produzidos pelos monócitos e macrófagos activados, aumentam a proteólise muscular com libertação de amino-ácidos para a circulação (102), provavelmente com destino ao fígado para síntese de proteínas de fase aguda (115);

(d) o factor de activação plaquetária induz a agregação das plaquetas com a consequente libertação de prostaglandinas, de leucotrienos e de radicais superóxido (254);

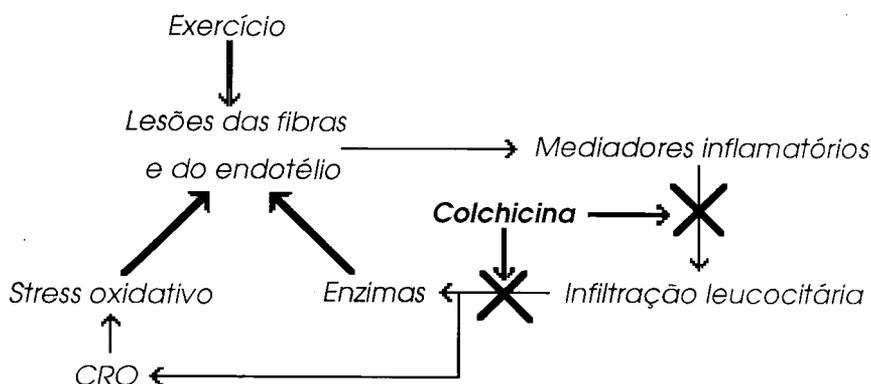
(e) os CRO libertados no espaço intersticial passam com relativa facilidade a membrana plasmática podendo exercer, desta forma, um efeito citotóxico directo (312), promovendo o aparecimento de lesões e agravando as lesões musculares pré-existentes resultantes do processo de degradação intrínseca (15, 19).

Para além destes efeitos, os CRO podem também inactivar a  $\alpha$ 1-antiprotease, proteína plasmática controladora da actividade da elastase (349) e que é libertada em grandes quantidades pelos leucócitos para o espaço intersticial (350). Criam-se assim condições para uma maior degradação do tecido conjuntivo de suporte (349), particularmente dos proteoglicanos, conforme foi demonstrado imuno-histoquimicamente no músculo após exercício por Fritz & Stauber (126) e por Stauber et al. (305).

### **Hipóteses a estudar:**

**1 - Atendendo ao potencial efeito citotóxico dos CRO e das**

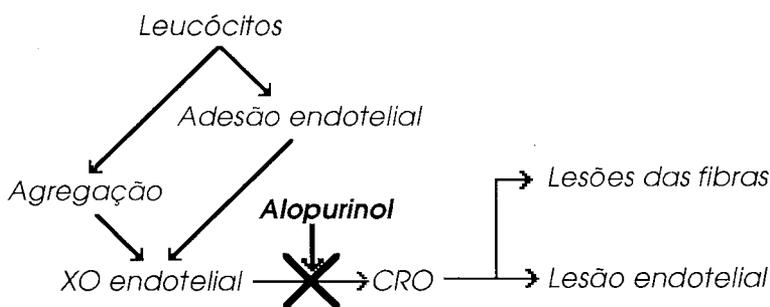
outras substâncias libertadas pelos leucócitos (146, 349), bem como ao seu carácter não selectivo (148), colocamos a hipótese (Fig. 10) de que os leucócitos possam contribuir para o exagero, não só das anormalidades bioquímicas tradutoras de agressão oxidativa, mas também das alterações histológicas descritas (9, 209, 338), tal como o observado em situações de isquemia/reperfusão muscular esquelética (28, 291) e cardíaca (312). Esta hipótese é reforçada pela aparente atenuação das lesões musculares, induzidas pela actividade física, exercida por determinados fármacos com actividade anti-inflamatória, esteróides (177) e não esteróides (264, 338).



**Figura 10** - Esquema ilustrativo da hipótese formulada.

2 - Os leucócitos que infiltram o tecido muscular, para além dos CRO que libertam directamente para o meio extra-celular, podem também contribuir de uma forma indirecta para o stress oxidativo

(para refs. ver 345) induzido pelo exercício físico (Fig. 11). Essas células sanguíneas parecem estar na origem da activação da XO endotelial, transformando-a numa oxidase oxigénio-dependente (243, 345). Considerando que o exercício físico motiva alterações acentuadas da morfologia das células endoteliais capilares musculares e que existem evidências, apesar de indirectas, de um aumento na actividade da XO muscular consequente à actividade física (23, 145), é provável que os leucócitos invasores possam, para além da temperatura, da anaerobiose, da oxidação de grupos tiol e da activação das calpáinas (241, 344), ter algum papel nesse aumento da actividade da XO muscular. Esta hipótese parece ser aceitável, já que há possibilidades dos neutrófilos activados no leito vascular se poderem agregar rapidamente e originar uma situação de oclusão vascular (74), ou de agirem directamente sobre as células endoteliais musculares durante a adesão leucocitária, conforme o verificado em estudos *in vitro* com células endoteliais de origem pulmonar (243); estas duas situações parecem favorecer a conversão da XO, de uma desigrogenase para uma oxidase oxigénio-dependente (345, 349). Da mesma forma, também durante o exercício extenuante observa-se uma elevação das concentrações musculares de adenosina mono-fosfato com a sua consequente desfosforilação (23, 40). A adenosina resultante ficaria então livre para se difundir para o exterior das fibras e servir de substrato para a XO endotelial previamente activada (23, 91).



**Figura 11** - Esquema representativo da hipótese elaborada.

Para testarmos estas hipóteses, sujeitámos murganhos a um exercício de corrida submetidos ou não à acção ou da colchicina, um fármaco inibidor da polimerização microtubular (72), afectando negativamente a funcionalidade dos leucócitos (340), ou do alopurinol, um inibidor da actividade da XO (241).

Para quantificação do stress oxidativo muscular doseámos as concentrações de GSH, tendo em conta que essas concentrações musculares constituem um bom indicador do débil equilíbrio existente entre os mecanismos teciduais de formação e remoção dos CRO (para refs. ver 113, 251, 323). As anomalias histológicas foram quantificadas por microscopia óptica e analisadas qualitativamente por microscopia electrónica.

#### **2.4.2.1. Material e métodos**

Foram utilizados 120 murganhos da estirpe Charles River

CD1, machos, com 12 semanas de idade e com um peso de 25/30 gramas. Os animais tiveram livre acesso à água e à alimentação, e foram mantidos à atmosfera normal, com uma temperatura de 21/25 graus centígrados e com uma variação cíclica de 12 horas luz/12 horas escuro. Os animais foram distribuídos por oito grupos:

grupo controlo (C, n=8),

grupo controlo+veículo da colchicina (C+VC, n=16),

grupo colchicina (CH, n=16),

grupo controlo+veículo do alopurinol (C+VA, n=8),

grupo alopurinol (ALO, n=8),

grupo exercício (EX, n=24),

grupo exercício+colchicina (EX+CH, n=16) e

grupo exercício+alopurinol (EX+ALO, n=24).

Para além da actividade normal em gaiola, os animais do grupo C não realizaram qualquer tipo de exercício, nem foram sujeitos à administração de qualquer fármaco ou veículo respectivo.

De acordo com a administração, por via intra-peritoneal, de uma ou de duas injeções de soro fisiológico estéril, de 0.1ml cada, os murganhos do grupo C+VC foram divididos em dois sub-grupos:

- C+VC48 (n=8) - injectados 48 horas antes do sacrificio,

- C+VC96 (n=8) - injectados 96 e 48 horas antes do sacrificio.

O mesmo procedimento foi adoptado para os animais sujeitos à administração de colchicina (*Produtos Farmacêuticos Diamant Ltda.*, Portugal), sedentários (CH) e exercitados (EX+CH), mediante a

administração de uma ou de duas injeções, na dose de 1m/Kg (184), diluída em 0.1ml de soro fisiológico estéril:

- CH48 (n=8) - injectados 48 horas antes do sacrificio,
- CH96 (n=8) - injectados 96 e 48 horas antes do sacrificio,
- EX+CH48 (n=8) - injectados 48 horas antes do sacrificio,
- EX+CH96 (n=8) - injectados 96 e 48 horas antes do sacrificio.

Cada animal dos grupos ALO e EX+ALO recebeu, nos 11 dias que antecederam o seu sacrificio, 10 mg/Kg/dia de alopurinol (*Sigma Chemical CO. St. Louis, USA*), suspenso em 0.1 ml de água, por intubação gástrica (216). Os murganhos do grupo C+VA foram submetidos à administração, também por intubação gástrica, de 0.1 ml de água/dia nos 11 dias que antecederam o seu sacrificio.

Os animais dos grupos EX, EX+CH e EX+ALO foram sujeitos a uma corrida em tapete rolante durante 60 minutos, com 0° de inclinação a uma velocidade de 1000 m/h (correspondendo a cerca de 80% da velocidade máxima dos animais para essa situação) com uma constante estimulação táctil das suas caudas. Antes de realizarem o protocolo de esforço, os animais foram sujeitos a um período de corrida (10 minutos) com velocidade reduzida, de forma a permitir uma adaptação prévia à situação experimental. O tapete rolante, da marca *AVIONICS*, foi previamente adaptado às necessidades de utilização impostas pelos animais através da delimitação de uma área de corrida, de forma rectangular (40x80 cm), a qual foi conseguida com a acopulação de paredes verticais

de madeira à estrutura do tapete (88).

Os animais dos grupos EX e EX+ALO foram sacrificados imediatamente, 48 horas e 96 horas após a finalização do exercício. No grupo EX+CH a administração de colchicina teve início imediatamente após a finalização do exercício físico, razão pela qual os animais deste grupo foram sacrificados 48 horas (n=8) e 96 horas (n=8) após a realização do protocolo de esforço (272, 340).

A todos os animais, sacrificados por deslocamento cervical entre as 9 e as 11 horas, foi retirado o músculo soleus direito, para determinação dos níveis de glutathiona reduzida, e o músculo soleus esquerdo para análise morfológica em microscopia de luz e electrónica, de acordo com a metodologia descrita nas fases experimentais anteriores (2.4.1.1.1. e 2.4.1.2.1.).

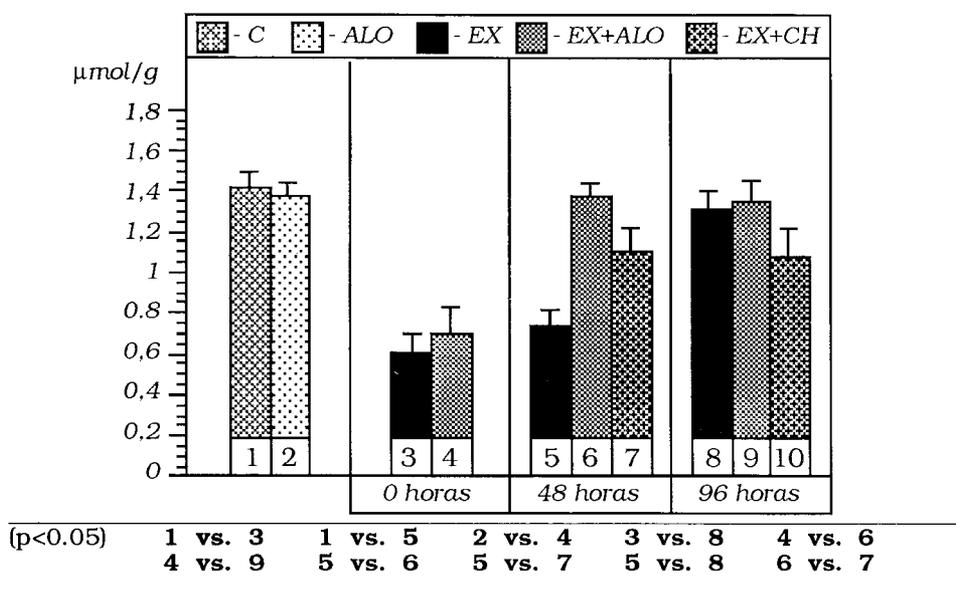
Para quantificação das lesões de miopatia do exercício nos diferentes grupos, foi calculada a média da percentagem de fibras portadoras de qualquer tipo de alteração estrutural (áreas de necrose segmentar e/ou infiltração de fagócitos, aspecto e distribuição dos núcleos, irregularidades do padrão estriado, vacuolização sarcoplasmática). O estudo ultra-estrutural teve por objectivo qualificar as lesões observadas em microscopia óptica.

A descrição da informação analítica e estrutural foi efectuada através da média (M) e do desvio padrão (sd). As diferenças de médias foram testadas a partir do t-teste e da ANOVA I. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

### 2.4.2.2. Resultados

No Gráfico 2 estão ilustrados os valores médios das concentrações de GSH no músculo soleus nos diferentes grupos e sub-grupos experimentais.

**Gráfico 2** - Concentrações de GSH ( $\mu\text{mol/g}$ ) no músculo soleus em vários grupos experimentais.



Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão).

#### Grupos C e EX

As concentrações de GSH muscular nestes dois grupos estão descritas no Quadro 4.

**Quadro 4** - Concentrações de GSH no músculo soleus ( $\mu\text{mol/g}$ ) nos diferentes momentos de observação.

	<b>C</b>	<b>EX</b>		
		0h (2)	48h (3)	96h (4)
	(1)			
<b>M</b>	<b>1.41</b>	<b>0.61</b>	<b>0.74</b>	<b>1.31</b>
sd	$\pm 0.131$	$\pm 0.137$	$\pm 0.179$	$\pm 0.119$
(p<0.05)	<b>1 VS. 2</b>	<b>1 VS. 3</b>	<b>2 VS. 4</b>	<b>3 VS. 4</b>

Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão).

Nos animais do grupo EX foi verificada uma redução significativa, relativamente aos animais controlo, nas concentrações musculares de GSH imediatamente e 48 horas após a finalização do exercício, tendo-se registado a recuperação daqueles valores nos animais sacrificados às 96 horas.

A análise estrutural, efectuada imediatamente após a finalização do exercício, revelou que as anomalias mais evidentes consistiam no edema das fibras, na vacuolização sarcoplasmática (Fig. 12), na presença de irregularidades do padrão estriado (Fig. 13) e na palidez de coloração com o ácido periódico de Schiff; 48 e 96 horas após o exercício físico foram evidentes à microscopia de luz, para além das lesões observadas às 0 horas, uma invasão tecidual de mono e polimorfonucleares circundando as áreas de necrose segmentar das fibras (Fig. 14), bem como a presença de núcleos em posição central (Fig. 15).



