

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSU* EM
EDUCAÇÃO FÍSICA

MÚLTIPLAS IMERSÕES EM ÁGUA GELADA ATENUAM O
DANO MUSCULAR, SEM ALTERAR A INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA E A RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MUSCULAR:
ESTUDO CONTROLADO, PARALELO E RANDOMIZADO

Angelina Freitas Siqueira

BRASÍLIA
2019

MÚLTIPLAS IMERSÕES EM ÁGUA GELADA ATENUAM O DANO MUSCULAR,
SEM ALTERAR A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E A RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO
MUSCULAR: ESTUDO CONTROLADO, PARALELO E RANDOMIZADO

ANGELINA FREITAS SIQUEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Educação Física da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Educação Física.

ORIENTADOR: JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Jussara e Bruno Cesar (*In memoriam*). Os senhores, por meio do exemplo, plantaram as sementinhas daquilo que mais valorizo e me conduz nessa vida: a fé; a família unida; a dedicação ao estudo e trabalho; o respeito, a honestidade; e o compromisso de somar onde quer que eu vá.

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade por ter me acompanhado e me fortalecido ao longo do percurso para essa conquista. Graças e louvores ao Pai, Filho e Espírito Santo!

Aos meus familiares e amigos, em especial aos meus irmãos Bruno Cesar, Rodrigo, Rafael, Paulo Cesar, Evandro, pela confiança, apoio e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Durigan, por ter me dado tantas oportunidades, como: frequentar a Universidade de Brasília; conhecer e/ ou estabelecer parceria com pesquisadores que admiro; participar de congressos divulgando nossos trabalhos; realizar visita técnica e parte do doutorado em grandes centros de ensino e pesquisa no exterior; conquistar o título de mestra e, em breve, o de doutora! Amadureci muito no convívio com você, tanto no âmbito pessoal quanto científico. Continue sonhando alto! Eu estarei torcendo por suas conquistas!

Ao meu companheiro em ciência e de vida, Amilton Vieira, pela generosidade em dividir comigo os seus saberes; por respeitar a minha forma de ser; pela escuta e pela palavra amigas. No convívio diário, você é capaz de me inspirar! Minha admiração e amor eternos por você!

Ao Prof. Dr. Martim, por ter me dado a oportunidade de realizar esse projeto em parceria com seu grupo de pesquisa e dentro do Laboratório de Treinamento de Força. Conviver com um grupo consolidado e maduro, me proporcionou uma rede de apoio e me fez desenvolver um olhar mais crítico sobre a ciência.

Ao Prof. Dr. Babault, pelo acolhimento no *Centre d'Expertise de la Performance* durante o estágio em pesquisa em Dijon, França. A experiência de estar em um centro ensino e pesquisa no exterior foi leve, graças a sua empatia e governança! Muito obrigada pela atenção, disponibilidade e pelas críticas construtivas! Foi uma experiência de vida muito rica! Carrego comigo o amor à cultura francesa e o respeito a esse povo!

À Prof.^a Rita de Cássia por ser um exemplo. Como uma mulher pode ser tão forte e delicada ao mesmo tempo?

A todos os professores da Faculdade de Educação Física que contribuíram para a minha formação acadêmica ao longo desses últimos 6 anos.

Aos professores Dr. Richard Liebano, Dr.^a Gracielle Ramos, Dr. Ricardo Moreno, Dr. Rodrigo Carregaro por terem aceitado compor a banca examinadora desse trabalho e pelas importantes contribuições.

Aos colegas que ajudaram na concretização desse trabalho: João Batista, Mateus, Paulo, Gleyce, Álef, Tiago, Yago, Ivo, Vinícius e Maria. Só é possível fazer um trabalho como esse à muitas mãos. A participação de cada um foi essencial! Obrigada pela responsabilidade e dedicação!

Aos participantes do estudo, que voluntariamente se submeteram aos procedimentos experimentais, contribuindo para o bem maior que é a ciência. Parabéns por essa

consciência! Sem vocês não teríamos conseguido transformar um projeto em trabalho concretizado!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de fomento para a execução deste trabalho.

Ao Laboratório Sabin por apoiar a pesquisa, mesmo em tempos difíceis! A colaboração do Laboratório enriqueceu nosso trabalho com análise de mais variáveis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela criação e fomento do Programa Pesquisador Visitante Especial. Esse intercâmbio científico e cultural com o Prof. Nicolas Babault foi muito produtivo para todos nós do Grupo de Pesquisa de Plasticidade Músculo Tendínea.

Aos meus colegas de Grupo de Pesquisa Plasticidade Músculo Tendínea, pela parceria, discussões científicas e desabafos!

Aos funcionários da Faculdade de Educação Física e coordenação do Programa de Pós Graduação em Educação Física pela solicitude e resolutividade de sempre.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Regional da Asa Norte e do Centro Especializado em Diabetes, Obesidade e Hipertensão, pela compreensão e incentivo.

A todos que de alguma forma participaram desse percurso e me fizeram entender uma das principais missões de um cientista: aproximar a ciência das pessoas.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de múltiplas imersões em água gelada (IAG) após o dano muscular induzido pelo exercício (DMIE) sobre a recuperação da função muscular, marcadores de dano muscular, inflamação e degradação da matriz extracelular (MEC). Vinte e nove homens fisicamente ativos foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos controle (n = 15) ou IAG (n = 14). O grupo IAG realizou 4 imersões (10° C, durante 20 min cada), uma imediatamente após o DMIE e as outras a cada 24 h durante 72 h, enquanto o grupo controle permaneceu em posição sentada durante os períodos correspondentes às imersões. Força muscular, altura do salto vertical, espessura muscular, dor muscular de início tardio (DMIT), creatina quinase (CK), proteína C-reativa (PCR), concentrações de citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa, interleucina (IL)-6, IL-1 alfa e IL-10) e atividade de metaloproteinase-2 de matriz (MMP-2) foram avaliadas Pré, Pós, 24, 48, 72, 96 e 168 h após o DMIE. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais para força muscular, altura do salto vertical, PCR, concentrações de citocinas inflamatórias e atividade de MMP-2 ($p > 0,05$). Às 24 h após o DMIE, a espessura muscular no grupo IAG retornou aos valores pré e apresentou-se significativamente reduzida em relação ao grupo controle ($p = 0,04$). Às 168 h após o DMIE, a DMIT apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), retornando aos valores pré no grupo IAG ($p = 0,11$). A CK, às 72 h após o DMIE, retornou aos valores pré no grupo IAG e, às 168h após o DMIE, foi observada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,02$), quando atingiu seu pico no grupo controle ($p = 0,01$). Conclui-se que múltiplas IAG após o DMIE atenuaram o dano muscular, sem alterar a recuperação da função muscular, inflamação e degradação da MEC.

Palavras-chave: crioterapia; músculo esquelético; recuperação de função fisiológica; inflamação; edema.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of multiple cold-water immersions (CWI) following exercise-induced muscle damage (EIMD) on muscle function recovery, markers of muscle damage, inflammation and extracellular matrix (ECM) degradation. Twenty-nine physically active males were randomly assigned to either a control (n = 15) or CWI group (n = 14). The CWI group performed four immersions (10 °C, for 20 min), one immediately post-exercise and then every 24 h for the following 72 h, while the control group remained in a seated position during these corresponding periods. Muscle strength, vertical jump height, muscle thickness, delayed-onset muscle soreness (DOMS), creatine kinase (CK), C-reactive protein (CRP), inflammatory cytokines concentration (tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)-6, IL-1 alpha e IL-10) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity were assessed at Pre, Post, 24, 48, 72, 96 and 168 h following EIMD. No significant difference between groups were obtained for muscle strength, vertical jump height, CRP, inflammatory cytokines concentration and MMP-2 activity ($p > 0.05$). At 24 h following EIMD, muscle thickness from the CWI group returned to baseline and was significantly lower than the control ($p = 0.04$). At 168 h following EIMD, the DOMS showed a significant difference between groups ($p < 0.05$) and returned to baseline for the CWI group ($p = 0.11$). The CK, at 72 h following EIMD, returned to baseline for the CWI group and, at 168 h following the EIMD, it was observed a time-group difference ($p = 0.02$) with a greater peak for the control group ($p = 0.01$). In conclusion, multiple CWI following EIMD attenuated muscle damage, but not altered muscle function recovery, inflammation and ECM degradation.

Keywords: cryotherapy; skeletal muscle; recovery of function; inflammation; edema.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sumário dos estudos que exploraram o efeito de múltiplas imersões em água gelada após uma única sessão de dano muscular induzido pelo exercício.....	24
TABELA 2 – Características físicas dos participantes de cada grupo experimental.....	42
TABELA 3 – Alterações após o dano muscular induzido pelo exercício sobre a atividade sistêmica de creatina quinase e marcadores de inflamação sistêmica.....	46
TABELA 4 – Alterações após o dano muscular induzido pelo exercício sobre a atividade da metaloproteinase-2 de matriz.....	46
TABELA 5 - Alterações da temperatura da pele, sensação e conforto térmicos ao longo das intervenções de recuperação em ambos os grupos experimentais após DMIE.....	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Delineamento do estudo.....	32
FIGURA 2 – Imersão em água gelada com imersão total dos membros inferiores até a altura das cristas ilíacas.....	34
FIGURA 3 – Procedimento de análise da espessura muscular no <i>software</i> Image J: imagem ultrassonográfica representativa dos músculos reto e vasto intermédio de um participante.....	37
FIGURA 4 – Escala visual analógica utilizada para análise da percepção subjetiva da dor muscular de início tardio.....	38
FIGURA 5 – Fluxograma de inclusão de participantes.....	41
FIGURA 6 – Alterações sobre a função muscular após dano muscular induzido pelo exercício.....	42
FIGURA 7 – Alterações sobre a espessura muscular após dano muscular induzido pelo exercício.....	43
FIGURA 8 – Alterações sobre a dor muscular de início tardio (DMIT) após dano muscular induzido pelo exercício.....	44

LISTA DE SIGLAS ABREVIações E SÍMBOLOS

α – alfa

ADM – amplitude de movimento

ANOVA – análise de variância

β – beta

Ca^{2+} – íon de cálcio

CIVM – contração isométrica voluntária máxima

CK – creatina quinase

DMIE – dano muscular induzido pelo exercício

DMIT – dor muscular de início tardio

ERO – espécies reativas de oxigênio

IAG – imersão em água gelada

IGF-1 – fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IL – interleucina

IL-1 α – interleucina-1 alfa

IL-1 β – interleucina-1 beta

IL-1ra – antagonista do receptor de IL-1

IL-4 – interleucina-4

IL-6 – interleucina-6

IL-10 – interleucina-10

IL-12 – interleucina-12

IL-13 – interleucina-13

MEC – Matriz extracelular

PCR – Proteína C-reativa

MMP – metaloproteinases de matriz

MMP-2 – metaloproteinase-2 de matriz

MMP-9 – metaloproteinase-9 de matriz

PAR-Q – Questionário de Prontidão para Atividade Física

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

Teste F – Teste de Fisher

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

°C – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Dano muscular induzido pelo exercício.....	16
3.2 Regeneração do tecido musculoesquelético.....	18
3.3 Imersão em água gelada.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Caracterização do estudo.....	30
4.2 Amostra.....	30
4.3 Delineamento do estudo.....	31
4.4 Protocolo de dano muscular induzido pelo exercício.....	33
4.5 Protocolo de imersão em água gelada.....	33
4.6 Função muscular.....	34
4.6.1 Força muscular.....	34
4.6.2 Altura do salto vertical.....	35
4.7 Marcadores de dano muscular.....	36
4.7.1 Espessura muscular.....	36
4.7.2 Dor muscular de início tardio.....	37
4.8 Marcadores bioquímicos.....	38
4.8.1 Análises químicas.....	38
4.9 Temperatura da pele e sensação e conforto térmicos.....	39
4.10 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Função muscular.....	42
5.1.1 Força muscular.....	42
5.1.2 Altura do salto vertical.....	43
5.2 Marcadores de dano muscular.....	43
5.2.1 Espessura muscular.....	43
5.2.2 Dor muscular de início tardio.....	44
5.3 Marcadores bioquímicos.....	44

5.3.1 Atividade sistêmica de creatina quinase.....	45
5.3.2 Marcadores de inflamação sistêmica.....	45
5.3.3 Atividade sistêmica de metaloproteinase-2 de matriz.....	45
5.4 Temperatura da pele e sensação e conforto térmicos.....	47
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	69
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
ANEXO C – Artigo publicado.....	72

1 INTRODUÇÃO

Após a prática de exercícios não habituais e/ou excêntricos, é comum o desempenho da função muscular ficar comprometido por um longo período. Essa circunstância tem sido referida como dano muscular induzido por exercício (DMIE) (Ebbeling & Clarkson, 1989). O DMIE está associado ao aumento de marcadores de inflamação no sangue, à presença de edema local e de dor muscular de início tardio (DMIT) e, conseqüentemente, à redução da amplitude de movimento (ADM) e da força muscular (Clarkson & Hubal, 2002). Na tentativa de reduzir o DMIE e suas complicações, bem como acelerar o retorno com desempenho máximo às atividades de vida diária, laborais e/ou esportivas (Hubbard, Aronson, & Denegar, 2004), diferentes estratégias de recuperação muscular têm sido exploradas (Torres, Ribeiro, Duarte, & Cabri, 2012). Ultimamente, uma das estratégias que tem sido amplamente aplicada, tanto no contexto clínico quanto esportivo, é a crioterapia por meio de imersão em água gelada (IAG) (Bleakley et al., 2012; Broatch, Petersen, & Bishop, 2018; Stephens, Halson, Miller, Slater, & Askew, 2016). A IAG consiste na combinação de gelo e água à temperatura menor ou igual a 15°C, em que o indivíduo imerge parte do corpo ou o corpo todo (Broatch et al., 2018; Wilcock, Cronin, & Hing, 2006).

Os mecanismos fisiológicos associados à IAG não estão completamente elucidados (Bleakley et al., 2012). Contudo, são atribuídas à redução da temperatura muscular: a redução de taxa metabólica tecidual, de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de processo inflamatório e de atividade enzimática e, por fim, a minimização do dano muscular secundário (G E White & Wells, 2013). Adicionalmente, são atribuídas ao efeito da pressão hidrostática e/ou à vasoconstrição: alterações de fluxo sanguíneo e linfático intramusculares, que reduzem mais uma vez o infiltrado inflamatório e, assim, o edema (Wilcock et al., 2006). De fato, tem sido demonstrado que a magnitude dessas respostas fisiológicas é dependente da temperatura da água (Machado et al., 2016; Vieira et al., 2016; Gillian E White, Rhind, & Wells, 2014) e da duração e frequência das imersões (Bleakley et al., 2012; Hohenauer, Taeymans, Baeyens, Clarys, & Clijisen, 2015). Entretanto, apesar da ampla aplicação da IAG, ainda não está claro um protocolo ótimo capaz de provocar as respostas fisiológicas esperadas (Bleakley et al., 2012; Hohenauer et al., 2015; Leeder, Gissane, van Someren, Gregson, & Howatson, 2012).

No geral, a aplicação da crioterapia tem sido recomendada nas primeiras 72 h após ao dano muscular (Kellett J, 1986). A hipótese teórica que sustenta essa recomendação está relacionada a uma intervenção intensiva durante a fase de destruição e inflamação do processo de regeneração muscular (Swenson, Swärd, & Karlsson, 1996). A fase de destruição e inflamação é caracterizada pela ruptura de estruturas celulares (como proteínas contráteis, túbulos-T e sarcolema), morte de miofibras, edema muscular e processo inflamatório (Järvinen et al., 2007). De acordo com o nosso conhecimento, poucos estudos exploraram o efeito de múltiplas IAG por mais de 24 h após a uma única sessão DMIE (Crystal, Townson, Cook, & Laroche, 2013; Eston & Peters, 1999; Goodall & Howatson, 2008; Howatson, Goodall, & Someren, 2009; Ingram, Dawson, Goodman, Wallman, & Beilby, 2009; Kuligowski, Lephart, Giannantonio, & Blanc, 1998; Machado et al., 2017; Skurvydas et al., 2006; Vaile, Halson, Gill, & Dawson, 2008; Yanagisawa et al., 2003). Alguns desses estudos, demonstraram que as múltiplas IAG após o DMIE atenuaram o edema (Vaile et al., 2008; Yanagisawa et al., 2003), a limitação de ADM (Eston & Peters, 1999; Kuligowski et al., 1998), a DMIT (Ingram et al., 2009; Kuligowski et al., 1998; Yanagisawa et al., 2003), a atividade sistêmica da creatina quinase (CK) (Eston & Peters, 1999; Skurvydas et al., 2006; Vaile et al., 2008) e a redução da força muscular (Skurvydas et al., 2006; Vaile et al., 2008). Entretanto, outros estudos demonstraram que as múltiplas IAG não influenciam na recuperação do edema, da ADM, da DMIT, da atividade sistêmica da CK, da força muscular após DMIE (Crystal et al., 2013; Goodall & Howatson, 2008; Howatson et al., 2009; Machado et al., 2017) e de marcadores inflamatórios sistêmicos (Crystal et al., 2013; Vaile et al., 2008). Assim, não há um consenso a respeito da aplicação de múltiplas IAG após o DMIE, especialmente em humanos.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou em modelo animal que, múltiplas aplicações de crioterapia realizadas durante a fase de destruição e inflamação do processo de regeneração muscular pode reduzir o processo inflamatório, por meio da diminuição da infiltração de macrófagos (Ramos et al., 2016). Nesse mesmo estudo, a crioterapia reduziu os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para transcrição de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, e de metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9), um marcador de degradação de matriz extracelular (MEC) (Ramos et al., 2016). Em outro estudo do nosso grupo, também

em modelo animal, foi observado que múltiplas aplicações de crioterapia reduziram a produção ERO associada ao dano muscular (Siqueira et al., 2016).

Apesar dos resultados promissores em animais e da ampla recomendação na prática clínica e esportiva em relação às múltiplas aplicações de crioterapia nas primeiras 72 horas após o dano (Kellett J, 1986), de acordo com o nosso conhecimento, até o momento, nenhum estudo abordou o efeito de múltiplas IAG concomitantemente sobre mais de um marcador de inflamação e sobre a de degradação da MEC. Durante o processo de regeneração musculoesquelética, é importante o balanço adequado entre citocinas pro e anti-inflamatórias para a ativação de células satélites (Paulsen, Mikkelsen, Raastad, & Peake, 2012; J. Peake, Nosaka, & Suzuki, 2005; Urso, Pierce, Alemany, Harman, & Nindl, 2009), bem como, a expressão das metaloproteinases de matriz (MMP) para apropriada regulação de seus componentes no remodelamento da MEC (Nascimento et al., 2015; Urso et al., 2009). Nesse contexto, se faz necessário compreender o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre o processo inflamatório e de regeneração da MEC, visto que os mecanismos de ação da crioterapia permanecem duvidosos principalmente em humanos e os trabalhos são escassos nessa área (Broatch et al., 2018).

A hipótese do presente estudo consiste de que múltiplas IAG após o DMIE atenuarão o dano muscular, a inflamação sistêmica e a degradação da MEC, o que proporcionará recuperação mais rápida da função muscular.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre a recuperação da função muscular e os marcadores de dano muscular, de inflamação e de degradação da MEC.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre a recuperação da função muscular, por meio da força muscular e altura do salto vertical;

- Avaliar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre os marcadores de dano muscular, por meio da espessura muscular, DMIT e atividade sistêmica da CK;
- Avaliar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre os marcadores de inflamação, por meio do nível sistêmico de proteína C-reativa (PCR) e concentração sistêmica de TNF- α , interleucina (IL)-6, IL-1 α e IL-10;
- Avaliar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre os marcadores de degradação da MEC, por meio da atividade sistêmica de metaloproteinase-2 de matriz (MMP-2).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Dano muscular induzido pelo exercício

Geralmente, exercícios não habituais e/ou excêntricos impõe alto estresse mecânico e metabólico aos tecidos envolvidos. No tecido musculoesquelético, a ativação não uniforme e o alongamento excessivo das pontes cruzadas durante as contrações excêntricas favorecem o DMIE (Paulsen et al., 2012). O DMIE caracteriza-se por: 1) alterações estruturais, como ruptura de estruturas celulares (como sarcômeros, disco Z, membranas) e aumento da presença de leucócitos no tecido; 2) alterações morfológicas, como edema; e 3) alterações funcionais, como redução da força, da potência e da ADM, além da presença de DMIT (Clarkson & Hubal, 2002). Se por um lado essas alterações são atribuídas como respostas inerentes ao DMIE, por outro são consideradas essenciais à regeneração muscular (J. M. Peake, Neubauer, Gatta, & Nosaka, 2017).

