

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DA CRIO E TERMOTERAPIA CONTRA O
DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR DISTENSÃO
MUSCULAR EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nélson Rodrigues de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2012

EFEITOS DA CRIO E TERMOTERAPIA CONTRA O DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR DISTENSÃO MUSCULAR EM RATOS

Nélson Rodrigues de Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial
para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

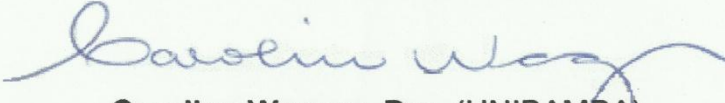
**EFEITOS DA CRIO E TERMOTERAPIA CONTRA O DANO
OXIDATIVO INDUZIDO POR DISTENSÃO MUSCULAR EM RATOS**

elaborada por
Nélson Rodrigues de Carvalho

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:


Félix Alexandre Antunes Soares, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Caroline Wagner, Dra. (UNIPAMPA)


Ana Flávia Furian, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 16 de março de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre guiando meu caminho.

Em especial à Cintia, pelo seu amor, companheirismo, incentivo e paciência durante as minhas atividades do mestrado.

A minha mãe pelo amor, pelo incentivo, pela dedicação, pelos valores, além de ser um ponto de referência em minha vida é um exemplo a ser seguido.

Ao meu orientador Prof. Felix Soares acima de tudo pela amizade e confiança na realização de meus trabalhos. Agradeço pela orientação, por compartilhar os conhecimentos sobre bioquímica, pela disponibilidade de tempo, e também pelos “puxões de orelha” nos momentos certos. Além de minha gratidão, admiro-o por seu caráter e sua sabedoria.

Aos colegas do laboratório do Prof. Félix, que são hoje minha “segunda família”, agradeço-os pela amizade, auxílio, compreensão, conhecimento e companheirismo compartilhados diariamente. Agradeço a todos por darem sentido a minha vida acadêmica.

Ao Prof. Gustavo Orione Puntel, pelos conhecimentos transmitidos desde o começo da minha vida acadêmica e como aluno de iniciação científica até o momento. Admiro-o pelos seus conhecimentos e dedicação ao seu trabalho.

A Prof^a. Nilda de Vargas Barbosa e ao Prof. João Batista Teixeira da Rocha pela orientação e ensinamentos transmitidos desde os meus primeiros momentos na bioquímica até o presente. Agradeço pela prestatividade em todos os momentos em que precisei de seus conhecimentos. Além de minha gratidão, admiro-os pelo caráter e sabedoria.

Aos colegas do laboratório do “Tio João”, agradeço por compartilhar a amizade, companheirismo e conhecimentos desde os meus primeiros momentos na bioquímica.

Aos professores Gilson Zeni e Cristina Nogueira, pelo exemplo de conhecimento e de competência. Agradeço pela prestatividade em todos os momentos em que precisei de seus conhecimentos.

Aos colegas de laboratório e de graduação que tomaram outros rumos, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

Aos funcionários Angélica, Márcia e Rinaldo pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos durante os momentos iniciais deste curso.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DA CRIO E TERMOTERAPIA CONTRA O DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR DISTENSÃO MUSCULAR EM RATOS

AUTOR: NÉLSON RODRIGUES DE CARVALHO

ORIENTADOR: FÉLIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 16 de março de 2012.

Lesões musculares esqueléticas estão entre as causas mais frequentes de comprometimento funcional do tecido muscular, acometendo a qualidade de vida e são as principais responsáveis pela perda do ritmo de treinamento no caso de atletas. As lesões mais frequentes são as contusões e distensões musculares. Assim, o desenvolvimento de terapias que amenizem e possam acelerar o processo de reparo celular e reabilitação tecidual são de grande importância. Desta forma, aplicações terapêuticas de agentes físicos estão ganhando destaque, principalmente na medicina desportiva, no tratamento de lesões musculares esqueléticas, porém, não apresentam o mecanismo de ação totalmente esclarecido. Este estudo foi realizado para examinar se a modulação do estresse oxidativo poderia ser um importante fator envolvido nos efeitos benéficos da crio e da termoterapia na injúria por distensão no músculo *gastrocnemius*. Ratos machos *Wistar* adultos foram submetidos à distensão muscular e tratados com agentes terapêuticos físicos, frio e calor, de forma isolada ou combinada. A lesão por distensão causou um aumento nos marcadores de dano oxidativo, tais como a formação de espécies reativas e peroxidação lipídica no músculo e no sangue. Nós sugerimos que este dano oxidativo é possivelmente relacionado a um prejuízo da estrutura da célula muscular, assim, observamos uma significativa correlação positiva entre o aumento nos níveis plasmáticos de Creatina Quinase e no músculo e sangue níveis de Diclorofluoresceína oxidada e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A intensidade da resposta inflamatória parece ser também um importante fator envolvido na gênese do dano oxidativo nos momentos iniciais a lesão. O frio terapêutico parece ser o mais efetivo em prevenir o dano induzido pela distensão muscular possivelmente devido a sua capacidade em modular os danos à estrutura da célula muscular e também a intensidade da resposta inflamatória que segue a injúria músculo esquelética.

Palavras-Chaves: Músculo esquelético. Distensão. Crioterapia. Termoterapia. Dano oxidativo

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduation Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF THE CRYO AND THERMORAPY AGAINST THE OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY A MUSCLE STRAIN INJURY IN RATS

AUTHOR: NÉLSON RODRIGUES DE CARVALHO

ADVISOR: FELIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES

Date and Place of the Defense: Santa Maria, 16th March 2012

Skeletal muscle injuries are among the most frequent causes of functional impairment in muscle tissue, affecting the life quality and are primarily responsible for the loss of rhythm in the case of training athletes. The skeletal muscle lesion most frequent are contusion and strain injury. Thus, developing therapies that mitigate and might accelerate the rehabilitation process of injured tissue are of great importance. For this reason, therapeutic applications of physical agents are gaining prominence, especially in sports medicine for the treatment of skeletal muscle injury, but do not have the mechanism of action fully understood. This study was performed in order to examine whether the modulation of oxidative stress could be an important factor involved in the beneficial effect of cryo and thermotherapy on strain *gastrocnemius* muscle injury. Adult male *Wistar* rats were submitted to a strain injury and treated with the therapeutic agents in an isolated or combined form. Strain damages caused an increase in muscle and blood oxidative damage. We suggest that this oxidative damage is possible related to the impairment of the muscle cells structure since that we observed a significant positive correlation among the increase in plasma Creatine Kinase levels and in muscle and blood Dichlorofluorescein oxidized and Thiobarbituric acid reactive substance levels. The inflammatory response intensity seems to be also an important factor involved in the genesis of the oxidative damage in the initial moments that follows the muscle strain injury. The therapeutic cold seems to be more effective to prevent the damage induced by the strain injury possible due to its capacity to control the muscle cells structure impairment and also to modulate the inflammatory response intensity that follows a muscle strain injury.

Key Words: Skeletal muscle. Strain injury. Cryotherapy. Thermotherapy. Oxidative damage.

LISTA DE ACRÔNIMOS

$\cdot\text{OH}$ - Radical hidroxila

AINEs - Antiinflamatórios não esteroidais

ATP - Adenosina trifosfato

Ca^{2+} - Cálcio

CAT - Catalase

CQ - Creatina quinase

DCF-oxid - Diclorofluoresceína oxidada

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ERs - Espécies reativas

Fe^{2+} - Ferro no estado ferroso

Fe^{3+} - Ferro no estado férrico

G6PDH - Glicose 6 fosfato desidrogenase

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH – Glutathione reduzida

GST - Glutathione S-transferase

H_2O - Água

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HOCl - Ácido hipocloroso

K^+ - Potássio

MnSOD - Manganês superóxido dismutase

MPO - Mieloperoxidase

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

Nrf2 - Fator de transcrição nuclear 2

NOS – Óxido nítrico sintase

O_2 - Oxigênio

$\text{O}_2^{\cdot-}$ - Ânion superóxido

OCl^- - Hipoclorito

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

FIGURA 1: Muscle oxidative damage	27
FIGURA 2: Muscle myeloperoxidase (MPO) activity	28
FIGURA 3: Blood oxidative damage	29
FIGURA 4: Effects of cold treatment on muscle oxidative damage	30
FIGURA 5: Effects of cold treatment on blood oxidative damage	31
FIGURA 6: Effects of heat treatment on muscle oxidative damage	32
FIGURA 7: Effects of heat on blood oxidative damage	33
FIGURA 8: Effects of combined cold and heat treatments on muscle oxidative damage.....	34
FIGURA 9: Effects of combined cold and heat treatments on blood oxidative damage.....	35

LISTA DE TABELA

ARTIGO

TABELA 1: Correlations between the different oxidative damage parameters analyzed36

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS.....	22
Objetivo Geral.....	22
Objetivo Específico	22
DESENVOLVIMENTO	23
Artigo: Efeito protetor do frio e calor terapêutico contra o dano oxidativo induzido por uma lesão por distensão muscular em ratos	24
Abstract	25
Introdução	25
Materiais & Métodos	26
Resultados.....	29
Discussão	32
Conclusão.....	35
Literatura citada – Referências bibliográficas.....	36
CONCLUSÕES	38
Conclusão Geral	38
Conclusões Específicas	38
PERSPECTIVAS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

O desenvolvimento referente a esta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo publicado na revista Journal of Sports Sciences o qual se encontra alocado no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS** são encontrados no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre a investigação desenvolvida.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação uma vez que o artigo científico contém as suas próprias referências.

INTRODUÇÃO

O tecido muscular apresenta origem mesodérmica, podendo ser diferenciado em três tipos, músculo cardíaco, músculo esquelético e músculo liso, caracterizados de acordo com suas peculiares morfológicas e funcionais (Grounds, 1998). O tecido músculo esquelético é constituído por células organizadas em grupos de feixes que se encontram envolvidos pelo tecido conjuntivo, o qual permite uma união concisa entre as fibras apresentando flexibilidade, auxiliando para que a força contrátil gerada individualmente possa ser transferida de forma única para todo o músculo. Assim, o músculo apresenta uma função essencial para o organismo, desenvolver tensão e executar trabalho mecânico, ou seja, promover o movimento (Brukner e Khan, 2001; Jarvinen et al., 2005). O músculo esquelético demonstra ser um tecido altamente versátil, e capaz de se adaptar perfeitamente, a determinadas situações. É possível de ser observada esta capacidade adaptativa durante a prática de exercício físico, onde o músculo consegue se adequar a uma necessidade metabólica maior do que aquela durante o período de repouso (Ji et al., 1991). Estudos também demonstram que durante a senescência há o prejuízo funcional do músculo observado pela sarcopenia, perda de massa muscular, em associação a isto é possível de ser evidenciado um aumento no dano oxidativo e consequentemente disfunção mitocondrial (Grounds, 1998; Lanza e Nair, 2009).

Por outro lado, o comprometimento da capacidade funcional do tecido muscular como consequência das injúrias musculares esqueléticas estão entre as principais causas de morbidade e perda de ritmo de treinamento para atletas profissionais, praticantes de atividades recreativas ou atividades diárias, desta forma, as lesões musculares demonstram-se como complicações que apresentam uma alta frequência, e assim, afetando a qualidade de vida (Li et al., 2005). Pesquisas recentes têm demonstrado que diversas atividades podem apresentar um índice considerável de lesões musculares esqueléticas, dentre estas podem ser destacadas as atividades de deslocamento (caminhada e ciclismo) e atividades cotidianas (jardinagem, cuidados do lar) as quais apresentam respectivamente 5 e 22 % de incidências de lesões musculares. No entanto, a grande maioria das lesões musculares são ocasionadas durante atividades recreativas e esportes competitivos, representando 73% das lesões (Parkkari et al., 2004).

Neste contexto é importante determinar qual o tipo e o grau de lesão, desta forma as injúrias musculares esqueléticas podem ser divididas em categorias distintas, classificadas de acordo com a forma e grau de injúria tecidual, assim, são elas: As contusões musculares ocorrem quando o músculo é submetido a uma abrupta e pesada força compressiva levando ao comprometimento interno, em geral com integridade do segmento cutâneo, sendo típico de esportes de contato. A laceração é um evento mais drástico, onde não somente há o rompimento de fibras musculares, mas também um possível dano a estrutura óssea, é considerada o tipo de lesão mais incomum, as câibras que são contrações musculares que impossibilitam o atleta de relaxar o músculo voluntariamente, os entorses se apresentam como um movimento brusco além da amplitude normal do movimento fisiológico da articulação, a luxação que é a perda da congruência articular, tendinites e bursites. Por último, a distensão muscular que ocorre em decorrência de uma força de tração excessiva submetida ao músculo e levando-o a uma sobrecarga das fibras musculares e, conseqüentemente, uma ruptura próxima a junção miotendinosa (Kellett, 1986; Jarvinen et al., 2005). Nestas circunstâncias as propriedades de elasticidade, extensibilidade e contratilidade das células musculares podem ser comprometidas.