**Figura 12** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **imediatamente após** a finalização do exercício. Em algumas fibras é notória a vacuolização sarcoplasmática difusa (x470).

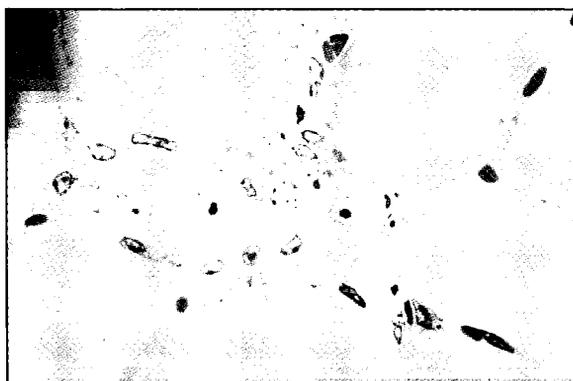
A média da percentagem de fibras lesadas neste grupo foi de  $26,5 \pm 14,98$  às 0 horas,  $47,2 \pm 11,57$  às 48 horas e de  $43,2 \pm 15,19$  às 96 horas após exercício (ver Gráfico 3).



**Figura 13** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **imediatamente após** a finalização do exercício, ilustrando uma área de irregularidades do padrão estriado (x740).



**Figura 14** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **48 horas após** a finalização do exercício. É notória a presença de uma área de necrose segmentar com infiltração de fagócitos (x740).



**Figura 15** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício. São evidentes duas fibras portadoras de núcleos em posição central (x925).

A análise ultra-estrutural evidenciou, imediatamente após o exercício, irregularidades do padrão estriado, edema inter-fibrilar, "swelling" mitocondrial e algumas alterações estruturais endoteliais

(Fig. 16).

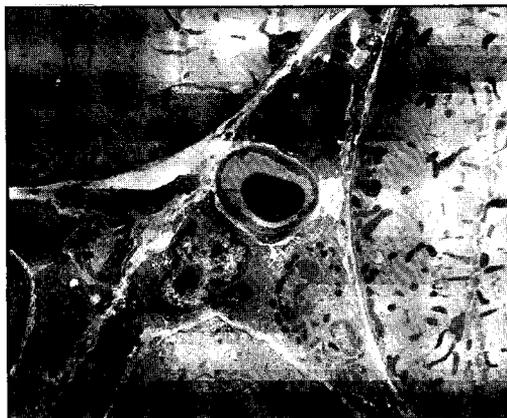


**Figura 16** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **imediatamente após** a finalização do exercício. É visível "swelling" mitocondrial, irregularidades do padrão estriado, algum edema inter-miofibrilar e ligeiras alterações estruturais endoteliais (x1500).

Na observação efectuada às 48 e 96 horas, para além da manutenção destas lesões e dos numerosos lisossomas secundários, foi visualizada uma invasão acentuada de polimorfonucleares e de monócitos/macrófagos, quer no interstício, quer no interior de algumas das fibras lesadas (Fig. 17), e uma exacerbação das alterações das células endoteliais nas regiões adjacentes às fibras lesadas. A infiltração muscular de eosinófilos observada nos animais exercitados foi também muito marcada (Fig. 18, 19). Sinais de regeneração muscular, tais como células satélite activadas e fusão de mioblastos foram mais evidentes às 96 horas após o exercício (Figs. 18, 19).

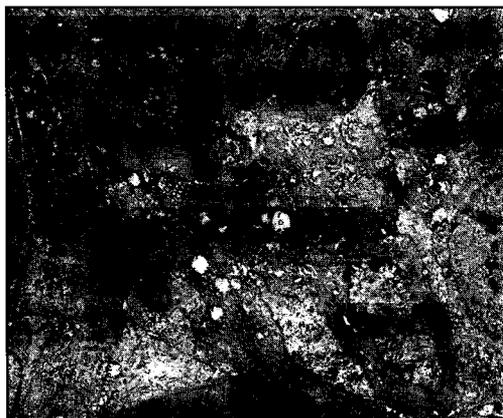


**Figura 17** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício, demonstrando a presença de fagócitos no interior de uma fibra muscular (x800).



**Figura 18** -Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **48 horas após** a finalização do exercício, demonstrando infiltração de eosinófilos e de macrófagos. A activação fibroblástica e a vacuolização endotelial são também alterações evidentes (x1200).

Nos animais do grupo C não foi observada qualquer alteração estrutural nos músculos estudados.



**Figura 19** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício. É de realçar, para além da invasão de fagócitos, a presença de sinais de activação fibroblástica, de mioblastos e de miotúbulos (x1200).

#### Grupos C+VC, CH e EX+CH

As concentrações de GSH muscular nos animais destes grupos estão ilustradas no Quadro 5.

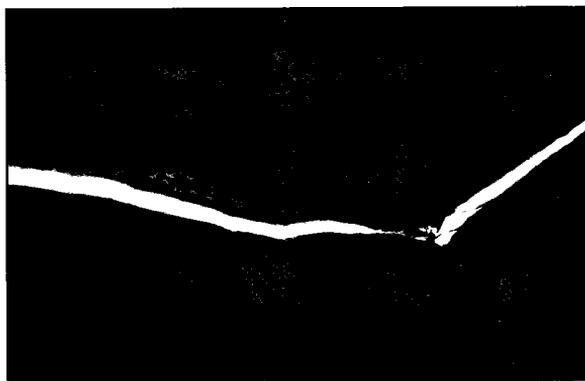
**Quadro 5** - Concentrações de GSH no músculo soleus ( $\mu\text{mol/g}$ ) em diferentes momentos de observação.

	C+VC		CH		EX+CH	
	48h (1)	96h (2)	48h (3)	96h (4)	48h (5)	96h (6)
<b>M</b>	<b>1.45</b>	<b>1.42</b>	<b>1.42</b>	<b>1.37</b>	<b>1.1</b>	<b>1.08</b>
sd	$\pm 0.137$	$\pm 0.067$	$\pm 0.144$	$\pm 0.152$	$\pm 0.213$	$\pm 0.189$
(p<0.05)	<b>1 vs. 5</b>		<b>2 vs. 6</b>		<b>3 vs. 5</b>	<b>4 vs. 6</b>

Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão).

Nos grupos C+VC e CH estas concentrações não apresentaram diferenças significativas relativamente aos animais do grupo C. Comparativamente com os valores de GSH observados às 48 horas no grupo EX, os murganhos do grupo EX+CH sacrificados às 48 horas apresentavam valores significativamente mais elevados daquele peptídeo, mantendo essas concentrações na observação verificada às 96 horas. As diferenças entre os grupos CH96 e EX+CH96 apresentaram também significado estatístico.

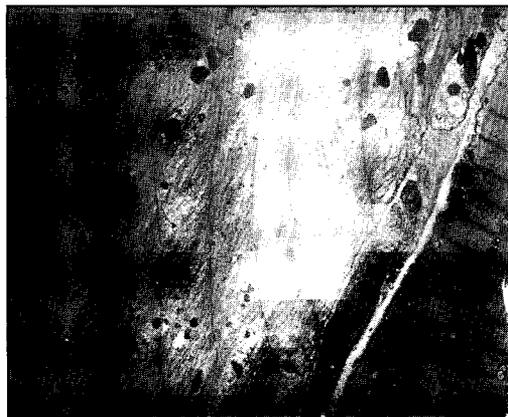
No grupo EX+CH não foi observada qualquer infiltração de leucócitos. Neste grupo, a média da percentagem de fibras lesadas foi de  $25,3 \pm 12,98$  às 48 horas e de  $24,0 \pm 9,69$  às 96 horas (ver Gráfico 3).



**Figura 20** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX+CH sacrificado **48 horas após** a finalização do exercício, ilustrando a presença de áreas de irregularidades do padrão estriado em diferentes fibras musculares (x470).

Com exceção das irregularidades do padrão estriado que

tinham, aparentemente, uma extensão idêntica à observada no grupo EX (Fig. 20), todas as restantes lesões (alterações morfológicas endoteliais, o edema interfibrilar, o "swelling" mitocondrial e a presença de lisossomas secundários), foram menos intensas (Fig. 21) e pareciam afectar uma menor percentagem de fibras musculares. No entanto, às 96 horas, os músculos observados apresentavam uma grande quantidade de detritos celulares (Fig. 22) no espaço intersticial (Fig. 23).

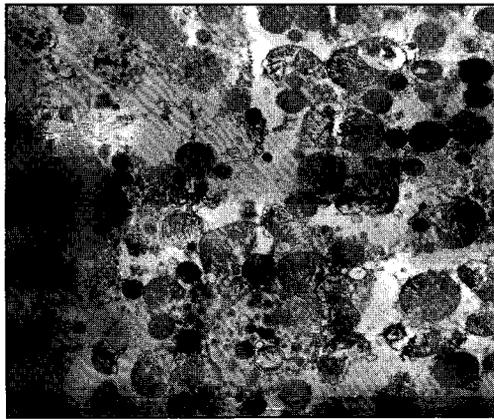


**Figura 21** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+CH sacrificado **48 horas após** a finalização do exercício físico. É visível uma área com alterações das linhas Z e algum "swelling" mitocondrial. As células endoteliais não estão vacuolizadas (x1200).

Focos de regeneração muscular foram também encontrados às 48 e 96 horas (Fig. 24) apesar de possuírem um aspecto diferente daquele observado no grupo EX, uma vez que a formação de miofilamentos nem sempre foi observada (Fig. 25).

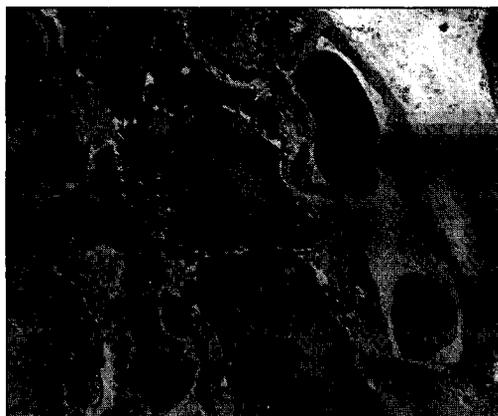


**Figura 22** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX+CH sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício, demonstrando a presença de detritos celulares no espaço intersticial (x590).

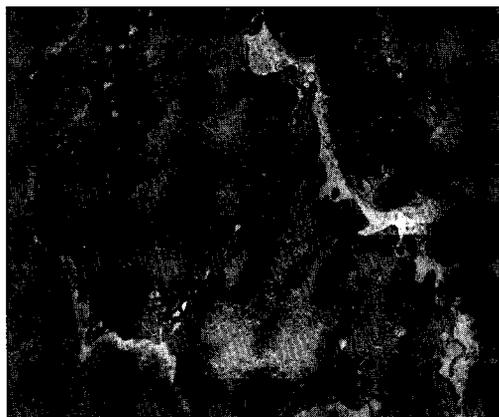


**Figura 23** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+CH sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício. São evidentes, no espaço intersticial, numerosos detritos celulares e lisossomas secundários (x2300).

A análise estrutural e ultra-estrutural nos grupos C+VC e CH não revelou quaisquer fibras portadoras de alterações morfológicas.



**Figura 24** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+CH sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício. São notórios os sinais de regeneração muscular e os detritos celulares no espaço intersticial. O endotélio possui uma estrutura normal (x2300).



**Figura 25** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+CH sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício. Nos mioblastos com francos sinais de activação não são observados miofilamentos (x2300).

#### Grupos C+VA, ALO e EX+ALO

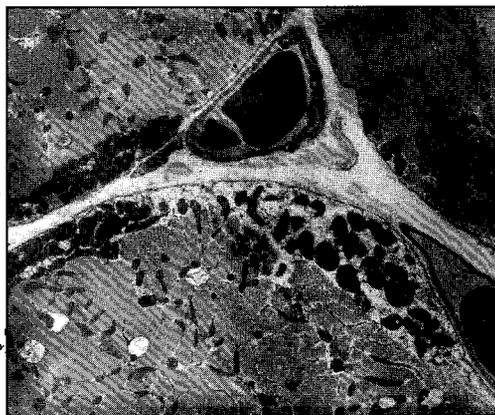
As concentrações de GSH muscular nos animais destes grupos estão ilustradas no Quadro 6.

**Quadro 6** - Concentrações de GSH ( $\mu\text{mol/g}$ ) no músculo soleus em diferentes momentos de observação.

	<b>C+VA</b>	<b>ALO</b>	<b>EX+ALO</b>		
	(1)	(2)	0 h (3)	48 h (4)	96 h (5)
<b>M</b>	<b>1.4</b>	<b>1.38</b>	<b>0.69</b>	<b>1.38</b>	<b>1.35</b>
sd	$\pm 0.093$	$\pm 0.051$	$\pm 0.183$	$\pm 0.05$	$\pm 0.117$
( $p < 0.05$ )	<b>1 vs. 3</b>	<b>2 vs. 3</b>	<b>3 vs. 4</b>	<b>3 vs. 5</b>	

Os valores são médios ( $\pm$ desvio-padrão).

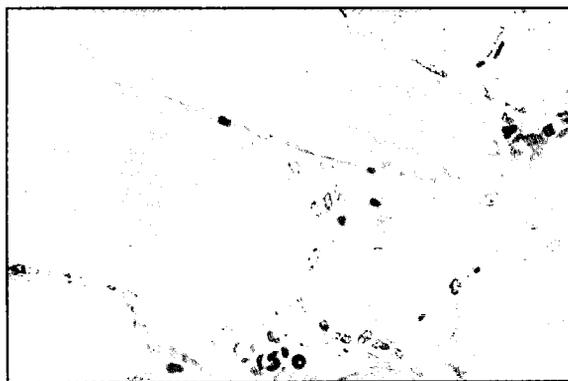
Os valores de GSH nos grupos C+VA e ALO não diferiram significativamente dos observados no grupo C. Nos animais do grupo EX+ALO, tal como nos do grupo EX, também se verificou uma descida acentuada e com significado estatístico, relativamente aos valores do grupo ALO, nas concentrações de GSH imediatamente após a finalização do exercício.



**Figura 26** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+ALO sacrificado **48 horas após** a finalização do exercício. O endotélio capilar adjacente à fibra portadora de um edema ligeiro e de algum "swelling" mitocondrial apresenta uma estrutura normal ( $\times 1200$ ).