A avaliação direta do dano muscular é realizada por biópsia tecidual, um método invasivo, complexo, de alto custo e ainda questionável, pois critica-se se uma amostra tecidual poderia estimar o dano do músculo como um todo (Paulsen et al., 2012). Alternativamente, a avaliação do dano muscular tem sido realizada indiretamente por: desempenho da função muscular, edema, DMIT e/ou dosagem de proteínas plasmáticas (por exemplo CK, mioglobina, citocinas, MMP) (Clarkson & Hubal, 2002; Paulsen et al., 2012). Nesse contexto, vale a pena elucidar os mecanismos associados ao DMIE para compreender a sua relação com essas avaliações potenciais.

Imediatamente após o DMIE ocorrem alterações estruturais imediatas que configuram o dano primário (Merrick, 2002). O dano primário é aquele resultante da ruptura de proteínas contráteis, túbulos-T e sarcolema (Järvinen, Järvinen, & Kalimo, 2013) e da abertura de canais ativadas por estiramento que, em conjunto desencadeiam alteração da permeabilidade de membrana, favorecendo o influxo de Ca^{2+} e efluxo de enzimas musculares, e a morte celular (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). Sugere-se que o Ca^{2+} ativa a calpaína presente no citosol, que, por sua vez, degrada as proteínas contráteis e assim, agrava a disfunção do mecanismo acoplamento excitação-contração, resultando em comprometimento da função muscular (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). Se a força muscular inicial reduzir em aproximadamente 50% imediatamente após o DMIE, a recuperação da força muscular pode demandar mais de 168 h (Byrne & Feston, 2002). Entretanto, a interpretação sobre a recuperação da força muscular merece atenção, pois os achados podem ser comprometidos por outras estruturas e/ou mecanismos envolvidos na sua geração, como a própria motivação do participante (Byrne & Feston, 2002). Em relação ao efluxo de enzimas musculares, pode ser observado um aumento plasmático de: 1) mioglobina, responsável por estocar e transportar oxigênio na miofibrila. A mioglobina em grande quantidade na corrente sanguínea tem um efeito nefrotóxico e pode aumentar o risco de rabdomiólise (síndrome caracterizada pela ruptura de miofibrilas). E assim, pode ser necessária uma intervenção médica para prevenção de complicações renais permanentes (Baird, Graham, Baker, & Bickerstaff, 2012); e 2) CK, enzima que catalisa a conversão de creatina em fosfocreatina (PCr), consumindo trifosfato de adenosina (ATP) e gerando difosfato de adenosina (ADP). Esta reação é reversível e assim, o ATP pode ser gerado a partir de PCr e ADP. Dessa forma, a PCr é uma fonte de energia para as contrações musculares, o que torna a CK importante para o adequado funcionamento celular. Apesar da CK ser frequentemente mensurada como marcador indireto de dano muscular, os achados a seu respeito exigem cautelosa interpretação. Pois, no plasma a CK não reflete apenas a ruptura de miofibrilas, mas também a taxa de atividade energética e, ainda, a taxa de depuração da própria CK. Além disso, há uma grande variabilidade dos valores basais de CK entre indivíduos, bem como há indivíduos “respondedores” e indivíduos “não respondedores” a um mesmo protocolo de DMIE. Sendo assim, recomenda-se que a avaliação da CK plasmática seja realizada sempre associada a outros marcadores de DMIE (Baird et al., 2012).

O dano primário pode envolver também estruturas adjacentes ao tecido muscular, como os vasos sanguíneos e linfáticos, a MEC e os neurônios (Merrick, 2002). A alteração da permeabilidade dos vasos e a ruptura de capilares favorecem o acúmulo de fluido e de proteínas plasmáticas no músculo, normalmente excedendo a capacidade de drenagem e gerando edema local. O edema favorece a DMIT, tanto por estímulos mecânicos, ao comprimir os nervos (Swenson et al., 1996), quanto por estímulos químicos, ao favorecer acúmulo local de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) que reduzem o limiar de ativação dos nociceptores (Yeung et al., 2016). Por sua vez, a DMIT favorece a inibição neural e o espasmo muscular, os quais causam a redução da ADM e ainda agravam o prejuízo do desempenho muscular (Merrick, 2002). Somado a isso, é comum a ruptura da MEC acompanhar o DMIE, visto que a MEC é uma estrutura intimamente ligada ao sarcolema e, entre suas funções estão possibilitar a transdução da força de contração e proteger as miofibras (Lund & Cornelison, 2013). Além disso, em resposta ao exercício há um aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9, as quais atuam na degradação de constituintes estruturais da MEC, como o colágeno tipo IV. Então, durante o processo de regeneração muscular, as MMP aparentemente contribuem para a regulação constitutiva da MEC (Nascimento et al., 2015; Urso et al., 2009).

As células adjacentes que não foram comprometidas diretamente pelo estresse do exercício podem sofrer dano secundário (Merrick, 2002). O dano secundário é induzido por respostas enzimáticas e pela isquemia tecidual, a qual compromete a oxigenação, nutrição e remoção de metabólitos dos tecidos, aumentando a liberação de ERO (Merrick, 2002; Siqueira et al., 2016). Em conjunto, esses mecanismos alteram as funções de lipídeos, proteínas e até mesmo DNA, favorecendo o colapso das miofibras (Merrick, 2002).

3.2 Regeneração do tecido musculoesquelético

Após o DMIE, o tecido musculoesquelético tem a capacidade de iniciar rapidamente o processo regeneração (Forbes & Rosenthal, 2014). A regeneração muscular é mediada por sinais imunológicos e passa obrigatoriamente por três fases, são elas: 1) fase de destruição e inflamação (0 a 72 h); 2) fase de reparo (até 3 a 4 semanas); e 3) fase de remodelamento (até 3 a 6 meses) (Baoge et al., 2012; Järvinen et al., 2007). Em resposta ao exercício excêntrico, é rara a ocorrência de necrose com

comprometimento total da miofibra, apesar da possibilidade de ocorrer necrose de segmentos da mesma (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017).

A fase de destruição e inflamação é caracterizada pela ruptura de estruturas celulares, morte de miofibras e edema muscular (já descritos anteriormente), bem como pelo recrutamento de células inflamatórias (leucócitos) (Järvinen et al., 2007). Imediatamente após o exercício, os leucócitos se infiltram para a região comprometida, estimulados por quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo tecido muscular. Entretanto, apenas 24 a 48 h após o exercício, os leucócitos são detectados na MEC (Paulsen et al., 2012). Nas 24 h iniciais após o DMIE, os primeiros leucócitos identificados no tecido muscular são os neutrófilos (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). Independentemente do recrutamento de monócitos disponíveis no sangue, leucócitos residentes em tecidos podem ser ativados após o exercício (Paulsen et al., 2012). A diferenciação de monócitos em macrófagos de fenótipo pró inflamatórios (que expressam CD68 em sua superfície celular), os macrófagos M1, é estimulada pelo TNF- α (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). Quando ativados, os macrófagos M1 aumentam a síntese de mediadores inflamatórios, como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-12 e óxido nítrico, que por sua vez recrutam mais células inflamatórias (Forbes & Rosenthal, 2014; J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). A maior concentração de monócitos/ macrófagos no tecido muscular ocorre entre 48 e 168 h. Os leucócitos infiltram o espaço intracelular do tecido muscular envolvido no exercício entre 96 e 168 h após o DMIE (Paulsen et al., 2012). A resposta inflamatória após DMIE apresenta alta variabilidade inter-indivíduos. Aqueles indivíduos considerados “respondedores” ao protocolo de DMIE apresentam uma relação indireta entre a resposta inflamatória e o desempenho da função muscular. Consequentemente, a cinética e a magnitude do processo inflamatório exercem efeito sobre velocidade da recuperação da função muscular (Tidball & Villalta, 2010). Na ausência de doença, a resolução do processo inflamatório é promovida pelo adequado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias. (Tedesco, Dellavalle, Diaz-manera, Messina, & Cossu, 2010).

Na fase de reparo, neutrófilos e monócitos degradam o tecido comprometido pelo DMIE por fagocitose e liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). As células inflamatórias secretam fatores de crescimento, como insulina e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), que ativam as células satélites quiescentes, protagonistas do processo de

regeneração muscular (Tidball & Villalta, 2010). Dessa forma, o processo inflamatório que acompanha o DMIE, é essencial para a ativação das células satélites, localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal (Giordani, Parisi, & Le Grand, 2018). A localização das células satélites resulta em exposição a sinais diferentes em cada lado deste compartimento de nicho, destacando a importância dessas estruturas na regulação da atividade celular (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). As células satélites tem a capacidade de originar progenitores miogênicos que irão se proliferar, diferenciar e se fundir ao tecido muscular comprometido e/ou formar novas miofibras, e assim restaurar a funcionalidade do tecido. Além disso, após a resolução do dano, uma parte dessas células ativadas retornam ao estado de quiescência e preservam a reserva de células satélites, a fim de manter a capacidade de regeneração do tecido muscular esquelético (Giordani et al., 2018; Mauro, 1961).

Durante a execução do exercício, aumenta a concentração de IL-6, indicando sua ação pró inflamatória (Petersen & Pedersen, 2006). Concomitantemente, a IL-6 exerce ação anti-inflamatória, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e potencializa a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 - IL-1ra) (J. Peake et al., 2005). Em resposta ao processo inflamatório instalado, a PCR é sintetizada pelo fígado e, de maneira semelhante à IL-6, exerce papel a favor tanto da inflamação, ao atrair macrófagos para fagocitar os detritos celulares; quanto da resolução do processo inflamatório, ao inibir a síntese de citocinas pró inflamatórias pelos macrófagos M1 e induzir a síntese de citocinas anti-inflamatórias por monócitos circulantes (Pue, Mortensen, Marsh, Pope, & Wewers, 1996). Citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-13 estimulam a diferenciação de monócitos em macrófagos de fenótipo anti-inflamatório (que expressam CD163 em sua superfície celular), os macrófagos M2 (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017; Tedesco et al., 2010). Adicionalmente, a IL-10 e a proteína quinase ativada por AMP estimulam a diferenciação de macrófagos M1 em macrófago M2 (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). Os macrófagos M2 intensificam a liberação de IL-4 e IGF-1, e dessa forma induzem a proliferação de células satélites, sua diferenciação em mioblastos e sua fusão às miofibras. Os macrófagos M2 também liberam IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), os quais promovem o remodelamento da MEC e estimulam a angiogênese (Forbes & Rosenthal, 2014). Ainda na fase de reparo, pode ocorrer o inadequado depósito de

tecido conjuntivo no músculo (Järvinen et al., 2007; Takagi et al., 2011; Tedesco et al., 2010).

Além das células inflamatórias já citadas, participam do processo de regeneração muscular: 1) os mastócitos, que secretam proteínas quimioatraentes e triptase, que agem aumentando a proliferação e suprimindo a diferenciação de mioblastos; 2) as células T reguladoras, que secretam fatores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF- β e, como os mastócitos, agem aumentando a proliferação e suprimindo a diferenciação de mioblastos, bem como suprimindo proteínas da MEC que induzem a fibrose; 3) os linfócitos T CD8, que estimulam a secreção de quimiocina ligante 2 e recrutam macrófagos M1; 4) os eosinófilos, que secretam IL-4, que por sua vez, estimula progenitores fibro-adipogênicos; 5) e os pericitos, que secretam vários fatores de crescimento que aumentam a diferenciação dos mioblastos e estimulam a quiescência das células satélites (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017).

Na fase de remodelamento, finalmente, as miofibras tornam-se funcionais e a MEC se reorganiza (Forbes & Rosenthal, 2014). O remodelamento da MEC é atribuído especialmente à atividade das MMP, as quais podem degradar laminina, fibronectina, elastina, colágeno tipo IV, entre outros. Após o DMIE, células satélites ativadas sinalizam de maneira autócrina a mobilização de células satélites vizinhas para a regeneração muscular, seja pela síntese de MMP-2 ou regulação negativa de inibidores de MMP. A MMP-9, por sua vez, é expressa por neutrófilos e macrófagos que infiltram a MEC. As MMP aumentam a concentração de fatores de ativação bioquímica sequestrados, liberando-os de locais de ligação temporários e disponibilizando-os em nichos de células satélites. E assim, durante a regeneração muscular, o remodelamento da MEC exerce um controle espaço-temporal da ação das células satélites (Li, McKee-Muir, & Gilbert, 2018).

3.3 Imersão em água gelada

Com a finalidade de reduzir o DMIE e suas complicações, bem como acelerar o retorno com desempenho máximo às atividades cotidianas, laborais e/ou esportivas (Hubbard et al., 2004), diferentes estratégias de recuperação muscular têm sido exploradas (Torres et al., 2012). Ultimamente, uma das estratégias que tem sido amplamente aplicada, tanto no contexto clínico quanto esportivo, é a crioterapia por meio de IAG (Bleakley et al., 2012; Broatch et al., 2018; Stephens et al., 2016).

A IAG consiste na combinação de gelo e água à temperatura menor ou igual a 15°C, em que o indivíduo imerge parte do corpo ou o corpo todo (Broatch et al., 2018; Wilcock et al., 2006). A IAG se destaca dentre as diversas modalidades de crioterapia pois a água garante superior resfriamento tecidual durante a aplicação e, mesmo após a interrupção da imersão, mantém o resfriamento por período mais prolongado (Kennet, Hardaker, Hobbs, & Selfe, 2007; Merrick, Jutte, & Smith, 2003; Myrer, Measom, & Fellingham, 1998). Ainda favorável à IAG há o seu baixo custo, fácil acesso e vantajosa aplicação a grandes volumes corporais e superfícies irregulares (Knight, 2000).

Embora não haja um protocolo de IAG plenamente estabelecido (Bleakley & Davison, 2012; Leeder et al., 2012; Wilcock et al., 2006), as múltiplas aplicações de crioterapia durante as primeiras 72 horas após o DMIE têm sido amplamente recomendadas por profissionais que trabalham no meio esportivo e na reabilitação (Kellett J, 1986). Além do mais, apesar da ampla recomendação e aplicação da crioterapia, os seus mecanismos fisiológicos não estão completamente elucidados (Broatch et al., 2018). A hipótese é de que o resfriamento tecidual, durante a fase de destruição e inflamação do processo de regeneração muscular, desencadeia uma série de respostas fisiológicas, as quais acarretam em redução do dano muscular secundário, e portanto, em uma recuperação mais rápida da função muscular (Knight, 2000). Entre essas respostas fisiológicas estão: redução do metabolismo e do consumo de oxigênio celular, acarretando em aumento da tolerância celular à isquemia induzida pelo dano; redução da inflamação, da produção de ERO e da liberação de proteínas livres, diminuindo a reação enzimática e a pressão oncótica no tecido; e, por fim, em conjunto, redução da morte celular (Merrick, 2002).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou em modelo animal que, múltiplas aplicações de crioterapia realizadas durante a fase de destruição e inflamação do processo de regeneração muscular pode reduzir o processo inflamatório, por meio da diminuição da infiltração de macrófagos e dos níveis de RNAm para transcrição de TNF- α e de MMP-9 (Ramos et al., 2016). Em outro estudo do nosso grupo, também em modelo animal, foi observado que múltiplas aplicações de IAG reduziram a produção ERO associada ao dano muscular (Siqueira et al., 2016).

Conforme a Tabela 1, poucos estudos exploraram o efeito de múltiplas IAG por mais de 24 h após uma única sessão de DMIE (Crystal et al., 2013; Eston & Peters, 1999; Goodall & Howatson, 2008; Howatson et al., 2009; Ingram et al., 2009;

Kuligowski et al., 1998; Machado et al., 2017; Skurvydas et al., 2006; Vaile et al., 2008; Yanagisawa et al., 2003). Como é possível verificar, há inconsistência entre os achados, a qual pode ser atribuída à grande variedade metodológica entre esses estudos, como: tamanho da amostra, perfil dos participantes, protocolo de DMIE, protocolo de IAG, desfechos avaliados e até mesmo, formas de avaliar (Eston & Peters, 1999; Goodall & Howatson, 2008; Machado et al., 2017; Vaile et al., 2008). Ademais, há de se considerar que os achados podem sofrer influência do efeito placebo, devido a dificuldade de se cegar os participantes em relação à estratégia de recuperação com resfriamento tecidual e presença de um senso comum de que essa é uma estratégia vantajosa (Broatch, Petersen, & Bishop, 2014).

De acordo com nosso conhecimento, até o momento, nenhum estudo abordou o efeito de múltiplas IAG concomitantemente sobre mais de um marcador de inflamação e sobre a degradação da MEC em humanos. Entretanto, uma única IAG (10 min a 10 °C) após uma única sessão de treino resistido, não diminuiu o processo inflamatório, quando comparada à recuperação ativa (J. M. Peake, Roberts, Figueiredo, Egner, Krog, Aas, Suzuki, Markworth, Coombes, Cameron-Smith, et al., 2017). Em contrapartida, múltiplas (imediatamente, 24 h, 48 h, 72 h) sessões de crioterapia de corpo inteiro (3 min a -110 °C) após a corrida (48 min) reduziram citocinas pró inflamatórias (IL-1 β e a PCR, respectivamente 1 h e 24 h após o DMIE) e aumentaram citocina anti-inflamatória (IL-1ra, 1 h após o DMIE), quando comparado à recuperação passiva (Pournot et al., 2011). Além disso, uma recente revisão sugere que a IAG reduz o processo inflamatório secundário ao dano, mas pode ser desfavorável às adaptações musculares relacionadas ao treino resistido, como ganho de força e massa muscular. Por outro lado a IAG pode ter pouco ou nenhum efeito favorável às adaptações relacionadas ao treino aeróbio, como em nível mitocondrial (Broatch et al., 2018). Visto que os mecanismos de ação da crioterapia permanecem duvidosos, principalmente em humanos, e os trabalhos nessa área são escassos, ressalta-se a importância de compreender o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre o processo inflamatório e de regeneração da MEC (Broatch et al., 2018).

TABELA 1 - Sumário dos estudos que exploraram o efeito de múltiplas imersões em água gelada após uma única sessão de dano muscular induzido pelo exercício.