As alterações nas propriedades mecânicas e fisiológicas do tecido podem ser resultado de uma incapacidade funcional da unidade contrátil da fibra muscular, a qual é designada como sarcômero. Além disso, a lesão conseqüentemente poderia provocar um comprometimento da membrana celular. Desta forma, dados da literatura indicam que lesões por contusão e distensão perfazem aproximadamente 90% dos casos documentados (Hurme e Kalimo, 1992; Kalimo et al., 1997), e a importância da distensão, uma injúria por estiramento, é clara para medicina esportiva e ocupacional uma vez que a distensão muscular acomete aproximadamente 30% dos casos relatados na medicina. No campo do atletismo as lesões musculares por distensão são comuns em atletas de velocidades, tais como corredores e participantes de futebol americano, basquetebol, futebol, rugby e outros esportes (Kirkendall e Garrett, 2002).

Além das categorias de lesões musculares apresentadas, estas podem ser separadas de acordo com o grau de cada uma delas, sendo assim, divididas em lesões de primeiro, segundo e terceiro grau (Jarvinen et al., 2005). Lesões de primeiro (1º) grau são as mais comuns e acontecem quando há um estiramento das

fibras musculares, porém o indivíduo permanece praticando a atividade. A sensação intensa de dor costuma aparecer no dia seguinte e o período de recuperação é cerca de 5 dias. Segundo (2º) Grau uma maior quantidade de fibra é rompida. Durante a atividade há a sensação de algo “rasgando” no músculo, e apresenta-se a incapacidade de manter a atividade física. O período de recuperação corresponde a aproximadamente 10 dias. Terceiro (3º) Grau é o caso mais grave. Há uma ruptura completa do músculo, e a cura só é possível com cirurgia. O indivíduo interrompe de imediato e, muitas vezes, não tem condições de movimentar a região do corpo onde houve a lesão. A recuperação é aproximadamente 21 dias (Hurme e Kalimo, 1992; Kalimo et al., 1997). A reabilitação estrutural do tecido muscular esquelético está intimamente associada com o processo de resposta inflamatória (Kirkendall e Garrett, 2002).

Como um mecanismo de proteção para o organismo, a resposta inflamatória é um evento desencadeado pelo sistema imunológico. A resposta inflamatória pode ser iniciada por diversos fatores, tais como injúria mecânica, , doenças infecciosas e toxinas bioquímicas. Além de se manifestar fisiopatologicamente em diversas doenças humanas como a hepatotoxicidade, injúria por isquemia e reperfusão muscular esquelética (Gute et al., 1998; Judge e Dodd, 2003; Dambach et al., 2006). A resposta inflamatória apresenta sintomas e sinais característicos, como a formação de calor, rubor, tumor (edema), dor e por último a perda da função. Estes sinais cardinais apresentados são manifestados em decorrência do aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade capilar, permitindo um influxo de células fagocíticas, e conseqüente dano ao tecido. Levando isto em consideração, a resposta inflamatória subsequente à lesão muscular envolve uma cascata complexa de eventos, sendo que este abrange a participação de linfócitos e mensageiros químicos sinalizadores. Dentre as moléculas químicas atuantes neste processo, se destaca, sobretudo, a bradicinina e histamina, que sensibilizam os receptores da dor, e produzem vasodilatação local, além da conseqüente migração de fagócitos, os quais são atraídos por quimiotaxia para o sítio do processo inflamatório. O processo inflamatório em injurias musculares tais como as lesões por distensão e contusão consistem de neutrofilia, ativação de neutrófilos e acúmulo de neutrófilos dentro da área lesada (Toumi e Best, 2003).

Assim, é importante destacar que tanto o reparo celular quanto tecidual no sítio de lesão são essenciais para o processo de reabilitação. Neste contexto, o

estabelecimento do reparo tecidual pode apresentar-se dividido em 3 fases: 1ª fase ocorre a destruição – inflamação, 2ª fase acontece o reparo propriamente dito e 3ª fase o remodelamento e reorganização do tecido. Desta forma, é importante salientar que, cada uma destas fases apresenta uma íntima dependência do grau de lesão a qual o tecido está sendo submetido (Jarvinen et al., 2005). A existência de uma resposta inflamatória subsequente a injúria muscular é um processo necessário, o qual visa uma reabilitação e regeneração tecidual. O processo inflamatório desencadeado para reabilitação frequentemente é acompanhado por um aumento da formação de espécies reativas tanto de oxigênio (EROs) quanto nitrogênio (ERNs), as quais auxiliam na degradação e remoção de células danificadas. Todavia, este processo deve ser, portanto, controlada para evitar uma excessiva produção de espécies reativas, as quais podem exacerbar o dano tecidual (Toumi e Best, 2003).

Com o advento evolutivo do metabolismo aeróbico, a célula eucariótica tornou-se um ambiente altamente oxidante o qual não somente permite extrair com maior eficiência a energia química de seus substratos energéticos, mas também, uma maior eficiência na produção de adenosina trifosfato (ATP) durante a fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial (Thannickal, 2009). O oxigênio envolvido no metabolismo oxidativo demonstra ser fundamental na manutenção da vida dos organismos aeróbicos. Todavia, o próprio metabolismo oxidativo celular pode apresentar como subprodutos de determinadas reações a geração de moléculas reativas, e estas por sua vez, poderiam ser tóxicas e mutagênicas para a célula (Gutteridge, 1994). No entanto, a formação ponderada das EROs podem ser benéficas, pois estão envolvidas no auxílio à resposta imunológica e sinalização intracelular modulando não somente a cascata de sinalização do NF- κ B, fator nuclear kappa B, um importante fator de transcrição de muitos genes de pro - sobrevivência, mas também o Nrf2, fator de transcrição nuclear 2, um regulador de um amplo espectro de genes antioxidantes que atuam em sinergia para remover EROs através de reações enzimáticas sequenciais (Fialkow et al., 2007; Buonocore et al., 2010).

A geração endógena de EROs pode ocorrer como subprodutos da atividade catalíticas de determinadas enzimas, tais como, α -Cetoglutarato Desidrogenase (Tretter e Adam-Vizi, 2004), Xantina Oxidase e NADPH Oxidase (Medow et al., 2011). Além destas fontes enzimáticas, a atividade da cadeia respiratória

mitocondrial contribui ativamente para a formação de espécies reativas (Kowaltowski et al., 2009). Dados da literatura demonstram que aproximadamente 1-5% dos elétrons que fluem pela cadeia respiratória mitocondrial, não reduzem o oxigênio (O_2) molecular em água (H_2O), e sim acarretam na formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e posteriormente produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fridovich, 1978; Halliwell, 1994a; Kowaltowski et al., 2009). A geração mitocondrial de espécies reativas ocorre principalmente através da atividade dos Complexos I e III, desencadeando a geração de $O_2^{\cdot-}$. Assim, é importante salientar que a produção espécies reativas mitocondriais, quando elevadas, podem comprometer a integridade da membrana interna e externa, afetando a formação do potencial de membrana e em função disso comprometendo a síntese de ATP, um processo dependente da diferença de potencial gerado através do bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembrana (Jezek e Hlavata, 2005; Kowaltowski et al., 2009), e especialmente causar danos significativos em nível de DNA mitocondrial, afetando a maquinaria metabólica da organela.

A participação dos neutrófilos é fundamental durante a inflamação, os neutrófilos são as primeiras populações de células brancas a entrar na área traumatizada ou tecidos estressados, e sua principal função é conter e destruir o tecido danificado ou corpos estranhos através da fagocitose, aumento respiratório, e degranulação. Neutrófilos geram ácido hipocloroso e hipoclorito ($HOCl/OCl^-$) a partir de H_2O_2 na presença de íons cloreto para facilitar a degradação e remoção do tecido danificado. A geração pronunciada do $HOCl/OCl^-$ é um processo catalisado pela mieloperoxidase (MPO), enzima localizada dentro de grânulo chamado azurófilo encontrado em leucócitos, sendo que esta enzima perfaz 5 e 1% do conteúdo total de proteína celular, em neutrófilos e monócitos, respectivamente (Brown et al., 2001). O potencial destas células capaz de exacerbar o dano muscular tem sido cuidadosamente estudado em uma variedade de modelos experimentais (Schneider e Tiidus, 2007).

É importante considerar que em determinadas situações, tais como as lesões musculares por distensão e por contusão, à formação de moléculas reativas tornasse demasiadamente elevada, e o evidente desequilíbrio entre a formação e a decomposição das EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) alcançam níveis considerados tóxicos, desta forma, caracterizasse como um processo denominado de estresse oxidativo (Fridovich, 1978; Halliwell, 2006; Kowaltowski et al., 2009). O

estresse oxidativo tem sido amplamente documentado na literatura em situações fisiopatológicas de determinadas doenças humanas, tais como aterosclerose, hipertensão, isquemia e reperfusão, inflamação, fibrose cística, diabetes, Parkinson, Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, entretanto, durante as lesões musculares por distensão e contusão ainda permanece obscuro (Halliwell, 1994b;2006). A instabilidade redox intracelular provocada pelo estresse oxidativo acarreta em uma perturbação da homeostase intracelular (Buonocore et al., 2010). O dano oxidativo leva a uma complexa sequência de eventos celulares, tais como a peroxidação lipídica, ligação covalente a macromoléculas, mudanças no status tiol, inibição de enzimas. Além disso, mudanças na estrutura e permeabilidade da membrana, danificação no DNA, dano mitocondrial, e por fim consequentemente provocando o processo de apoptose e necrose do tecido (Halliwell, 2006; Buonocore et al., 2010).

Como mecanismo apropriado para prosperidade da vida na terra, organismos aeróbicos desenvolveram evolutivamente uma complexa maquinaria metabólica apropriada para minimizar os danos oxidativos causados pela formação exagerada de EROs e ERNs (Gutteridge, 1994; Thannickal, 2009). Os sistemas de defesa celular são divididos em duas categorias, as quais desempenham sua atividade por meio da neutralização das moléculas reativas, ou impedindo a sua formação. O sistema antioxidante enzimático constituído pela Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), além de enzimas auxiliares que contribuem para a manutenção da homeostase do status redox celular, tais como Glutathione Redutase (GR), Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH) e Glutathione S-Transferase (GST) (Ji et al., 1991; Gutteridge, 1994). O sistema antioxidante não enzimático, o qual se relaciona a um grupo de antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso do tripeptídeo glutathione (GSH), da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como vitaminas E, C, β -caroteno, α -tocoferol e outros compostos. (Gutteridge, 1994; Halliwell, 1994a;b; Powers e Jackson, 2008). A concentração dessas moléculas no organismo é fortemente modulada pela alimentação através da ingestão de compostos que poderiam atuar como precursores metabólicos. Em situações como a observada durante aclimação ao exercício, a demanda metabólica intensa provoca um aumento no consumo de oxigênio o qual, culmina na formação de EROs. Entretanto, no decorrer do

treinamento, este aumento na formação de EROs, é o sinal necessário para desencadear um aumento na expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela resposta antioxidante, tais como MnSOD e GPx (Ji et al., 1990; Ji, 1993). Além disso, uma maior produção de antioxidantes não enzimáticos como a GSH, que favorece uma adaptação ao estresse provocado pela atividade física (Halliwell e Cross, 1994; Ji et al., 1998).

A geração de óxido nítrico (NOS) a qual envolve a participação da enzima óxido nítrico sintase é essencial para o tecido, uma vez que a produção endotelial de óxido nítrico auxilia na vasodilatação resultando no aumento da perfusão sanguínea no sítio de lesão (Filippin et al., 2011; Krauss et al., 2011). Dados da literatura demonstram, em modelos de isquemia e reperfusão muscular, que a utilização de L-arginina, um substrato para enzima NOS, reduz a formação de edema no local de lesão, indicando que o óxido nítrico influencia na permeabilidade endotelial (Krauss et al., 2011). Contudo, durante a intensa resposta inflamatória no tecido muscular lesado a produção excessiva de $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o óxido nítrico e intensificar o dano com a formação de peroxinitrito, processo que contribui para o estresse oxidativo oriundo da lesão muscular (Huk et al., 1997). Por outro lado, estudos demonstram que a geração de óxido nítrico durante a fase de regeneração e reabilitação tecidual é um fator importante para que as células satélites possam iniciar o reparo, assim, existe uma complexa combinação de múltiplos eventos que seriam clinicamente importantes para promover a regeneração e minimizar a formação da cicatriz fibrótica, resultando em um melhor funcionamento e recuperação muscular após a lesão (Filippin et al., 2011). Todavia, o papel das ERNs ainda permanece obscuro para a lesão muscular, porém tanto os efeitos benéficos quanto tóxicos parecem apresentar uma íntima associação com o balanço redox na célula.