Em contraste com o verificado no grupo EX às 48 horas, os valores desse tripeptídeo doseados no grupo EX+ALO foram idênticos aos verificados no grupo ALO tendo-se mantido no doseamento efectuado às 96 horas (Quadro 6).

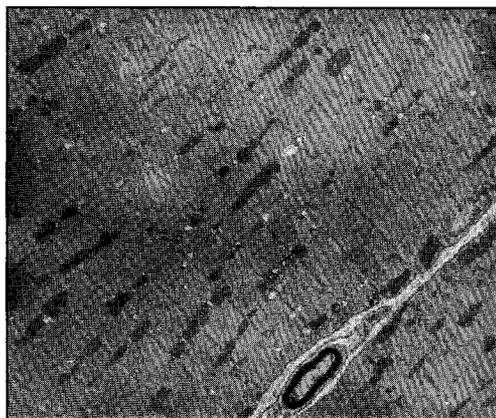
Na análise morfológica do grupo EX+ALO, nas diferentes observações temporais, a ausência de alterações ultra-estruturais nas células endoteliais capilares na proximidade de fibras portadoras de anomalias histológicas foi a observação mais relevante (Fig. 26); mesmo quando observadas, essas alterações endoteliais, comparadas com as do grupo EX, eram muito ténues. Aparentemente, nas observações efectuadas às 48 e 96 horas no grupo EX+ALO, a detecção de leucócitos invasores foi mais rara do que no grupo EX, sugerindo uma menor infiltração muscular por estas células.



**Figura 27** - Fotografia de microscopia óptica do músculo soleus de um animal do grupo EX+ALO sacrificado **96 horas após** a finalização do exercício. De realçar a presença de uma área de necrose segmentar com infiltração celular (x740).

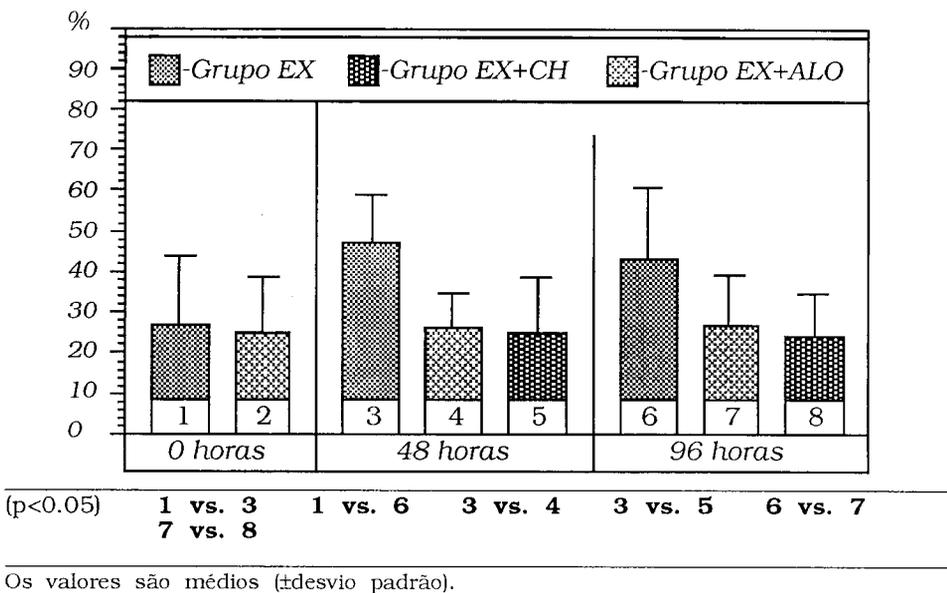
De facto, quase não foram detectados eosinófilos neste grupo

exercitado. Todas as restantes alterações histológicas observadas (Figs. 27 e 28) estavam atenuadas, em aspecto e extensão, relativamente às do grupo EX. No grupo EX+ALO a média da percentagem de fibras lesadas foi de  $25,3 \pm 12,31$  às 0 horas,  $26,2 \pm 8,94$  às 48 horas e de  $27,0 \pm 11,37$  às 96 horas após exercício (ver Gráfico 3). Nos animais dos grupos C+VA e ALO não foram visualizadas fibras musculares portadoras de anomalias estruturais.



**Figura 28** - Fotografia de microscopia electrónica do músculo soleus de um animal do grupo EX+ALO sacrificado **48 horas após** a finalização do exercício. É visível um ligeiro "swelling" mitondrial (x1200).

**Gráfico 3** - Intensidade das lesões de miopatia do exercício nos grupos exercitados em diferentes momentos de observação.



### 2.4.2.3. Discussão dos resultados

Um dos objectivos desta fase experimental foi o de inibir a infiltração e a função leucocitária tecidual nos animais submetidos a exercício físico exaustivo. A utilização do termo "leucócitos" poderá parecer generalista mas, tanto polimorfonucleares (17) como mononucleares (306), foram já encontrados nas áreas musculares lesadas não traumáticamente pelo exercício.

Nos animais do grupo EX+CH, a administração de colchicina efectuada apenas depois da realização da corrida é justificada pelos objectivos deste trabalho. De facto, a invasão leucocitária só se

começa a evidenciar 4 a 6 horas após a finalização do exercício (15), tempo suficiente para que a colchicina, administrada imediatamente após o exercício, exerça os seus efeitos farmacológicos (272, 340). A administração de uma segunda injeção daquele fármaco teve por objectivo manter a inibição leucocitária até às 96 horas após exercício. O intervalo de 48 horas utilizado entre as duas injeções e/ou entre a injeção e o sacrifício dos animais foi baseado nos trabalhos de Kondo et al. (184) com reticulócitos.

Muitos dos resultados da literatura referentes à importância da XO na gênese dos CRO, particularmente em situações de isquemia/reperfusão que utilizam o alopurinol como inibidor daquela enzima, são contraditórios (para refs. ver 86, 117). Este facto parece resultar das diferentes doses utilizadas e do tempo de administração de alopurinol, que são variáveis de autor para autor (86, 216). Optámos pela administração prolongada desse fármaco tendo em conta os resultados de Megison et al. (216) com a administração prolongada de alopurinol e o facto de que, para inibir a XO, o alopurinol necessita primeiro de ser oxidado em oxipurinol (86, 241).

Nos animais do grupo EX, a descida de GSH muscular observada imediatamente após a finalização do esforço de corrida, constitui, aparentemente, um indicador de stress oxidativo (113) motivado pelo exercício (3, 162, 163, 249). Os resultados das concentrações de GSH muscular nos animais tratados com vitamina

E (capítulo 2.4.1.2.) confirmam esta suposição (158). Neste grupo, a recuperação dos valores de GSH observada apenas às 96 horas após o exercício parece ser motivada pela exagerada produção de CRO verificada às 48 horas e não uma consequência da demorada re-síntese celular desse tripeptídeo; a recuperação total da GSH observada às 48 horas no grupo EX+ALO, concordante com o observado em outros tecidos (60, 80), corrobora esta hipótese.

Imediatamente após a finalização do exercício, partindo do princípio que a invasão leucocitária muscular só se começa a verificar algumas horas após a agressão (15), parece estar excluída qualquer responsabilidade dessas células nas variações de concentração de GSH. Tendo em consideração os valores de GSH nos animais do grupo EX+ALO, a possível participação da XO na gênese dos CRO imediatamente após a finalização do exercício, também não parece viável. A hipótese mais provável para a origem dessa agressão oxidativa poderá ser a cadeia respiratória, apesar da participação da ciclo-oxigenase e da lipo-oxigenase, consequentes à activação da fosfolipase A2, não ser de excluir (para refs. ver 19).

Os resultados de Armstrong et al (17), relativos à actividade sanguínea da cretina-quinase e da lactato desidrogenase verificada em ratos após exercício de corrida, sugerem a ocorrência de uma segunda agressão muscular após o exercício físico. Os trabalhos de McCully & Faulkner (209), Faulkner et al. (111) e de Zerba et al. (359) reforçam essa suposição, demonstrando uma segunda lesão

muscular, aparentemente mais intensa do que a primeira, e que se parece relacionar temporalmente com a resposta inflamatória tecidual. Também os resultados de Cannon et al. (51), obtidos com humanos, sugerem que o aumento retardado da permeabilidade do sarcolema se poderá relacionar com a actividade tecidual dos leucócitos invasores. Da mesma forma que o observado por Appell et al. (9) e Soares et al. (299), também nos animais do grupo EX se verificou um agravamento do quadro anatomo-patológico das 0 horas para as 48 horas após o exercício. Neste momento de observação, às 48 horas após exercício, o grupo EX apresentava uma média da percentagem de fibras musculares lesadas significativamente superior à verificada no grupo EX+CH (Gráfico 3). Assim, se há indicações de que a reacção inflamatória, em geral, pode contribuir para o agravamento das lesões da miopatia do exercício (49, 51, 177, 264, 306, 338), os resultados morfológicos dos grupos EX e EX+CH não deixam dúvidas de que a infiltração leucocitária, em particular, contribui significativamente para o exagero desse quadro anatomo-patológico. O facto do agravamento das lesões não se ter verificado nos animais do grupo EX+ALO poderá ser explicado quer pela atenuação da reacção inflamatória tecidual, resultante de uma diminuição da lesão endotelial com menor libertação de factores quimiotácticos (148, 345), quer pela redução do stress oxidativo muscular, como se pode verificar pelos níveis de GSH às 48 horas idênticos aos do grupo ALO.

A comparação dos valores de GSH encontrados às 48 horas nos grupos EX e EX+CH, também sugere que, nos processos de lesão/regeneração muscular motivados pela actividade física, os leucócitos que invadem o tecido para remoção dos detritos celulares e dos segmentos das fibras já pouco viáveis (116, 359), contribuem activamente para a manutenção dos baixos níveis de GSH muscular; os CRO libertados pelos neutrófilos e macrófagos permitem explicar esta observação. De facto, estas células sintetizam elevadas quantidades de CRO, sendo cerca de 70% do oxigénio consumido pelos leucócitos destinado à produção de superóxido (143). Também nos grupos EX e EX+CH, os resultados obtidos às 96 horas sugerem que a infiltração leucocitária é determinante para a recuperação dos níveis de GSH muscular. Colocando a hipótese de que o fenómeno de iniciação e/ou propagação dos CRO (162) pode ocorrer nos detritos celulares, observados em grande quantidade na análise morfológica do grupo EX+CH, as baixas concentrações de GSH muscular verificadas às 96 horas nos animais exercitados e tratados com colchicina, poderão ser explicados pela não remoção das áreas lesadas ou necrosadas das fibras agredidas.

Apesar da aparente concordância dos resultados bioquímicos e morfológicos verificada no grupo EX+CH, se conjugarmos estes dados, às 48 e às 96 horas com os do grupo EX+ALO, as hipóteses colocadas no último parágrafo necessitam de uma interpretação mais pormenorizada, como se pode verificar nos

parágrafos seguintes.

Nas determinações de GSH efectuadas no grupo EX+ALO às 48 e 96 horas após a finalização do exercício, os valores encontrados vêm sugerir, em oposição a Evans e Cannon (103), que a produção de CRO que ocorre 48 horas após a finalização do exercício poderá ser da inteira responsabilidade da XO. Para além da inibição da XO, a administração de alopurinol poderia, por si só, contribuir para essa rápida recuperação dos valores de GSH, tendo em conta o papel anti-oxidante deste fármaco (143, 222). No entanto, a semelhança dos resultados observados às 0 horas nos grupos EX e EX+ALO não parece relevar a acção anti-oxidante do alopurinol. As baixas doses de alopurinol administradas neste trabalho, comparativamente a outros estudos (57, 336), sugerem que a acção anti-oxidante directa deste fármaco poderá ser dose-dependente.

Estes resultados parecem retirar qualquer importância aos neutrófilos e monócitos/macrófagos que invadem o tecido, na génese da agressão oxidativa muscular observada às 48 horas. Caso a XO estivesse presente nos neutrófilos e fosse uma fonte de CRO destas células, conforme foi inicialmente proposto por Tubaro et al. (319), a inibição dessa enzima reduziria a produção de CRO pelos neutrófilos, explicando assim os nossos resultados. Contudo, como tal hipótese não parece confirmar-se (143), não pode ser aceite para justificar os valores de GSH encontrados nos grupos EX+ALO e

EX+CH. A evidência, no grupo EX+ALO, de uma aparente diminuição na infiltração leucocitária, poderá ser uma explicação aceitável. Esta menor infiltração poderá ser justificada pela quase ausência de lesões observadas nas células endoteliais. De facto, sabe-se que as células endoteliais têm um papel activo, e não de alvo, na reacção inflamatória (43, 148, 243). Estas células participam activamente na libertação de mediadores inflamatórios e imunológicos, determinantes da intensidade do quadro inflamatório (43).

A comparação das concentrações de GSH nos grupos EX e EX+ALO também parece contrariar alguns estudos bioquímicos que retiram qualquer importância à XO na gênese tecidual de CRO (para refs. ver 117). Esses trabalhos descrevem, nos homogeneizados do tecido muscular, valores quase nulos da actividade daquela enzima, quer em diferentes animais de laboratório, entre os quais o murganho, quer no Homem (161). Contudo, os resultados de trabalhos histológicos, com utilização da técnica de imunofluorescência, revelaram uma concentração elevada da XO nas células endoteliais capilares de vários tecidos, entre os quais o tecido muscular esquelético (para refs. ver 161); com a homogeneização muscular, a elevada actividade da XO endotelial fica extremamente diluída, explicando assim a discrepância dos resultados dos trabalhos bioquímicos e histológicos.

Existem já bastantes evidências que atribuem aos neutrófilos

um importante papel na indução de lesões nas células endoteliais a nível pulmonar (para refs. ver 345). Ao que tudo indica, as lesões destas células parecem ser da responsabilidade da XO previamente activada e convertida numa oxidase oxigénio-dependente pelos neutrófilos estimulados (243), apesar desses mecanismos não serem ainda totalmente conhecidos (345). Os nossos resultados morfológicos, ao demonstrarem uma quase normalidade das células endoteliais nos animais exercitados e tratados com alopurinol, corroboram essa hipótese a nível muscular. Tudo indica que sejam os CRO, formados pela XO do endotélio muscular, os responsáveis pelas lesões morfológicas dessas células, particularmente evidentes 48 horas após a finalização do exercício nos animais do grupo EX.