Autor(es) e ano	Desenho	Tamanho da amostra	Participantes	Protocolo de DMIE	Protocolo de IAG <i>versus</i> grupo controle	Desfechos (momento de avaliação)	Principais achados em relação às múltiplas IAG
Kuligowski e coautores, 1998	Estudo controlado, randomizado e paralelo	n = 56	Ambos os sexos, adultos jovens	Contrações excêntricas máximas unilateral de flexores de cotovelo (5 x 10)	4 IAG (12,8 ± 1°C, 24 min): imediatamente* após o DMIE e a cada 24 h; (n = 14) <i>versus</i> 4 imersões em água morna; (n= 14) <i>versus</i> 4 sessões de terapia de contraste por imersão; (n = 14) <i>versus</i> recuperação passiva; (n = 14)	<ul style="list-style-type: none"> • ADM de repouso • ADM ativa • Força durante CIVM • DMIT durante movimentação ativa (Pré, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o DMIE) 	Menor aumento da DMIT e menor redução da ADM de repouso no grupo múltiplas IAG <i>versus</i> sem intervenção

Eston e Peters, 1999	Estudo controlado, randomizado e paralelo	n = 15	Mulheres, adultas jovens	Contrações recíprocas máximas unilateral de flexores de cotovelo (8 x 5)	7 IAG (15 ± 1°C, 15 min): imediatamente após o DMIE e a cada 12 h; (n= 8) <i>versus</i> sem intervenção; (n = 7)	<ul style="list-style-type: none"> • CK • ADM • Força durante CIVM • DMIT durante estímulo com algômetro • Perimetria (Pré, 24 h, 48 h e 72 h após o DMIE) 	Menor aumento da CK e menor redução da ADM no grupo múltiplas IAG <i>versus</i> sem intervenção
Yanagisawa e colaboradores, 2003	Estudo controlado, randomizado e paralelo	n = 28	Homens, adultos jovens, destreinados	Contrações excêntricas de flexores plantares (5 x 20)	2 IAG (5°C, 15 min): imediatamente e 24 h após o DMIE; (n= 9) <i>versus</i> 1 IAG (5°C, 15 min): imediatamente após o DMIE; (n= 9) <i>versus</i> sem intervenção; (n = 10)	<ul style="list-style-type: none"> • CK • ADM • Lactato desidrogenase • DMIT • Edema por ressonância magnética (Pré, Pós, 20 min, 40 min, 60 min, 24 h, 48 h, 96 h e 168 h após o DMIE) 	Menor aumento da DMIT e edema no grupo múltiplas IAG <i>versus</i> sem intervenção

Skurvydas e colaboradores, 2006	Estudo controlado, randomizado e cruzado	n = 20	Homens, adultos jovens, destreinados	<i>Drop jump</i> (100, 20 s de intervalo entre cada 1)	4 IAG ($15 \pm 1^\circ\text{C}$, 2 x 15 min, intervalo de 10 min): imediatamente, 4 h, 8 h e 24 h após o DMIE; (n = 20) e recuperação passiva; (n = 20)	<ul style="list-style-type: none"> • CK (Pré, imediatamente e 72 h após o DMIE) • Força evocada • Força durante CIVM • Altura do salto vertical • DMIT (Pré, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h e 72 h após o DMIE) 	Menor aumento da CK e DMIT; e menor redução da força evocada e durante CIVM e da altura do salto vertical no grupo múltiplas IAG <i>versus</i> sem intervenção
Goodall e Howatson, 2008	Estudo controlado, randomizado e paralelo	n = 18	Homens, adultos jovens, fisicamente ativos	<i>Drop jump</i> (5 x 20)	4 IAG ($15 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 min): imediatamente após o DMIE e a cada 24 h; (n = 9) <i>versus</i> recuperação passiva; (n = 9)	<ul style="list-style-type: none"> • CK • ADM • Força durante CIVM • DMIT enquanto parado e em pé • DMIT durante agachamento • Perimetria (Pré, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o DMIE) 	Nenhum desfecho investigado apresentou diferença entre os grupos

Vaile e coautores, 2008	Estudo controlado, randomizado, cruzado entre as modalidades de imersão e recuperação passiva	n = 38	Homens, adultos jovens, praticantes de exercícios de força	Contrações excêntricas máximas bilateral em <i>leg press</i> (7 x 10)	4 IAG (15°C, 14 min); (n = 12) imediatamente* após o DMIE e a cada 24 h <i>versus</i> 4 imersões em água morna; (n = 11) <i>versus</i> 4 sessões de terapia de contraste por imersão; (n = 15) e recuperação passiva; (n = 38)	<ul style="list-style-type: none"> • Força de reação isométrica e potência durante <i>squat jump</i> • Perimetria • CK • Mioglobina • IL-6 • Lactato desidrogenase • DMIT durante agachamento (Pré, imediatamente, 24 h, 48 h e 72 h após o DMIE) 	Menor aumento da perimetria e CK e menor redução da força e da potência no grupo múltiplas IAG <i>versus</i> recuperação passiva
Ingram e colaboradores, 2009	Estudo controlado, randomizado, cruzado	n = 11	Homens, adultos jovens, jogadores de esportes coletivos	4 x 20 min de corrida intermitente	2 IAG (10°C, 2 x 5 min; intervalo de 2.5 min); (n = 11) imediatamente* e 24 h após o DMIE e 2 sessões de terapia de contraste por imersão; (n = 11) e recuperação passiva; (n = 11)	<ul style="list-style-type: none"> • CK • PCR (Sangue: Pré, imediatamente, 24 h e 48 h após o DMIE) • Performance no <i>sprint</i> • Força durante CIVM • DMIT (Performance: Pré e 48 h após o DMIE) 	Menor aumento da DMIT e menor redução da força durante CIVM, e da performance no <i>sprint</i> no grupo múltiplas IAG <i>versus</i> recuperação passiva

Howatson e colaboradores, 2009	Estudo controlado, randomizado, cruzado	n = 16	Homens, adultos jovens, fisicamente ativos	<i>Drop jump</i> (5 x 20)	4 IAG ($15 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 min); (n = 16) imediatamente após o DMIE e a cada 24 h e recuperação passiva; (n = 16)	<ul style="list-style-type: none"> • CK • Força durante CIVM • DMIT durante agachamento • ADM durante movimento ativo • Perimetria (Pré, imediatamente, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após o DMIE) 	Nenhum desfecho investigado apresentou diferença entre os grupos
Crystal e colaboradores, 2013	Estudo controlado, randomizado e paralelo	n = 20	Homens, adultos jovens, fisicamente ativos	Corrida em declive (40 min)	4 IAG ($5 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 min): imediatamente* após o DMIE e a cada 24 h; (n = 10) <i>versus</i> recuperação passiva; (n = 10)	<ul style="list-style-type: none"> • Força durante CIVM • DMIT durante descida de escada • Perimetria • Quimiocina ligante 2 (Pré, imediatamente, 1h, 6h, 24 h, 48 h e 72 h após o DMIE) 	Nenhum desfecho investigado apresentou diferença entre os grupos

Machado e coautores, 2017	Estudo controlado, randomizado e paralelo	n = 60	Homens, adultos jovens	Contrações excêntricas unilaterais de extensão de joelho (5 x 15)	5 IAG (9°C, 15 min) imediatamente e 40 min após o DMIE e a cada 24 h; (n = 20) <i>versus</i> 4 IAG (14°C, 15 min); (n = 20) <i>versus</i> recuperação passiva; (n = 20)	<ul style="list-style-type: none"> • CK • DMIT durante CIVM • limiar de dor • CIVM (imediatamente, 40 min, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h após o DMIE) 	Nenhum desfecho investigado apresentou diferença entre os grupos
---------------------------	---	--------	------------------------	---	---	--	--

DMIE: dano muscular induzido pelo exercício; IAG: imersão em água gelada; CK: creatina quinase; ADM: amplitude de movimento; CIVM: contração isométrica voluntária máxima; DMIT: dor muscular de início tardio; Imediatamente*: alguns minutos após o dano muscular induzido pelo exercício pois antes foram realizadas as avaliações; IL-6: interleucina-6.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

O presente estudo caracteriza-se como ensaio clínico, controlado e randomizado. O *web site* randomization.com (<http://www.randomization.com>) foi utilizado para realizar a distribuição aleatória e paralela dos trinta participantes em dois grupos experimentais: (1) grupo controle (n=15); e (2) grupo IAG (n=15). Não foi adotada a distribuição cruzada dos participantes entre os grupos experimentais para evitar o efeito da carga repetida, isto é, ao repetir a execução de um exercício como o *drop jump*, o qual apresenta fase excêntrica importante, em um intervalo menor que 8 semanas, há um indicativo de que a extensão do dano muscular é menor da segunda vez em que o exercício é executado, pois a recuperação da função muscular demonstrou-se mais rápida em relação à primeira vez (Miyama & Nosaka, 2004b; Nosaka, Sakamoto, Newton, & Sacco, 2001).

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (protocolo nº 243/13, conforme ANEXO I); foi conduzido respeitando os princípios éticos da resolução CNS 466/12 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012); e foi registrado de maneira retrospectiva no *US National Institutes of Health* (*ClinicalTrials.gov*, em 16/12/2014, protocolo nº NCT02341612).

4.2 Amostra

A amostra foi por conveniência. Os critérios de inclusão foram: gênero masculino; idade entre 18 e 30 anos; fisicamente ativos, praticantes de atividades aeróbias de leve a moderada intensidade (por exemplo: corrida ou ciclismo) e/ou atividades recreativas (por exemplo: futebol). Foram adotados como critérios de exclusão: (1) história recente (< 3 meses) de prática de exercício resistido ou pliométrico intenso; (2) responder “sim” a qualquer pergunta do Questionário de Prontidão para Atividade Física (*Physical Activity Readness Questionnaire – PAR-Q*) (Thomas, Reading, & Shephard, 1992); (3) história de doença neurológica ou lesão musculoesquelética envolvendo membros inferiores; (4) história de doença

inflamatória ou uso de anti-inflamatórios nas 4 semanas antecedentes; (5) história de reações adversas a temperaturas frias (por exemplo: fenômeno de Raynaud); (6) dobra cutânea da coxa > 20 mm, visto que a quantidade de tecido adiposo afeta o resfriamento intramuscular (Myrer, Myrer, Measom, Fellingham, & Evers, 2001); (7) pico de força dos músculos extensores de joelho < 185 N.m, para favorecer homogeneidade da amostra. Os participantes foram orientados a: não usar anti-inflamatórios não-esteroidais e/ou suplementos nutricionais, 4 semanas antes de realizarem o protocolo de DMIE e durante o experimento; absterem-se de exercícios resistidos e/ou potencialmente danosos, 3 semanas antes de realizarem o protocolo de DMIE e durante o experimento; não consumir estimulantes (por exemplo: álcool, café e chocolate), 24 h antes do DMIE e durante o experimento; e manter o regime de hidratação usual, durante o experimento (Howatson et al., 2009; Sellwood, Brukner, Williams, Nicol, & Hinman, 2007). Para evitar a influência do ciclo circadiano, foi solicitado aos participantes que realizassem as visitas ao Laboratório de Treinamento de Força sempre no mesmo horário (entre 13 e 16 h) (Carrier & Monk, 2000). Uma vez informados quanto a natureza, propósito, riscos e benefícios do estudo, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO II).

O cálculo da amostra foi realizado baseado no pico de força dos músculos extensores de joelho (considerado o desfecho primário do presente estudo) reportado em um estudo similar (Ferreira-Junior et al., 2015). Para isso foi utilizado o G*Power (versão 3.1.9.2; Universidade de Heinrich Heine de Düsseldorf, Alemanha) e consideradas as seguintes especificações: $\alpha = 0.05$; $(1-\beta) = 0.8$; tamanho do efeito $f = 0.2$; tipo de teste = teste F e teste estatístico = análise da variância (ANOVA) com comparação intra e inter grupos = 2 e com medida repetida = 7. O tamanho da amostra estimado com tais especificações foi de 20 participantes (10 por grupo).

4.3 Delineamento do estudo

Os participantes visitaram sete vezes o Laboratório (Figura 1). Na primeira visita, foi realizado o registro de dados antropométricos daqueles que preencheram os critérios de inclusão e exclusão; a distribuição aleatória dos participantes entre os dois grupos experimentais; e a familiarização dos mesmos com equipamentos e procedimentos de avaliação e com os protocolos de DMIE e crioterapia.

A segunda visita ao Laboratório aconteceu entre três a sete dias após a familiarização, quando então os participantes foram submetidos ao protocolo de DMIE. Para investigar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre a recuperação da função muscular e, os marcadores de dano muscular, de inflamação e de degradação da MEC, foi adotada a seguinte sequência de avaliação: (1) ultrassonografia; (2) coleta de sangue; (3) percepção subjetiva da dor muscular durante a tarefa de sentar e levantar; (4) pico de torque e percepção subjetiva da dor muscular durante a contração isométrica voluntária máxima (CIVM); e (5) salto contra movimento. Essas avaliações foram realizadas Pré, imediatamente (Pós), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h após o DMIE. A DMIT não foi avaliada Pós, uma vez que o seu início se dá algumas horas pós exercício (Cheung, Hume, & Maxwell, 2003). A coleta de sangue não foi realizada Pós e às 96 h com o objetivo de reduzir a quantidade de procedimentos invasivos e seus riscos. Os examinadores envolvidos nas avaliações e análise de dados eram cegos em relação a que grupo experimental cada participante fazia parte. As avaliações sempre precederam às IAG ou a recuperação passiva, a depender do grupo experimental a que cada participante fazia parte.

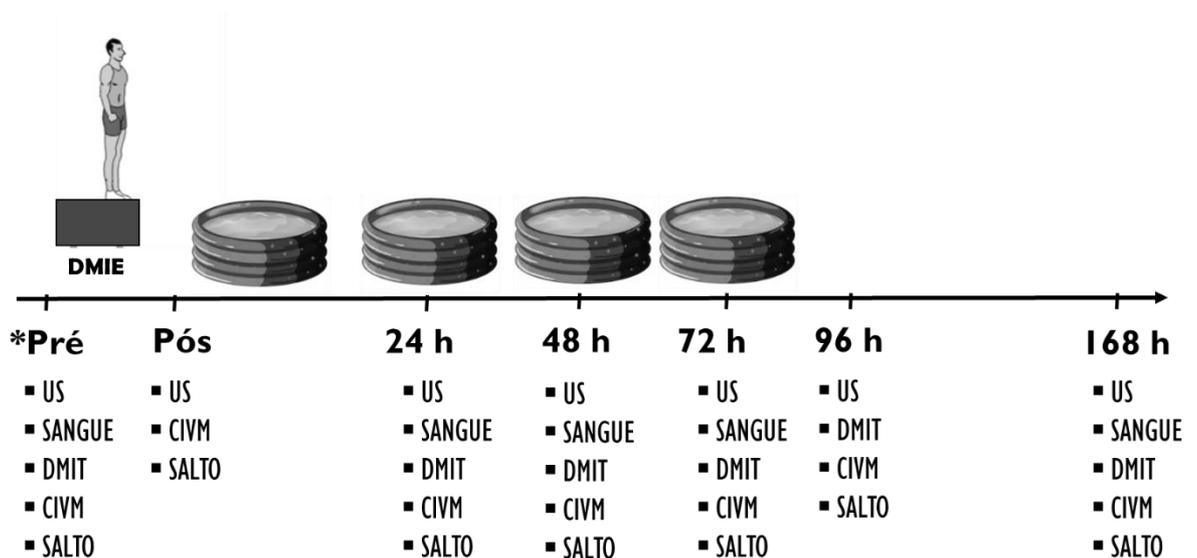


FIGURA 1 – Delineamento do estudo. Na linha do tempo estão representados os momentos em que foram realizadas as avaliações, o protocolo de dano muscular induzido pelo exercício (DMIE) e as imersões em água gelada (IAG). Como protocolo de DMIE, foi adotado um protocolo de *drop jumps*. A imagem ultrassonográfica (US), a contração isométrica voluntária máxima (CIVM) e o salto contra movimento (SALTO) foram registrados Pré, imediatamente (Pós), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h após o DMIE. A dor muscular de início tardio (DMIT) não foi mensurada Pós. A coleta de sangue não foi realizada Pós e às 96 h. O protocolo de IAG constou de quatro IAG ($10 \pm 1^{\circ} \text{C}$, 20 min), sendo aplicadas imediatamente e a cada 24 h após o DMIE.

4.4 Protocolo de dano muscular induzido pelo exercício

Para induzir o dano muscular, os participantes foram submetidos a um protocolo *drop jumps*. Como descrito anteriormente, todos os participantes foram familiarizados antes com a técnica adequada de execução do salto. O protocolo consistiu em 100 *drop jumps* (5 séries de 20 repetições, com 2 min de intervalo entre as séries) de uma caixa de 60 cm de altura (Miyama & Nosaka, 2004a, 2004b). Mantendo sempre as mãos na cintura, os participantes foram instruídos a descer da caixa aterrissando e enfatizando o movimento de flexão das articulações dos membros inferiores, especialmente dos joelhos em no mínimo 90° (em que 0° = extensão total). Imediatamente após aterrissagem, foram orientados a realizar um salto vertical explosivo. Durante todos os saltos, os participantes receberam incentivo verbal para a manutenção do esforço máximo. Esse protocolo de DMIE impõe aos músculos extensores de joelho ações excêntricas repetitivas no momento da aterrissagem (Miyama & Nosaka, 2004b). Um estudo prévio demonstrou que indivíduos sem experiência com treino resistido são mais suscetíveis ao DMIE (Miyama & Nosaka, 2004b), por esse motivo foram excluídos do presente estudo indivíduos com história recente (< 3 meses) de prática de exercício resistido ou pliométrico intenso.

4.5 Protocolo de imersão em água gelada

Durante as primeiras 72 h após o DMIE foram realizadas quatro IAG: imediatamente (10 min após), 24 h, 48 h e 72 h após o DMIE. Cada IAG foi realizada a 10 ° C durante 20 min. A temperatura da água foi controlada por termo resistência conectada a um display digital e era checada a cada 5 min. Aceitou-se uma margem de erro ± 1 °C, mas quando necessário adicionou-se gelo triturado para atingir a temperatura alvo. A determinação da temperatura alvo nesse estudo foi baseada em metanálise que afirmou que 75% dos estudos de IAG aplicam temperaturas entre 10 e 15 ° C (Bleakley et al., 2012). Já a determinação da duração da IAG foi baseada em estudos prévios realizados com população similar (Crystal et al., 2013; Vieira et al., 2016). Para assegurar imersão total dos membros inferiores, os participantes vestiram sunga e posicionaram-se sentados com os joelhos estendidos em uma banheira

plástica preenchida com água e gelo até a altura das cristas ilíacas (Figura 2). Os participantes foram orientados a movimentar os membros inferiores a cada 2 min para prevenir a formação sobre a pele de uma camada de água com temperatura menos gelada. Durante os períodos correspondentes às IAG, os participantes do grupo controle permaneceram confortavelmente sentados em ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C). Após completarem suas respectivas estratégias de recuperação, os participantes de cada grupo experimental deram continuidade às suas atividades regulares.



FIGURA 2 – Imersão em água gelada com imersão total dos membros inferiores até a altura das cristas ilíacas.

4.6 Função muscular

4.6.1 Força muscular

Para a avaliação de força muscular foi considerado o pico de torque (N.m) dos músculos extensores de joelho durante a CIVM a 60° (0° = extensão total) em dinamômetro isocinético (*Biodex Multi-Joint System 3, Biodex Biomedical, Inc., Estados Unidos da América*). O procedimento de calibração do equipamento seguiu

as recomendações do fabricante. Os testes foram realizados sempre com o membro inferior direito. Na familiarização com o equipamento e procedimento, os participantes foram posicionados confortavelmente no assento, mantendo o epicôndilo lateral do fêmur alinhado com o eixo do dinamômetro. Tronco e pelve foram atados com cintos (Weir, Evans, & Housh, 1996) e os braços foram mantidos cruzados contra o peito segurando os cintos do tronco (Stumbo et al., 2001) para minimizar os movimentos compensatórios que poderiam afetar a produção do torque. As regulagens de cada participante foram registradas para manter o mesmo posicionamento nos testes subsequentes. Durante os testes, os participantes foram encorajados (McNair, Depledge, Brett Kelly, & Stanley, 1996) a realizar o esforço máximo durante 4 s (Brown & Weir, 2001). Cada participante realizou duas CIVM com 1 min de intervalo entre as tentativas. Para as análises, foi considerado o maior pico de torque entre as duas tentativas.