A resposta inflamatória e os danos primários causados pela lesão muscular são eventos que apresentam como consequência o estresse oxidativo e o comprometimento não somente em nível macroscópico, mas também microscópico como a incapacidade funcional de proteínas responsáveis pelas propriedades contráteis do tecido. A aplicação de medidas terapêuticas que visem uma rápida reabilitação e com o mínimo de efeitos colaterais se faz essencial, contudo, a medida terapêutica apropriada para o tratamento da injúria muscular ainda permanece incerta. O uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) têm

sido estudado em modelos de lesão muscular animal (Kellett, 1986). Entretanto existem poucos dados relacionando o tratamento com AINES em humanos (Jarvinen et al., 2005). Deste modo, evidências na literatura mostram que a utilização de AINES durante um período curto resulta na melhora transitória na recuperação do tecido lesado, reduzindo a resposta inflamatória, a dor e o inchaço, sem apresentar efeitos adversos sobre o processo de reabilitação (O'grady et al., 2000). Por outro lado, é possível que a resposta inflamatória seja necessária durante a reabilitação do tecido, e a inibição desta fase pode resultar em uma má cicatrização como tem sido demonstrado com o uso de potentes anti-inflamatórios (Rahusen et al., 2004). A utilização de agentes físicos como medida terapêutica para tratar injúrias musculares é uma prática muito frequente, porém, os efeitos benéficos, relacionado a estes agentes físicos ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim podemos destacar dois agentes físicos que apresentam maior destaque na medicina desportiva e ocupacional, o frio e o calor.

Muitos estudos têm indicado um papel central do estresse oxidativo no desenvolvimento agudo e crônico de doenças humanas (Halliwell, 2006). Contudo, há poucos dados na literatura a respeito do envolvimento do estresse oxidativo em modelos de lesão muscular esquelética, como por exemplo, as induzidas por distensão (Li et al., 2005). Em vista disto, a realização de estudos que investiguem os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos de agentes terapêuticos clássicos usados na prática clínica esportiva é de grande interesse para o tratamento de diferentes tipos de lesões musculares. Agentes físicos, tais como crioterapia e a termoterapia são frequentemente tolerados para tratar lesões musculares (Thorsson, 2001; Bleakley et al., 2004; Cochrane, 2004), os quais são clinicamente eficientes, contudo, o mecanismo molecular exato envolvido no efeito protetor por eles exibidos ainda permanecem desconhecidos. Um possível mecanismo envolvido na ação da frio e termoterapia envolve sua capacidade de agir como agente antioxidante e, portanto, modulando o estresse oxidativo causado pela lesão muscular esquelética.

A crioterapia permanece como a modalidade terapêutica que apresenta uma grande frequência de utilização em situações de pós-lesão muscular esquelética, sendo aplicada, tanto empiricamente, como por profissionais da área clínica desportiva (Bleakley et al., 2004; Puntel et al., 2011). As primeiras utilizações de frio com neve e gelo natural foram feitas pelos antigos Gregos e Romanos para tratar uma variedade de problemas médicos. Muitos livros antigos foram escritos sobre a

crioterapia no início do século XIX e, em 1835, a aplicação de compressas geladas em ferimentos inflamados era bastante popular. A grande aplicabilidade como medida terapêutica, é em função principalmente devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo. Assim, atualmente muitos estudos descrevem a eficácia do frio usando modelos animais e também o sucesso desta modalidade terapêutica na prática desportiva para combater os efeitos posteriores a atividade física intensa e injúrias por isquemia e reperfusão musculares esqueléticas (Presta e Ragnotti, 1981; Bleakley et al., 2004). Além disso, é possível observar a preservação morfo-anatômica e histológica do tecido lesado quando submetido ao tratamento com o frio (Puntel et al., 2011). A utilização clínica da crioterapia em circunstâncias fisiopatológicas e/ou injúrias musculares, apresenta determinadas características proveniente do resfriamento local, dentre essas podemos citar, um efeito analgésico, a diminuição da demanda metabólica tecidual, uma redução do aporte sanguíneo em decorrência do efeito vasoconstritor e, por conseguinte uma atenuação da pressão hidrostática, a qual levaria a formação do edema. Associado à isto, podemos observar uma substancial diminuição na demanda metabólica e no dano desencadeado por uma resposta inflamatória descontrolada (Bleakley et al., 2004; Schaser et al., 2007; Puntel et al., 2011). Desta forma, o tratamento com aplicação do resfriamento local seria benéfico e auxiliaria no processo de reabilitação do tecido lesado.

Da mesma forma que a crioterapia, outra modalidade terapêutica muito adotada na reabilitação do tecido lesionado é a aplicação de calor na forma de termoterapia (Cochrane, 2004). Assim, este agente físico apresenta como efeitos provenientes da elevação superficial da temperatura local, um aumento no aporte sanguíneo, vasodilatação, aumento da produção metabólica e diminuição do espasmo muscular (Zuluaga, 1995; Prentice, 1999; Brukner e Khan, 2001). Como recursos da termoterapia temos o calor superficial e o calor profundo. O calor superficial é obtido através de compressas, bolsas e imersões com água quente e infravermelho. O tratamento com calor profundo necessita de aparelhos específicos que emitem ondas que penetram pela pele e atingem camadas mais profundas que o calor superficial, como ultra-som, ondas curtas e microondas (Brukner e Khan, 2001). Por outro lado, a aplicabilidade do calor, não se restringe somente na terapia de reabilitação do tecido muscular pós injúria muscular, existem dados na literatura com a utilização da termoterapia em ósteo artrite e artrite reumatóide (Nicholas,

1994). Seguindo esta linha de estudo, a utilização da termoterapia em modelo experimental de cultura de condrócitos observou que a aplicação terapêutica do calor aumenta a viabilidade celular e o metabolismo de proteoglicanos, indicando que a aplicação da termoterapia poderia não somente atuar o dano celular sobre os sítio da injúria, mas também sobre o tecido conjuntivo que envolve a junção miofibrilar, e, portanto, acelerar o processo de reabilitação (Hojo et al., 2003).

Portanto, como as injúrias musculares esqueléticas podem ocorrer com frequência durante a prática esportiva profissional, recreativas ou devido a atividades cotidianas, como uma simples caminhada, e, além disso, estas lesões podem se manifestar de formas diferentes, sendo que uma das formas de lesões musculares com maior incidência são aquelas provocadas por distensões musculares esqueléticas. Devido a este fato, é de grande importância a aplicação de medidas terapêuticas eficientes que visem uma rápida reabilitação. Neste contexto, o uso dos agentes terapêuticos físicos, tais como a crio e a termoterapia têm apresentado resultados clínicos significativos no processo de aceleração da reabilitação do tecido lesionado. Considerando o fato de existir poucos relatos na literatura sobre os fenômenos bioquímicos envolvidos nos efeitos da crio e termoterapia sobre o dano muscular esquelético, o conhecimento de como estes agentes físicos exercem seus efeitos benéficos torna-se importante, uma vez que estes constituem uma das principais estratégias utilizadas no tratamento de lesões musculares, e pelo fato de que os mecanismos bioquímicos envolvidos na origem de seus efeitos protetores não se encontram completamente esclarecidos.

Considerando estes fatos, este estudo teve como objetivo examinar o possível envolvimento do estresse oxidativo no processo de lesão muscular induzida por distensão em músculo *gastrocnemius* de ratos; avaliando simultaneamente a capacidade dos agentes físicos em modular o dano oxidativo causado na fibra muscular. Além disto, este estudo visa também investigar o possível envolvimento da resposta inflamatória na gênese do dano oxidativo em resposta a injúria por distensão muscular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da frio e termoterapia na modulação do estresse oxidativo induzido pela injúria muscular esquelética em um modelo experimental de distensão muscular.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- ❖ Avaliar os efeitos do modelo de distensão muscular sobre os marcadores bioquímicos de estresse oxidativo;
- ❖ Quantificar o comprometimento da membrana celular muscular através da atividade plasmática da enzima Creatina quinase (CQ) após a lesão;
- ❖ Quantificar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de diclorofluoresceína oxidada (DCF-oxid) em amostras do tecido muscular e fração sanguínea (plasma e fração celular do sangue) dos animais submetidos à lesão e tratados com os agentes físicos;
- ❖ Analisar os efeitos do frio e calor terapêutico sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em amostras do tecido muscular;
- ❖ Quantificar a resposta inflamatória no tecido muscular através da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).

DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento que faz parte desta dissertação está apresentado sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O artigo encontra-se na formatação de publicação da revista científica Journal of Sports Sciences.

ARTIGO: EFEITO PROTETOR DO FRIO E CALOR TERAPÊUTICO CONTRA O DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR UMA LESÃO POR DISTENSÃO MUSCULAR EM RATOS

Artigo científico publicado na revista Journal of Sports Sciences

PROTECTIVE EFFECTS OF THE THERAPEUTIC COLD AND HEAT AGAINST THE OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY A MUSCLE STRAIN INJURY IN RATS

Nélson Carvalho, Gustavo Puntel, Philipe Correa, Priscila Gubert, Guilherme Amaral,
Jefferson Morais, Luiz Royes, João da Rocha, Félix Soares

Journal of Sports Sciences, 2010, Published online, 28 (9) 923 - 935

Doi: 10.1080/02640414.2010.481722

Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats

NÉLSON CARVALHO, GUSTAVO PUNTEL, PHILIPPE CORREA, PRISCILA GUBERT, GUILHERME AMARAL, JEFFERSON MORAIS, LUIZ ROYES, JOÃO DA ROCHA, & FÉLIX SOARES

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

(Accepted 26 March 2010)

Abstract

The mechanisms of action of physical agents commonly used to treat skeletal muscle lesions are not well understood. In this study, we examined whether the modulation of oxidative stress is involved in the beneficial effects of cold and heat on gastrocnemius muscle strain injury. Adult male *Wistar* rats were submitted to a strain injury and treated with therapeutic agents in an isolated or combined form. Strain damage caused an increase in muscle and blood oxidative damage. We suggest that this oxidative damage might be related to the impairment of the muscle cell structure, since we observed a significant positive correlation between increased plasma creatine kinase activity and both oxidized dichlorofluoresceine and lipid peroxidation levels in muscle and blood. The intensity of the inflammatory response appears also to be an important factor in the genesis of oxidative damage immediately following a muscle strain injury. Therapeutic cold seems to be more effective in preventing the damage induced by a strain injury, possibly due to its capacity to control the impairment of muscle cell structure and to modulate the intensity of the inflammatory response that follows a muscle strain injury.

Keywords: *Skeletal muscle, strain injury, cold, heat, oxidative damage*

Introduction

The development of therapies for the rehabilitation or prevention of skeletal muscle disorders is fundamental to sport clinical practice (Clanton & Coupe, 1998; Kujala, Orava, & Järvinen, 1997). The choice of a technique or a method of treatment depends on the type of lesion, stage of development, and available resources (Järvinen, Järvinen, Kääriäinen, Kalimo, & Järvinen, 2005). Physical modalities such as therapeutic cold (Bleakley, McDonough, & MacAuley, 2004; Järvinen et al., 2005) and therapeutic heat (Cochrane, 2004) are generally selected due to their wide availability and relatively low cost.

Strain injuries are among the most frequent skeletal muscle injuries and are due to a sudden stretch to the muscle (Kujala et al., 1997; Li, Feng, & Wang, 2005; Mair, Seaber, Glisson, & Garrett, 1996). Under such conditions, a disruption of the skeletal muscle cell structure generally occurs near the myotendinous junction (Tidball, Salen, & Zernicke, 1993). A large haematoma results and an increased number of inflammatory cells reach the

injured tissue to start the repair process (Järvinen et al., 2005; Li et al., 2005).

An inflammatory response is required for the structural and functional rehabilitation of the damaged tissues (Järvinen et al., 2005). One method to investigate the intensity of the inflammatory response that follows a skeletal muscle injury is to measure myeloperoxidase activity in plasma. Some studies have shown that skeletal muscle damage, such as that related to excessive physical exercise, could result in an increase in neutrophil degranulation, leading to the release of active myeloperoxidase into the plasma (Belcastro, Arthur, Albisser, & Raj, 1996; Bury & Pirnay, 1995). Moreover, there is histological evidence for a relationship between the increase in myeloperoxidase activity and neutrophil extravasation into the injured skeletal muscle (Tidball, 2005).