No entanto, estes resultados não atribuem exclusivamente aos leucócitos o papel de activação e conversão de XO endotelial. De facto, nos animais tratados com colchicina, a acção dos leucócitos previamente activados sobre a XO das células endoteliais pode ser apreciada indirectamente pelos resultados morfológicos e bioquímicos. Caso aquela acção fosse exclusiva dos leucócitos, diminuindo a funcionalidade dessas células pela administração de colchicina, seria de esperar uma quase ausência de alterações estruturais das células endoteliais, o que não está de acordo com o observado nos animais deste grupo. Da mesma forma, caso aquela acção fosse exclusiva dos leucócitos, neste grupo de animais sacrificados às 48 horas após exercício seria de esperar uma normalidade nas

concentrações de GSH, tal como o verificado no grupo EX+ALO, o que não corresponde ao observado.

Estes resultados retiram aos leucócitos a acção exclusiva de activação e conversão da XO das células endoteliais e reforçam a possível participação de outros mecanismos naquela acção. Para além dos leucócitos, vários mecanismos poderão explicar a activação e transformação da XO endotelial, de desidrogenase para oxidase oxigénio-dependente:

(a) a elevação da temperatura muscular verificada com a actividade física (134, 180);

(b) a agressão oxidativa, observada às 0 horas nos animais exercitados, poderia também induzir essa transformação, de carácter reversível, através da oxidação de alguns dos grupos tiol da enzima (241, 344), para além de poder motivar peroxidação lipídica das membranas das células endoteliais com perda consequente da sua homeostasia ao ião cálcio (108, 109, 110, 191);

(c) as elevadas concentrações deste ião activariam as calpaínas citoplasmáticas (190) com a consequente proteólise da XO, transformando a conversão, até aí reversível, em irreversível (241).

Se a infiltração leucocitária parece ser determinante para a recuperação das concentrações de GSH muscular, conforme é demonstrado pelos resultados do grupo EX+CH às 96 horas após

exercício, ficamos em dúvida se essa acção resulta da remoção dos detritos das fibras musculares e/ou das células endoteliais lesadas. Nestas células, é de esperar, na presença de xantinas e hipoxantinas provenientes do próprio músculo ou do plasma (23), que a XO irreversivelmente convertida numa oxidase oxigénio-dependente, esteja continuamente a produzir CRO até que essas células sejam removidas ou até a enzima ser libertada para a circulação. As alterações morfológicas e/ou funcionais das células endoteliais podem facilitar a saída de XO para o plasma e, dessa forma, serem as responsáveis por uma provável auto-imunização contra a XO, demonstrada pela presença plasmática de anti-corpos anti-XO em humanos clinicamente saudáveis (161). Assim, a elevada quantidade de eosinófilos observada nos animais dos grupos EX às 48 e às 96 horas após o exercício físico e a sua quase ausência no grupo EX+ALO, está de acordo com as observações de Field et al. (114) e corrobora a hipótese das fibras, ou das células endoteliais agredidas, poderem expor determinados antigénios até aí estranhos ao sistema imunológico. Apesar de ter sido descrita a presença de XO no plasma de ratos (337), não temos conhecimento da possível existência, nesses animais de laboratório, de anticorpos anti-XO. Para além da possível libertação para o plasma da XO, considerando que nos animais do grupo EX+CH a XO foi activada por algum(s) dos mecanismos atrás expostos e que não há recuperação dos valores de GSH às 96 horas após a finalização do

exercício, parece lógico atribuir aos leucócitos um papel determinante na remoção das células endoteliais lesadas e, conseqüentemente, na recuperação das concentrações de GSH muscular.

Da mesma forma que os leucócitos que infiltram o músculo, e tendo em consideração a percentagem de fibras lesadas nos animais dos grupos EX e EX+ALO, é possível concluir que a XO, provavelmente pelo stress oxidativo que induz às 48 horas após o exercício, contribui significativamente para o agravamento do quadro anatomo-patológico às 48 e 96 horas após a actividade física.

## 2.5 Conclusões

Da análise dos resultados observados nas diferentes fases experimentais pode concluir-se:

a) as alterações estruturais motivadas pelo exercício possuem um carácter necrótico e inflamatório. Essas lesões são focais, conforme se pode deduzir pelos elevados desvios-padrão encontrados em cada grupo;

b) a intensidade máxima deste quadro anatomo-patológico ocorre entre as 48 horas e as 96 horas após a finalização do exercício e as diferentes alterações estruturais celulares observadas parecem ter diferentes fisiopatologias;

c) quer o processo de degeneração intrínseca, quer o de degeneração extrínseca, contribuem activamente para a manifestação e agravamento das lesões encontradas. Para além dos neutrófilos, monócitos e macrófagos, também os eosinófilos compõem o infiltrado inflamatório. Este infiltrado é decisivo para a remoção dos detritos celulares;

d) as células endoteliais do músculo soleus agredido pelo exercício parecem condicionar a intensidade do infiltrado celular inflamatório;

e) os mecanismos de regeneração muscular estão já activos 48 horas após a finalização do protocolo de esforço;

f) as alterações celulares observadas nos animais exercitados são coincidentes com as induzidas experimentalmente com a perda da homeostasia das fibras ao ião cálcio;

g) a nifedipina diminui a incidência de lesões musculares motivadas pelo exercício físico exaustivo metabolicamente agressivo para o músculo. Estes fármaco, com a dose utilizada, não tem, aparentemente, acção lesiva sobre o músculo esquelético;

h) neste tipo de exercício, os canais lentos de cálcio do sarcolema poderão ter papel importante na perda celular da homeostasia ao ião cálcio;

i) o exercício induz reduções nas concentrações de GSH no músculo soleus, cuja recuperação é apenas observada 96 horas após a finalização do exercício. Estas variações nas concentrações de GSH são atenuadas pela prévia administração crónica de acetato de  $\alpha$ -tocoferol, sugerindo a presença de uma situação de stress oxidativo muscular às 0 horas e às 48 horas após exercício.

j) o tecido muscular pode recuperar completamente as concentrações de GSH em 48 horas a partir de uma depleção de cerca de 60% dos valores observados em repouso. O infiltrado celular inflamatório é decisivo para o restabelecimento muscular dessas concentrações de GSH;

k) a xantina-oxidase endotelial contribui activamente para a redução das concentrações musculares de GSH observadas às 48 horas após o exercício físico. Tudo indica que esta enzima seja a

responsável por uma grande percentagem de fibras lesadas, às 48 e às 96 horas, e pelas alterações morfológicas endoteliais que compõem o quadro anatomo-patológico da miopatia do exercício;

l) a atenuação das reduções das concentrações de GSH observadas com a inibição da função leucocitária são provavelmente devidas à ausência da activação da xantina-oxidase por estas células; para além da infiltração leucocitária, outros mecanismos parecem também activar e converter a XO endotelial após o exercício físico.

m) A acção da XO no agravamento da percentagem de fibras lesadas poderá ser consequência, tal como as concentrações de GSH sugerem, da agressão oxidativa muscular resultante da produção exagerada de CRO por essa enzima.

### 3. Referências

1. ABBOTT, B.C.; BIGLAND, B.; RITCHIE, J.M. (1952): The physiological cost of negative work. *J. Physiol. (Lond.)* 117: 380-390.
2. ABRAHAM, W.M. (1977): Factors in delayed muscle soreness. *Med. Sci. Sports* 9:11-20.
3. ALESSIO, H.M. (1993): Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 218-224.
4. ALESSIO, H.M.; GOLDFARB, A. (1988): Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J. Appl. Physiol.* 64: 1333-1336.
5. AMELINK, G.J.; KAMP, H.H.; BÄR, P.R. (1988): Creatine kinase isoenzyme profiles after exercise in the rat: sex-linked differences in leakage of CK-MM. *Pflügers Arch.* 412: 417-421.
6. AMELINK, G.J.; KOOT, R.W.; ERICH, W.B.M.; van GIJN, J.; BÄR, P.R. (1990): Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation. *Acta Physiol. Scand.* 138: 115-124.
7. AMELINK, G.J.; van KALLEN, C.J.H.; WOKKE, J.H.J.; BÄR, P.R. (1990): Dantrolene sodium diminishes exercise-induced muscle damage in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 179: 187-192.
8. ANDERSON, J.R. (1980): *Muir's Textbook of Pathology*. Eleventh Edition. Fletcher & Son Ltd, Norwich, Great Britain.
9. APPELL, H.-J.; SOARES, J.M.; DUARTE, J.A. (1992): Exercise, muscle damage and fatigue. *Sports Med.* 13: 108-115.
10. APPLE, F.S.; ROGERS, M.A.; CASAL, D.C.; LEWIS, L.; IVY, J.L.; LAMPE, J.W. (1987): Skeletal muscle creatine kinase MB alterations in women marathon runners. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56: 49-52.
11. APPLE, F.S.; ROGERS, M.A.; CASAL, D.C.; SHERMAN, W.M.; IVY, J.L. (1985): Creatine kinase-MB isoenzyme adaptations in stressed human skeletal muscle of marathon runners. *J. Appl. Physiol.* 59: 149-153.
12. ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. (1982): Monoclonal antibody analysis of the mononuclear cells in the muscle biopsy. *Ann. Neurol.* 12: 79.
13. ARMSTRONG, R.B. (1984): Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscle soreness: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 16: 529-538.
14. ARMSTRONG, R.B. (1986): Muscle damage and endurance events. *Sports Med.* 3: 370-381.
15. ARMSTRONG, R.B. (1990): Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22: 429-435.
16. ARMSTRONG, R.B.; LAUGHLIN, M.H.; ROME, L.; TAYLOR, C.R. (1983): Metabolism of rats running up and down an incline. *J. Appl. Physiol.* 55: 518-521.
17. ARMSTRONG, R.B.; OGILVIE, R.W.; SCHWANE, J. A. (1983): Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 54: 80-93.

18. ARMSTRONG, R.B.; PHELTS, R.O. (1984): Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 17: 259-272.
19. ARMSTRONG, R.B.; WARREN, G.L.; WARREN, J.A. (1991): Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med.* 12: 184-207.
20. ASAYAMA, K.; KATO, K. (1990): Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 293-303.
21. ASMUSSEN, E. (1953): Positive and negative muscular work. *Acta Physiol. Scand.* 28: 364-382.
22. AUST, S.D.; SVINGEN, B.A. (1982): The role of iron in enzymatic lipid peroxidation. In: *Free Radicals in Biology*. W.A. Pryor (Ed.), Vol. 5, Academic Press, New York, pp: 1-28.
23. BANGSBO, J.; SJÖDIN, B.; HELLSTEN-WESTING, Y. (1992): Exchange of hypoxanthine in muscle during intense exercise in man. *Acta Physiol. Scand.* 146: 549-550.
24. BÅR, P.R.; AMELINK, G.J.; JACKSON, M.J.; JONES, D.A.; BAST, A. (1990): Aspects of exercise-induced muscle damage. In: *Sports, Medicine and Health*. G.P.H. Hermans & W.L. Mosterd (Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam - New York - Oxford, pp 1143-1148.
25. BÅR, P.R.; AMELINK, G.J.; OLDENBURG, B.; BLANKENSTEIN, M.A. (1988): Prevention of exercise-induced muscle membrane damage by oestradiol. *Life Sci.* 42: 2677-2681.
26. BARACOS, V; 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.
27. BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. (1991): Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med. Suppl.* 3C 92: 2S-13S.
28. BELKIN, M.; LaMORTE, W.L.; WRIGHT, J.G.; HOBSON, R.W. (1989): The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J. Vasc. Surg.* 10: 14-19.
29. BIGLAND-RITCHIE, B.; WOODS, J.J. (1976): Integrated electromyogram and oxygen uptake during positive and negative work. *J. Physiol. (Lond.)* 260: 267-277.
30. BINKHORST, F.M.; KUIPERS, H.; HEYMANS, J.; FREDERIK, P.M.; SLAAF, D.W.; TANGELDER, G.-J.; RENEMAN, R.S. (1989): Exercise-induced focal skeletal muscle fiber degeneration and capillary morphology. *J. Appl. Physiol.* 66: 2857-2865.
31. BINKHORST, F.M.; SLAAF, D.W.; KUIPERS, H.; TANGELDER, G.-J.; RENEMAN, R.S. (1990): Exercise-induced swelling of rat soleus muscle: its relationship with intramuscular pressure. *J. Appl. Physiol.* 69: 67-73.
32. BODENSTEINER, J.B.; ENGEL, A.G. (1978): Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567.000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology (Minneapolis)* 28: 439-446.
33. BOIS, P.; ROMÉY, G.; LAZDUNSKI, M. (1991): Indolizinsulphones. A class of blockers with dual but discriminative effects on L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 419: 651-656.
34. BONNER, H.W.; LESLIE, S.W.; COMBS, A.B.; TATE, C.A. (1976): Effects of exercise training and exhaustion on <sup>45</sup>Ca uptake by rat skeletal muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 14: 767-770.

35. BORLE, A.B. (1990): An overview of techniques for the measurement of calcium distribution, calcium fluxes, and cytosolic free calcium in mammalian cells. *Environ. Health Persp.* 84: 45-56.
36. BOUSQUET, E.; SANTAGATI, N.A.; LANCETTA, T. (1989): Determination of glutathione in biological tissues by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Pharmac. Biomed. Analysis* 7: 643-647.
37. BOVERIS, A.; CADENAS E.; STOPPANI, A.O.M. (1976): Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156: 435-444.
38. BRAZEAU, G.A.; FUNG, H.-L. (1990): Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J. Pharm. Sci.* 79: 393-397.
39. BRENDSTRUP, P. (1962): Late edema after muscular exercise. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 43: 401-405.
40. BROOKS, G.A.; FAHEY, T.D. (1985): *Exercise Physiology: Human Bioenergetics and its Applications*. MacMillan Pub. Comp., New York.
41. BROOKS, S.V.; FAULKNER, J.A. (1990): Contraction-induced injury: recovery of skeletal muscles in young and old mice. *Am. J. Physiol.* 258: C436-C442.
42. BUCKLEY, I.K. (1972): A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. *Lab. Invest.* 26: 201-209.
43. BUCKLEY, B.J.; BARCHOWSKY, A.; DOLOR, R.J.; WHORTON, A.R. (1991): Regulation of arachidonic acid release in vascular endothelium. Ca<sup>2+</sup> - dependent and -independent pathways. *Biochem. J.* 280: 281-287.
44. BUSCH, W.A.; STROMER, M.H.; COLL, D.E.; SUZUKI, A. (1972): Ca<sup>2+</sup> specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 52: 367-381.
45. BYRD, S.K. (1992): Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 24: 531-536.
46. BYRD, S.K.; BODE, A.K.; KLUG, G.A. (1989): Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function. *J. Appl. Physiol.* 66: 1383-1388.
47. BYRNES, W.C.; CLARKSON, P.M. (1986): Delayed onset muscle soreness and training. *Clin. Sports Med.* 5: 605-614.
48. BYRNES, W.C.; CLARKSON, P.M.; WHITE, J.S.; HSIEH, S.S.; FRYKMAN, P.N.; MAUGHAN, R.J. (1985): Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. *J. Appl. Physiol.* 59: 710-715.
49. CANNON, J.G.; FIELDING, R.A.; FIATARONE, M.A.; ORENCOLE, S.F.; DINARELLO, C.A.; EVANS, W.J. (1989): Increased interleukin 1B in human skeletal muscle after exercise. *Am. J. Physiol.* 257: R451-R455.
50. CANNON, J.G.; KLUGER, M.J. (1983): Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. *Science Wash. DC* 220: 617-619.
51. CANNON, J.G.; ORENCOLE, S.F.; FIELDING, R.A.; MEYDANI, M.; MEYDANI, S.N.; FIATARONE, M.A.; BLUMBERG, J.B.; EVANS, W.J. (1990): Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. *Am. J. Physiol.* 259: R1214-R1219.
52. CANONICO, P.G.; BIRD, J.W.C. (1970): Lysosomes in skeletal muscle tissue. Zonal centrifugation evidence for multiple cellular sources. *J. Cell Biol.* 45: 321-333.
53. CARAFOLI, E. (1987): Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 395-433.