4.6.2 Altura do salto vertical

A altura do salto vertical foi avaliada utilizando uma plataforma de força (modelo BP4006000-HF-2000, *Advance Mechanical Technology, Inc*, Estados Unidos da América) com frequência amostral de 1000 Hz. Os participantes foram orientados a calçar o mesmo par de tênis em todos os testes. Mantendo as mãos na cintura, foram encorajados verbalmente a obter o melhor desempenho (maior altura) durante o salto contra movimento. Cada voluntário realizou três tentativas com 1 min de intervalo entre os saltos (Vieira et al., 2016). Os dados dos saltos foram capturados pelo *software (AMTI acquisition software, versão 4.2)*. Posteriormente, a partir da curva de reação ao solo e utilizando modelos matemáticos descrito por Linthorne (2001) (Linthorne, 2001), foi calculado deslocamento do centro de massa a cada instante do movimento utilizando o *MatLab (v R2008a7, The MathWorks, Inc., Estados Unidos da América)*, de tal forma que o maior deslocamento vertical foi considerado a altura máxima do salto. Para análise foi considerado o salto de melhor desempenho.

4.7 Marcadores de dano muscular

4.7.1 Espessura muscular

A imagem ultrassonográfica para avaliação da espessura muscular e, portanto, do edema, foi obtida por um ultrassom portátil (Philips-VMI, Ultra Vision Flip, Modelo BF, Brasil) com transdutor linear de 7,5 MHz de frequência. As configurações de modo (no caso, modo B), frequência e ganho, foram mantidas constantes entre os participantes e entre as coletas. Entretanto, a configuração de profundidade foi ajustada a cada participante para permitir a visualização completa em corte transversal dos músculos reto e vasto intermédio da coxa direita. Para o registro da imagem, os participantes foram posicionados em decúbito dorsal, com joelhos em extensão máxima e rotação neutra, mantendo os músculos dos membros inferiores relaxados. O local de coleta das imagens foi determinado a 60% da distância entre o trocanter maior e o epicôndilo lateral e a 3 cm lateral à linha média anterior da coxa (Chilibeck, Stride, Farthing, & Burke, 2004). Uma marcação com caneta dermatográfica de alta fixação foi realizada a fim de que as imagens fossem capturadas precisamente sempre no mesmo local. No transdutor do ultrassom foi aplicado gel a base de água, para permitir melhor contato acústico entre o transdutor e a superfície cutânea. Mantendo o transdutor perpendicular à coxa e sem deprimir a superfície da pele, um examinador único buscou uma imagem de qualidade para registro (Bemben, 2002). Utilizando o *software* ImageJ (NIH, Estados Unidos da América), a imagem foi avaliada por outro examinador que identificou em triplicata a espessura muscular, definida como a distância entre a interface dos tecidos adiposo subcutâneo-músculo e a interface músculo-osso (Abe, DeHoyos, Pollock, & Garzarella, 2000), expressa em mm (Figura 3). O valor médio entre essas três medidas foi utilizado para análise como representativo da espessura muscular da coxa. Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, com a participação do mesmo examinador, a espessura muscular apresentou coeficiente de variação de 4,95% (Vieira, 2016).

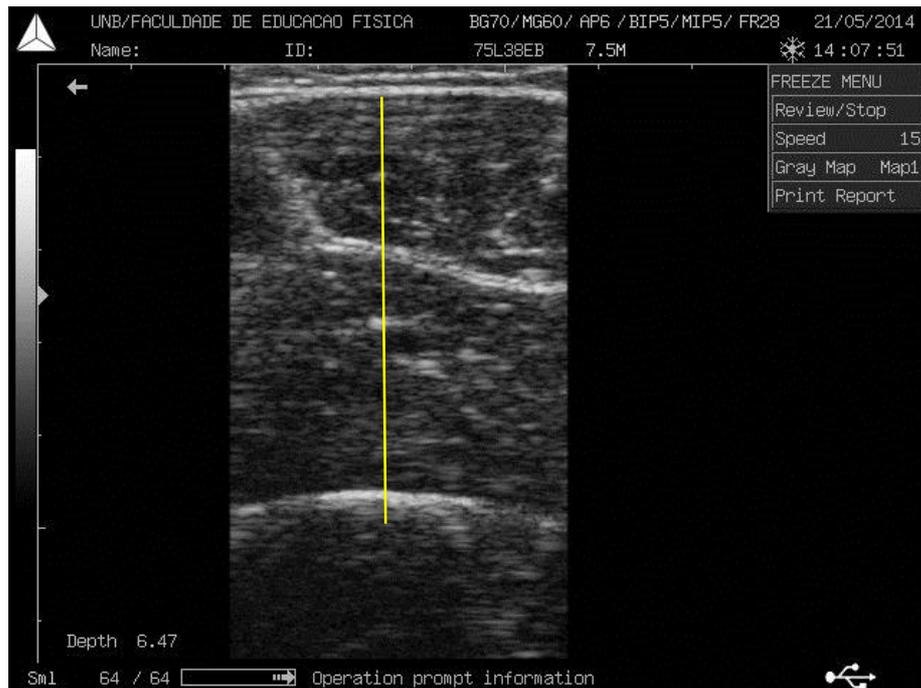


FIGURA 3 - Procedimento de análise da espessura muscular no *software* Image J: imagem ultrassonográfica representativa dos músculos reto e vasto intermédio de um participante.

4.7.2 Dor muscular de início tardio

A DMIT foi avaliada com auxílio de uma escala visual analógica, de 0 a 10 cm, disposta horizontalmente (Figura 4). Em que o "0", localizado na extremidade esquerda, representou "nenhuma dor" e o "10", localizado na extremidade direita, representou "extrema intensidade de dor" (Bailey et al., 2007; Miyama & Nosaka, 2004a). Os participantes reportaram a percepção subjetiva de dor nos extensores de joelho do membro inferior direito durante duas situações distintas (Vieira et al., 2016): (1) CIVM dos músculos extensores de joelho: ao final da execução de duas CIVM o participante reportou a percepção subjetiva de dor; e (2) tarefa de sentar e levantar: ao final da execução de três movimentos consecutivos de sentar e levantar, a uma cadência constante (de 2 s para sentar e 2 s para levantar) utilizando uma cadeira de 43 cm, o participante reportou a percepção subjetiva de dor.

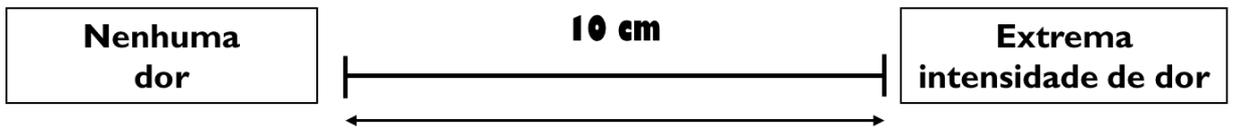


FIGURA 4 - Escala visual analógica utilizada para análise da percepção subjetiva da dor muscular de início tardio.

4.8 MARCADORES BIOQUÍMICOS

4.8.1 Análises bioquímicas

Para mensurar os marcadores bioquímicos de dano muscular, inflamação e degradação da MEC, um técnico habilitado puncionou veia superficial do antebraço e coletou 12 mL de sangue diretamente em tubos de coleta a vácuo (2 tubos de 6mL) (Greiner Bio-ona; Alemanha). Para separar o soro, os tubos com amostra de sangue foram centrifugados (Centrífuga, 3250 RPM, Modelo *Centurion*, Brasil) a 2500 rotações por minuto ($\cong 1000 \times g$), durante 20 min, à temperatura ambiente. O soro foi separado em alíquotas de (250 μ L), as quais foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até as análises. A partir desse soro foram feitas as análises de marcadores bioquímicos de: dano muscular por meio de mensuração da atividade da creatina quinase (CK); inflamação por meio de mensuração do nível de proteína C-reativa (PCR) e da concentração de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-10; e degradação de MEC por meio de mensuração da atividade da MMP-2.

As análises bioquímicas foram analisadas em soro de acordo com o manual do fabricante, em duplicidade, por um examinador cego. Todas as curvas de calibração mostraram entre os ensaios coeficiente de correlação $\geq 0,95$ e coeficiente de variação $< 5\%$. A atividade da CK foi determinada por teste enzimático para CK total (Siemens Medical System, Erlangen, Alemanha) com limite de detecção de zero (U/L) e linearidade de 1300 U/L. Os níveis de PCR foram analisados por imunoturbidimetria intensificada por látex para PCR de intervalo largo (Siemens Medical Systems, Erlanger, Alemanha) com limite de detecção de 0,003 mg/L e linearidade de 156-164 mg/L. Os níveis de TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-10 foram determinados por teste imunoenzimático Quantikine® ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EUA) usando leitor de absorvância (Elx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, EUA). Os limites de

detecção foram experimentalmente definidos em 1,0 pg/mL para IL-6 e IL-10, 1,5 pg/mL para TNF- α e 0,4 pg/mL para IL-1 α .

A atividade da MMP-2 foi mensurada por zimografia. Amostras de 0,5 μ L de soro foram adicionadas a 0,5 μ L de SDS (8%) (v:v) e subsequentemente foi adicionado 10 μ L de solução tampão de SDS 20% sem β -mercaptoetanol. Sequencialmente, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 10% (SDS_PAGE) e gelatina a uma concentração final de 1mg/mL. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 20 min em 2,5% e 0,02% de Triton X-100 para remover o SDS. Os géis foram incubados em substrato tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; CaCl² 5 mM e NaN³ 0,02%) a 37 °C por 20 h. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue por 1,5 h e descorados com ácido acético: metanol: água (1:4:5). A atividade gelatinolítica foi visualizada como bandas claras nos géis corados (de Souza Neto et al., 2017). A análise densitométrica semi-quantitativa das bandas de MMP foi realizada como previamente descrito por Hu e Beeton (Hu & Beeton, 2010), em triplicidade, por um único examinador cego, usando o *software* Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). De tal forma que, a média do pico da área foi utilizada para a análise final.

4.9 Temperatura da pele e sensação e conforto térmicos

Cada intervenção de IAG ou recuperação passiva teve duração de 20 min. Antes e a cada 5 min ao longo da intervenção, os participantes foram solicitados a levantarem-se e, no caso da IAG, a secarem delicadamente com toalha a região anterior da coxa direita, preparando a área para mensuração da temperatura da pele. Como referência para o posicionamento do termômetro infravermelho (Fluke, 566, China) foi utilizado o mesmo local marcado para registro da imagem da ultrassonografia. Para o procedimento de mensuração da temperatura, o termômetro foi mantido perpendicular à coxa e mantido a 8 cm de distância da pele. Para análise, foi calculado o valor médio da temperatura da pele antes e a cada 5 min ao longo da intervenção de ambos os grupos experimentais.

Além do mais, os participantes foram solicitados a classificar a sensação térmica e o conforto térmico antes e a cada 5 min ao longo da intervenção. A sensação térmica foi classificada por escala de Likert de nove pontos, em que “- 4” = muito

gelada, “- 3” = gelada, “- 2” = fria, “-1” = levemente fria, “0” = neutra, “1” = levemente morna, “2” = morna, “3” = quente, “4” = muito quente. O conforto térmico, por sua vez, foi classificado por escala de Likert de cinco pontos, em que: “0” = confortável, “1” = pouco desconfortável, “2” = desconfortável, “3” = muito desconfortável, “4” = extremamente desconfortável (Costello, Culligan, Selfe, & Donnelly, 2012). Para análise, foi considerada a mediana encontrada pela escala de Likert antes e a cada 5 min de cada intervenção, em ambos os grupos experimentais.

4.10 Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão, com exceção da escala de Likert utilizada para medir a sensação e o conforto térmicos, que foi descrita como mediana. A normalidade e homogeneidade dos dados foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. O pico de torque, a altura do salto vertical, a espessura muscular e a atividade da MMP-2 apresentaram distribuição normal. Portanto, foram analisados aplicando análise de variância (ANOVA) de modelos mistos com dois fatores (grupo X tempo) e *post hoc* de Tukey. A DMIT, a atividade da CK, os marcadores de inflamação sistêmica (PCR, TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-10) e a classificação de sensação e conforto térmicos não apresentaram distribuição normal e foram analisados por testes não paramétricos. O teste de Mann-Whitney foi realizado para avaliar diferenças entre os grupos experimentais e o teste de Wilcoxon foi realizado para avaliar diferenças no tempo para cada estratégia de recuperação. As características físicas dos participantes, o pico de torque e altura do salto vertical Pré foram avaliados usando um teste t independente. O nível de significância para todos os testes aplicados foi de 5% e o programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 20.0 (IBM, EUA). Foram calculados também o tamanho do efeito e o poder estatístico. O tamanho do efeito dos dados analisados pela ANOVA foram determinados usando *eta* quadrado parcial (η_p^2). Cohen forneceu intervalos de confiança para definir o tamanho do efeito: pequeno ($\eta_p^2 = 0,01$), médio ($\eta_p^2 = 0,06$) e grande ($\eta_p^2 = 0,14$) (Cohen, 1988). Para calcular o tamanho do efeito e poder estatístico dos dados analisados para os testes não paramétricos, foi utilizado o programa G*Power (versão 3.1.9.2, Universidade de Heinrich Heine de Düsseldorf, Alemanha). Os intervalos de confiança do tamanho do

efeito (d) para os dados analisados por teste não paramétrico foram: 0,2, 0,5 e acima de 0,8 representando respectivamente, pequeno, médio e grande (Cohen, 1988). O poder para os testes não paramétricos foi calculado pelo método de eficiência relativa assintótica (A.R.E.) (Lehmann & D´Abrera, 1975).

5 RESULTADOS

Conforme ilustrado na Figura 5, entre dezembro de 2013 e agosto de 2014, foi avaliada a elegibilidade de trinta e dois homens fisicamente ativos para participação no estudo. Dois indivíduos foram excluídos pois apresentaram dobra cutânea de coxa superior a 20 mm. Dessa forma, trinta indivíduos participaram voluntariamente e foram aleatoriamente alocados no (1) grupo controle ou no (2) grupo IAG. Entretanto, um participante do grupo IAG foi excluído às 48 h após o DMIE, pois a equipe médica diagnosticou que o mesmo apresentava quadro clínico de rabdomiólise. As análises dos desfechos primário e secundários incluíram os vinte e nove participantes que finalizaram o estudo. Como apresentado na Tabela 2, não foram observadas diferenças significativas dos valores basais referentes às características físicas entre os grupos controle e IAG.

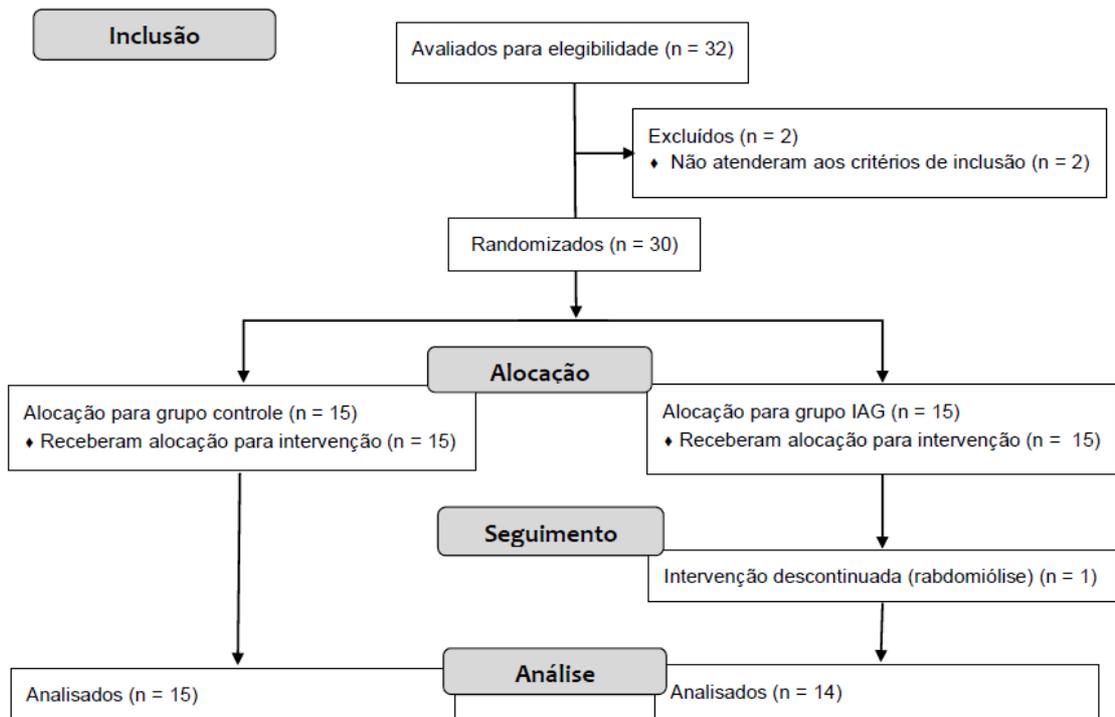


FIGURA 5 – Fluxograma de inclusão de participantes.

TABELA 2 – Características físicas dos participantes de cada grupo experimental.

Características físicas	Grupo controle (n=15)	Grupo IAG (n=14)	Valor de p
Idade (anos)	19,9 ± 1,4	20,5 ± 1,4	0,284
Massa corporal (kg)	71,3 ± 9,4	71,3 ± 9,1	0,997
Estatura (cm)	175,7 ± 7,2	176,3 ± 5,0	0,791
IMC (kg/m ²)	23,0 ± 2,0	22,4 ± 2,8	0,496
Dobra cutânea de coxa (mm)	14,3 ± 5,8	13,6 ± 4,3	0,748
Pico de torque (N·m)	333,5 ± 52,0	327,9 ± 47,1	0,770
Altura do salto vertical (cm)	46,6 ± 5,1	49,6 ± 8,1	0,297
Espessura muscular (mm)	35,2 ± 4,8	35,3 ± 3,8	0,964

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. IMC: índice de massa corporal; IAG: imersão em água gelada.

5.1 Função muscular

5.1.1 Força muscular

Não foi encontrada interação significativa entre os fatores grupo X tempo para força muscular [$F = 0,778$, $p = 0,588$, $\eta^2 = 0,027$, $power = 0,303$]. Entretanto, a força muscular apresentou significativo efeito do tempo [$F = 44,305$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,613$, $power = 0,999$]. Os menores valores de força muscular foram obtidos imediatamente após o DMIE (Figura 6A). Em ambos os grupos, a força muscular retornou aos valores pré apenas às 168 h após o DMIE ($p = 1,0$).

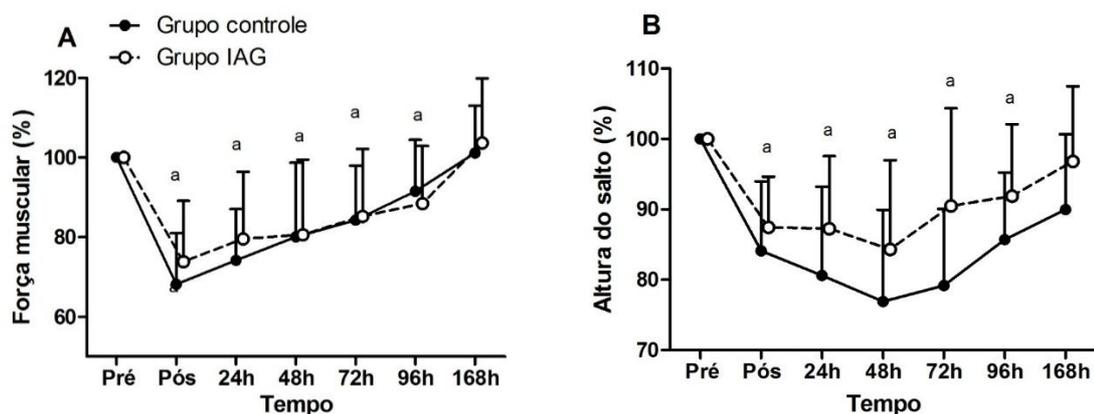


FIGURA 6 – Alterações sobre a função muscular após dano muscular induzido pelo exercício. (A) Pico de torque dos músculos extensores de joelho. (B) Altura do salto vertical. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. As diferenças intra e intergrupos foram analisadas por ANOVA de modelos mistos com dois fatores. ^a Diferente do valor pré independentemente do grupo experimental. IAG: imersão em água gelada.