However, an excessive inflammatory response could be accompanied by the uncontrolled generation of reactive species (Spiteller, 2006; Supinski & Callahan, 2007). To remove reactive species and their secondary products, cells display several defence and repair mechanisms, which are grouped in enzymatic and

Correspondence: F. Soares, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário 97, 105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: felix_antunes_soares@yahoo.com.br

non-enzymatic antioxidant systems (Chain, Chow, & Chui, 1999). An imbalance between the antioxidant defence systems and the reactive species generated may result in an impairment of normal cell function.

Many studies have suggested a central role for oxidative stress in the development of acute and chronic human disorders (Halliwell, 2006). However, there are limited data for the existence of such alterations in models of skeletal muscle tissue lesions, such as those due to muscle strains (Li et al., 2005). Thus, understanding the mechanisms involved in the beneficial effects of classical therapeutic agents used to treat muscle lesions is of interest. Physical agents usually used to treat skeletal muscle lesions, such as therapeutic cold (Bleakley et al., 2004; Thorsson, 2001) and therapeutic heat (Cochrane, 2004), are clinically efficient, although the mechanisms involved in their protective effects are unknown.

Since limited data are available in the literature regarding the biochemical phenomena that underlie the therapeutic effects of cold and heat in skeletal muscle damage, we examined the possible central role of oxidative damage in skeletal muscle strain injury induced in rats. The intensity of the inflammatory response and impairment to muscle cell membrane structure were also investigated as possible factors related to the genesis of the oxidative damage that follows a muscle strain injury. We also analysed the capacity of therapeutic cold, therapeutic heat, and a combination of the two to modulate the oxidative damage in the lesions, and the possible mechanisms related to their beneficial effects.

Materials and methods

Animals

Male *Wistar* rats weighing 270–320 g from our own breeding colony were kept in cages of five animals each, with food and water *ad libitum*, in a temperature-controlled room ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) with a 12-h light/dark cycle and with lights on at 07.00 h. The animals were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

Skeletal muscle strain damage

The skeletal muscle strain was induced according to Almeskinders and Gilbert (1986), with few modifications. First, the animals were anaesthetized with an injection of ketamine ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) and xilazine ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.). The fully anaesthetized animals were placed in a prone position and the surgical incision made in the right hind limb was trichotomized and sterilized. The distal tendon of the right

gastrocnemius muscle was surgically detached from the other tendons and connected to a force cell and strained at a continuous speed of $6 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ for 30 s, since preliminary experiments in our laboratory pointed to a latency range of 0.35–1.25 min to tendon rupture. After the strain, the distal tendon was replaced and the wounds were sterilized and closed. All the animals were treated with benzyl penicillin ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) for 3 days to prevent infection of the wound. The bandage was changed just before each treatment session.

Treatments

The animals were divided into six groups:

1. Control animals not subjected to the muscular strain lesion ($n = 15$).
2. Sham animals subjected to the standard surgical procedure without a lesion ($n = 15$).
3. Animals subjected to the muscular lesion without any treatment ($n = 15$).
4. Animals subjected to the muscular lesion with therapeutic cold as treatment ($n = 15$).
5. Animals subjected to the muscular lesion with therapeutic heat as treatment ($n = 15$).
6. Animals subjected to the muscular lesion followed by both therapeutic cold and therapeutic heat as treatments ($n = 15$).

In all treatments groups, the animals were not subjected to any previous training process. All treatment sessions were undertaken twice a day for 5 min starting at 07.00 and 19.00 h, respectively (Bleakley et al., 2004). The first session was applied 30 min after the muscle strain. The effects of all treatment protocols were also analysed in a condition similar to that of the control animal group, characterized by the absence of any muscular lesion. They received therapeutic cold and/or heat and no significant changes were observed, indicating an absence of an effect *per se* of the treatments used (data not shown).

Therapeutic cold. Therapeutic cold was developed by static application of ice cubes directly under the injured muscle tendon (above the surgical wound).

Therapeutic heat. Therapeutic heat was developed by the application of infrared rays directly under the injured muscle tendon (above the surgical wound). The infrared radiation was produced using an infrared lamp (INFRAPHIL PAR38E 230 V, 150 W, Philips, Netherlands) placed 30 cm from the treatment site.

Combined therapeutic cold and therapeutic heat. The combined application of therapeutic cold and therapeutic heat was performed by subjecting the rats

first to the treatment with therapeutic heat followed immediately by the treatment with therapeutic cold.

Biochemical analysis

Biochemical analyses were performed 2 h and 1, 5, 10 or 15 days after treatment. The choice of the treatment period was based on the initial phase of the repair process, so as not only to observe the possible oxidative stress induced by the strain injury under such conditions, but also to investigate and compare the effects of the different treatment protocols used here.

Tissue preparation. Rats were euthanized and whole blood collected (cardiac puncture) in previously heparinized tubes and kept on ice. Whole blood samples were precipitated with chloroacetic acid 40% (1:1) and centrifuged (4000 *g* for 10 min at 4°C) to obtain the supernatant fraction that was used for determination of thiobarbituric acid reactive species. Other heparinized blood samples were centrifuged at 1000 *g* for 10 min at 4°C to obtain plasma and cellular blood fractions, which were used

for measurement of dichlorofluorescein diacetate oxidation. In addition, aliquots of plasma were frozen (−20°C) for 7 days for later analysis of creatine kinase activity. The right gastrocnemius muscle was also removed and quickly homogenized in saline (150 mM) and kept on ice. After homogenization, the skeletal muscle samples were centrifuged at 4000 *g* for 10 min at 4°C to yield a low-speed supernatant fraction that was used for determination of thiobarbituric acid reactive species and dichlorofluorescein diacetate oxidation. Aliquots of skeletal muscle supernatant fraction were frozen (−20°C) for later analysis of antioxidant enzyme catalase and superoxide dismutase activities, and for protein determination.

2',7'-dichlorofluorescein fluorescence assay. A dichlorofluorescein fluorescence assay was used to measure cellular peroxide production (Myhre, Andersen, Aarnes, & Fonnum, 2003). Aliquots of plasma (200 ml), cellular blood fraction (10 ml) or skeletal muscle supernatant fraction (50 ml) were added to a medium containing Tris-HCl buffer

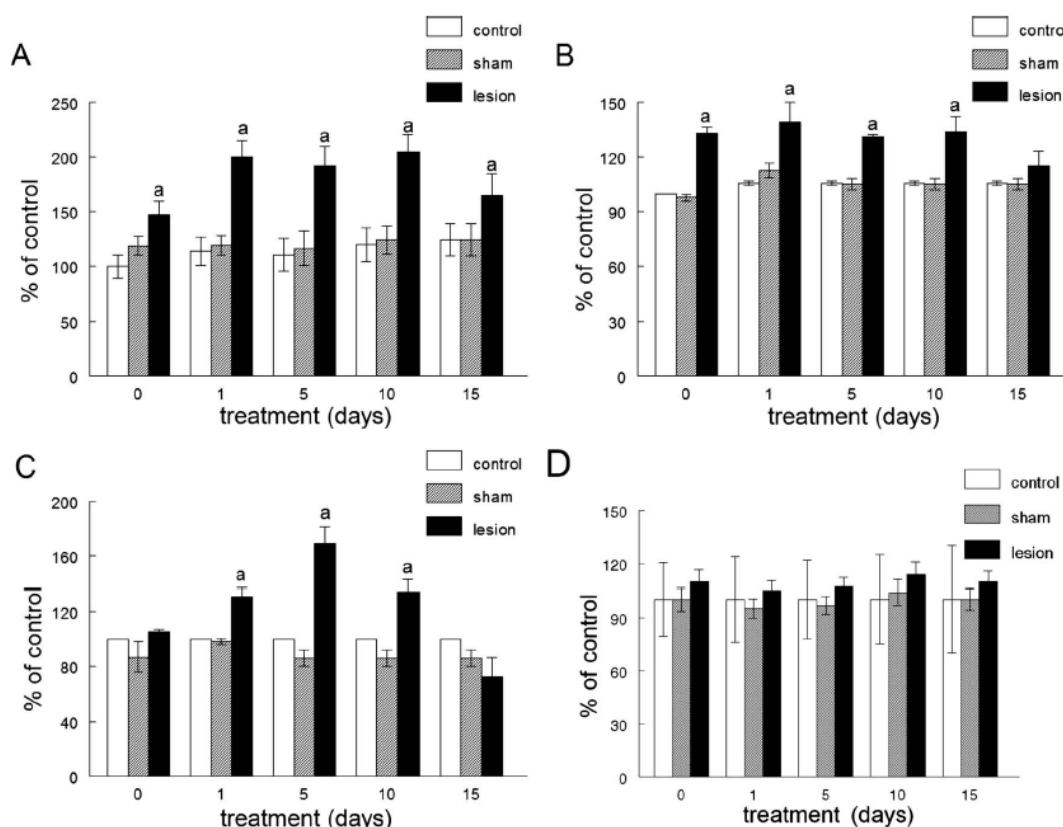


Figure 1. Muscle oxidative damage: (A) dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (C) catalase activity; (D) superoxide dismutase (SOD) activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n=3$). Control DCF-RS value was 42.163 ± 0.541 fluorescence units, control TBARS value was $10.450 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, control catalase activity was $104.677 \pm 10.640 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, and control SOD activity was $51.188 \pm 0.130 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control.

(0.01 mM, pH 7.4) and dichlorofluorescein diacetate (7 mM). After the addition of dichlorofluorescein diacetate, the medium was incubated in the dark for 1 h until the fluorescence measurement procedure (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, with both slit widths at 5 nm). Oxidized dichlorofluorescein was determined using a standard curve of dichlorofluorescein and results were expressed as a percentage of the control group (Pérez-Severiano et al., 2004).

Lipid peroxidation assay. Lipid peroxidation was determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances as described by Ohkawa and colleagues (Ohkawa, Ohishi, & Yagy, 1979) in whole blood samples and in skeletal muscle supernatant fraction. We added 500-ml aliquots of supernatant fraction obtained after blood sample precipitation, or 200-ml aliquots of skeletal muscle supernatant fraction, for the colour reaction. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances was measured at 532 nm using a standard curve of malondialdehyde, and the results were expressed as a percentage of the control group.

Creatine kinase activity assay. Total creatine kinase activity was measured spectrophotometrically in

plasma samples as an index of strain muscle damage using diagnosis kits (CK-NAC Liquiform, Labtest, MG, Brazil).

Superoxide dismutase activity assay. Superoxide dismutase enzyme activity in skeletal muscle supernatant fraction was assayed spectrophotometrically as described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the capacity of superoxide dismutase to inhibit autoxidation of adrenaline to adrenochrome. Briefly, different aliquots of supernatant fraction were added to a medium containing glycine buffer (50 mM, pH 10.5) and adrenaline (1 mM). The kinetic analysis of superoxide dismutase was started after the addition of adrenaline, and the colour reaction was measured at 480 nm.

Catalase activity assay. Catalase enzyme activity was determined in skeletal muscle supernatant fraction by the decomposition of hydrogen peroxide according to Aebi (1984). Briefly, a 50-ml aliquot of supernatant fraction was added to a medium containing potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and hydrogen peroxide (1 mM). The kinetic analysis of catalase was started after the addition of hydrogen peroxide, and the colour reaction was measured at 240 nm.