54. CARLSON, B.M. (1973): The regeneration of skeletal muscle: a review. *Am. J. Anat.* 173: 119-150.
55. CARLSON, B.M.; FAULKNER, J.A. (1983): The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15: 187-198.
56. CARLSON, B.M.; HANSEN-SMITH, F.M.; MAGON, D.K. (1979): The life history of a free muscle graft. In: *Muscle Regeneration*. A. Mauro (Ed.), Raven Press, New York. pp: 493-507.
57. CASTILLO, M.; TOLEDO-PEREYRA, L.H.; SHAPIRO, E.; GUERRA, E.; PROUGH, D.; FRANTZIS, P. (1990): Protective effect of allopurinol, catalase, or superoxide dismutase in the ischemic rat liver. *Transplant. Proc.* 22: 490-491.
58. CERNEY, F.; HARALAMBIE, G. (1983): Exercise-induced loss of muscle enzymes. In: *Biochemistry of Exercise*. H. Knuttgen, J. Vogel & J. Poortmans (Eds.), Champaign, IL: Human Kinetics, pp: 441-446.
59. CHEETHAN, M.E.; BOOBIS, L.H.; BROOKS, S.; WILLIAMS, S. (1986): Human muscle metabolism during sprint running. *J. Appl. Physiol.* 61: 54-60.
60. CHEN, T.S.; RICHIE, J.P.; LANG, C.A. (1990): Life span profiles of glutathione and acclaminophen detoxification. *Drug Metab. Dispos.* 18: 882-886.
61. CHIA, L.S.; THOMPSON, J.E.; MOSCARELLO, M.A. (1983): Disorders in human myelin induced by superoxide radical: an in vitro investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 141-146.
62. CHOW, C.K. (1991): Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 215-232.
63. CLARKSON, P.M. (1992): Exercise-induced muscle damage - animal and human models. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 510-511.
64. CLARKSON, P.M.; BYRNES, W.C.; McCORMICK, K.M.; TURCOTTE, L.P.; WHITE, J.S. (1986): Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric, and concentric exercise. *Int. J. Sports Med.* 7: 152-155.
65. CLARKSON, P.M.; EBBELING, C.B. (1988): Investigation of serum creatine kinase variability after muscle-damaging exercise. *Clin. Sci.* 75: 257-261.
66. CLARKSON, P.M.; NOSAKA, K.; BRAUN, B. (1992): Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 512-520.
67. CLARKSON, P.M.; TREMBLAY, I. (1988): Exercise-induced muscle damage, repair and adaptation in humans. *J. Appl. Physiol.* 65: 1-6.
68. COCHRANE, C. (1991): Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med. Suppl.* 3C: 91: 23S-30S.
69. COLOMO, F.; LAMBARDI, V.; PIAZZESI, G. (1988): The mechanisms of force enhancement during constant velocity lengthening in tetanized single fibres of frog muscle. *Adv. Exper. Med. Biol.* 226: 489-502.
70. COLSON, J.H.C.; ARMOUR, W.J. (1975): *Sports Injuries and Their Treatment*. Stanley Paul, London.
71. CORCORAN, G.B.; RAY, S.D. (1992): The role of the nucleus and other compartments in toxic cell death produced by alkylating hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 167-183.
72. CORREIA, J.J. (1991): Effects of antimetabolic agents on tubulin-nucleotide interactions. *Pharmacol. Ther. (England)* 52: 127-147.

73. COSTILL, D.L.; GOLLNICK, P.D.; JANSSON, E.D.; SALTIN, B.; STEIN, E.M. (1973): Glycogen depletion pattern in human muscle fibres during distance running. *Acta Physiol. Scand.* 89: 374-383.
74. CRADDOCK, P.R.; HAMMERSCHMIDT, D.E.; MOLDOW, C.F.; YAMADA, O.; JACOB, H.S. (1979): Granulocyte aggregation as a manifestation of membrane interactions with complement: possible role in leucocyte margination, microvascular occlusion, and endothelial damage. *Semin. Hematol.* 16: 140-147.
75. CRONENWETT, J.L.; LEE, K.R.; SHLAFFER, M.; ZELENOCK, G.B. (1989): The effect of ischemia-reperfusion derived oxygen free radicals on skeletal muscle calcium metabolism. *Microcirc. Endoth. Lymphatics* 5: 171-187.
76. CULLEN, M.J.; APPELYARD, S.T.; BINDOFF, L. (1979): Morphological aspects of muscle breakdown and lysosomal activation. *Ann. NY Acad. Sci.* 317: 440-464.
77. DARGEL, R. (1992): Lipid peroxidation - a common pathogenetic mechanism? *Exp. Toxicol. Pathol.* 44: 169-181.
78. DARR, K.C.; SCHULTZ, E. (1987): Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63: 1816-1821.
79. DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PARKER, L. (1982): Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.
80. DENECKE, S.M.; STEIGER, V.; FANBURG, B.L. (1987): Effect of hyperoxia on glutathione levels and glutamic acid uptake in endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* 63: 1966-1971.
81. DESCHENES, M.R.; KRAEMER, W.J.; MARESH, C.M.; CRIVELLO, J.F. (1991): Exercise-induced hormonal changes and their effects upon skeletal muscle tissue. *Sports Med.* 12: 80-93.
82. deVRIES, H.A. (1960): Prevention of muscular distress after exercise. *Res. Quart.* 32: 177-185.
83. deVRIES, H.A. (1966): Quantitative electromyographic investigation of the spasm theory of muscle pain. *Am. J. Phys. Med.* 45: 119-134.
84. DILLARD, C.J.; LITOR, R.E.; SAVIN, W.M.; DUMELIN, E.E.; TAPPEL, A.L. (1978): Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45: 927-932.
85. DIXON, I.M.C.; KANEKO, M.; HATA, T.; PANAGIA, V.; DHALLA, N.S. (1990): Alterations in cardiac membrane Ca<sup>2+</sup> transport during oxidative stress. *Mol. Cell Biochem.* 99: 125-133.
86. DOWNEY J.M. (1990): Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 487-504.
87. DUAN, C.; DELP, M.D.; HAYES, D.A.; DELP, P.D.; ARMSTRONG R.B. (1990): Rat skeletal muscle mitochondria [Ca<sup>2+</sup>] and injury from downhill walking. *J. Appl. Physiol.* 68: 1241-1251.
88. DUARTE, J.A. (1990): *Miopatia do Exercício-Alterações Estruturais no Músculo Esquelético do Ratinho Sujeito a Dois Protocolos Diferentes de Corrida*. Monografia apresentada às Provas de Aptidão Pedagógica e de Capacidade Científica, Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física, Universidade do Porto.
89. DUARTE, J.A.; SOARES, J.M. (1990): Sensação retardada de desconforto muscular. Etiologia, fisiopatologia, tratamento e prevenção. *Rev. Port. Med. Desp.* 8: 155-162.

90. DUARTE, J.A.; SOARES, J.M. (1991): Etiologia da fadiga muscular. Alguns factores condicionantes. *Rev. Port. Med. Desp.* 9: 165-174.
91. DUARTE, J.A.; SOARES, J.M. (1991): Papel do ião cálcio na miopatia do exercício. Actas do II Congresso de Educação Física dos Países de Língua Portuguesa, *As Ciências do Desporto e a Prática Desportiva no Espaço da Língua Portuguesa*. Vol. 2, pp: 95-102.
92. DUBOWITZ, V. (1985): *Muscle Biopsy: a Pratical Approach*. 2ª Edition. Bailliére Tindall.
93. DUNCAN, C.J. (1987): Role of calcium in triggering rapid ultrastructural damage in muscle: a study with chemically skinned fibrés. *J. Cell. Sci.* 87: 581-594.
94. DUNCAN, C.J. (1989): Mechanisms that produce rapid damage to myofilaments of amphibian skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 12: 210-218.
95. DUNCAN, C.J. (1989): Cytotoxicity of phenazine methosulphate on skeletal muscle. The role of the sarcoplasmic reticulum in initiating myofilament damage. *Virchows Archiv. B (Cell Pathol.)* 56: 271-276.
96. DUNCAN, C.J.; JACKSON, M.J. (1987): Different mechanisms mediate structural changes and intracellular enzyme efflux following damage to skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 87: 183-188.
97. DUTHIE, G.G.; WAHLE, K.W.J.; HARRIS, C.I.; ARTHUR, J.R.; MORRICE, P.C. (1992): Lipid peroxidation, antioxidant concentrations, and fatty acid contents of muscle tissue from malignant hyperthermia-susceptible swine. *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 592-596.
98. EBBELING, C.B.; CLARKSON, P.M. (1989): Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med.* 7: 207-234.
99. EBBELING, C.B.; CLARKSON, P.M. (1990): Muscle adaptation prior to recovery following eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 60: 26-31.
100. ENGEL, A.G.; ARAHATA, K. (1986): Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell mediated cytotoxicity in some diseases and implication for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Hum. Pathol.* 17: 704-721.
101. ENGEL, A.G.; ARAHATA, K.; BIESECKER, G. (1984): Mechanisms of muscle fiber destruction. In: *Neuromuscular Diseases*. Serratrice et al. (Eds.), Raven Press, New York, pp.137-141.
102. EVANS, W.J. (1992): Exercise, nutrition and aging. *J. Nutr.* 122: 796-801.
103. EVANS, W.J.; CANNON, J.G. (1991): The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. In: *Exercise and Sports Sciences Reviews*. Vol. 19. Baltimore: Williams and Wilkins. pp: 99-125.
104. EVANS, W.J.; MEREDITH, C.N.; CANNON, J.G.; DINARELLO, C.A.; FRONTERA, W.R.; HUGHES, V.A.; JONES, B.H.; KNUTTGEN, H.G. (1986): Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *J. Appl. Physiol.* 61: 1864-1868.
105. FAGAN, J.M.; WAJNBERG, E.F.; CULBERT, L.; WAXMAN, L. (1992): ATP depletion stimulates calcium-dependent protein breakdown in chick skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 262: E637-E643.
106. FAGGIOTTO A.(1991): Therapy of atherosclerosis: When? In: *The Universe of Adalat. Potentials*. P.R. Lichtlen & A. Reale (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 169-179.

107. FARBER, J.L. (1981): The role of calcium in cell death. *Life Sci.* 29: 1289-1295.
108. FARBER, J.L. (1982): Membrane injury and calcium homeostasis in pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab. Invest.* 47: 114-123.
109. FARBER, J.L. (1990): The role calcium in lethal cell injury. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 503-508.
110. FARBER, J.L. (1990): The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environm. Health Persp.* 84: 107-111.
111. FAULKNER, J.; JONES, D.A.; ROUND, J.M. (1989): Injury to skeletal muscles of mice by forced lengthening during contractions. *Q. J. Exp. Physiol.* 74: 661-670.
112. FAWTHROP, D.J.; BOOBIS, A.R.; DAVIES, D.S. (1991): Mechanisms of cell death. *Arch. Toxicol.* 65: 437-444.
113. FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; CARGNONI, A.; ALFIERI, O.; PARDINI, A.; MARZOLLO, P.; VISIOLI, O. (1991): Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am. J. Med. Suppl* 3C 91: 95S-105S
114. FIELD, C.J.; GOUGEON, R.; MARLISS, E.B. (1991): Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J. Appl. Physiol.* 71: 1089-1097.
115. FISCHER, J.E.; HASSELGREN, P.-O. (1991): Cytokines and glucocorticoids in the regulation of the "hepato-skeletal muscle axis" in sepsis. *Am. J. Surg.* 161: 266-271.
116. FISHER, B.D.; BARACOS, V.E.; SHNITKA, T.K.; MENDRYK, S.W.; REID, D.C. (1990): Ultrastructural events following acute muscle trauma. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22: 185-193.
117. FLAHERTY, J.T. (1991): Myocardial injury mediated by oxygen free radicals. *Am. J. Med. Suppl* 3C 91: 79S-85S.
118. FRIDÉN, J. (1984): Changes in human skeletal muscle induced by long-term eccentric exercise. *Cell Tissue Res.* 236: 365-372.
119. FRIDÉN, J.; KJÖRELL, U.; THORNELL, L.-E. (1984): Delayed muscle soreness and cytoskeletal alterations: an immunocytochemical study in man. *Int. J. Sports Med.* 5: 15-18.
120. FRIDÉN, J.; LIEBER, R.L. (1992): Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 521-530.
121. FRIDÉN, J.; SEGER, J.; EKBLOM, B. (1988): Sublethal muscle fiber injury after high-tension anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 360-368.
122. FRIDÉN, J.; SEGER, J.; SJÖSTRÖM, M.; EKBLOM, B. (1983): Adaptive response in human skeletal muscle subjected to prolonged eccentric training. *Int. J. Sports Med.* 4: 177-183.
123. FRIDÉN, J.; SFAKIANOS, P.N.; HARGENS, A.R. (1986): Muscle soreness and intramuscular fluid pressure: comparison between eccentric and concentric load. *J. Appl. Physiol.* 61: 2175-2179.
124. FRIDÉN, J.; SJÖSTRÖM, M.; EKBLOM, B. (1981): A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia* 37: 506-507.