5.1.2 Altura do salto vertical

A altura do salto vertical não apresentou interação significativa entre os fatores grupo X tempo [$F = 1,220$, $p = 0,301$, $\eta_p^2 = 0,058$, $power = 0,465$], porém apresentou significativo efeito do tempo [$F = 17,116$, $p < 0,001$, $\eta_p^2 = 0,461$, $power = 0,999$]. A altura do salto vertical reduziu imediatamente após o DMIE, sendo que os menores valores foram observados às 48 h após o DMIE (Figura 6B). Em ambos os grupos experimentais, a recuperação da altura do salto vertical aos valores pré ocorreu às 168 h após o DMIE ($p = 0,188$).

5.2 Marcadores de dano muscular

5.2.1 Espessura muscular

A espessura muscular apresentou interação significativa entre os fatores grupo X tempo [$F = 2,204$, $p = 0,04$, $\eta_p^2 = 0,109$, $power = 0,758$] com significativa diferença entre os grupos experimentais às 24 h após o DMIE [$F = 6,089$, $p = 0,024$, $\eta_p^2 = 0,253$, $power = 0,646$] e significativo efeito do tempo [$F = 12,024$, $p < 0,001$, $\eta_p^2 = 0,400$, $power = 0,999$]. Imediatamente após o DMIE, houve um aumento da espessura muscular em ambos os grupos experimentais. Porém, a recuperação da espessura muscular foi diferente entre os grupos (Figura 7). O grupo IAG retornou aos valores pré às 24 h após o DMIE ($p = 0,900$), enquanto o grupo controle retornou aos valores pré apenas às 168 h após o DMIE ($p = 0,900$).

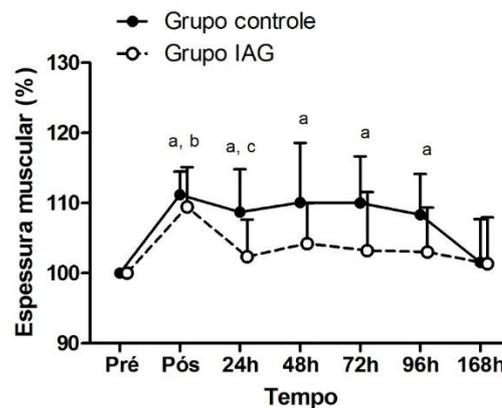


FIGURA 7 – Alterações sobre a espessura muscular após dano muscular induzido pelo exercício. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças intra e intergrupos foram analisadas por ANOVA de modelos mistos com dois fatores. ^a Diferente do valor pré no grupo controle; ^b Diferente do valor pré no grupo IAG; ^c Diferença entre os grupos controle e IAG. IAG: imersão em água gelada.

5.2.2 Dor muscular de início tardio

Em ambas avaliações da DMIT foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Durante a CIVM, a DMIT apresentou diferença significativa entre os grupos às 168 h após o DMIE ($U = 30,5$, $p = 0,009$, $d = 0,678$, $power = 0,190$, Figura 8A); e durante a tarefa de sentar e levantar, às 96 h ($U = 41$, $p = 0,046$, $d = 0,717$, $power = 0,468$) e 168 h após o DMIE ($U = 33$, $p = 0,014$, $d = 1,131$, $power = 0,626$, Figura 8B). Durante ambas as avaliações, o pico de DMIT foi atingido às 48 h após o DMIE tanto no grupo controle, quanto no grupo IAG. Às 168 h após o DMIE, o grupo IAG retornou aos valores pré em ambas avaliações ($W = 1$, $p = 0,317$, $d = 0,318$, $power = 0,586$, durante a CIVM; e $W = 6$, $p = 0,109$, $d = 0,339$, $power = 0,368$, durante a tarefa de sentar e levantar), enquanto o grupo controle não se recuperou da DMIT ao longo do período investigado em nenhuma das avaliações ($W = 45$, $p = 0,008$, $d = 0,485$, $power = 0,163$, durante a CIVM; e $W = 45$, $p = 0,008$, $d = 1,017$, $power = 0,143$, durante a tarefa de sentar e levantar).

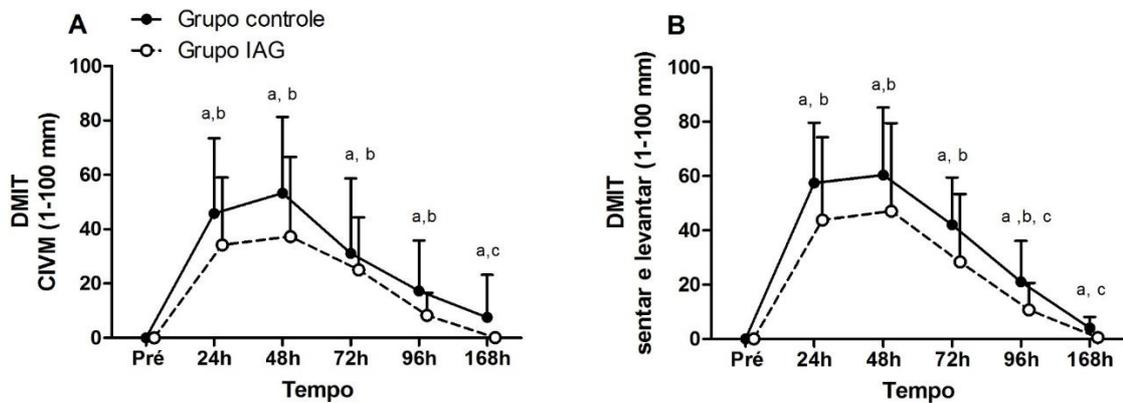


FIGURA 8 – Alterações sobre a dor muscular de início tardio (DMIT) após dano muscular induzido pelo exercício. DMIT reportada durante: (A) contração isométrica voluntária máxima (CIVM); e (B) tarefa de sentar e levantar. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças intergrupos foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney e as diferenças ao longo do tempo foram analisadas pelo teste de Wilcoxon. ^a Diferente do valor pré no grupo controle; ^b Diferente do valor pré no grupo IAG; ^c Diferença entre os grupos controle e IAG. IAG: imersão em água gelada.

5.3 Marcadores bioquímicos

Todos os marcadores bioquímicos investigados não apresentaram diferença do valor pré entre os grupos controle e IAG ($p > 0,05$, Tabela 3).

5.3.1 Atividade sistêmica de creatina quinase

Ambos os grupos experimentais apresentaram aumento significativo da atividade da CK às 24 h após o DMIE. No grupo IAG, a atividade da CK retornou aos valores pré às 72 h após o DMIE ($W = 34,5$, $p = 0,155$, $d = 0,500$, $power = 0,547$), permanecendo estável na sequência (Tabela 3). Entretanto, no grupo controle, a atividade da CK não retornou aos valores pré ao longo do período investigado ($W = 63$, $p = 0,008$, $d = 0,442$, $power = 0,091$ às 168h). Interessantemente, às 168 h após o DMIE a atividade da CK atingiu o seu pico no grupo controle, e nesse momento foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais ($U = 18$, $p = 0,016$, $d = 0,618$, $power = 0,162$).

5.3.2 Marcadores de inflamação sistêmica

Alterações dos marcadores de inflamação sistêmica estão apresentadas na Tabela 3. Os níveis de PCR aumentaram significativamente às 24 h após o DMIE no grupo IAG ($W = 52$, $p = 0,013$, $d = 0,430$, $power = 0,267$). Em relação à concentração de IL-6 e IL-10, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados ($p > 0,05$), bem como nenhum efeito do tempo em ambos os grupos experimentais ($p > 0,05$). No grupo controle, a concentração de TNF- α aumentou significativamente às 24 h após o DMIE ($W = 28$, $p = 0,018$, $d = 0,334$, $power = 0,104$), enquanto no grupo IAG a concentração de IL-1 α aumentou significativamente às 72 h após o DMIE ($W = 15$, $p = 0,043$, $d = 0,413$, $power = 0,304$).

5.3.3 Atividade sistêmica de metaloproteinase-2 de matriz

A atividade da MMP-2 não apresentou interação significativa entre os fatores grupo X tempo [$F = 1,139$, $p = 0,356$, $\eta^2 = 0,125$, $power = 0,316$] e não apresentou efeito do tempo após o DMIE [$F = 1,415$, $p = 0,251$, $\eta^2 = 0,150$, $power = 0,390$], (Tabela 4).

TABELA 3 - Alterações após dano muscular induzido pelo exercício sobre a atividade sistêmica de creatina quinase e marcadores de inflamação sistêmica.

	Grupos	Tempo				
		Pré	24 h	48 h	72 h	168 h
CK (U/L)	Controle	84,1 ± 31,3	313,5 ± 169,4 ^a	231,8 ± 128,0 ^a	840,4 ± 1707,1 ^a	2932,0 ± 6446,9 ^{a,c}
	IAG	86,4 ± 35,8	630,5 ± 1058,6 ^b	216,3 ± 117,5 ^b	127,5 ± 65,5	113,2 ± 61,1
PCR (mg/L)	Controle	0,4 ± 0,4	0,8 ± 1,0	0,5 ± 1,1	0,3 ± 0,6	0,5 ± 0,8
	IAG	0,4 ± 0,5	1,2 ± 1,3 ^b	0,5 ± 0,5	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,7
IL-6 (pg/mL)	Controle	4,0 ± 4,9	5,8 ± 11,6	4,3 ± 8,9	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,4
	IAG	4,1 ± 10,4	5,9 ± 16,2	3,7 ± 8,8	10,9 ± 22,0	3,5 ± 6,9
TNF- α (pg/mL)	Controle	20,3 ± 35,0	43,4 ± 60,2 ^a	52,2 ± 106,4	13,8 ± 24,4	23,9 ± 31,6
	IAG	9,3 ± 19,1	30,3 ± 54,4	32,9 ± 334,6	7,8 ± 16,0	7,6 ± 13,9
IL-1α (pg/mL)	Controle	25,4 ± 84,1	64,7 ± 147,5	36,6 ± 68,1	86,6 ± 142,7	100,7 ± 187,8
	IAG	23,4 ± 46,0	31,6 ± 68,1	31,5 ± 73,6	75,8 ± 120,3 ^b	44,8 ± 91,0
IL-10 (pg/mL)	Controle	129,4 ± 229,3	229,2 ± 555,9	505,7 ± 811,7	136,9 ± 252,9	164,1 ± 238,9
	IAG	39,5 ± 99,7	98,9 ± 178,3	85,5 ± 249,5	436,4 ± 1203,7	62,4 ± 145,6

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. ^a Diferente do valor pré no grupo controle; ^b Diferente do valor pré no grupo IAG; ^c Diferença entre os grupos controle e IAG. CK: creatina quinase; PCR: proteína C-reativa; IL-6: interleucina-6; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL-1α: interleucina-1 alfa; IL-10: interleucina-10; IAG: imersão em água gelada.

TABELA 4 - Alterações após dano muscular induzido pelo exercício sobre atividade da metaloproteinase-2 de matriz.

	Grupos	Tempo				
		Pré	24 h	48 h	72 h	168 h
Atividade da MMP-2 (u.a.)	Controle	19.449 ± 4.767	21.774 ± 5.021	17.614 ± 8.067	19.963 ± 3.809	22.188 ± 4.733
	IAG	16.753 ± 9.275	21.988 ± 8.257	19.511 ± 8.431	19.420 ± 5.392	17.340 ± 5.877

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. MMP-2: metaloproteinase-2 de matriz; u.a.: unidade arbitrária; IAG: imersão em água gelada.

5.4 Temperatura da pele e sensação e conforto térmicos

Antes das intervenções de recuperação, a temperatura da pele apresentou-se similar entre ambos os grupos experimentais ($U = 95$, $p = 0,910$, $d = 0,316$, $power = 0,944$). No grupo controle, nenhuma alteração significativa da temperatura da pele foi observada ao longo dos 20 min de recuperação ($p > 0,05$, em todos os momentos de investigação). Por outro lado, no grupo IAG observou-se redução significativa da temperatura da pele após 5 min de imersão ($W = 7$, $p = 0,004$, $d = 6,070$, $power = 1,000$). Ao longo do período de imersão remanescente, a temperatura da pele permaneceu significativamente reduzida em relação à temperatura antes da imersão ($p < 0,05$).

Antes das intervenções de recuperação, a sensação térmica reportada como “1” = levemente morna, foi similar entre ambos os grupos experimentais ($U = 95$, $p = 0,683$, $d = 0,190$, $power = 0,733$). Entretanto, a partir dos 5 min de intervenção, a sensação térmica entre os grupos diferenciou-se ($U = 5$, $p < 0,001$, $d = 2,752$, $power = 0,914$). O grupo IAG reportou a sensação térmica como “- 2” = fria, após 5 min de intervenção ($W = 0$, $p = 0,001$, $d = 1,850$, $power = 0,321$) e, ao longo do período remanescente de imersão, reportou continuamente a sensação como “- 1” = levemente fria ($p = 0,001$, para todos os momentos seguintes avaliados). Por sua vez, o grupo controle ainda reportou sensação “1” = levemente morna após 5 min de imersão ($p = 1,00$), e “0” = neutra entre os 10 min de intervenção até os 20 min finais ($p < 0,05$).

Em relação ao conforto térmico, antes das intervenções de recuperação não houve diferença entre os grupos ($U = 98$, $p = 1,000$, $d = 0$, $power = 1,000$). Ambos os grupos reportaram o conforto térmico como “0” = confortável. Porém, a partir dos 5 min de intervenção foi observada diferença entre os grupos ($U = 182$, $p < 0,001$, $d = 2,264$, $power = 0,962$). A partir dos 5 min de intervenção, o grupo IAG reportou a intervenção como “1” = pouco desconfortável ($p = 0,002$, para todos os momentos seguintes avaliados), enquanto o grupo controle reportou como “0” = confortável durante todo o período remanescente da intervenção ($p > 0,05$).

TABELA 5 - Alterações da temperatura da pele, sensação e conforto térmicos ao longo das intervenções de recuperação em ambos os grupos experimentais após DMIE.

	Grupos	Tempo				
		Pré	5 min	10 min	15 min	20 min
Temperatura da pele (°C)	Controle	32,0 ± 1,7	32,1 ± 1,4	31,9 ± 1,2	32,2 ± 1,4	32,3 ± 1,4
	IAG	32,5 ± 1,4	13,1 ± 2,9 ^{b,c}	15,1 ± 1,3 ^{b,c}	12,2 ± 1,7 ^{b,c}	12,0 ± 1,5 ^{b,c}
Sensação térmica	Controle	Levemente morna (1)	Levemente morna (1)	Neutra (0) ^a	Neutra (0) ^a	Neutra (0) ^a
	IAG	Levemente morna (1)	Fria (-2) ^{b,c}	Levemente fria (-1) ^{b,c}	Levemente fria (-1) ^{b,c}	Levemente fria (-1) ^{b,c}
Conforto térmico	Controle	Confortável (0)	Confortável (0)	Confortável (0)	Confortável (0)	Confortável (0)
	IAG	Confortável (0)	Pouco desconfortável (1) ^{b,c}			

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. ^a Diferente do valor pré no grupo controle; ^b Diferente do valor pré no grupo IAG ; ^c Diferença entre os grupos controle e IAG. IAG: imersão em água gelada.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito de múltiplas IAG após o DMIE sobre a recuperação da função muscular e, os marcadores de dano muscular, de inflamação sistêmica e de degradação da MEC. A hipótese inicial foi confirmada parcialmente. De fato, as múltiplas IAG atenuaram o dano muscular, uma vez que aceleraram a redução da espessura muscular, da DMIT e da atividade sistêmica da CK em relação ao grupo controle. Entretanto, a recuperação da função muscular, a inflamação sistêmica e a degradação da MEC não apresentaram diferença entre o grupo IAG e o grupo controle.

No presente estudo, as múltiplas IAG (10 °C, 20 min) não foram efetivas para acelerar a recuperação de ambas as avaliações relativas à função muscular: força e altura do saldo vertical. De fato, há uma inconsistência dos achados relativos à recuperação da função muscular entre os estudos que investigaram o efeito de múltiplas IAG após uma única sessão de DMIE (Crystal et al., 2013; Eston & Peters, 1999; Goodall & Howatson, 2008; Howatson et al., 2009; Ingram et al., 2009; Kuligowski et al., 1998; Machado et al., 2017; Skurvydas et al., 2006; Vaile et al., 2008; Yanagisawa et al., 2003). Machado e coautores investigaram o efeito de múltiplas IAG

em protocolos com diferentes temperaturas, e encontraram que múltiplas IAG a 14 °C com duração de 15 min favoreceram recuperação mais rápida da força isométrica máxima em relação a múltiplas IAG a 9 °C com duração de 15 min (Machado et al., 2017). Contudo, não houve diferença entre a recuperação do grupo controle e as múltiplas IAG, independentemente da temperatura (Machado et al., 2017). Por outro lado, Vaile e coautores (Vaile et al., 2008) identificaram que múltiplas IAG a 15°C com duração de 14 min aceleraram a recuperação da força de reação isométrica e da potência avaliadas pelo *squat jump*, quando comparadas à recuperação passiva. Skurvydas e coautores (Skurvydas et al., 2006) observaram que múltiplas imersões a 15 °C com duração de 30 min, aplicadas ao longo das primeiras 24 h, aceleraram a recuperação da força isométrica máxima, da força evocada e da altura do salto vertical. Já Ingram e coautores (Ingram et al., 2009) verificaram que múltiplas imersões a 10 °C com duração de 10 min favoreceram a recuperação da força isométrica máxima e a performance no *sprint*. A inconsistência em relação aos achados relativos à recuperação da função muscular pode ser atribuída à variedade de: perfis dos participantes, protocolos de IAG (duração e temperatura); e métodos de avaliação da função muscular. Enquanto, na maioria dos estudos não houve um controle do nível de atividade física dos participantes (Crystal et al., 2013; Eston & Peters, 1999; Goodall & Howatson, 2008; Howatson et al., 2009; Kuligowski et al., 1998; Machado et al., 2017; Skurvydas et al., 2006; Yanagisawa et al., 2003); no presente estudo, foi adotado como critério de exclusão, história recente de prática de exercício resistido ou pliométrico intenso; contudo, nos estudos de Vaile e coautores e Ingram e coautores, a familiaridade dos participantes com a modalidade de exercícios que foram escolhidos para o protocolo de DMIE pode ter contribuído para os achados favoráveis das múltiplas IAG sobre a recuperação da função muscular (Ingram et al., 2009; Vaile et al., 2008). No que se trata dos protocolos de IAG, estudos prévios têm sugerido que IAG com água em temperaturas mais extremas (9 - 10 °C *versus* 14 - 15 °C) e de duração prolongada (20 min *versus* 14 e 15 min) são desfavoráveis à recuperação da função muscular (Machado et al., 2017, 2016; Vaile et al., 2008; Vieira et al., 2016). De fato, a redução a temperatura tecidual durante a IAG é inversamente proporcional à temperatura da água e diretamente proporcional à duração da imersão (Peiffer, Abbiss, Watson, Nosaka, & Laursen, 2009). Um resfriamento excessivo do tecido pode causar estresse celular e exacerbar a resposta

inflamatória, que conseqüentemente pode prejudicar a recuperação do DMIE (Broatch et al., 2018; Paulsen et al., 2012; Gillian E White et al., 2014). No estudo de Skurvydas e coautores as múltiplas aplicações de IAG foram concentradas entre as primeiras 24 h após o DMIE (imediatamente, 4 h, 8 h e 24h) (Skurvydas et al., 2006). De fato, no presente estudo as maiores alterações da função muscular ocorreram entre 24 e 48 h. Em conjunto esses achados corroboram para o entendimento de que as alterações estruturais e morfológicas ocorrem precocemente na fase de destruição e inflamação, e múltiplas aplicações devem ser realizadas com breves intervalos (< 24 h) entre elas nas primeiras 72 h. Finalmente, tratando-se dos métodos de avaliação da função muscular, a maioria dos estudos avaliaram a força isométrica máxima de um único grupo muscular e observaram recuperação similar entre os grupos IAG e controle (Crystal et al., 2013; Eston & Peters, 1999; Goodall & Howatson, 2008; Howatson et al., 2009; Kuligowski et al., 1998; Machado et al., 2017). Entretanto, a crioterapia parece favorecer mais a recuperação de outros parâmetros de função muscular (Ingram et al., 2009; Skurvydas et al., 2006). Por exemplo, quando a função muscular foi avaliada por saltos em estudos prévios que realizaram uma única IAG, observou-se que a recuperação da função muscular foi mais rápida nos grupos IAG, mas ainda sem diferença significativa em relação aos grupos recuperação passiva (Vieira et al., 2016; Gillian E White et al., 2014), sugerindo-se que a IAG exerce uma ação sobre o ciclo encurtamento-alongamento, mas que ainda é necessário investigar o provável mecanismo (Vieira et al., 2016; Gillian E White et al., 2014).