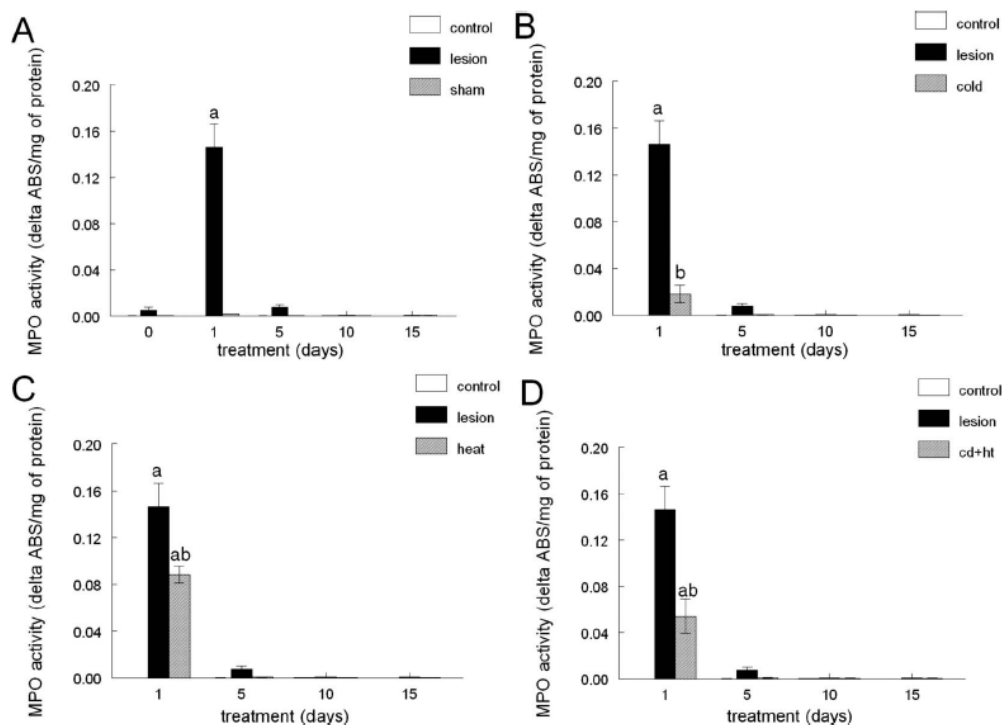


Figure 2. Muscle myeloperoxidase (MPO) activity: (A) lesion animals; (B) cold-treated animals; (C) heat-treated animals; (D) combined cold- and heat-treated animals. Values are expressed as change in absorbance per milligram of protein (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

Myeloperoxidase activity assay. Myeloperoxidase enzyme activity was determined in skeletal muscle supernatant fraction according to the method of Grisham and colleagues (Grisham, Hernandez, & Granger, 1986), with some modifications. Briefly, a sample of the skeletal muscle preparation (20 ml) was added to a medium containing potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) containing hexadecyltrimethylammonium bromide (0.5%) and *N, N, N', N'*-tetramethylbenzidine (1.5 mM). The kinetic analysis of myeloperoxidase was started after the addition of hydrogen peroxide (0.01%), and the colour reaction was measured at 655 nm at 37°C.

Protein determination. The protein content was determined according to Lowry and colleagues (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analysed by two- or three-way analysis of variance, and univariate analysis of variance followed by Duncan's test. Correlations between the factors

measured here were performed by Pearson's correlation. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Effect of the strain muscle injury

Skeletal muscle tissue. Figure 1A and 1B show that oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substance activity increased significantly in skeletal muscle after the lesion ($P \leq 0.05$). Catalase activity was also significantly increased one day after the lesion (Figure 1C; $P \leq 0.05$), although no significant differences were observed for superoxide dismutase activity (Figure 1D). Figure 2A shows that myeloperoxidase activity increased significantly only one day after the muscle strain injury ($P \leq 0.05$).

Blood tissue. Figure 3A and 3B show an increase in oxidized dichlorofluorescein in plasma and in the cellular blood fraction after the lesion ($P \leq 0.05$). There was also a significant increase in whole-blood thiobarbituric acid reactive substance concentration

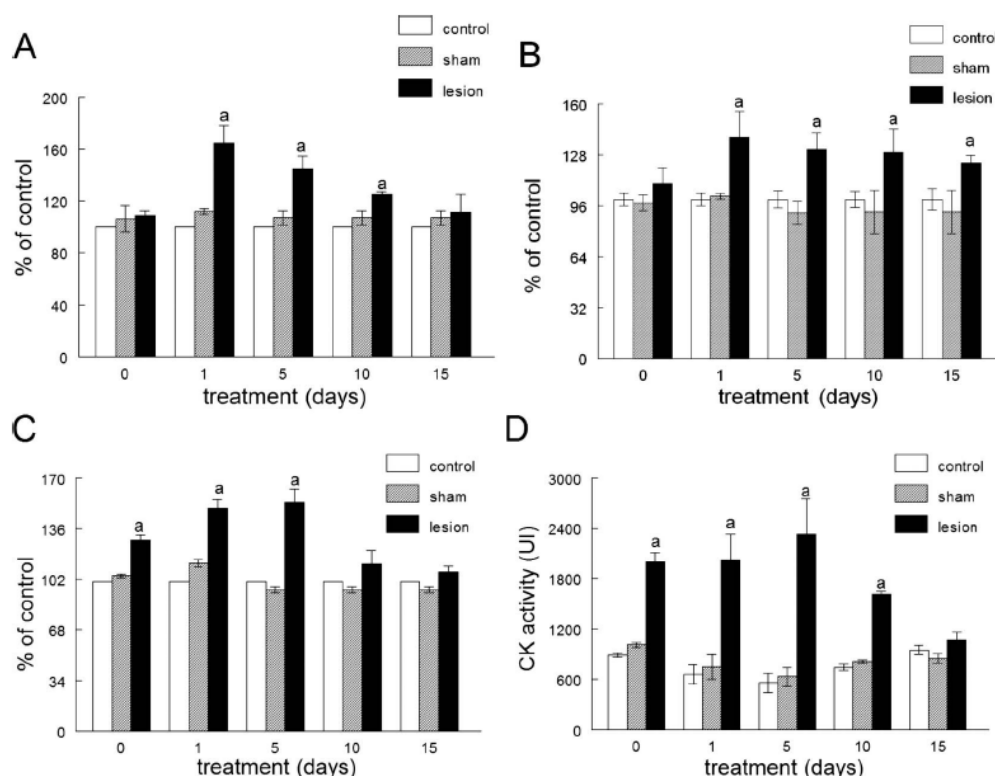


Figure 3. Blood oxidative damage: (A) plasma dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) cellular blood fraction DCF-RS concentration; (C) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (D) plasma creatine kinase activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n = 3$). Control DCF-RS in plasma value was 55.776 ± 0.520 fluorescence units, control DCF-RS in erythrocytes value was 266.471 ± 10.360 fluorescence units, and control TBARS value was $1.226 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{ml}^{-1}$ whole blood (means \pm standard errors; $n = 3$). *Significant difference ($P \leq 0.05$) compared with control.

and in plasma creatine kinase activity after the lesion (Figure 3C and 3D; $P \leq 0.05$).

Effects of therapeutic cold

Skeletal muscle tissue. Figure 4A and 4B show that therapeutic cold treatment modulated the increase in oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances levels induced by the lesion ($P \leq 0.05$). Catalase activity was also modulated by the cold treatment (Figure 4C; $P \leq 0.05$) but no significant effects were observed for superoxide dismutase activity (Figure 4D). The increase in myeloperoxidase activity was also significantly modulated by the cold treatment (Figure 2B; $P \leq 0.05$).

Blood tissue. Figure 5A and 5B shows that the therapeutic cold treatment maintained plasma and cellular blood fraction oxidized dichlorofluorescein levels near to control values ($P \leq 0.05$). The increases in whole-blood thiobarbituric acid reactive

substance concentration and in plasma creatine kinase activity were also modulated by the cold treatment (Figure 5C and 5D; $P \leq 0.05$).

Effects of therapeutic heat

Skeletal muscle tissue. Figure 6A and 6B illustrate that therapeutic heat modulated the increase in oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances induced by the lesion only after 5 days of treatment ($P \leq 0.05$). Catalase activity was modulated by the heat treatment only after 10 days of treatment (Figure 6C; $P \leq 0.05$), but no significant effects were observed for superoxide dismutase activity (Figure 6D). The increase in myeloperoxidase activity was also significantly modulated by the heat treatment (Figure 2C; $P \leq 0.05$), although the control value was not reached.

Blood tissue. Figure 7A and 7B show that the therapeutic heat treatment decreased plasma and cellular blood fraction oxidized dichlorofluorescein

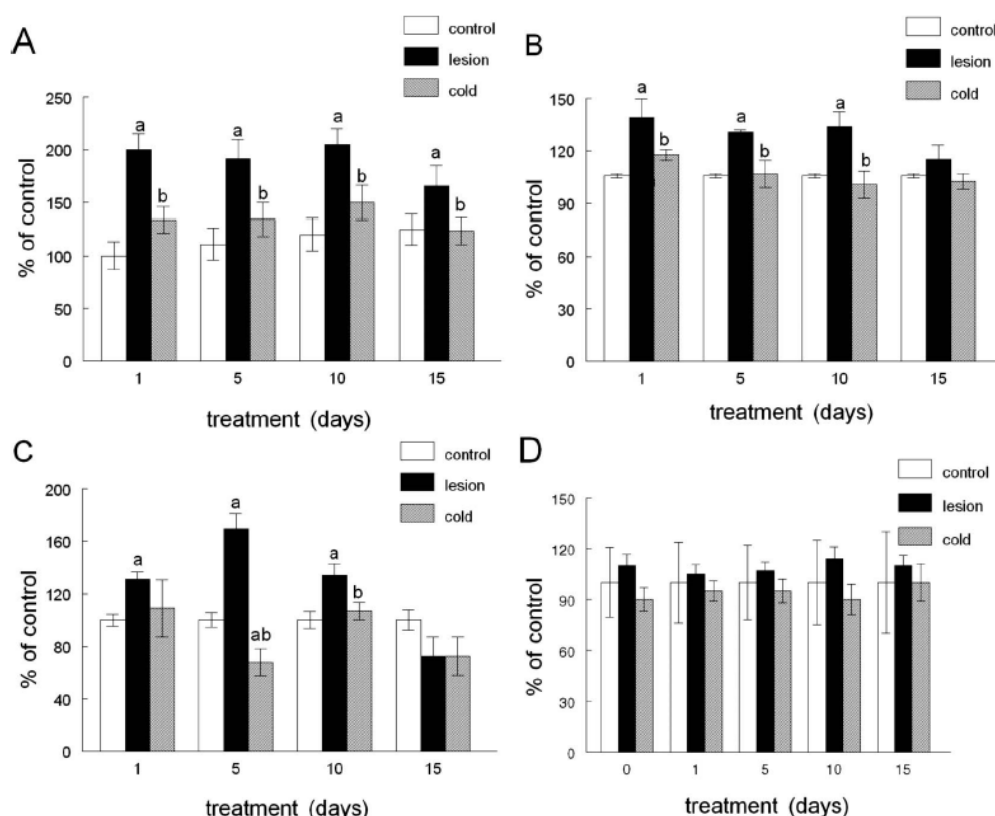


Figure 4. Effects of cold treatment on muscle oxidative damage: (A) plasma dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (C) catalase activity; (D) superoxide dismutase (SOD) activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n = 3$). Control DCF-RS value was 42.163 ± 0.541 fluorescence units, control TBARS value was $10.450 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein protein, control catalase activity was $104.677 \pm 10.640 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, and control SOD activity was $51.188 \pm 0.130 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein (means \pm standard errors; $n = 3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

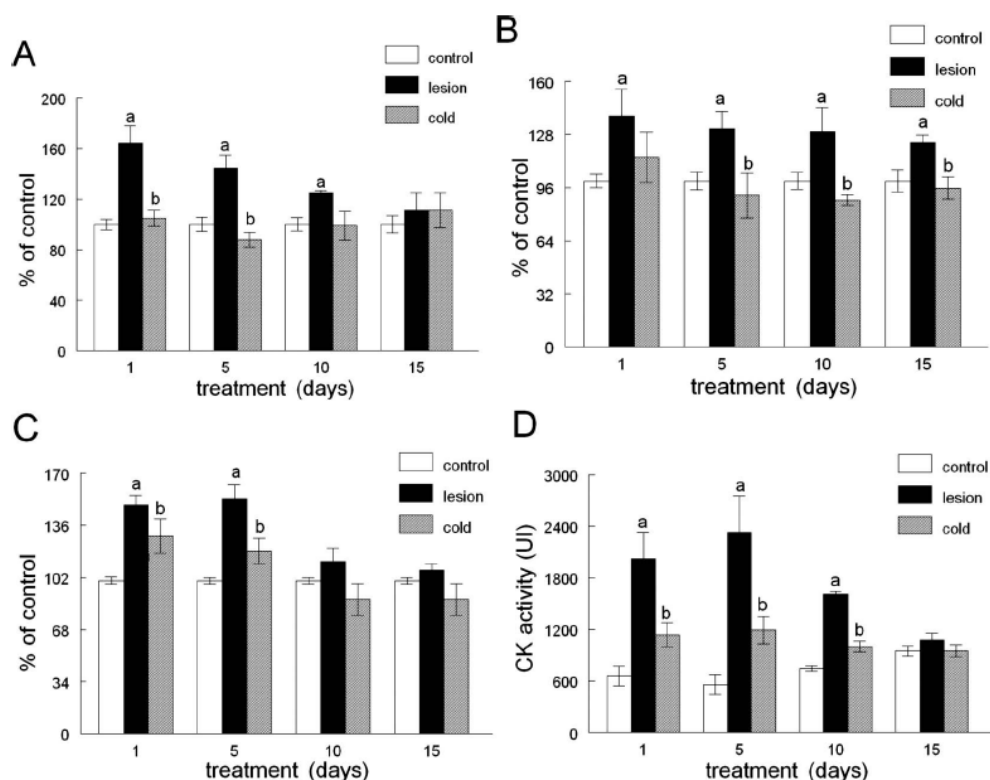


Figure 5. Effects of cold treatment on blood oxidative damage: (A) plasma dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) cellular blood fraction DCF-RS concentration; (C) whole-blood thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (D) plasma creatine kinase activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n=3$). Control DCF-RS in plasma value was 55.776 ± 0.520 fluorescence units, control DCF-RS in erythrocytes value was 266.471 ± 10.360 fluorescence units, and control TBARS value was $1.226 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{ml}^{-1}$ whole blood (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

levels only after 10 days of treatment ($P \leq 0.05$). However, the increase in whole-blood thiobarbituric acid reactive substances was not significantly modulated by the heat treatment (Figure 6C). Plasma creatine kinase activity was also significantly modulated by the heat treatment (Figure 6D; $P \leq 0.05$), although the control value was not reached.