125. FRIDÉN, J.; SJÖSTRÖM, M.; EKBLÖM, B. (1983): Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int. J. Sports Med.* 4: 170-176.
126. FRITZ, V.K.; STAUBER, W.T. (1988): Characterization of muscles injured by forced lengthening. II. Proteoglycans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20: 354-361.
127. FROLICH, M.; WALMA, S.J.; SOUVERIJN, J.H.M. (1981): Probable influence of cage desing on muscle metabolism of rats. *Lab. Anim. Sci.* 31: 510-512.
128. GAMBLE, J.G. (1988): *The Musculoskeletal System: Physiological Basics*. Raven Press, New York.
129. GARCIA, J.; AVILA-SAKAR, A.J.; STEFANI, E. (1990): Repetitive stimulation increases the activation rate of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> currents. *Plügers Arch.* 416: 210-212.
130. GARNER, M.H.; GARNER, T.H.; SPECTOR, A. (1984): Kinetic cooperativity change after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modification of (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 259: 7712-7718.
131. GEROK, W.; HEILMANN, C.; SPAMER, C. (1990): Regulation of intracellular calcium by endoplasmic reticulum of hepatocytes. *Intracellular Calcium Regulation*. Alan R. Liss, Inc. pp: 249-270.
132. GIDDINGS, G.J.; NEAVES, W.B.; GONYEA, W.J. (1985): Muscle fiber necrosis and regeneration induced by prolonged weigh-lifting exercise in the cat. *Anat. Rec.* 211: 133-141.
133. GOLLNICK, P. D. (1986): Metabolic regulation in skeletal muscle: influence of endurance training as exerted by mitochondrial protein concentration. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 556 128: 53-66.
134. GOLLNICK, P. D. (1989): Skeletal muscle morphology: adaptations to altered demands. In: *Fucture Directions in Exercise and Sport Science Research*. J.S. Skinner, C.B. Corbin, D.M. Landers, P.E. Martin & C.L. Wells (Eds). Human Kinetics Book, Champaign, Illinois. pp: 275-292.
135. GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. (1990): Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258: C755-C786.
136. HALLIWELL, B. (1991): Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role of human disease. *Am. J. Med. Suppl.* 3C 91: 14S-22S.
137. HAMILL, J.; FREEDSON, P.S.; CLARKSON, P.M.; BRAUN, B. (1991): Muscle soreness during running: biomechanical and physiological considerations. *Int. J. Sport Biomech.* 7: 125-137.
138. HAMMEREN, J.; POWERS, S.; LAWLER, J.; CRISWELL, D.; MARTIN, D.; LOWENTHAL, D.; POLLOCK, M. (1992): Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. *Int. J. Sports Med.* 13: 412-416
139. HANG, Y.; TANG, C.M.; CHENG, C.K.; CHOU, Y.L. (1991): Muscle soreness and serum creatine kinase activity following concentric and eccentric contraction. *Proceedings of the Second IOC World Congress on Sport Sciences*. Barcelona. p: 307.
140. HANSFORD, R.G. (1985): Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 102: 1-72.
141. HARRISON - *Medicina Interna* (1988). E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson, J.B. Martin & A.S. Fauci (Eds.), 11ª Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

142. HASSON, S.M.; DANIELS, J.C.; DIVINE, J.G.; NIEBUHR, B.R.; RICHMOND, S.; STEIN, P.G.; WILLIAMS, J.H. (1993): Effect of ibuprofen use on muscle soreness, damage, and performance: a preliminary investigation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 9-17.
143. HEARSE, D.J.; MANNING, A.S.; DOWNEY, J.M.; YELLON, D.M. (1986): Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548: 65-7.
144. HEIZMANN, C.W.; SCHÄFER, B.W. (1990): Internal calcium-binding proteins. *Seminars Cell Biol.* 1: 277-282.
145. HELLSTEN, Y.; AHLBORG, G.; JENSEN-URSTAD, M.; SJODIN, B. (1988): Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol. Scand.* 134: 159-160.
146. HENSON, P.M.; JOHNSTON, R.B. (1987): Tissue injury in inflammation. *J. Clin. Invest.* 79: 669-674.
147. HIKIDA, R.S.; STARON, R.S.; HAGERMAN, F.C.; SHERMAN, W.M.; COSTILL, D.L. (1983): Muscle fiber necrosis associated with human marathon runners. *J. Neurol. Sci.* 59: 185-203.
148. HILL, R.B.; LAVIA, M.F. (1980): *Principles of Pathobiology*. Third Edition. Oxford University Press, Inc. New York. Oxford.
149. HOLZER, H.; HEINRICH, P.C. (1980): Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 63-91.
150. HOMMEN, N.; CADE, R.; PRIVETTE, M. (1991): The effects of fluid and protein intake on muscle damage during exercise. In: *Aquatic Sports Medicine*. J.M. Cameron (Ed.), Ferrand Press, London. pp: 194-197.
151. HUDGSON, P.; FIELD, E.J. (1973): Regeneration of muscle. In: *The Structure and Function of Muscle*. 2 Edition. Vol. 2 Part 2. G.H. Bourne (Ed.), Academic Press. New York. pp: 311-363.
152. HULTMAN, E.; SJOHOLM, H.; SAHLIN, K.; EDSTROM, L. (1981): Glycolytic and oxidative energy metabolism and contraction characteristics of intact human muscle. In: *Human Muscle Fatigue: Physiological Mechanisms*. R. Porter & J. Whelan (Eds.), Pitman Medical, London. pp: 19-35.
153. HURME, T.; KALIMO, H. (1992): Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 197-205.
154. HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, H. (1991): Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 801-810.
155. INESI, G.; MILLMAN, M.; ELETR, S. (1973): Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Mol. Biol.* 81: 483-504.
156. IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. (1987): Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. *Cell Tissue Res.* 249: 509-521.
157. ISAACS, H. (1977): Myopathy and malignant hyperthermia. In: *The Second International Symposium on Malignant Hyperthermia*. J.A. Aldrete & B.A. Britt (Eds.), New York. Grune & Stratton.
158. JACKSON, M.J.; EDWARDS, R.T.H. (1988): Free radicals, muscle damage and muscular dystrophy. In: *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine*. A. Quintanilha (Ed.), Plenum Press, New York. pp: 197-210.

159. JACKSON, M.J.; JONES, D.A.; EDWARDS, R.T.H. (1984): Experimental skeletal muscle damage: the nature of calcium activated degenerative processes. *Eur. J. Clin. Invest.* 369-374.
160. JANSSEN, G.M.E.; KUIPERS, H.; WILLEMS, G.M.; DOES, R.J.M.M.; JANSSEN, M.P.E.; GEURTEN, P. (1989): Plasma activity of muscle enzymes: quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables. *Int. J. Sports Med. Suppl.* 3 10: S160-S168.
161. JARASCH, E.-D.; BRUDER, G.; HEID, H.W. (1986): Significance of xantine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.* Suppl 584: 39-46.
162. JENKINS, R.R. (1988): Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 5: 156-170.
163. JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. (1993): Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 210-212.
164. JENKINS, R.R.; KRAUSE, K.; SCHOFIELD, L.S. (1993): Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 213-217.
165. JENNISCHE, E. (1985): Ischaemia-induced injury in glycogen-depleted skeletal muscle. Selective vulnerability of FG-fibres. *Acta Physiol. Scand.* 125: 727-734.
166. JI, L.L. (1993): Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 225-231.
167. JONES, D.A.; NEWHAM, D.J.; CLARKSON, P.M. (1987): Skeletal muscle stiffness and pain following eccentric exercise of the elbow flexors. *Pain* 30: 233-242.
168. JONES, D.A.; NEWHAM, D.J.; ROUND, J.M.; TOLFREE, S.E.J. (1986): Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *J. Physiol. (Lond.)* 375: 435-448.
169. JUEL, C.; BANGSBO, J.; GRAHAM, T.; SALTIN, B. (1990): Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiol. Scand.* 140: 147-159.
170. KAMEYAMA, T.; ETLINGER, J.D. (1979): Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. *Nature* 279: 344-346.
171. KANEKO, M.; SINGAL, P.K.; DHALLA, N.S. (1990): Alterations in heart sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> - ATPase and Ca<sup>2+</sup> -binding activities due to oxygen free radicals. *Basic Res. Cardiol.* 85: 45-54.
172. KANTER, M.M.; LESMES, G.R.; KAMINSKY, L.A.; HAM-SÆGER, J.; NEQUIN, N.D. (1988): Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 60-63.
173. 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.
174. KAYAR, S.R.; HOPPELER, H.; HOWALD, H.; CLAASSEN, H.; OBERHOLZER, F. (1986): Acute effects of endurance exercise on mitochondrial distribution and skeletal muscle morphology. *Eur. J. Appl. Physiol.* 54: 578-584.
175. KENDALL, A.; HOFFMAN-GOETZ, L.; HOUSTON, M.; MacNEIL, B.; ARUMUGAM, Y. (1990): Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration, and subject fitness effects. *J. Appl. Physiol.* 69: 251-260.

176. KEUL, J.; DOLL, E.; KEPPLER, D. (1972): *Energy Metabolism of Human Muscles*. S. Karger, Basel.
177. KIHILSTRÖM, M.; SALMINEN, A.; VIHKO, V. (1984): Prednisolone decreases exercise-induced acid hydrolase response in mouse skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 53: 53-56.
178. KIHILSTRÖM, M.; SALMINEN, A.; VIHKO, V. (1988): Food deprivation decreases the exertion-induced acid hydrolase response in mouse skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 177-180.
179. KIM, K.J. (1991): Blood cell parameters related to immunity function during training and resting phase in athletes. *Proceedings of the Second IOC World Congress on Sport Sciences*. Barcelona. p: 240.
180. KLUG, G.A.; TIBBITS, G.F. (1988): The effect of activity on calcium-mediated events in striated muscle. *Exercise Sport Sciences Reviews*. Vol. 16. Baltimore: Williams and Wilkins. pp: 1-59.
181. KNOCHEL, J.P. (1982): Rhabdomyolysis and myoglobinuria. *Ann. Rev. Med.* 33: 435-443.
182. KNUITGEN, H.G. (1986): Human performance in high-intensity exercise with concentric and eccentric muscle contractions. *Int. J. Sports Med. Suppl.* 7: 6-9.
183. KOMI, P.V.; RUSKO, O. (1974): Quantitative evaluation of mechanical and electrical changes during fatigue loading of eccentric and concentric work. *Scand. J. Rehab. Med. Suppl.* 3: 121-126.
184. KONDO Y, HONDA S, NAKAJIMA M, MIYAHANA K, HAYASHI M, SHINAGAWA Y, SATO S, INOUE K, NITO S, ARIYUKI F (1992) Micronucleus test with vincristine sulfate and colchicine in peripheral blood reticulocytes of mice using acridine orange supravital staining. *Mutat. Res.* 278: 187-191.
185. KOREN, A.; SUABER, C.; SENTJURO, M.; SCHARA, M. (1983): Free radicals in tetanic activity of isolated skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 633-635.
186. KRETZSCHMAR, B.; KLINGER, W. (1990): The hepatic glutathione system - influences of xenobiotics. *Exp. Pathol.* 38: 145-164.
187. KUIPERS, H.; DRUKKER, J.; FREDERIK, P.M.; GEURTEN, P.; KRANENBURG, G.V. (1983): Muscle degeneration after exercise in rats. *Int. J. Sports Med.* 4: 45-51.
188. KUIPERS, H.; JANSSEN, G.M.E.; BOSMAN, F.; FREDERIK, P.M.; GEURTEN, P. (1989): Structural and ultrastructural changes in skeletal muscle associated with long-distance training and running. *Int. J. Sports Med. Suppl.* 3 10: S156-S159.
189. KUIPERS, H.; KEISER, H.A.; VERSTAPPEN, F.T.J.; COSTILL, D.C. (1985): Influence of a prostaglandin inhibiting drug on muscle soreness after eccentric work. *Int. J. Sports Med.* 6: 336-339.
190. KUMAMOTO, T.; KLEESE, W.C.; CONG, J.; GOLI, D.E.; PIERCE, P.R.; ALLEN, R.E. (1992): Localization of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat. Rec.* 232: 60-77.
191. KUTRYK, M.J.B.; MADDAFORD, T.G.; RAMJIWAN, B.; PIERCE, G.N. (1991): Oxidation of membrane cholesterol alters active and passive transsarcolemmal calcium movement. *Circ. Res.* 68: 18-26.

192. LAUGHLIN, M.H.; SIMPSON, T.; SEXTON, W.L.; BROWN, O.R.; SMITH, J.K.; KORTHUIS, R.J. (1990): Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 68: 2337-2343.
193. LEGROS, P.; JEHEONSON, P.; GASCARD, J.P.; KOZAK-REISS, G. (1992): Long-term relationship between acute rhabdomyolysis and abnormal high-energy phosphate metabolism potentiated by ischemic exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 298-302.
194. LEMASTERS, J.J.; di GUISEPPI, J.; NIEMINEN, A.-L.; HERMAN, B. (1987): Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325: 78-81.
195. LEMASTERS, J.J.; GORES, G.J.; NIEMINEN, A.-L.; DAWSON, T.L.; WRAY, B.E.; HERMAN, B. (1990): Multiparameter digitized video microscopy of toxic and hypoxic injury in single cells. *Environ. Health Perspect.* 84: 83-94.
196. LEW, H.; PYKE, S.; QUINTANILHA, A. (1985): Role of liver in exercise-induced increases in plasma concentrations of reduced glutathione in rats. *FEBS Lett.* 185: 262-266.
197. LEW, H.; PYKE, S.; QUINTANILHA, A. (1987): The effects of physical exercise on the antioxidative capacity of the liver. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 18: 231-246.
198. LEW, H.; QUINTANILHA, A. (1991): Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 16: 59-68.
199. LEWICKI, R.; TCHORZEWSKI, H.; MAJEWSKA, E.; NOWAK, Z.; BAJ, Z. (1988): Effect of maximal physical exercise on T- lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL1) and interleukin 2 (IL2) production in vitro. *Int. J. Sports Med.* 9: 114-117.
200. LIEBER, R.L.; FRIDÉN, J. (1993): Muscle damage is not a function of muscle force but active muscle strain. *J. Appl. Physiol.* 74: 520-526.
201. LONG, J.W.; LASTER, J.L.; STEVENS, R.P.; SILVER, W.P.; SILVER, D. (1989): Contractile and metabolic function following an ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: influence of oxygen free radical scavengers. *Microcirc. Endoth. Lymphatics* 5: 351-363.
202. LOPEZ, J.R.; GERARDI, A.; LOPEZ, M.J.; ALLEN, P.D. (1992): Effects dantrolene on myoplasmic free [Ca<sup>2+</sup>] measured in vivo in patients susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 76: 711-719.
203. LOVLIN, R.; COTTLE, W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, A.N. (1987): Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56: 313-316.
204. LUGER, A.; DEUSTER, P.A.; KYLE, S.B.; GALLUCCI, W.T.; MONTGOMERY, L.C.; GOLD, P.W.; LORIAUX, D.L.; CHROUSOS, G.P. (1987): Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. *N. Engl. J. Med.* 316: 1309-1315.
205. MANFREDI, T.G.; FIELDING, R.A.; O'REILLY, K.P.; MEREDITH, C.N.; LEE, H.Y.; EVANS, W.J. (1991): Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in holder men. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 1028-1034.
206. MARTIN, T.P.; LANG, G.; GARETTA, R.; SIMON, G. (1983): Scintigraphic evaluation of muscle damage following extreme exercise. *J. Nucl. Med.* 24: 308-311.
207. MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. (1991): Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 194S-200S.