Como esperado, a espessura muscular aumentou imediatamente após o DMIE em ambos os grupos experimentais (Yanagisawa, Kudo, Takahashi, & Yoshioka, 2004). O aumento da espessura muscular representa o edema decorrente do dano dos tecidos conectivo e muscular, ou do aumento da permeabilidade vascular ou pressão oncótica, ou da combinação de todos esses fatores (Clarkson & Hubal, 2002; Yanagisawa et al., 2004). No presente estudo, as múltiplas IAG diminuíram a perpetuação do edema, visto que no grupo IAG a espessura muscular retornou aos valores pré às 24 h (após a uma única imersão), enquanto que no grupo controle retornou apenas às 168 h após o DMIE. Provavelmente, o efeito da pressão hidrostática (Wilcock et al., 2006) associado à vasoconstricção induzida pela baixa temperatura (Yanagisawa et al., 2004) reduziram o fluxo sanguíneo local e a permeabilidade dos capilares e vasos linfáticos, diminuindo a difusão de fluidos para

o tecido muscular (Merrick, 2002). Dessa forma, as múltiplas IAG impediram a perpetuação dos mecanismos que contribuem para a formação do edema e reduziram a difusão de fluidos pelo tecido muscular (Merrick, 2002). Além do mais, as diferenças encontradas entre os grupos controle e IAG podem ser atribuídas à capacidade da crioterapia em reduzir o metabolismo celular, a síntese de citocinas inflamatórias e de ERO, e assim favorecer a preservação das estruturas musculares e das miofibras, reduzindo o dano muscular secundário (Merrick, 2002; Siqueira et al., 2016).

No que se refere ao gerenciamento da DMIT, revisões sistemáticas e metanálises têm sugerido que a IAG é uma estratégia de recuperação melhor do que recuperação passiva ou nenhuma intervenção (Bleakley et al., 2012; Hohenauer et al., 2015; Leeder et al., 2012; Machado et al., 2016). Em conformidade as com revisões sistemáticas e metanálises (Bleakley et al., 2012; Hohenauer et al., 2015; Leeder et al., 2012; Machado et al., 2016), o presente estudo demonstrou que o grupo IAG apresentou reduzidas taxas de DMIT em comparação ao grupo controle e recuperou totalmente da DMIT às 168 h após o DMIE, enquanto o grupo controle ainda referia DMIT. A presença prolongada da DMIT está de acordo com estudos prévios que adotaram o mesmo protocolo de DMIE (Goodall & Howatson, 2008; Miyama & Nosaka, 2004a; Vieira et al., 2016) e, uma única IAG também não foi eficiente para o controle da DMIT em relação ao grupo controle (Vieira et al., 2016). A inconsistência entre o pico da CK e o pico de DMIT, sugere que a longa duração da DMIT não pode ser completamente atribuída à magnitude do dano muscular (Cheung et al., 2003). Há sugestões de que a DMIT está mais relacionada à inflamação da MEC, que ao dano do muscular em si (J. M. Peake, Neubauer, et al., 2017). Provavelmente, os estudos que realizaram múltiplas imersões em IAG não observaram o retorno da DMIT aos níveis pré exercício em nenhum grupo experimental, porque o período de seguimento de avaliação da DMIT foi relativamente curto (96 h) (Crystal et al., 2013; Eston & Peters, 1999; Howatson et al., 2009; Skurvydas et al., 2006; Vaile et al., 2008). Apesar de Machado e coautores reportarem que múltiplas IAG reduziram a DMIT, há de se considerar que essa redução foi apontada imediatamente e 40 min após IAG (Machado et al., 2017). E há diferenças entre os mecanismos de analgesia de curto prazo, daqueles de longo prazo encontrados no presente estudo. Após crioterapia, a analgesia a curto prazo pode ser provocada pela redução na velocidade de condutância de nervos sensoriais e motores, o que respectivamente limita a dor e

espasmos reflexos (Herrera, Sandoval, Camargo, & Salvini, 2010), bem como pela ativação dopaminérgica da via mesolímbica (Gear, Aley, & Levine, 1999). Já a analgesia de longo prazo é atribuída a alterações no deslocamento de fluidos, assim favorece: a nutrição e o transporte de detritos (Yeung et al., 2016); a redução do edema muscular, prevenindo a compressão nervosa (Swenson et al., 1996), e a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), que uma vez presentes podem mediar a atividade do nociceptor no tecido muscular (Zhang & An, 2007).

Em consonância com estudos prévios, no presente estudo foi observado que múltiplas IAG reduziram a atividade sistêmica da CK após o DMIE (Eston & Peters, 1999; Skurvydas et al., 2006; Vaile et al., 2008). Entretanto, entre os estudos observa-se uma discrepância entre os momentos de redução da atividade sistêmica da CK. No estudo de Vaile e coautores, o fato dos participantes serem praticantes de exercício resistido e, portanto, menos vulneráveis ao dano, pode ter contribuído para a redução relativamente precoce (às 24 e 72 h) da atividade sistêmica da CK no grupo múltiplas IAG após protocolo de contrações excêntricas bilaterais em *leg press* (Vaile et al., 2008). Já no estudo de Eston e Peters, o protocolo de DMIE foi realizado unilateralmente com os músculos flexores de cotovelo (Eston & Peters, 1999). Apesar dos membros superiores serem mais susceptíveis ao dano em relação aos membros inferiores (Nosaka, Aldayel, Jubeau, & Chen, 2011), o fato da atividade sistêmica da CK ter reduzido tardiamente no presente estudo (168 h) em relação ao estudo de Eston e Peters (às 48 e 72h), pode ser justificada pelo protocolo de *drop jumps* que envolve massa muscular proporcionalmente maior. O estudo de Skurvydas e coautores também aplicou o protocolo de *drop jumps* em participantes destreinados e, às 24 h pós DMIE, a atividade sistêmica da CK apresentou reduzida entre o grupo múltiplas IAG em relação ao grupo controle, provavelmente devido ao protocolo de múltiplas IAG incisivo nas primeiras 24 h (Skurvydas et al., 2006). Interessantemente, o grupo controle do presente estudo demonstrou um padrão bifásico da atividade da CK, com um primeiro pico às 24 h após o DMIE, e um segundo pico ainda maior às 168 h após o DMIE. Estudos prévios que usaram protocolo de DMIE similar descreveram o mesmo padrão bifásico (Miyama & Nosaka, 2004b; Vieira et al., 2016). Esse segundo pico de atividade sistêmica da CK ocorre pois com a ruptura das miofibras, a CK é liberada no líquido intersticial e pode ser conduzida primeiramente

ao sistema linfático e só posteriormente atingir a corrente sanguínea (Clarkson & Hubal, 2002). A interpretação da atividade sistêmica da CK deve ser cautelosa, pois há uma grande variabilidade inter-indivíduos no que tange a liberação e depuração da CK, que pode ser influenciada por fatores étnicos, genéticos e até mesmo pela capacidade individual de gerar energia (Baird et al., 2012).

Em resposta ao DMIE, é importante o adequado balanço entre citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-1 α) e anti-inflamatórias (como IL-10) para a apropriada regeneração dos tecidos muscular e conectivo adjacente (J. Peake et al., 2005). Os achados relativos às citocinas inflamatórias são inconsistentes no presente estudo e, não confirmam a hipótese inicial de que o protocolo de múltiplas IAG reduz a resposta inflamatória em relação à recuperação passiva. A resposta inflamatória após DMIE apresenta alta variabilidade inter-indivíduos, havendo indivíduos “respondedores” e “não respondedores” para um mesmo protocolo de DMI, o que dificulta esse tipo de avaliação (Tidball & Villalta, 2010).

No presente estudo, observou-se que o nível da PCR aumentou significativamente às 24 h após o DMIE no grupo IAG. Por sua vez, Ingram e coautores, observaram aumento significativo da PCR às 24 h em ambos os grupos experimentais, sem diferença do retorno aos níveis basais entre os grupos ao longo do período avaliado (Ingram et al., 2009). A PCR, está associada à resposta pró inflamatória pois é produzida pelo fígado em resposta ao aumento da IL-6 e é responsável por atrair macrófagos para fagocitar as células mortas. Mas também está associada à resolução da inflamação, por inibir a síntese de citocinas pró inflamatórias pelos macrófagos M1 e induzir a síntese de citocinas anti-inflamatórias por monócitos circulantes (Pue et al., 1996). Os achados do presente estudo estão em divergência com metanálise que apontou que a crioterapia reduziu os níveis de PCR às 48h (Hohenauer et al., 2015). Os achados da metanálise não são conclusivos, visto que foram poucos os estudos que investigaram os níveis de PCR e, entre esses poucos estudos, o número de participante foi pequeno e as modalidades de crioterapia foram heterogenias (Hohenauer et al., 2015). Além do mais, entre os estudos que analisaram o nível de PCR e de mais um marcador inflamatório, não foi encontrada diferença entre os grupos crioterapia e controle (Hohenauer et al., 2015). Pournot e coautores ao investigarem o efeito de múltiplas (imediatamente, 24 h, 48 h, 72 h) sessões de crioterapia de corpo inteiro (3 min a -110 °C) após exercício aeróbio (simulação de

corrida em trilha, 48 min) observaram a diminuição do nível de PCR em todos os momentos investigados após o DMIE (Pournot et al., 2011). Provavelmente, essa diferença da resposta dos níveis de PCR, entre o presente estudo e o estudo de Pournot e coautores, está relacionada às diferentes modalidades de exercício (resistido *versus* aeróbio) adotadas entre os protocolos de DMIE (Broatch et al., 2018) e a magnitude de resfriamento tecidual induzido pelos diferentes protocolos de crioterapia (Donges, Duffield, & Drinkwater, 2010; J. Peake et al., 2008).

A IL-6 tem sido caracterizada como uma miocina responsiva a inflamação. Por um lado a IL-6 responde à carga mecânica imposta pelo exercício, exercendo um efeito pró-inflamatório e, por outro, a IL-6 inibe a produção de TNF- α e potencializa a produção de IL-10, sugerindo um efeito anti-inflamatório (J. Peake et al., 2005). No presente estudo, não houve diferença entre os grupos IAG e controle em relação às concentrações de IL-6 e IL-10. Pournot e coautores também não identificaram nenhuma diferença nas concentrações de IL-6 e IL-10 após múltiplas sessões de crioterapia de corpo inteiro (Pournot et al., 2011). Contudo, White e coautores investigaram o efeito de uma única IAG em protocolos com diferentes temperaturas e durações, e identificaram que o grupo controle e o grupo única IAG a 20 °C com duração de 10 min apresentaram redução do nível de IL-6 às 2 h após o DMIE diferentemente dos outros grupos de IAG (20 °C com duração de 30 min, 10 °C com duração de 10 min, 20 °C com duração de 30 min) que retornaram aos níveis pré apenas às 24 h (Gillian E White et al., 2014). Portanto, como já discutido, a magnitude do resfriamento do protocolo de IAG parece ter sido determinante nesse achado. E considerando que a concentração sistêmica de IL-6, geralmente, retorna aos valores pré nas primeiras 24 h após o DMIE, mas não aumenta apenas em resposta à carga mecânica do exercício, não está claro se múltiplas IAG (10°C, 20 min) podem interferir na concentração de IL-6. Pois, no presente estudo, não foram realizadas coletas de sangue imediatamente após cada IAG e/ ou no intervalo das primeiras 24 h após o DMIE (J. M. Peake, Roberts, Figueiredo, Egner, Krog, Aas, Suzuki, Markworth, Coombes, Cameron-smith, et al., 2017; Pournot et al., 2011; G E White & Wells, 2013).

O TNF- α intermedia a ativação de monócitos em macrófagos de fenótipo M1, os quais sintetizam mediadores pró inflamatórios, como IL-1 β , IL-1 α , IL-12 e óxido nítrico, que por sua vez recrutam mais células inflamatórias. Em conjunto, macrófagos M1 e mediadores pró inflamatórios iniciam a degradação do tecido comprometido pelo

dano e assim, favorecem o edema local (Forbes & Rosenthal, 2014). Interessantemente, o grupo controle apresentou aumento significativo da concentração de TNF- α às 24 h após o DMIE e presença duradoura da atividade de CK, do edema muscular e de reduzido desempenho muscular. Além disso, no grupo IAG, foi observado um pico na concentração de IL-1 α às 72 h após o DMIE. Esse achado corrobora com a hipótese de que a redução na temperatura muscular pela crioterapia pode atrasar a ativação da calpaína e, assim, atrasar a cascata inflamatória e prejudicar o processo de regeneração (Takagi et al., 2011). Em geral, o DMIE está associado a ruptura da membrana celular e, assim, permite que o Ca²⁺ invada a miofibrila e ative a calpaína presente no citosol (Takagi et al., 2011). A calpaína intensifica a degradação de proteínas contráteis e catalisa o precursor da IL-1 α , tornando essa molécula ativa (Dinarelli, 2009). De fato, Takagi e coautores, observaram no tecido muscular que a crioterapia atrasou em torno de 24 h o pico da contagem de macrófagos e em torno de 48 h a expressão de TFG- β e IGF-1 (Takagi et al., 2011). Esse atraso da cascata inflamatória foi associado ao depósito excessivo de colágeno durante o processo de regeneração (Takagi et al., 2011). No presente estudo não é possível concluir que as múltiplas IAG alteraram o depósito de colágeno durante o processo de regeneração, visto que a atividade da MMP-2 se apresentou similar entre ambos os grupos experimentais e não foi observado nem mesmo efeito DMIE. Tayebjee e coautores, do mesmo modo, não encontraram alteração significativa na atividade de MMP-2 após um teste na esteira (Tayebjee, Lip, Blann, & MacFadyen, 2005). Entretanto, mesmo sem nenhuma intervenção após o DMIE foi observado que alguns participantes apresentaram um elevado aumento da atividade de MMP-2 enquanto outros apresentaram indetectáveis alterações da atividade de MMP-2 (Tayebjee et al., 2005). Os autores destacaram a importância de categorizar a atividade de MMP-2 devido a essa extensa variabilidade inter-indivíduos (Tayebjee et al., 2005). Interessantemente, um estudo em modelo animal demonstrou que apenas exercícios de alta intensidade promoveram um aumento significativo da atividade de MMP-2 e, principalmente em músculos compostos predominantemente por fibras rápidas (Carmeli, Moas, Lennon, & Powers, 2005). Muito provavelmente, esses achados incongruentes a respeito da atividade sistêmica de MMP-2 pós exercício também indica diferenças entre análises realizadas utilizando o próprio

tecido muscular ou material sistêmico, como o plasma utilizado aqui (Carmeli et al., 2005; Tayebjee et al., 2005).

Todas as estratégias de recuperação de DMIE, incluindo a IAG, têm sido influenciadas pelo efeito placebo (Rattray, Argus, Martin, Northey, & Driller, 2015). Devido à popularidade da IAG, pode ser assumido que a maior parte dos participantes já ouviram falar das suas supostas vantagens e isso pode ter interferido nas avaliações (Hohenauer et al., 2018) tanto subjetivas, quanto relacionadas ao desempenho muscular (Mawhinney et al., 2017), de forma a confundir os achados. Broatch e coautores realizaram estudo que suporta que o efeito placebo sobrepõe pelo menos em parte os efeitos da IAG (Broatch et al., 2014). O procedimento experimental fez com que os participantes acreditassem que o líquido adicionado à água termoneutra era vantajoso para a recuperação muscular. Surpreendentemente, a estratégia placebo foi tão efetiva quanto a IAG na recuperação da força muscular e na dor, vigor e prontidão referidos (Broatch et al., 2014). Se o efeito placebo afeta os achados de estudos que investigam IAG, essa é uma importante questão que tem que ser elucidada. Entretanto, como já pontuado anteriormente (J. M. Peake, Roberts, Figueiredo, Egner, Krog, Aas, Suzuki, Markworth, Coombes, Cameron-Smith, et al., 2017), os efeitos subjetivos durante e após as estratégias de recuperação têm sua importância. No presente estudo, mesmo que a recuperação da função não tenha sido acelerada pelas múltiplas IAG, considerando outros desfechos, as múltiplas IAG podem ser percebidas como efetivas e essa percepção pode encorajar atitudes positivas dos indivíduos após o DMIE.

É importante destacar as limitações do presente estudo. Primeiro, a aplicação de múltiplas IAG foi restrito a uma população de adultos jovens, sem doença diagnosticada e sem familiaridade com exercícios resistidos e/ou pliométricos. Apesar da maioria dos participantes de estudos que investigam os efeitos da IAG na prevenção e tratamento de DMIT serem com esse perfil de indivíduos, no geral são os atletas que utilizam a IAG regularmente (Bleakley et al., 2012). Portanto, outros estudos comparativos são necessários para investigar essa população específica. Segundo, com o objetivo de determinar a regeneração muscular seriam interessantes avaliações adicionais para ter maiores informações a respeito das alterações locais, como, por exemplo, biopsia muscular (Sarver, 2017) e mensuração da temperatura intramuscular (Mawhinney et al., 2017). Entretanto, vale ressaltar que múltiplas IAG

aumentam o risco de contaminação na região de acesso a esses procedimentos invasivos. Terceiro, a alimentação influencia na velocidade da recuperação muscular após DMIE, entretanto não foi realizada avaliação prévia dos hábitos alimentares de cada participante e nem mesmo foram dadas orientações nutricionais para serem seguidas durante o experimento (Beelen, 2010). Adicionalmente, seriam interessantes avaliações que minimizem o efeito placebo para elucidar os reais efeitos fisiológicos da IAG como, por exemplo, avaliação de mecanismos centrais e periféricos neuromusculares (Pointon, Duffield, Cannon, & Marino, 2011; Rattray et al., 2015). Quarto, a adição de um grupo que realizasse uma única IAG poderia ter sido interessante para determinar se a magnitude do efeito entre múltiplas e uma única IAG. Finalmente, apesar da atividade da MMP-9 ter sido detectada na análise dos géis de zimografia, a atividade da MMP-9 não foi mensurada devido a interferência da coagulação fibrinolítica que pode aumentar o conteúdo de MMP-9 plasmática (Mannello, 2008).

7 CONCLUSÕES

Em resumo, múltiplas IAG após o DMIE reduziram a magnitude do dano muscular, como observado pela avaliação da espessura muscular, DMIT e atividade de CK. Entretanto, não alterou a recuperação da função muscular, os marcadores de inflamação e de degradação da MEC. Portanto, a aplicação de múltiplas IAG após o DMIE poderá ser recomendada como estratégia que pode favorecer a redução do dano, mas sem a expectativa de acelerar a recuperação entre as sessões de reabilitação, de treinamento ou de competição. Além disso, sugere-se que futuros estudos substituam o grupo controle por intervenção placebo, a fim de evitar que a crença popular em supostas vantagens relacionadas à recuperação muscular pela crioterapia influenciem na construção das evidências.