Effects of combined therapeutic cold and therapeutic heat

Skeletal muscle. Figure 8A and 8B show that the combined cold and heat treatment modulated the increase in oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances induced by the lesion, although the control value was reached only after 5 days of treatment ($P \leq 0.05$). Catalase activity was significantly modulated by the combined cold and heat treatment after 5 days of treatment (Figure 8C; $P \leq 0.05$), although the control value was reached only after 10 days of treatment. There were no significant effects of the combined cold and heat treatment on superoxide dismutase activity (Figure 8D). The increase in myeloperoxidase activity was

also significantly modulated by the combined cold and heat treatment (Figure 2D; $P \leq 0.05$), although the control value was not reached.

Blood tissue. Figure 9A and 9B illustrate that the combined treatments modulated plasma and cellular blood fraction oxidized dichlorofluorescein levels only after 5 days of treatment ($P \leq 0.05$). Similarly, the increase in whole-blood thiobarbituric acid reactive substances levels was modulated only after 5 days of treatment (Figure 9C), although control values were not reached. Plasma creatine kinase activity was not significantly modulated by the combined cold and heat treatment (Figure 9D).

Comparisons among the effects of the different physical agents

Univariate analysis of variance showed that the cold- or heat-treated animals showed a significant decrease in muscle or blood oxidized dichlorofluorescein compared with the combined cold- and heat-treated animals ($F=24.794$, $P \leq 0.05$). Similarly, thiobarbituric acid reactive substances in muscle and in

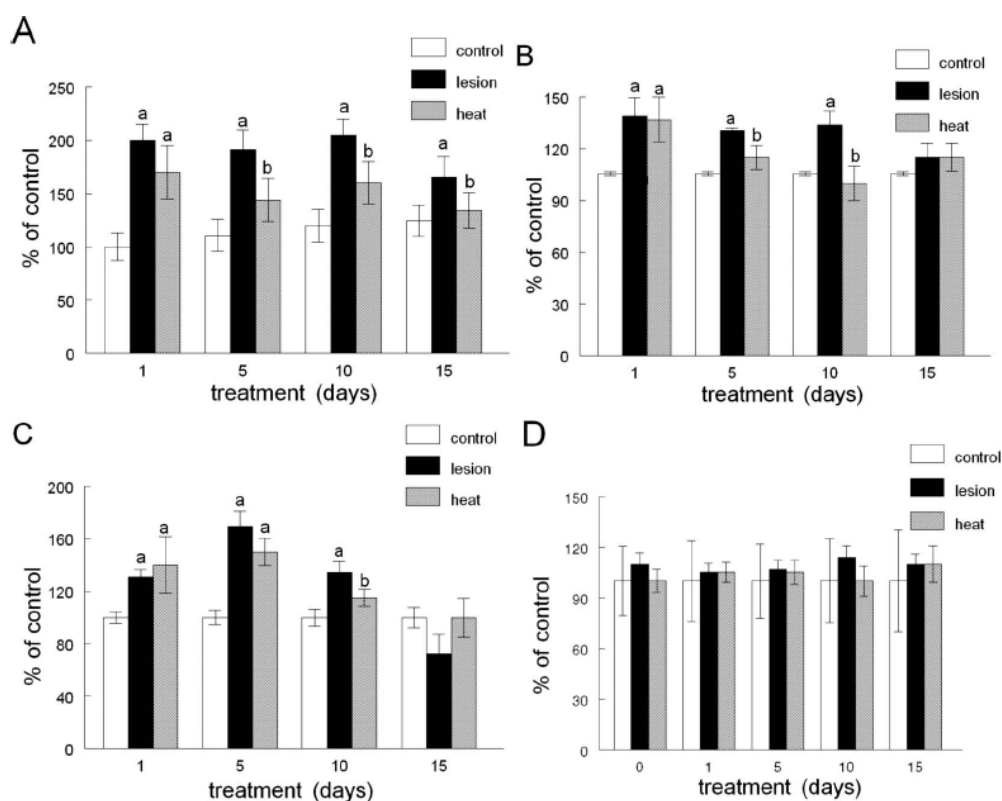


Figure 6. Effects of heat treatment on muscle oxidative damage: (A) dichlorofluoresceine (DCF-RS) concentration; (B) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (C) catalase activity; (D) superoxide dismutase (SOD) activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n=3$). Control DCF-RS value was 42.163 ± 0.541 fluorescence units, control TBARS value was $10.450 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, control catalase activity was $104.677 \pm 10.640 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, and control SOD activity was $51.188 \pm 0.130 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

blood varied significantly among groups, with the cold-treated animals showing the most significant decrease in thiobarbituric acid reactive substances followed by the combined cold- and heat-treated animals ($F=29.246$, $P \leq 0.001$). In addition, muscle catalase enzyme activity and plasma creatine kinase activity varied significantly among groups, with the cold-treated animals showing the most significant decrease in these enzymes followed by the combined cold- and heat-treated animals ($F=4.492$, $P \leq 0.001$ and $F=80.375$, $P \leq 0.001$, respectively). All these data were confirmed by three-way analysis of variance.

Correlations between oxidative damage in skeletal muscle and in blood

Table I shows the correlations among oxidative damage parameters analysed in animals with lesions taking into account the mean values obtained on the different days of analysis after the lesion was induced (1, 5, 10, and 15 days after). A significant positive correlation was observed between oxidized dichlorofluoresceine and thiobarbituric acid reactive

substance concentrations in muscle (Table I). In addition, oxidized dichlorofluoresceine and thiobarbituric acid reactive substance concentrations in muscle were correlated positively with their respective concentrations in blood (Table I). Muscle catalase activity and plasma creatine kinase activity were also correlated positively with the muscle and blood oxidized dichlorofluoresceine and thiobarbituric acid reactive substance concentrations (Table I). In contrast, a significant negative correlation was observed between skeletal muscle superoxide dismutase activity and oxidized dichlorofluoresceine concentrations in plasma (Table I).

Discussion

Our results point to a significant increase in oxidized dichlorofluoresceine and thiobarbituric acid reactive substances in both skeletal muscle and in blood in response to a standard muscle strain injury. These results support the hypothesis that oxidative damage is a classical feature that follows an acute disorder such as a muscle lesion (Li et al., 2005; Supinski & Callahan, 2007). We believe that the genesis of the

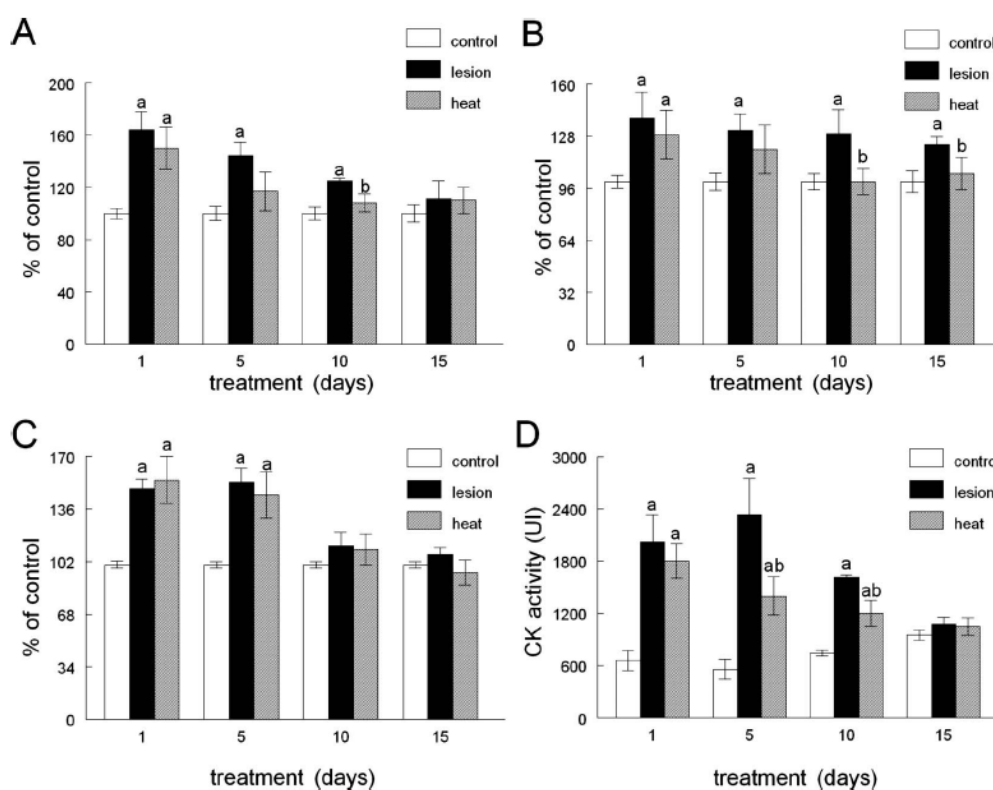


Figure 7. Effects of heat treatment on blood oxidative damage: (A) plasma dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) cellular blood fraction DCF-RS concentration; (C) whole-blood thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (D) plasma creatine kinase activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n=3$). Control DCF-RS in plasma value was 55.776 ± 0.520 fluorescence units, control DCF-RS in erythrocytes value was 266.471 ± 10.360 fluorescence units, and control TBARS value was $1.226 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ whole blood (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

oxidative damage could be related to the intensity of the inflammatory response immediately after a lesion is sustained. This hypothesis is supported by our results that show a significant increase in muscle myeloperoxidase activity 1 day after the muscle strain injury (Figure 9A). Thus, our results are in accordance with the literature showing that an excessive inflammatory response is generally followed by an uncontrolled generation of reactive species (Spiteller, 2006; Supinski & Callahan, 2007), which could result in oxidative damage and consequently impairment of normal cell function (Gutteridge & Halliwell, 1994).

We observed a relationship between oxidative damage at the site of the lesion and also in blood, since there was a significant positive correlation between oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances in skeletal muscle and in blood. We believe that the reason for this similar increase in oxidative damage markers in muscle and blood could also be related to the high intensity of the inflammatory response, at least in the initial moments following the muscle strain injury.

The increase in oxidized dichlorofluorescein concentration was also correlated positively with the increase in thiobarbituric acid reactive substances. A possible explanation for these results is that there is a marked generation in reactive species in response to a muscle strain injury that lead not only to oxidized dichlorofluorescein formation but also help to start a complex cascade of reactions that culminate in lipid peroxidation. Based on our results, we hypothesize that the peripheral analysis of oxidative damage markers in blood could be used as a useful tool to analyse the extent as well as the healing processes after a muscle lesion.