208. McCULLY, K.K. (1986): Exercise-induced injury to skeletal muscle. *Fed. Proc.* 45: 2933-2936.
209. McCULLY, K.K.; FAULKNER, J.A. (1985): Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. *J. Appl. Physiol.* 59: 119-126.
210. McCULLY, K.K.; FAULKNER, J.A. (1986): Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 61: 293-299.
211. McCULLY, K.K.; SHELOCK, F.G.; BANK, W.J.; POSNER, J.D. (1992): The use of nuclear magnetic resonance to evaluate muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 537-542.
212. McCUTCHEON, L.J.; BYRD, S.K.; HODGSON, D.R. (1992): Ultrastructural changes in skeletal muscle after fatiguing exercise. *J. Appl. Physiol.* 72: 1111-1117.
213. McGUINNESS, O.; YAFEI, N.; COSTI, A.; CROMPTON, M. (1990): The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria. Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner-membrane Ca<sup>2+</sup>-dependent pore. *Eur. J. Biochem.* 194: 671-679.
214. McMUTCHAN, H.J.; SCWAPPACH, J.R.; ENQUIST, E.G.; WALDEN, D.L.; TERADA, L.S.; REISS, O.K.; LEFF, J.A.; REPINE, J.E. (1990): Xanthine oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 258: H1415-H1419.
215. McNEIL, P.L.; KHAKEE, R. (1992): Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am. J. Pathol.* 140: 1097-1109.
216. MEGISON, S.M.; HORTON, J.W.; CHAO, H.; WALKER, P.B. (1990): High dose versus low dose enteral allopurinol for prophylaxis in mesenteric ischemia. *Circ. Shock* 30: 323-329.
217. MEHROTRA, S.; KAKKAR, P.; VISWANATHAN, P.N. (1991): Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 277-285.
218. MEISTER, A. (1992): Commentary on the antioxidante effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 44: 1905-1915.
219. METZGER, J.M.; FITTS, R.H. (1987): Role of intracellular pH in muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 62: 1392-1397.
220. MEYER, J. (1986): Advances in the invasive diagnosis and treatment of coronary artery disease. In: *Adalat. Myocardial Protection in Cardiovascular Emergencies*, Bayer brochure, Leverkusen, pp: 37-44.
221. MOKRI, B.; ENGEL, A.G. (1975): Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fibers. *Neurology (Minneapolis)* 25: 1111-1120.
222. MOORHOUSE, P.C.; GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B.; QUINLAN, J.G.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1987): Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 213: 23-28.
223. NADEL, R.E.; BERCH, U.; SALTIN, B. (1972): Body temperatures during negative work exercise. *J. Appl. Physiol.* 33: 553-558.
224. NAYLER, W.G. (1988): Identification, mode of action and nomenclature of calcium antagonists. In: *Calcium Antagonists*. W.G. Nayler (Ed.), Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, pp: 69-85.
225. NEWHAM, D.J. (1988): The consequences of eccentric contractions and their relationship to delayed onset muscle pain. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 353-359.

226. NEWHAM, D.J.; JONES, D.A. (1985): Intra-muscular pressure in the painful human biceps. *Clin. Sci.* 69: 27p.
227. NEWHAM, D.J.; JONES, D.A.; CLARKSON, P.M. (1987): Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. *J. Appl. Physiol.* 63: 1381-1386.
228. NEWHAM, D.J.; JONES, D.A.; EDWARDS, R.H.T. (1983): Large delayed plasma creatine kinase changes after stepping exercise. *Muscle Nerve* 6: 380-385.
229. NEWHAM, D.J.; JONES, D.A.; TOLFREE, S.E.; EDWARDS, R.H.T. (1986): Skeletal muscle damage: a study of isotope uptake, enzyme efflux and pain after stepping. *Eur. J. Appl. Physiol.* 55: 106-112.
230. NEWHAM, D. J.; McPHAIL, G.; MILLS, K.R.; EDWARDS, R.H.T. (1983): Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions. *J. Neurol. Sci.* 61: 109-122.
231. NEWHAM, D. J.; MILLS, K.R.; QUIGLEY, R.; EDWARDS, R.H.T. (1983): Pain and fatigue following concentric and eccentric muscle contractions. *Clin. Sci.* 64: 55-62.
232. NIELSEN, B.; SAVARD, G.; RICHTER, E.A.; HARGREAVES, H.; SALTIN, B. (1990): Muscle blood flow and muscle metabolism during exercise and heat stress. *J. Appl. Physiol.* 69: 1040-1046.
233. NIEMINEN, A.-L.; GORES, G.J.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. (1988): Cytosolic free Ca<sup>2+</sup>, mitochondrial membrane potential, cell surface blebbing and cell death in hepatocytes exposed to Hg<sup>++</sup>. *FASEB J.* 2: A825.
234. NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. (1991): Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 201S-205S
235. NIMMO, M.A.; SNOW, D.H. (1982): Time course of ultrastructural changes in skeletal muscle after two types of exercise. *J. Appl. Physiol.* 52: 910-913.
236. NUMAN, I.T.; HASSAN, M.Q.; STOHS, S.J. (1990): Protective effects of antioxidants against endrin-induced lipid peroxidation, glutathione depletion, and lethality in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 302-306.
237. O'REILLY, K.P.; WARHOL, M.J.; FIELDING, R.A.; FRONTERA, W.R.; MEREDITH, C.N.; EVANS, W.J. (1987): Eccentric exercise-induced muscle damage impairs muscle glycogen repletion. *J. Appl. Physiol.* 63: 252-256.
238. OGILVIE, R.W.; ARMSTRONG, R.B.; BAIRD, K.E.; BOTTOMS, C.L. (1988): Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am. J. Anat.* 182: 335-346.
239. OKUDA, M.; LEE, H.-C.; CHANCE, B.; KUMAR, C. (1992): Depletion and repletion of Ca<sup>2+</sup> in the perfused rat liver. *J. Lab. Clin. Med.* 120: 57-66.
240. OMAJE, S.T.; TAPPEL, A.L. (1974): Glutathione peroxidase, glutathione reductase, and thiobarbituric acid-reactive products in muscles of chickens and mice with genetic muscular dystrophy. *Life Sci.* 15: 137-145.
241. PARKS, D.A.; GRANGER, D.N. (1986): Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548: 87-99.
242. PAUL, G.L.; DeLANY, J.P.; SNOOK, J.T.; SEIFERT, J.G.; KIRBY, T.E. (1989): Serum and urinary markers of skeletal muscle tissue damage after weight lifting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58: 786-790.
243. PHAN, S.H.; GANNON, D.E.; VARANIL, J.; RYAN, U.S.; WARD, P.A. (1989): Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils. *Am. J. Pathol.* 134: 1201-1211.

244. PHILLIPS, G.D.; KNIGHTON, D.R. (1990): Skeletal muscle regenerates. *Wounds* 2: 82-94.
245. POORTMANS, J.R. (1985): Postexercise proteinuria in humans: facts and mechanisms. *JAMA* 253: 236-240.
246. POSTLEWAIT, A.E.; KANG, A.H. (1976): Collagen and collagen peptide induced chemotaxis of human blood monocytes. *J. Exp. Med.* 143: 1299-1307.
247. PRYOR, W.A.; GODBERG, S.S. (1991): Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 177-184.
248. PYKE, S.; LEW, H.; QUINTANILHA, A. (1986): Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 926-931.
249. QUINTANILHA, A. (1988): Oxidative effects of physical exercise. In: *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine*. A. Quintanilha (Ed.) Plenum Press, New York. pp 187-195
250. RASMUSSEN, H.; BARRETT, P.Q. (1984): Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol. Rev.* 64: 938-984.
251. REED, D.J. (1990): Glutathione: Toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631.
252. RENAUD, J.-F.; SCHMID, A. (1986): Propriétés biochimiques et pharmacologiques du canal Ca<sup>2+</sup> du muscle squelettique: apparition au cours de la myogénèse et relation entre sa structure et sa fonction. *J. Physiol. (Paris)* 81: 177-184.
253. REPINE, J.E. (1991): Oxidant-antioxidant balance: some observations from studies of ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am. J. Med. Suppl* 3C 91: 45S-53S.
254. RICO, J.M.T. (1986): Possíveis domínios de actuação no futuro da terapêutica dos quadros inflamatórios. *Arq. Reumatol. Suppl* 2 8: 21-34.
255. ROBBINS, S.L. (1974): *Patologia Estrutural e Funcional*. Editora Interamericana Ltd, Rio de Janeiro, Brasil.
256. RODMAN, H.P.; GOLDBERG, A.L. (1982): Arachidonic acid, prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 257: 1632-1638.
257. RODRIGUEZ, A.B.; BARRIGA, C.; DE LA FUENTE, M. (1991): Phagocytic function of blood neutrophils in sedentary young people after physical exercise. *Int. J. Sports Med.* 12: 276-280.
258. ROJAS, C.; JAIMOVICH, E. (1990): Calcium release modulated by inositol triphosphate in ruptured fibers from frog skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 416: 296-304.
259. RUMEUR, E.; MOYEC, L.; TOULOUSE, P.; BARS, R.; CERTAINES, J.D. (1990): Muscle fatigue unrelated to phosphocreatine and pH: an "in vivo" <sup>31</sup>P NMR spectroscopy study. *Muscle Nerve* 13: 438-444.
260. SAHLIN, K.; ALVESTRAND, A.; BRANDT, R.; HULTMAN, E. (1978): Intracellular pH and bicarbonate concentration in human muscle during recovery from exercise. *J. Appl. Physiol.* 45: 474-480.
261. SAHLIN, K.; EDSTRÖM, L.; SJOHOLM, H.; HULTMAN, E. (1981): Effects of lactic acid accumulation and ATP decrease on muscle tension and relaxation. *Am. J. Physiol.* 240: C121-C126.

262. SALMINEN, A. (1985): Lysosomal changes in skeletal muscle during the repair of exercise injuries in muscle fibers. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 539.
263. SALMINEN, A.; HONGISTO, K.; VIHKO, V. (1984): Lysosomal changes related to exercise injuries and training-induced protection in mouse skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 120: 15-19.
264. SALMINEN, A.; KIHILSTRÖM, M. (1987): Protective effects of indomethacin against exercise-injuries in mouse skeletal muscle fibers. *Int. J. Sports Med.* 8: 46-49.
265. SALMINEN, A.; VIHKO, V. (1983): Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta Physiol. Scand.* 117: 109-113
266. SALMINEN, A.; VIHKO, V. (1983): Susceptibility of mouse skeletal muscles to exercise injuries. *Muscle Nerve* 6: 596-601.
267. SALMINEN, A.; VIHKO, V. (1983): Lipid peroxidation in exercise myopathy. *Exp. Molec. Pathol.* 38: 380-388
268. SALMINEN, A.; VIHKO, V. (1984): Autophagic response to strenuous exercise in mouse skeletal muscle fibers. *Virchows Arch. B (Cell Pathol)* 45: 97-106.
269. SALO, D.C.; DONOVAN, C.M.; DAVIES, K.J.A. (1991): HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 239-246.
270. SARGEANT, A.J.; DOLAN, P. (1987): Human muscle function following prolonged eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56: 704-711.
271. SCHANNE, F.A.X.; KANE, A.B.; YOUNG, E.E.; FARBER, J.L. (1979): Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206: 700-702.
272. SCHMALBRUCH, H. (1976): The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tiss. Cell* 8: 673-692.
273. SCHMALBRUCH, H. (1985): *Skeletal Muscle*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
274. SCHMITZ, G.; HANKOWITZ, J.; KOVACS, E.M. (1991): Potential biochemical mechanisms of the antiatherogenic properties of calcium antagonists. In: *The Universe of Adalat. Potentials*. P.R. Lichtlen & A. Reale (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 180-196.
275. SCHULTZ, E. (1989): Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration. *Med. Sci. Sports Exerc.* Suppl. 21: S181-S186.
276. SCHULTZ, E.; JARYSZAK, D.L.; VALLIERE, C.R. (1985): Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 8: 217-222.
277. SCHUMANN, H.-J. (1972): Überlastungsnekrosen der skelettmuskulatur nach experimentellem laufzwang. *Zbl. Allg. Pathol.* 116: 181-190.
278. SCHWANE, J.A.; ARMSTRONG, R.B. (1983): Effects of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *J. Appl. Physiol.* 55: 969-975.
279. SCHWANE, J.A.; JOHNSON, S.R.; VANDENAKKER, C.B.; ARMSTRONG, R.B. (1983): Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15: 51-56.