REFERÊNCIAS

- Abe, T., DeHoyos, D. V, Pollock, M. L., & Garzarella, L. (2000). Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. *European Journal of Applied Physiology*, 81(3), 174–180. <https://doi.org/10.1007/s004210050027>
- Bailey, D. M., Erith, S. J., Griffin, P. J., Dowson, A., Brewer, D. S., Gant, N., & Williams, C. (2007). Influence of cold-water immersion on indices of muscle

- damage following prolonged intermittent shuttle running. *Journal of Sports Sciences*, 25(11), 1163–1170. <https://doi.org/10.1080/02640410600982659>
- Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S., & Bickerstaff, G. F. (2012). Creatine-kinase-and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 960363. <https://doi.org/10.1155/2012/960363>
- Baoge, L., Van Den Steen, E., Rimbaut, S., Philips, N., Witvrouw, E., Almqvist, K. F., ... Vanden Bossche, L. C. (2012). Treatment of skeletal muscle injury: a review. *ISRN Orthopedics*. <https://doi.org/10.5402/2012/689012>
- Bemben, M. G. (2002). Use of diagnostic ultrasound for assessing muscle size. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 16(1), 103–108.
- Bleakley, C. M., & Davison, G. W. (2012). Cryotherapy and inflammation: evidence beyond the cardinal signs. *Physical Therapy Reviews*, 15(6), 430–435. <https://doi.org/10.1179/1743288x10y.0000000014>
- Bleakley, C. M., McDonough, S., Gardner, E., Baxter, G. D., Hopkins, J. T., & Davison, G. W. (2012). Cold-water immersion (cryotherapy) for preventing and treating muscle soreness after exercise (review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
- Broatch, J. R., Petersen, A., & Bishop, D. J. (2014). Postexercise cold water immersion benefits are not greater than the placebo effect. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 46(11), 2139–2147. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000348>
- Broatch, J. R., Petersen, A., & Bishop, D. J. (2018). The influence of post-exercise cold-water immersion on adaptive responses to exercise: a review of the literature. *Sports Medicine*, 48(6), 1369–1387. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0910-8>
- Brown, L. E., & Weir, J. P. (2001). ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. *Journal of Exercise Physiology*, 4(11).
- Byrne, C., & Feston, R. (2002). Maximal-intensity isometric and dynamic exercise performance after eccentric muscle actions. *Journal of Sports Sciences*, 20(12), 951–959. <https://doi.org/10.1080/026404102321011706>
- Carmeli, E., Moas, M., Lennon, S., & Powers, S. K. (2005). High intensity exercise

- increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Experimental Physiology*, *90*(4), 613–619.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.029462>
- Carrier, J., & Monk, T. H. (2000). Circadian rhythms of performance: new trends. *Chronobiology International*, *17*(6), 719–732. <https://doi.org/10.1081/CBI-100102108>
- Cheung, K., Hume, P. A., & Maxwell, L. (2003). Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. *Sports Medicine*, *33*(2), 145–164.
- Chilibeck, P. D., Stride, D., Farthing, J. P., & Burke, D. G. (2004). Effect of creatine ingestion after exercise on muscle thickness in males and females. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *36*(10), 1781–1788.
<https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000142301.70419.C6>
- Clarkson, P. M., & Hubal, M. J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*, *81*(11 Suppl), S52–S69.
<https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029772.45258.43>
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. New York: Routledge.
- Costello, J. T., Culligan, K., Selfe, J., & Donnelly, A. E. (2012). Muscle, skin and core temperature after -110°C cold air and 8°C water treatment. *PLoS ONE*, *7*(11), e48190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048190>
- Crystal, N. J., Townson, D. H., Cook, S. B., & Laroche, D. P. (2013). Effect of cryotherapy on muscle recovery and inflammation following a bout of damaging exercise. *European Journal of Applied Physiology*, *113*(10), 2577–2586.
<https://doi.org/10.1007/s00421-013-2693-9>
- de Souza Neto, I. V., Tibana, R. A., Durigan, J. L. Q., Pereira, G. B., Navalta, J. W., Marqueti, R. de C., & Prestes, J. (2017). Effects of resistance training volume on MMPs in circulation, muscle and adipose tissue. *International Journal of Sports Medicine*, *38*(4), 307–313.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, *27*, 519–550.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Donges, C. E., Duffield, R., & Drinkwater, E. (2010). Effects of resistance or aerobic

- exercise training on interleukin-6, C-reactive protein, and body composition. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 42(2), 304–313.
<https://doi.org/10.1249/mss.0b013e3181b117ca>
- Ebbeling, C. B., & Clarkson, P. M. (1989). Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Medicine*, 7(4), 207–234.
- Eston, R., & Peters, D. (1999). Effects of cold water immersion on the symptoms of exercise-induced muscle damage. *Journal of Sports Sciences*, 17(3), 231–238.
<https://doi.org/10.1080/026404199366136>
- Ferreira-Junior, J. B., Bottaro, M., Vieira, A., Siqueira, A. F., Vieira, C. A., Durigan, J. L. Q., ... Bembem, M. G. (2015). One session of partial-body cryotherapy (-110°C) improves muscle damage recovery. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 25(5), e524–e530. <https://doi.org/10.1111/sms.12353>
- Forbes, S. J., & Rosenthal, N. (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature Medicine*, 20(8), 857–869.
<https://doi.org/10.1038/nm.3653>
- Gear, R. W., Aley, K. O., & Levine, J. D. (1999). Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *Journal of Neuroscience*, 19(16), 7175–7181.
- Giordani, L., Parisi, A., & Le Grand, F. (2018). Satellite Cell Self-Renewal. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 126).
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.001>
- Goodall, S., & Howatson, G. (2008). The effects of multiple cold water immersions on indices of muscle damage. *Journal of Sports Science and Medicine*, 7(2), 235–241.
- Herrera, E., Sandoval, M. C., Camargo, D. M., & Salvini, T. F. (2010). Motor and sensory nerve conduction are affected differently by ice pack, ice massage, and cold water immersion. *Physical Therapy*, 90(4), 581–591.
<https://doi.org/10.2522/ptj.20090131>
- Hohenauer, E., Costello, J. T., Stoop, R., Küng, U. M., Clarys, P., Deliëns, T., & Clijse, R. (2018). Cold-water or partial-body cryotherapy? Comparison of physiological responses and recovery following muscle damage. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 28(3), 1252–1262.
<https://doi.org/10.1111/sms.13014>
- Hohenauer, E., Taeymans, J., Baeyens, J., Clarys, P., & Clijse, R. (2015). The

- effect of post-exercise cryotherapy on recovery characteristics: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.*, 10(9), 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139028>
- Howatson, G., Goodall, S., & Someren, K. A. (2009). The influence of cold water immersions on adaptation following a single bout of damaging exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 105(4), 615–621.
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0941-1>
- Hu, X., & Beeton, C. (2010). Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *JoVE*, 45, 2445. <https://doi.org/10.3791/2445>
- Hubbard, T. J., Aronson, S. L., & Denegar, C. R. (2004). Does cryotherapy hasten return to participation? A systematic review. *Journal of Athletic Training*, 39(1), 88–94.
- Ingram, J., Dawson, B., Goodman, C., Wallman, K., & Beilby, J. (2009). Effect of water immersion methods on post-exercise recovery from simulated team sport exercise. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 12(3), 417–421.
<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2007.12.011>
- Järvinen, T. A. H., Järvinen, M., & Kalimo, H. (2013). Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 3(4), 337–345. <https://doi.org/10.11138/mltj/2013.3.4.337>
- Järvinen, T. A. H., Järvinen, T. L. N., Kääriäinen, M., Äärimaa, V., Vaittinen, S., Kalimo, H., & Järvinen, M. (2007). Muscle injuries: optimising recovery. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 21(2), 317–331.
<https://doi.org/10.1016/j.berh.2006.12.004>
- Kellett J. (1986). Acute soft tissue injuries - a review of the literature. *Medicine and Science in Sports and Exercises*, 18, 489–500.
- Kennet, J., Hardaker, N., Hobbs, S., & Selfe, J. (2007). *Cryotherapeutic Agents*. 42(3), 343–348.
- Knight, K. L. (2000). *Crioterapia no tratamento das lesões esportivas*. São Paulo: Manole.
- Kuligowski, L. A., Lephart, S. M., Giannantonio, F. P., & Blanc, R. O. (1998). Effect of whirlpool therapy on the signs and symptoms of delayed-onset muscle soreness. *Journal of Athletic Training*, 33(3), 222–228.
- Leeder, J., Gissane, C., van Someren, K., Gregson, W., & Howatson, G. (2012). Cold

- water immersion and recovery from strenuous exercise: a meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*, 46(4), 233–240. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090061>
- Lehmann, E. L., & D´Abrera, H. (1975). *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. Retrieved from <http://cds.cern.ch/record/112666>
- Li, E. W., McKee-Muir, O. C., & Gilbert, P. M. (2018). Cellular Biomechanics in Skeletal Muscle Regeneration. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 126). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.007>
- Linthorne, N. P. (2001). Analysis of standing vertical jumps using a force platform. *American Journal of Physics*, 69(11), 1198–1204. <https://doi.org/10.1119/1.1397460>
- Lund, D. K., & Cornelison, D. D. W. (2013). Enter the matrix: shape, signal and superhighway. *FEBS Journal*, Vol. 280, pp. 4089–4099. <https://doi.org/10.1111/febs.12171>
- Machado, A. F., Almeida, A. C., Micheletti, J. K., Vanderlei, F. M., Tribst, M. F., Netto Junior, J., & Pastre, C. M. (2017). Dosages of cold-water immersion post exercise on functional and clinical responses: a randomized controlled trial. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 27(11), 1356–1363. <https://doi.org/10.1111/sms.12734>
- Machado, A. F., Ferreira, P. H., Micheletti, J. K., de Almeida, A. C., Lemes, Í. R., Vanderlei, F. M., ... Pastre, C. M. (2016). Can water temperature and immersion time influence the effect of cold water immersion on muscle soreness? A systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 46(4), 503–514. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0431-7>
- Mannello, F. (2008). Serum or plasma samples? The “cinderella” role of blood collection procedures: preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, 611–614. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159608>
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9(2), 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
- Mawhinney, C., Low, D. A., Jones, H., Green, D. J., Costello, J. T., & Gregson, W. (2017). Cold-water mediates greater reductions in limb blood flow than whole

- body cryotherapy. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 49(6), 1252–1260.
- Mcnaair, P. J., Depledge, J., Brett Kelly, M., & Stanley, S. N. (1996). Verbal encouragement: effects on maximum effort voluntary muscle action. *British Journal of Sports Medicine*, 30(3), 243–245.
<https://doi.org/10.1136/bjism.30.3.243>
- Merrick, M. A. (2002). Secondary injury after musculoskeletal trauma: A review and update. *Journal of Athletic Training*, 37(2), 209–217.
- Merrick, M. A., Jutte, L. S., & Smith, M. E. (2003). Cold modalities with different thermodynamic properties produce different surface and intramuscular temperatures. *Journal of Athletic Training*, 38(1), 28–33. Retrieved from www.journalofathletictraining.org
- Miyama, M., & Nosaka, K. (2004a). Influence of surface on muscle damage and soreness induced by consecutive drop jumps. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, 18(2), 206–211.
- Miyama, M., & Nosaka, K. (2004b). Muscle damage and soreness following repeated bouts of consecutive drop jumps. *Advances in Exercise and Sports Physiology*, 10(3), 63–69.
- Myrer, J. W., Measom, G., & Fellingham, G. W. (1998). Temperature changes in the human leg during and after two methods of cryotherapy. *Journal of Athletic Training*, 33, 25–29.
- Myrer, J. W., Myrer, K. A., Measom, G. J., Fellingham, G. W., & Evers, S. L. (2001). Muscle temperature is affected by overlying adipose when cryotherapy is administered. *Journal of Athletic Training*, 36(1), 32–36.
- Nascimento, D. da C., de Cassia Marqueti Durigan, R., Tibana, R. A., Durigan, J. L. Q., Navalta, J. W., & Prestes, J. (2015). The Response of Matrix Metalloproteinase-9 and -2 to Exercise. *Sports Medicine*, 45(2), 269–278.
<https://doi.org/10.1007/s40279-014-0265-8>
- Nosaka, K., Aldayel, A., Jubeau, M., & Chen, T. C. (2011). Muscle damage induced by electrical stimulation. *European Journal of Applied Physiology*, 111(10), 2427–2437. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2086-x>
- Nosaka, K., Sakamoto, K., Newton, M., & Sacco, P. (2001). How long does the

- protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(9), 1490–1495.
- Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise Immunology Review*, 18, 42–97. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181ac7afa>
- Peake, J. M., Neubauer, O., Gatta, P. A. D., & Nosaka, K. (2017). Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *Journal of Applied Physiology*, 122(3), 559–570. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00971.2016>
- Peake, J. M., Roberts, L. A., Figueiredo, V. C., Egner, I., Krog, S., Aas, S. N., ... Raastad, T. (2017). The effects of cold water immersion and active recovery on inflammation and cell stress responses in human skeletal muscle after resistance exercise. *The Journal of Physiology*, 595(3), 695–711. <https://doi.org/10.1113/JP272881>
- Peake, J. M., Roberts, L. A., Figueiredo, V. C., Egner, I., Krog, S., Aas, S. N., ... Raastad, T. (2017). The effects of cold water immersion and active recovery on inflammation and cell stress responses in human skeletal muscle after resistance exercise. *The Journal of Physiology*, 595(3), 695–711. <https://doi.org/10.1113/JP272881>
- Peake, J., Nosaka, K., & Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exercise Immunol Rev*, 11, 64–85. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181874564>
- Peake, J., Peiffer, J. J., Abbiss, C. R., Nosaka, K., Okutsu, M., Laursen, P. B., & Suzuki, K. (2008). Body temperature and its effect on leukocyte mobilization, cytokines and markers of neutrophil activation during and after exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 102(4), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0598-1>
- Peiffer, J. J., Abbiss, C. R., Watson, G., Nosaka, K., & Laursen, P. B. (2009). Effect of cold-water immersion duration on body temperature and muscle function. *Journal of Sports Sciences*, 27(10), 987–993. <https://doi.org/10.1080/02640410903207424>
- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2006). The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *Journal of Physiology and Pharmacology*,

57(Suppl. 10), 43–51.

- Pointon, M., Duffield, R., Cannon, J., & Marino, F. E. (2011). Cold application for neuromuscular recovery following intense lower-body exercise. *European Journal of Applied Physiology*, *111*(12), 2977–2986.
<https://doi.org/10.1007/s00421-011-1924-1>
- Pournot, H., Bieuzen, F., Louis, J., Fillard, J. R., Barbiche, E., & Hausswirth, C. (2011). Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS ONE*, *6*(7), e22748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022748>
- Pue, C. A., Mortensen, R. F., Marsh, C. B., Pope, H. A., & Wewers, M. D. (1996). Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, *156*(4), 1594–1600.
- Ramos, G. V., Pinheiro, C. M., Messa, S. P., Delfino, G. B., Marqueti, R. de C., Salvini, T. de F., & Durigan, J. L. Q. (2016). Cryotherapy reduces inflammatory response without altering muscle regeneration process and extracellular matrix remodeling of rat muscle. *Scientific Reports*, *6*, 18525.
<https://doi.org/10.1038/srep18525>
- Ratray, B., Argus, C., Martin, K., Northey, J., & Driller, M. (2015). Is it time to turn our attention toward central mechanisms for post-exertional recovery strategies and performance? *Front Physiol*, Vol. 6, p. 79.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00079>
- Sarver, D. C. (2017). Cryotherapy minimally impacts the metabolome and transcriptome of human skeletal muscle. *Scientific Reports*, *7*(1), 2423.
- Sellwood, K. L., Brukner, P., Williams, D., Nicol, A., & Hinman, R. (2007). Ice-water immersion and delayed-onset muscle soreness: A randomised controlled trial. *British Journal of Sports Medicine*, *41*(6), 392–397.
<https://doi.org/10.1136/bjsm.2006.033985>
- Siqueira, A. F., Vieira, A., Ramos, G. V, Marqueti, R. C., Salvini, T. F., Puntel, G. O., & Durigan, J. L. Q. (2016). Multiple cryotherapy applications attenuate oxidative stress following skeletal muscle injury. *Redox Report*, *22*(6), 323–329.
<https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1239880>
- Skurvydas, A., Sipaviciene, S., Krutulyte, G., Gailiuniene, A., Stasiulis, A., Mamkus,

- G., & Stanislovaitis, A. (2006). Cooling leg muscles affects dynamics of indirect indicators of skeletal muscle damage. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation*, 19(4), 141–151. <https://doi.org/10.3233/BMR-2006-19406>
- Stephens, J., Halson, S., Miller, J., Slater, G., & Askew, C. (2016). Cold-water immersion for athletic recovery: one size does not fit all. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 12(1), 2–9.
- Stumbo, T. A., Merriam, S., Nies, K., Smith, A., Spurgeon, D., & Weir, J. P. (2001). The effect of hand-grip stabilization on isokinetic torque at the knee. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 15(3), 372–377.
- Swenson, C., Swärd, L., & Karlsson, J. (1996). Cryotherapy in sports medicine. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, (6), 193–200.
- Takagi, R., Fujita, N., Arakawa, T., Kawada, S., Ishii, N., & Miki, A. (2011). Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *Journal of Applied Physiology*, 110(2), 382–388. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01187.2010>
- Tayebjee, M. H., Lip, G. Y. H., Blann, A. D., & MacFadyen, R. J. (2005). Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thrombosis Research*, 115(3), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.08.023>
- Tedesco, F. S., Dellavalle, A., Diaz-manera, J., Messina, G., & Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *Current Topics in Developmental Biology*, 120(1), 11–19. <https://doi.org/10.1172/JCI40373>.and
- Thomas, S., Reading, J., & Shephard, R. J. (1992). Revision of the physical activity readiness questionnaire (PAR-Q). *Canadian Journal of Sport Sciences*, 17(4), 338–345.
- Tidball, J. G., & Villalta, S. A. (2010). Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(5), R1173–R1187. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00735.2009>
- Torres, R., Ribeiro, F., Duarte, J. A., & Cabri, J. M. H. (2012). Evidence of the physiotherapeutic interventions used currently after exercise-induced muscle

- damage: systematic review and meta-analysis. *Physical Therapy in Sport*, 13(2), 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.ptsp.2011.07.005>
- Urso, M. L., Pierce, J. R., Alemany, J. A., Harman, E. A., & Nindl, B. C. (2009). Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 106(5), 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1063-0>
- Vaile, J., Halson, S., Gill, N., & Dawson, B. (2008). Effect of hydrotherapy on the signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. *European Journal of Applied Physiology*, 102(4), 447–455. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0605-6>
- Vieira, A., Siqueira, A. F., Ferreira-Junior, J. B., do Carmo, J., Durigan, J. L. Q., Blazeovich, A., & Bottaro, M. (2016). The effect of water temperature during cold-water immersion on recovery from exercise-induced muscle damage. *International Journal of Sports Medicine*, 37(12), 937–943. <https://doi.org/10.1055/s-0042-111438>
- Weir, J. P., Evans, S. A., & Housh, M. L. (1996). The effect of extraneous movements on peak torque and constant joint angle torque-velocity curves. *Journal of Orthopaedic Sports and Physical Therapy*, 23(5), 302–308.
- White, G E, & Wells, G. D. (2013). Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affecting recovery from high-intensity exercise. *Extreme Physiology & Medicine*, 2, 26. <https://doi.org/10.1186/2046-7648-2-26>
- White, Gillian E, Rhind, S. G., & Wells, G. D. (2014). The effect of various cold-water immersion protocols on exercise-induced inflammatory response and functional recovery from high-intensity sprint exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 114(11), 2353–2367. <https://doi.org/10.1007/s00421-014-2954-2>
- Wilcock, I. M., Cronin, J. B., & Hing, W. A. (2006). Physiological response to water immersion: a method for sport recovery? *Sports Medicine*, 36(9), 747–765. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636090-00003>
- Yanagisawa, O., Kudo, H., Takahashi, N., & Yoshioka, H. (2004). Magnetic resonance imaging evaluation of cooling on blood flow and oedema in skeletal muscles after exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 91(5–6), 737–740. <https://doi.org/10.1007/s00421-004-1060-2>

- Yanagisawa, O., Niitsu, M., Yoshioka, H., Goto, K., Kudo, H., & Itai, Y. (2003). The use of magnetic resonance imaging to evaluate the effects of cooling on skeletal muscle after strenuous exercise. *European Journal of Applied Physiology*, *89*(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/s00421-002-0749-3>
- Yeung, S. S., Ting, K. H., Hon, M., Fung, N. Y., Choi, M. M., Cheng, J. C., & Yeung, E. W. (2016). Effects of cold water immersion on muscle oxygenation during repeated bouts of fatiguing exercise: a randomized controlled study. *Medicine*, *95*(1), e2455. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002455>
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin.*, *45*(2), 27–37.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **243/13**

Título do Projeto: “Efeitos de Diferentes Temperaturas de Imersão em ÁGUA Gelada no Desempenho e Recuperação Muscular após dano Muscular Induzido pelo Exercício”

Pesquisador Responsável: Amilton Vieira

Data de Entrada: 29/08/2013

Com base na Resolução 466/12, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **243/13** com o título: “Efeitos de Diferentes Temperaturas de Imersão em ÁGUA Gelada no Desempenho e Recuperação Muscular após dano Muscular Induzido pelo Exercício”, analisado na 11ª Reunião Ordinária, realizada no dia 08 de Outubro de 2013.