Skeletal muscle catalase activity was also significantly increased following the muscle lesion (Figure 1C). Since catalase is an important antioxidant enzyme in skeletal muscle, we believe that the increase in its activity could be understood as a compensatory mechanism in response to a stressing condition where the impairment of functional biomolecules is improved. This suggestion is supported by our results, which show a positive correlation between muscle catalase activity and

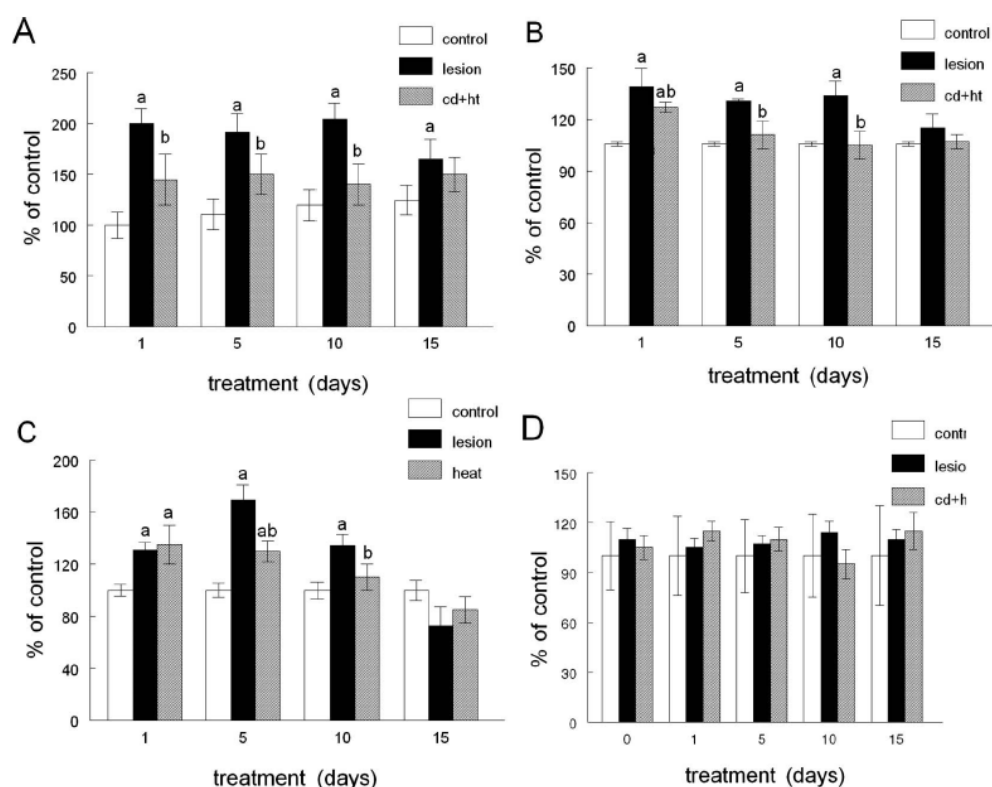


Figure 8. Effects of combined cold and heat treatments on muscle oxidative damage: (A) dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (C) catalase activity; (D) superoxide dismutase (SOD) activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n=3$). Control DCF-RS value was 42.163 ± 0.541 fluorescence units, control TBARS value was $10.450 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$, control catalase activity was $104.677 \pm 10.640 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$, and control SOD activity was $51.188 \pm 0.130 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

muscle and blood lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances). In contrast, the reason for no significant difference in superoxide dismutase enzyme activity could be related to the absence of sufficient time for an effective adaptation in view of the single stressing condition that the skeletal muscle was submitted to, or to the methodological limitations of the method used (Figure 1D).

Plasma creatine kinase activity was also significantly increased following the muscle lesion (Figure 2D). Since plasma creatine kinase activity is classically used as a means to analyse the extent of skeletal muscle cell rupture (Brancaccio, Maffulli, & Limogelli, 2007; Fink, Hase, Luttgau, & Wettwer, 1983), our results point to an extensive impairment in muscle cell structure in response to the lesion. Moreover, we believe that the extensive muscle cell rupture could also be related to the increase in oxidative damage of the muscle. This hypothesis is supported by our results, which show a significant positive correlation between plasma creatine kinase activity and oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances in muscle.

We observed the potential for therapeutic cold and heat to modulate the oxidative damage induced by a muscle strain injury. We found that the different physical agents were able to attenuate the increase in oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances in muscle and blood. However, the cold treatment was more effective in reducing this oxidative damage in both skeletal muscle and blood. We believe the effectiveness of the cold treatment to modulate the oxidative damage that follows a muscle strain injury could be related to its capacity to modulate the intensity of the initial inflammatory response after a muscle lesion. This hypothesis is supported by our results, which show a significant decrease in myeloperoxidase activity in cold-treated animals on the day following the muscle strain injury (Figure 9B). The capacity of the cold treatment to modulate the inflammatory response that follows a skeletal muscle injury has been reported previously in the literature (Schaser et al., 2007). In addition, we believe that the capacity of the heat treatment to limit the oxidative damage induced by the lesion

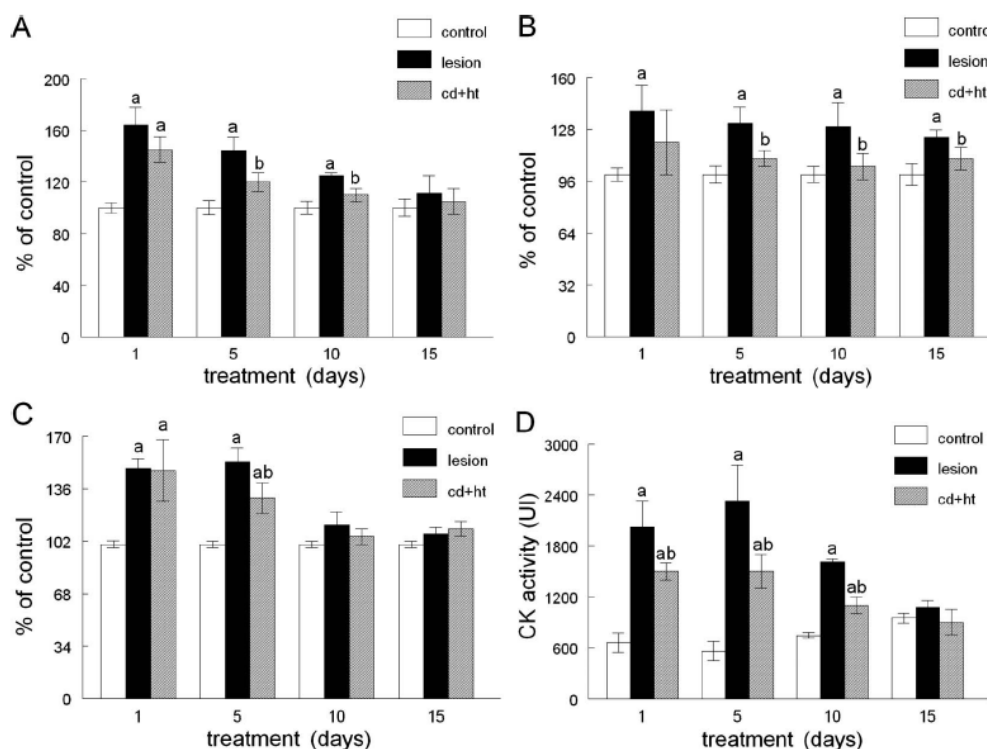


Figure 9. Effects of combined cold and heat treatments on blood oxidative damage: (A) plasma dichlorofluorescein (DCF-RS) concentration; (B) cellular blood fraction DCF-RS concentration; (C) whole-blood thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration; (D) plasma creatine kinase activity. Values are expressed as a percentage of control values \pm standard error ($n=3$). Control DCF-RS in plasma value was 55.776 ± 0.520 fluorescence units, control DCF-RS in erythrocytes value was 266.471 ± 10.360 fluorescence units, and control TBARS value was $1.226 \mu\text{mol MDA} \cdot \text{ml}^{-1}$ whole blood (means \pm standard errors; $n=3$). ^aSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with control. ^bSignificant difference ($P \leq 0.05$) compared with lesion.

and also to slightly decrease skeletal muscle myeloperoxidase activity could be related to the controlled heat application that was employed in our study.

The protective properties of therapeutic cold also could be related to its capacity to modulate the impairment of muscle cell structure. This hypothesis is supported by our results, which show a significant decrease in plasma creatine kinase in cold-treated animals compared with controls (Figure 4D). Similarly, the increase in skeletal muscle catalase activity was also significantly limited by the cold treatment. We believe that this decrease in muscle catalase activity in cold-treated animals could be related to lower levels of muscle oxidative damage markers. This hypothesis is also supported by our results, which showed a significant positive correlation between muscle catalase activity and concentrations of muscle oxidized dichlorofluorescein and thiobarbituric acid reactive substances (Table I). Although the heat-treated and the combined cold-and heat-treated animals showed a decrease in plasma creatine kinase and muscle catalase activity, the cold treatment was more effective in reducing the

levels of this marker of muscle cell structure impairment.

Conclusion

The lesion due to a muscle strain injury was associated with an increase in oxidative stress damage not only at the site of the lesion, but also in blood. Thus, we strongly believe that the analysis of oxidative stress markers in blood could be very useful as an index of muscle injury in strain lesions. The intensity of the inflammatory response appears also to be an important factor involved in the genesis of the oxidative damage in the moments that follow a muscle strain injury. Although heat and cold alone and in combination decreased the muscle and blood oxidative damage, the therapeutic cold treatment seems to be more effective in preventing the damage induced by a strain injury. We believe that the greater beneficial effects of the cold treatment are possibly related to its capacity to control the impairment of muscle cell structure and also to modulate the intensity of the inflammatory response that follows a muscle strain injury.

Table I. Correlations between the different oxidative damage parameters analysed.

	Muscle DCF-RS	Muscle TBARS	Muscle CAT	Muscle SOD	Plasma CK	Plasma DCF-RS	CBF DCF-RS	Whole-blood TBARS
Muscle DCF-RS								
<i>r</i>	1.000	0.491**	0.158	0.039	0.491**	0.342**	0.493**	0.364**
<i>P</i>		0.000	0.103	0.685	0.000	0.000	0.000	0.000
Muscle TBARS								
<i>r</i>	0.491**	1.000	0.206	0.069	0.529**	0.481**	0.281**	0.517**
<i>P</i>	0.000		0.032	0.480	0.000	0.000	0.003	0.000
Muscle CAT								
<i>r</i>	0.158	0.206*	1.000	0.114	0.263**	0.112	-0.069	0.324**
<i>P</i>	0.103	0.032		0.242	0.006	0.250	0.480	0.001
Muscle SOD								
<i>r</i>	0.039	0.069	0.114	1.000	-0.025	-0.250**	-0.094	0.046
<i>P</i>	0.685	0.480	0.242		0.801	0.009	0.333	0.636
Plasma CK								
<i>r</i>	0.491**	0.529**	0.263**	-0.025	1.000	0.428**	0.353**	0.599**
<i>P</i>	0.000	0.000	0.006	0.801		0.000	0.000	0.000
Plasma DCF-RS								
<i>r</i>	0.342**	0.481**	0.112	-0.250**	0.428**	1.000	0.443**	0.411**
<i>P</i>	0.000	0.000	0.250	0.009	0.000		0.000	0.000
CBF DCF-RS								
<i>r</i>	0.493**	0.281**	-0.069	-0.094	0.353**	0.443**	1.000	0.387**
<i>P</i>	0.000	0.003	0.480	0.333	0.000	0.000		0.000
Whole-blood TBARS								
<i>r</i>	0.364**	0.517**	0.324**	0.046	0.599**	0.411**	0.387**	1.000
<i>P</i>	0.000	0.000	0.001	0.636	0.000	0.000	0.000	

Note: DCF-RS = dichlorofluoresceine, TBARS = thiobarbituric acid reactive substances, CAT = catalase, SOD = superoxide dismutase, CK = creatine kinase, CBF = cellular blood fraction. *r* = Pearson's correlation coefficient, *P* = significance (two-tailed).

*Correlation significant at the 0.01 level (two-tailed). **Correlation significant at the 0.05 level (two-tailed).

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and CNPq (G.O.P. received fellowships from CAPES; L.F.F.R., F.A.A.S., and J.B.T.R. received fellowships from CNPq).