280. SCHWANE, J.A.; WILLIAMS, J.S.; SLOAN, J.H. (1987): Effects of training on delayed muscle soreness and serum creatine kinase activity after running. *Med. Sci. Sports Exerc.* 19: 584-590.
281. SEAMAN, R.; IANUZZO, C.D. (1988): Benefits of short-term muscular training in reducing the effects of muscular over-exertion. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58: 257-261.
282. SEMBROWICH, W.L.; QUINTINSKIE, J.J.; LI, G. (1985): Calcium uptake in mitochondria from different skeletal muscle types. *J. Appl. Physiol.* 59: 137-141.
283. 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.
284. SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. (1989): Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac. Ther.* 47: 61-71.
285. SHELLOCK, F.G.; FUKUNAGA, T.; MINK, J.H.; EDGERTON, V.R. (1991): Exertional muscle injury: evaluation of concentric versus eccentric actions with serial MR imaging. *Radiol.* 179: 659-664.
286. SHELLOCK, F.G.; FUKUNAGA, T.; MINK, J.H.; EDGERTON, V.R. (1991): Acute effects of exercise on MR imaging of skeletal muscle: concentric vs. eccentric actions. *A. J. R.* 156: 765-768.
287. SHEN, W.; KAMENDULIS, L.M.; RAY, S.D.; CORCORAN, G.B. (1992): Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca<sup>2+</sup>-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation with cell death. *Toxicol. Pharmacol.* 112: 32-40.
288. SHEPHARD, R.J.; VERDE, T.J.; THOMAS, S.J.; SHEK, P. (1991): Physical activity and the immune system. *Can. J. Spt. Sci.* 16: 163-185.
289. SIES, H. (1985): Oxidative stress: introductory remarks. In: *Oxidative Stress*. H. Sies (Ed.), London: Academic Press, pp: 1-8.
290. SIES, H. (1991): Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med. Suppl.* 3C 91: 31S-38S.
291. SIRSJÖ, A.; LEWIS, D.H.; NYLANDER, G. (1990): The accumulation of polymorphonuclear leukocytes in post-ischemic skeletal muscle in the rat, measured by quantitating tissue myeloperoxidase. *Int. J. Microcirc.; Clin. Exp.* 9: 163-173.
292. SJÖSTRÖM, M. (1989): Injury to the muscle fibres due to overuse. *Int. J. Sports Med.* 10: 584-585.
293. SJÖSTRÖM, M.; FRIDÉN, J. (1984): Muscle soreness and muscle structure. *Med. Sports Sci.* 17:169-186.
294. SJÖSTRÖM, M.; FRIDÉN, J.; EKBLÖM, B. (1987): Endurance, what is it? Muscle morphology after an extremely long distance run. *Acta Physiol. Scand.* 130: 513-520.
295. SMITH, J.K.; CARDEN, D.L.; KORTHUIS, R.J. (1989): Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 257: H1782-H1789.
296. SMITH, M.T.; THOR, H.; ORRENIUS, S. (1981): Toxic injury to hepatocytes is not dependent upon extracellular calcium. *Science* 213: 1257-1259.
297. SNOW, D.H.; HARRIS, R.C.; GASH, S.P. (1985): Metabolic response of equine muscle to intermittent maximal exercise. *J. Appl. Physiol.* 58: 1689-1697.

298. SOARES, J.M.; DUARTE, J.A. (1989): A miopatia do exercício: etiologia, fisiopatologia e factores de prevenção. *Rev. Port. Med. Desport.* 42: 187-200.
299. SOARES, J.M.; DUARTE, J.A.; APPELL, H.-J. (1992): Metabolic vs mechanic origin of muscle lesions induced by exercise. *Int. J. Sports Med.* 13: 84 (abstract).
300. SOARES, J.M.; DUARTE, J.A.; APPELL, H.-J. (1993): Is serum CK related to muscular fatigue in long-distance running?. In: *Neuromuscular fatigue*. A.J. Sargeant & D. Kernell (Eds.), Academy Series. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences - North Holland, Amsterdam. (no prelo)
301. SPRENGER, H.; JACOBS, C.; MAIN, M.; GRESSNER, A.M.; PRINZ, H.; WESEMANN, W.; GEMSA, D. (1992): Enhanced release of cytokines, interleukine-2 receptors, and neoptirin after long-distance running. *Clin. Immun. Immunopathol.* 63: 188-195.
302. STAAB, J.S.; AGNEW, J.W.; SICONOLFI, S.F. (1992): Metabolic and performance responses to uphill and downhill running in distance runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 124-127.
303. STARKE, P.E.; HOEK, J.B.; FARBER, J.L. (1986): Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261: 3006-3012.
304. STARNES J.; CANTU G.; FARRAR R.; KEHRER J. (1989) Skeletal muscle lipid peroxidation in exercised and food-restricted rats during aging. *J. Appl. Physiol.* 67: 69-75
305. STAUBER, W.T.; CLARKSON, P.M.; FRITZ, V.K.; EVANS, W.J. (1990): Extracellular matrix disruption and pain after eccentric muscle action. *J. Appl. Physiol.* 69: 868-874.
306. STAUBER, W.T.; FRITZ, V.K.; VOGELBACH, D.W.; DAHLMANN, B. (1988): Characterization of muscles injured by forced lengthening. I. Cellular infiltrates. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20: 345-353.
307. STENGER, R.J.; SPIRO, D.; SCULLY, R.E.; SHANNON, J.M. (1962): Ultrastructural and physiologic alterations in ischemic skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 40: 1-20.
308. SYMONS, J.A.; 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.
309. TANI, M. (1990): Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 543-559.
310. TANI, M.; NEELY, J.R. (1990): Na<sup>+</sup> accumulation increases Ca<sup>2+</sup> overload and impairs function in anoxic rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 22: 57-72.
311. TAYLOR, C.; ROGERS, G.; GOODMAN, C.; BAYNES, R.D.; BOTHWELL, T.H.; BEZWODA, W.R.; KRAMER, F.; HATTINGH, J. (1987): Hematologic, iron-related, and acute phase protein responses to sustained strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 62: 464-469.
312. THOMPSON, J.A.; HESS, M.L. (1986): The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Progr. Cardiovasc. Diseases* 28: 449-462.
313. THOR, H.; HARTZELL, P.; ORRENIUS, S. (1984): Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated calcium. *J. Biol. Chem.* 259: 6612-6615.

314. TIAN, Y.; YANG, X. (1991): The effect of rat mitochondrial Ca on skeletal muscle wreastructures. *Proceedings of the Second IOC World Congress on Sport Sciences*. Barcelona. p: 247.
315. TIBBITS, G.F. (1987): Cellular adaptation of skeletal muscle to prolonged work. *Can. J. Spt. Sci. Suppl.* 1 12: 26S-32S.
316. THIDUS, P.M.; IANUZZO, C.D. (1983): Effects of intensity and duration of muscular exercise on delayed soreness and serum enzyme activities. *Med. Sci Sports Exerc.* 15: 461-465.
317. TOURAKI, M.; BEIS, I. (1990): Characterization of the calcium paradox in isolated perfused frog heart: enzymatic, ionic, contractile and electrophysiological studies. *J. Comp. Physiol. B.* 160: 113-118.
318. TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K.; PHELPS, P.C. (1981): Sodium and calcium regulation and the role of the cytoskeleton in the pathogenesis of disease. A review and hypothesis. *Scanning Electron Microsc.* 2: 435-454.
319. TUBARO, E.; LOTTI, B.; SANTIANGELI, C.; CAVALLO, G. (1980): Xanthine oxidase: an enzyme playing a role in the killing mechanism of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 29: 3018-3020.
320. TURINSKY, J.; O'SULLIVAN, D.M.; BAYLY, B.P. (1992): Modulation of prostaglandin E2 synthesis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 262: E476-E482.
321. TURNER, P.R.; FONG, P.; DENETCLAW, W.F.; STEINHARDT, R.A. (1991): Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J. Cell Biol.* 115: 1701-1712.
322. TURNER, P.R.; WESTWOOD, T.; REGAN, C.M.; STEINHARDT, R.A. (1988): Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature (Lond.)* 335: 735-738.
323. UHLIG, S.; WENDEL, A. (1992): The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci.* 51: 1083-1094
324. VALK, P. (1984): Muscle localisation of TC-99m after exertion. *Clin. Nucl. Med.* 9: 493-494.
325. VALLOTTON, M.B.; CAPPONI, A.M.; LANG, U.; ROSSIER, M.F. (1991): Signalisation transmembranaire. Rôles respectifs du calcium cytosolique libre et de la protéine kinase C. *Ann. Endoc. (Paris)* 52: 381-386.
326. van AMSTERDAM, F.T.M.; ROVERI, A.; MAIORINO, M.; RATTI, E.; URSINI, F. (1992): Lacidipine: a dihydropyridine calcium antagonist with antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Méd.* 12: 183-187.
327. VANDEPLASSCHE, G.; BORGERS, M. (1990): Ultrastructure and Ca<sup>2+</sup> reallocation during ischemia, the Ca<sup>2+</sup> paradox and metabolic acisosis. *Cell Biol. Int. Rep.* 14: 317-333.
328. VANDENBURGH, H.H.; HATFALUDY, S.; SOHAR, I.; SHANSKY, J. (1990): Stretch-induced prostaglandins and protein turnover in cultured skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 259: C232-C240.
329. van der MEULEN, J.H.; KUIPERS, H.; DRUKKER, J. (1991): Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *J. Appl. Physiol.* 71: 999-1004.
330. van IWAARDEN, P.R.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. (1992): What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 161-170.

331. VERKLEIJ, A.J.; POST, J.A.; SCHNEIJDENBERG, C.T.W.M. (1990): Is acidosis the clue to the loss of structure and functioning of the sarcolemma? *Cell Biol. Int. Rep.* 14: 335-341.
332. VIHKO, V.; RANTAMAKI, J.; SALMINEN, A. (1978): Exhaustive physical exercise and acid hydrolase activity in skeletal muscle. A biochemical study. *Histochemistry* 57: 237-249.
333. VIHKO, V.; SALMINEN, A.; RANTAMAKI, J. (1978): Acid hydrolase activity in red and white skeletal muscle of mice during a two-week period following exhausting exercise. *Pflügers Arch.* 378: 99-106.
334. VITI, A.; MUSCETTOLA, M.; PAULESA, L.; BOCCI, V.; ALMI, A. (1985): Effects of exercise on plasma interferon levels. *J. Appl. Physiol.* 59: 426-428.
335. VOLLESTAD, N.K.; SEJERSTED, O.M. (1988): Biochemical correlates of fatigue. A brief review. *Eur J. Appl. Physiol.* 57: 336-347.
336. YOKOTA, J.; MINEI, J.P.; FANTINI, G.A.; SHIRES, G.T. (1989): Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. *Am. J. Physiol.* 257: H1068-H1075.
337. YOKOYAMA, Y.; BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.K.; WHEAT, J.K.; CASH, T.G.; FREEMAN, B.A.; PARKS, D.A. (1990): Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.* 258: G564-G570.
338. WALKER, J.A.; CERNY, F.J.; COTTER, J.R.; BURTON, J.R. (1992): Attenuation of contraction-induced skeletal muscle injury by bromelain. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 20-25.
339. WALKER, P.M.; LINDSAY, T.; LIAUW, S.; ROMASCHIN, A.D. (1989): The impact of energy depletion on skeletal muscle. *Microcirc. Endoth. Lymphatics* 5: 189-206.
340. WALLACE, S.L.; OMOKOKU, B.; ERTEL, N.H. (1970): Colchicine plasma levels. Implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am. J. Med.* 48: 443-448.
341. WALLENSTEN, R.; KARLSSON, J. (1984): Histochemical and metabolic changes in lower leg muscles in exercise-induced pain. *Int. J. Sports Med.* 5: 202-208.
342. WALMSLEY, B.; HODGSON, J.A.; BURKE, R.E. (1978): Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J. Neurophysiol.* 41: 1203-1216.
343. WALTON, J. (1981): Diffuse exercise-induced muscle pain of undetermined cause relieved by verapamil. *Lancet* 1: 993.
344. WAND, W.R.; RAJAGOPALAN, K.V. (1976): The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD<sup>+</sup> - dependent form (type D) to an O<sub>2</sub> - dependent form (type O). *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 365-379.
345. WARD, P.A. (1991): Mechanisms of endothelial cell killing by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or products of activated neutrophils. *Am. J. Med. Suppl.* 3C 91: 89S-94S.
346. WARHOL, M.J.; SIEGEL, A.J.; EVANS, W.J.; SILVERMAN, L.M. (1985): Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. *Am. J. Pathol.* 118: 331-339.
347. WARREN, J.A.; JENKINS, R.R.; PACKER, L.; WITT, E.H.; ARMSTRONG, R.B. (1992): Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. *J. Appl. Physiol.* 72: 2168-2175.
348. 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.

349. WEISS, S.J. (1986): Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 584: 9-37.
350. WEISS, S.J.; REGIANI, S. (1984): Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha-1-proteinase inhibitor. *J. Clin. Invest.* 73: 1297-1303.
351. WESTERBLAD, H.; LEE, J.A.; LÄNNERGREN, J.; ALLEN, D.G. (1991): Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 261: C195-C209.
352. WHEAT, M.R.; McCOY, S.L.; BARTON, E.D.; STARCHER, B.M.; SCHWANE, J.A. (1989): Hydroxylysine excretion does not indicate collagen damage with downhill running in young men. *Int. J. Sports Med.* 10: 155-160.
353. WHITAKER, M.; PATEL, R. (1990): Calcium and cell cycle control. *Development* 108: 525-542.
354. WILKIE, D. (1981): Shortage of chemical fuel as a cause of fatigue: studies by nuclear magnetic resonance and bicycle ergometry. In: *Human Muscle Fatigue: Physiological Mechanisms*. R. Porfer & J. Whelan (Eds.), Pitman Medical, London, pp: 102-114.
355. WILLIAMSON, J.R.; COOPER, R.H. (1980): Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 117: K73-K85.
356. WOOLF, N. (1986): *Cell, Tissue and Disease*. Bailliere and Tindal, London, pp: 41-67.
357. WROGEMANN, K.; PENA, S.D.J. (1976): Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* 27: 672-673.
358. ZAMMIT, V.A.; NEWSHOLME, E.A. (1976): Effects of calcium ions and adenosin diphosphate on the activities of NAD<sup>+</sup>- linked isocitrate dehydrogenase from the radular muscles of the whelk and flight muscles of insects. *Biochem. J.* 154: 677-687.
359. ZERBA, E.; KOMOROWSKI, T.E.; FAULKNER, J.A. (1990): Free radical injury to skeletal muscles of young, adult and old mice. *Am. J. Physiol.* 258: C429-C435.
360. ZOETEWEIJ, J.P.; WATER, B.; BONT, J.G.M.; MULDER, G.J.; NAGELKERKE, J.F. (1992): Involvement of intracellular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> in dissipation of the mitochondrial membrane potential and cell death induced by extracellular ATP in hepatocytes. *Biochem. J.* 288: 207-213.