References

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Almeskinders, L. C., & Gilbert, J. A. (1986). Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal anti-inflammatory medication. *American Journal of Sports Medicine*, 14, 303–308.
- Belcastro, A. N., Arthur, G. D., Albisser, T. A., & Raj, D. A. (1996). Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 80, 1331–1335.
- Bleakley, C., McDonough, S., & MacAuley, D. (2004). The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *American Journal of Sports Medicine*, 32, 251–261.
- Branaccio, P., Maffulli, N., & Limogelli, F. M. (2007). Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British Medical Bulletin*, 81/82, 209–230.
- Bury, T. B., & Pirnay, F. (1995). Effect of prolonged exercise on neutrophil myeloperoxidase secretion. *International Journal of Sports Medicine*, 16, 410–412.
- Chain, A. C., Chow, C. K., & Chiu, D. (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Experimental Biology and Medicine*, 222, 274–282.
- Clanton, T. O., & Coupe, K. J. (1998). Hamstring strains in athletes: Diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Orthopedic Surgeons*, 6, 237–248.
- Cochrane, D. J. (2004). Alternating hot and cold water immersion for athlete recovery: A review. *Physical Therapy in Sport*, 5, 26–32.
- Fink, R., Hase, S., Luttgau, H. C., & Wettwer, E. (1983). The effect of cellular energy reserves and internal calcium ions on the potassium conductance in skeletal muscle of the frog. *Journal of Physiology*, 336, 211–228.
- Grisham, M. B., Hernandez, L. A., & Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 251, G567–G574.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1994). Antioxidants in nutrition, health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634–1658.
- Järvinen, T. A., Järvinen, T. L., Kääriäinen, M., Kalimo, H. C., & Järvinen, M. (2005). Muscle injuries: Biology and treatment. *American Journal of Sports Medicine*, 33, 745–764.
- Kujala, U. M., Orava, S., & Järvinen, M. (1997). Hamstring injuries: Current trends in treatment and prevention. *Sports Medicine*, 23, 397–404.
- Li, G., Feng, X., & Wang, S. (2005). Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiological Research*, 54, 193–199.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Mair, S. D., Seaber, A. V., Glisson, R. R., & Garrett, W. E. J. (1996). The role of fatigue in susceptibility to acute muscle strain injury. *American Journal of Sports Medicine*, 24, 137–143.

- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, *247*, 3170–3175.
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H., & Fonnum, F. (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*, *65*, 1575–1582.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagy, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, *95*, 351–358.
- Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Pérez, M., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P. D., Medina-Campos, O. N., Ortiz-Plata, A., et al. (2004). S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International*, *45*, 1175–1183.
- Schaser, K. D., Disch, A. V., Stover, J. F., Lauffer, A., Bail, H. J., & Mittlmeier, T. (2007). Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *American Journal of Sports Medicine*, *35*, 93–102.
- Spiteller, G. (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radicals Biology and Medicine*, *41*, 362–387.
- Supinski, G. S., & Callahan, L. A. (2007). Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *Journal Applied Physiology*, *102*, 2056–2063.
- Thorsson, O. (2001). Cold therapy of athletic injuries: Current literature review. *Lakartidningen*, *98*, 1512–1513.
- Tidball, J. G. (2005). Inflammatory process in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *288*, 345–353.
- Tidball, J. G., Salen, G., & Zemicke, R. (1993). Site and mechanical conditions of failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. *Journal of Applied Physiology*, *74*, 1280–1286.

CONCLUSÕES

CONCLUSÃO GERAL

A utilização de modalidades terapêuticas como a crio e termoterapia demonstraram ser eficiente no tratamento da distensão muscular. A lesão muscular esquelética provocada pela distensão aumentou os parâmetros marcadores de dano oxidativo. Além disso, a intensidade da resposta inflamatória parece ser também um fator envolvido na gênese do dano oxidativo nos momentos que sucedem a distensão muscular esquelética. A aplicação terapêutica de calor e frio sozinhos e em combinação reduz o dano oxidativo muscular e no sangue, e o tratamento com o frio parece ser mais efetivo em prevenir o dano induzido pela distensão muscular. A recuperação do músculo lesado foi estimulada pela aplicação decorrente da aplicação controlada do calor, o qual apresentou um efeito modulatório sobre a resposta inflamatória auxiliando na recuperação do músculo.

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- ❖ A análise da atividade plasmática da enzima creatina quinase revelou um profundo aumento causado pela distensão, contudo tanto crio quanto termoterapia modulam o aumento deste marcador de dano muscular,
- ❖ A lesão muscular causou um aumento nos níveis de marcadores de dano oxidativo tanto na fração sanguínea quanto no sítio de lesão. Contudo o tratamento com crio e termoterapia modulou eficientemente este processo,
- ❖ A atividade catalase foi significativamente aumentada após a lesão muscular. No entanto, o tratamento com agentes físicos reduziu este efeito. A atividade da superóxido dismutase permaneceu inalterada durante o período experimental,
- ❖ O aumento da atividade da mieloperoxidase indicando uma intensa resposta inflamatória após a distensão foi eficientemente modulado pelo tratamento com a crio e termoterapia.

PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- ❖ Avaliar o envolvimento da disfunção mitocondrial durante o período inicial pós-lesão, assim como os parâmetros de funcionamento mitocondrial no tecido muscular submetido à distensão muscular.
- ❖ Investigar os efeitos da crio e termoterapia sobre os parâmetros de funcionamento mitocondrial durante a injúria muscular.
- ❖ Investigar a participação de mediadores químicos pro e anti-inflamatórios, tais como interleucinas, durante o período inicial de lesão muscular, assim como o efeito dos agentes físicos sobre estes fatores.
- ❖ Investigar o efeito da crio e termoterapia sobre a expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante e seu envolvimento na lesão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLEAKLEY, C.; MCDONOUGH, S.; MACAULEY, D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. **Am J Sports Med**, v. 32, n. 1, p. 251-61, Jan-Feb 2004.

BROWN, K. E.; BRUNT, E. M.; HEINECKE, J. W. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. **Am J Pathol**, v. 159, n. 6, p. 2081-8, Dec 2001.

BRUKNER, P.; KHAN, K., Eds. **Clinical Review of Sports Medicine**. Roseville, second ed. ed. 2001.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 15, n. 4, p. 186-90, Aug 2010.

COCHRANE, D. J. Alternating hot and cold water immersion for athlete recovery: a review. **Physical Therapy in Sport**, v. 5, n. 1, p. 26-32, Feb 2004.

DAMBACH, D. M.; DURHAM, S. K.; LASKIN, J. D.; LASKIN, D. L. Distinct roles of NF-kappaB p50 in the regulation of acetaminophen-induced inflammatory mediator production and hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 2, p. 157-65, Mar 1 2006.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 2, p. 153-64, Jan 15 2007.

FILIPPIN, L. I.; CUEVAS, M. J.; LIMA, E.; MARRONI, N. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; XAVIER, R. M. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 1, p. 43-9, Jan 1 2011.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, n. 4359, p. 875-80, Sep 8 1978.

GROUNDS, M. D. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p. 78-91, Nov 20 1998.

GUTE, D. C.; ISHIDA, T.; YARIMIZU, K.; KORTHUIS, R. J. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. **Mol Cell Biochem**, v. 179, n. 1-2, p. 169-87, Feb 1998.

GUTTERIDGE, J. M. Antioxidants, nutritional supplements and life-threatening diseases. **Br J Biomed Sci**, v. 51, n. 3, p. 288-95, Sep 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev**, v. 52, n. 8 Pt 1, p. 253-65, Aug 1994a.

_____. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-4, Sep 10 1994b.

_____. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, v. 102 Suppl 10, p. 5-12, Dec 1994.

HOJO, T.; FUJIOKA, M.; OTSUKA, G.; INOUE, S.; KIM, U.; KUBO, T. Effect of heat stimulation on viability and proteoglycan metabolism of cultured chondrocytes: preliminary report. **J Orthop Sci**, v. 8, n. 3, p. 396-9, 2003.

HUK, I.; NANOBASHVILI, J.; NEUMAYER, C.; PUNZ, A.; MUELLER, M.; AFKHAMPOUR, K.; MITTLBOECK, M.; LOSERT, U.; POLTERAUER, P.; ROTH, E.; PATTON, S.; MALINSKI, T. L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. **Circulation**, v. 96, n. 2, p. 667-75, Jul 15 1997.

HURME, T.; KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n. 2, p. 197-205, Feb 1992.

JARVINEN, T. A.; JARVINEN, T. L.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med**, v. 33, n. 5, p. 745-64, May 2005.

JEZEK, P.; HLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 12, p. 2478-503, Dec 2005.

JI, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med Sci Sports Exerc**, v. 25, n. 2, p. 225-31, Feb 1993.

JI, L. L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. **Am J Physiol**, v. 258, n. 4 Pt 2, p. R918-23, Apr 1990.

JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C.; LEICHTWEIS, S.; GORE, M.; FIEBIG, R.; HOLLANDER, J.; BEJMA, J. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p. 102-17, Nov 20 1998.

JI, L. L.; WU, E.; THOMAS, D. P. Effect of exercise training on antioxidant and metabolic functions in senescent rat skeletal muscle. **Gerontology**, v. 37, n. 6, p. 317-25, 1991.

JUDGE, A. R.; DODD, S. L. Oxidative damage to skeletal muscle following an acute bout of contractile claudication. **Atherosclerosis**, v. 171, n. 2, p. 219-24, Dec 2003.

KALIMO, H.; RANTANEN, J.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries in sports. **Baillieres Clin Orthop**, v. 2, p. 24, 1997.

KELLETT, J. Acute soft tissue injuries--a review of the literature. **Med Sci Sports Exerc**, v. 18, n. 5, p. 489-500, Oct 1986.

KIRKENDALL, D. T.; GARRETT, W. E., JR. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. **Clin Orthop Relat Res**, n. 403 Suppl, p. S81-9, Oct 2002.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 15 2009.

KRAUSS, H.; SOSNOWSKI, P.; BICZYSKO, M.; BICZYSKO, W.; MAJEWSKI, P.; JABLECKA, A.; MISKOWIAK, B.; SMOLAREK, I.; KONWERSKA, A.; IGNYS, I.; MICKER, M. Effects of L-arginine and NG-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle, small and large intestines. **Chin J Physiol**, v. 54, n. 1, p. 7-18, Feb 28 2011.

LANZA, I. R.; NAIR, K. S. Muscle mitochondrial changes with aging and exercise. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 1, p. 467S-71S, Jan 2009.

LI, G.; FENG, X.; WANG, S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. **Physiol Res**, v. 54, n. 2, p. 193-9, 2005.

MEDOW, M. S.; BAMJI, N.; CLARKE, D.; OCON, A. J.; STEWART, J. M. Reactive oxygen species (ROS) from NADPH and xanthine oxidase modulate the cutaneous local heating response in healthy humans. **J Appl Physiol**, v. 111, n. 1, p. 20-6, Jul 2011.

NICHOLAS, J. J. Physical modalities in rheumatological rehabilitation. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 75, n. 9, p. 994-1001, Sep 1994.

O'GRADY, M.; HACKNEY, A. C.; SCHNEIDER, K.; BOSSEN, E.; STEINBERG, K.; DOUGLAS, J. M., JR.; MURRAY, W. J.; WATKINS, W. D. Diclofenac sodium (Voltaren) reduced exercise-induced injury in human skeletal muscle. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 7, p. 1191-6, Jul 2000.

PARKKARI, J.; KANNUS, P.; NATRI, A.; LAPINLEIMU, I.; PALVANEN, M.; HEISKANEN, M.; VUORI, I.; JARVINEN, M. Active living and injury risk. **Int J Sports Med**, v. 25, n. 3, p. 209-16, Apr 2004.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1243-76, Oct 2008.

PRENTICE, W. E. **Therapeutic Modalities in Sports Medicine**. fourth ed. Boston: 1999.

PRESTA, M.; RAGNOTTI, G. Quantification of damage to striated muscle after normothermic or hypothermic ischemia. **Clin Chem**, v. 27, n. 2, p. 297-302, Feb 1981.

PUNTEL, G. O.; CARVALHO, N. R.; AMARAL, G. P.; LOBATO, L. D.; SILVEIRA, S. O.; DAUBERMANN, M. F.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B.; SOARES, F. A. Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. **Free Radic Res**, v. 45, n. 2, p. 125-38, Feb 2011.

RAHUSEN, F. T.; WEINHOLD, P. S.; ALMEKINDERS, L. C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. **Am J Sports Med**, v. 32, n. 8, p. 1856-9, Dec 2004.

SCHASER, K. D.; DISCH, A. C.; STOVER, J. F.; LAUFFER, A.; BAIL, H. J.; MITTLMEIER, T. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. **Am J Sports Med**, v. 35, n. 1, p. 93-102, Jan 2007.

SCHNEIDER, B. S.; TIIDUS, P. M. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? **Sports Med**, v. 37, n. 10, p. 837-56, 2007.

THANNICKAL, V. J. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 40, n. 5, p. 507-10, May 2009.

THORSSON, O. [Cold therapy of athletic injuries. Current literature review]. **Lakartidningen**, v. 98, n. 13, p. 1512-3, Mar 28 2001.

TOUMI, H.; BEST, T. M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? **Br J Sports Med**, v. 37, n. 4, p. 284-6, Aug 2003.

TRETTNER, L.; ADAM-VIZI, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. **J Neurosci**, v. 24, n. 36, p. 7771-8, Sep 8 2004.

ZULUAGA, M. **Sports physiotherapy : applied science and practice**. Melbourne ; New York: Churchill Livingstone, 1995. xix, 780 p.