O (a) pesquisador (a) responsável fica, desde já, notificado(a) da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente.

Brasília, 13 de Dezembro de 2013.


Prof. Natanael Monsore
Coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

O senhor está sendo convidado a participar do projeto **“Efeitos de diferentes temperaturas de imersão em água gelada no desempenho e recuperação muscular após dano muscular induzido pelo exercício”**.

O objetivo desta pesquisa é comparar os efeitos da crioterapia realizada com diferentes temperaturas sobre a recuperação muscular após o exercício de alta intensidade.

O senhor receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo.

A sua participação será por meio de 06 (seis) visitas ao Laboratório de Treinamento de Força da Faculdade de Educação Física (FEF), durante uma semana, nos dias úteis, respeitando sempre o mesmo horário. Em todas as visitas serão realizados os seguintes testes: registro de imagem de ultrassonografia; medidas da força muscular e do desempenho no salto vertical; e coletas sanguíneas por profissional habilitado e com materiais descartáveis, conforme as prerrogativas da ANVISA, com finalidade de mensurar marcadores químicos e inflamatórios do dano muscular. Apenas na primeira visita os testes serão realizados em dois momentos, antes e após um protocolo de saltos, sendo que nessa visita, a coleta sanguínea será realizada somente antes do protocolo de saltos. Ainda na primeira visita, será sorteado o grupo experimental o qual o senhor irá compor, podendo ser submetido a um protocolo de crioterapia (aplicação única de imersão em água gelada à 5°C, ou 15°C, ou 4 aplicações a 10°C sendo a primeira imediatamente após, a segunda 24h, a terceira 48h e a quarta 72h após o exercício), ou mesmo poderá compor o grupo controle, que não receberá nenhuma intervenção. A primeira sessão terá a duração aproximada de 60 minutos e as demais durarão aproximadamente 30 minutos para a realização de todos os procedimentos.

É necessário o senhor estar ciente da importância em relatar qualquer alteração ou complicação do seu estado de saúde na avaliação clínica. A avaliação não exclui a possibilidade de complicações de saúde decorrentes do protocolo de exercício, tendo em vista que a avaliação clínica não é capaz de reconhecer as disfunções de saúde como miopatias, hematopatias e insuficiência renal que não tenham manifestado sinais ou sintomas até o presente momento.

Informamos que o senhor pode se recusar a participar de qualquer procedimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o senhor tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, telefone para: Amilton Vieira, na Faculdade de Educação Física telefone (61) 3107-2500, no horário comercial das 8h00 às 18h00 ou telefone celular (61) 8280-5500; ou Angelina Freitas Siqueira, telefone celular (61) 8300-3248.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Os esclarecimentos das dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o senhor.

Nome / assinatura

Pesquisador responsável

Brasília, _____ de _____ de _____.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Multiple Cold-Water Immersions Attenuate Muscle Damage but not Alter Systemic Inflammation and Muscle Function Recovery: A Parallel Randomized Controlled Trial

Received: 14 July 2017
Accepted: 13 June 2018
Published online: 19 July 2018

Angelina Freitas Siqueira¹, Amilton Vieira², Martim Bottaro³, João Batista Ferreira-Júnior⁴, Otávio de Toledo Nóbrega⁵, Vinícius Carolino de Souza⁵, Rita de Cássia Marqueti⁶, Nicolas Babault⁷ & João Luiz Quagliotti Durigan⁵

The aim of this study was to investigate the effects of multiple cold-water immersions (CWIs) on muscle function, markers of muscle damage, systemic inflammation and ECM degradation following exercise-induced muscle damage (EIMD). Thirty physically active males were randomly assigned to either a control (n = 15) or cold-water immersion (CWI) group (n = 15). The CWI group performed one immersion (10 °C for 20 min) at post-exercise and every 24 h for the following 72 h, while the control group remained in a seated position during these corresponding periods. Muscle strength, vertical jump height, muscle thickness, delayed-onset muscle soreness (DOMS), systemic creatine kinase (CK), C-reactive protein (CRP), inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity were assessed at Pre, Post, 24, 48, 72, 96 and 168 h following EIMD. No significant time × group interaction was obtained for muscle strength, vertical jump height recovery and MMP-2 activity (p > 0.05). At 24 h, muscle thickness from the CWI group returned to baseline and was lower than the control (p = 0.04). DOMS returned to baseline at 168 h for the CWI group (p = 0.109) but not for the control (p = 0.008). At 168 h, CK showed a time-group difference with a greater peak for the control group (p = 0.016). In conclusion, multiple CWIs attenuated muscle damage, but not altered systemic inflammation and muscle function recovery.

The long-lasting impairment in muscle performance subsequent to unaccustomed and/or eccentric exercises has been referred as exercise-induced muscle damage (EIMD)¹. EIMD causes an increase in inflammatory markers in the blood, associated with an increase of edema and delayed onset muscle soreness (DOMS), as well as a prolonged impairment in muscle strength, and range of motion². Therefore, different strategies of muscle recovery have been employed to minimize EIMD. One strategy widely used today in both clinical settings and sports activities is cryotherapy using cold-water immersion (CWI)³ at temperatures lower than 15 °C⁴.

Although the mechanisms related to the benefits of CWI are not completely understood, it has been suggested that the decrease in muscle temperature causes a reduction in the metabolic rate, reactive oxygen species (ROS) production, and the inflammatory process, which may minimize secondary muscle damage⁵. In addition, alterations in intramuscular blood and lymphatic flow may occur partly because of cold-induced vasoconstriction and/or hydrostatic pressure⁴. It has been reported that the magnitude of the potential physiological changes

¹Physical Education Program, University of Brasília, Brasília, Brazil. ²Physical Education Department, UDF University Center, Brasília, Brazil. ³Physical Education College, University of Brasília, Brasília, Brazil. ⁴Federal Institute of Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, Brazil. ⁵Health Sciences Graduation Program, University of Brasília, Brasília, Brazil. ⁶Rehabilitation Sciences Graduation Program, University of Brasília, Brasília, Brazil. ⁷INSERM U1093, Faculty of Sport Science, University of Burgundy-Franche-Comté, Dijon, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.L.Q.D. (email: durigan@unb.br)

Physical characteristic	Control group (n = 15)	CWI group (n = 14)	p value
Age (years)	19.9 ± 1.4	20.5 ± 1.4	0.284
Body mass (kg)	71.3 ± 9.4	71.3 ± 9.1	0.997
Height (cm)	175.7 ± 7.2	176.3 ± 5.0	0.791
BMI (kg/m ²)	23.0 ± 2.0	22.4 ± 2.8	0.496
Thigh skinfold (mm)	14.3 ± 5.8	13.6 ± 4.3	0.748
Peak torque (N-m)	333.5 ± 52.0	327.9 ± 47.1	0.770
CMJ height (cm)	46.6 ± 5.1	49.6 ± 8.1	0.297

Table 1. Age, body mass, height, body mass index (BMI), thigh skinfold, baseline knee extensors peak torque and countermovement jump (CMJ) height from subjects of each experimental group. Data are expressed as mean ± SD. The differences between groups were analyzed using Student's test. No difference was observed in the physical characteristics between groups ($p > 0.05$). CWI: cold-water immersion.

related to CWI depends on the water temperature^{6–8}, immersion duration, and frequency^{3,9}. However, despite the widespread use of CWI, the optimal protocol to elicit the required physiological response remains unknown^{3,9,10}.

The use of cryotherapy has been recommended for the first 72 h after muscle damage¹¹. The theoretical hypothesis that underpins this recommendation is related to its intensive treatment during the destruction phase of muscle regeneration¹². The destruction phase, lasting 0–72 h, is characterized by cell membrane rupture, myofiber death, muscle edema and the inflammatory process¹³. To our knowledge, few studies^{14–17} have explored the effects of multiple CWIs during the first 72 h after a single bout of EIMD on acute recovery and muscle function. Some of these studies demonstrated that this recovery strategy reduces subjective ratings of DOMS^{16,17} and perceived exertion¹⁷, attenuates indirect markers of muscle damage^{14,16}, and accelerates the recovery of functional muscle performance^{16,17}. However, there is conflicting evidence from previous studies and there is no clear consensus supporting the use of multiple CWIs administration in humans.

We have previously demonstrated in an animal model that multiple administrations of cryotherapy during the destruction phase can reduce the inflammatory process through a decrease in macrophage infiltration¹⁸. In the same study, cryotherapy also reduced the release of messenger RNA levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and extracellular matrix (ECM) degradation markers (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)¹⁸. Siqueira and coauthors¹⁹ also reported that multiple cryotherapy administrations relieved the production of ROS after muscle injury. Since the balance of pro- versus anti-inflammatory cytokines plays a key role in muscle regeneration by affecting the activation of satellite cells and matrix metalloproteinases (MMPs), a clear understanding of the effects of multiple CWIs during the first 72 h following EIMD on the inflammatory process is important^{20–23}.

Despite these promissory results and the widespread use of cryotherapy after muscle damage/injury in clinical practice, no study has addressed the effects of multiple CWIs on inflammation and ECM degradation markers. In addition, the results related to muscle function recovery remain to be determined in humans. Thus, we aimed to investigate the effects of multiple CWIs during the first 72 h following a single bout of EIMD on muscle function (i.e., muscle strength, and vertical jump height), markers of muscle damage (muscle thickness, DOMS and creatine kinase), systemic inflammation (C-reactive protein, and cytokine kinetics), and ECM degradation. Our hypothesis was that multiple CWIs during the first 72 h post-exercise would attenuate muscle damage and the inflammatory response, which would support a quicker recovery of muscle function.

Results

We assessed the eligibility of thirty-two physically active males between December 2013 and August 2014. We excluded two individuals that had a thigh skinfold greater than 20 mm. Thirty individuals participated voluntarily and were allocated into the (1) control or (2) CWI group. However, one participant from the CWI group was excluded 48 h after exercise due to the manifestation of rhabdomyolysis diagnosed by the medical staff. Physical characteristics of each experimental group are shown in Table 1; there were no significant differences between groups at baseline ($p > 0.05$). The analysis of primary and secondary outcomes included all twenty-nine participants that finished the study.

Muscle function. Muscle Strength. No significant time \times group interaction was obtained for muscle strength [$F = 0.778$, $p = 0.588$, $\eta_p^2 = 0.027$, power = 0.303]. Nevertheless, a significant main time effect was observed [$F = 44.305$, $p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.613$, power = 0.999]. The lowest values of muscle strength were obtained immediately post-exercise (Fig. 1A). Muscle strength returned to pre-values only at 168 h in both groups ($p = 1.0$).

Vertical jump height. Vertical jump height showed no significant time \times group interaction [$F = 1.220$, $p = 0.301$, $\eta_p^2 = 0.058$, power = 0.465]. However, a significant main time effect was obtained [$F = 17.116$, $p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.461$, power = 0.999]. Vertical jump height declined immediately post-exercise with the lowest values at 48 h (Fig. 1B). Finally, the vertical jump height returned to pre-values at 168 h in both groups ($p = 0.188$).

Markers of muscle damage. Muscle thickness. Muscle thickness showed a significant time \times group interaction [$F = 2.204$, $p = 0.04$, $\eta_p^2 = 0.109$, power = 0.758] with a significant difference between groups at 24 h [$F = 6.089$, $p = 0.024$, $\eta_p^2 = 0.253$, power = 0.646]. A significant main time effect was also observed [$F = 12.024$, $p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.400$, power = 0.999]. The immediate increase in muscle thickness was similar in both groups,

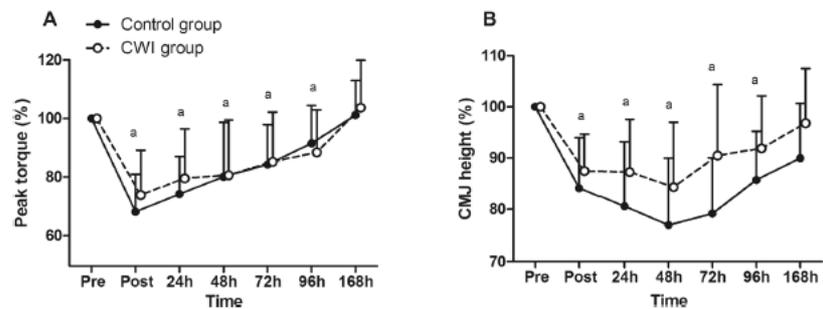


Figure 1. Changes in muscle function following exercise-induced muscle damage. (A) Knee extensor peak torque; and (B) counter-movement jump (CMJ) height. Data are expressed as mean \pm SD. The differences within and between groups were analyzed by the two-way mixed-model ANOVA. *Difference when compared to pre-value whatever the group. CWI: cold-water immersion.

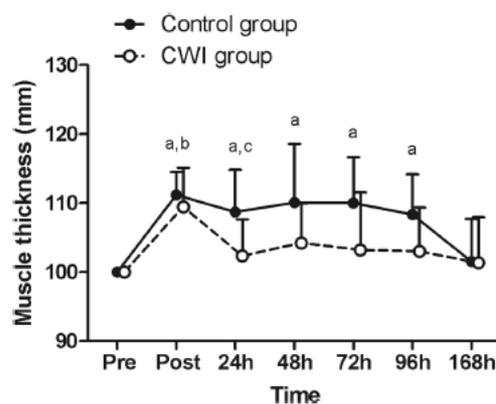


Figure 2. Changes in muscle thickness following exercise-induced muscle damage. Data are expressed as mean \pm SD. The differences within and between groups were analyzed by the two-way mixed-model ANOVA and Tukey post-hoc test. ^aDifference when compared to pre-value for the control group; ^bdifference when compared to pre-value for the CWI group; ^cdifference between control and CWI groups. CWI: cold-water immersion.

however, each group recovered differently over time (Fig. 2). Muscle thickness returned toward pre-values at 24 h in the CWI group ($p = 0.900$) and only at 168 h in the control group ($p = 0.900$).

Delayed-onset muscle soreness. Time-group differences were found in both the maximum isometric voluntary contraction (MIVC) and the seat-to-stand assessment of DOMS: at 168 h ($U = 30.5$, $p = 0.009$, $d = 0.678$, $\text{power} = 0.190$) during MIVC (Fig. 3A); and at 96 h ($U = 41$, $p = 0.046$, $d = 0.717$, $\text{power} = 0.468$) and 168 h ($U = 33$, $p = 0.014$, $d = 1.131$, $\text{power} = 0.626$) during the seat-to-stand task (Fig. 3B). The CWI and control groups rated peak DOMS at 48 h post-exercise during both indices. The CWI group returned to pre-exercise values at 168 h ($W = 1$, $p = 0.317$, $d = 0.318$, $\text{power} = 0.586$ in MIVC; and $W = 6$, $p = 0.109$, $d = 0.339$, $\text{power} = 0.368$ in seat-to-stand task), whereas the control group did not recover over the investigated time period ($W = 45$, $p = 0.008$, $d = 0.485$, $\text{power} = 0.163$ in MIVC; and $W = 45$, $p = 0.008$, $d = 1.017$, $\text{power} = 0.143$ in seat-to-stand task).

Biochemical markers of muscle damage, systemic inflammation and ECM degradation. There was no difference in the pre-values of any investigated biochemical markers between both experimental groups ($p > 0.05$, Table 2).

Creatine kinase. Both experimental groups showed significant increases in CK activity at 24 h. The CWI group returned to pre-values at 72 h ($W = 34.5$, $p = 0.155$, $d = 0.500$, $\text{power} = 0.547$), remaining stable for all subsequent

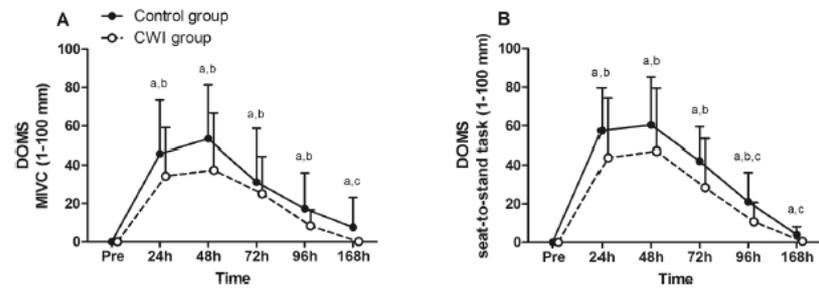


Figure 3. Changes in delayed-onset muscle soreness (DOMS) following exercise-induced muscle damage, during: (A) maximal voluntary isometric contraction (MIVC); (B) seat-to-stand task. Data are expressed as mean \pm SD. The differences between groups were analyzed using a Mann-Whitney test and the differences in time for each recovery modality using the Wilcoxon test. ^aDifference when compared to pre-value for the control group; ^bdifference when compared to pre-value for the CWI group; ^cdifference between control and CWI groups. CWI: cold-water immersion.

Biochemical markers	Group	Time					
		Pre	24h	48h	72h	168h	
CK (U/L)	Control	84.1 \pm 31.3	313.5 \pm 169.4 ^a	231.8 \pm 128.0 ^a	840.4 \pm 1707.1 ^a	2932.0 \pm 6446.9 ^{a,c}	
	CWI	86.4 \pm 35.8	630.5 \pm 1058.6 ^b	216.3 \pm 117.5 ^b	127.5 \pm 65.5	113.2 \pm 61.1	
CRP (mg/L)	Control	0.4 \pm 0.4	0.8 \pm 1.0	0.5 \pm 1.1	0.3 \pm 0.6	0.5 \pm 0.8	
	CWI	0.4 \pm 0.5	1.2 \pm 1.3 ^b	0.5 \pm 0.5	0.2 \pm 0.2	0.4 \pm 0.7	
IL-6 (pg/mL)	Control	4.0 \pm 4.9	5.8 \pm 11.6	4.3 \pm 8.9	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.4	
	CWI	4.1 \pm 10.4	5.9 \pm 16.2	3.7 \pm 8.8	10.9 \pm 22.0	3.5 \pm 6.9	
TNF- α (pg/mL)	Control	20.3 \pm 35.0	43.4 \pm 60.2 ^a	52.2 \pm 106.4	13.8 \pm 24.4	23.9 \pm 31.6	
	CWI	9.3 \pm 19.1	30.3 \pm 54.4	32.9 \pm 334.6	7.8 \pm 16.0	7.6 \pm 13.9	
IL-1 α (pg/mL)	Control	25.4 \pm 84.1	64.7 \pm 147.5	36.6 \pm 68.1	86.6 \pm 142.7	100.7 \pm 187.8	
	CWI	23.4 \pm 46.0	31.6 \pm 68.1	31.5 \pm 73.6	75.8 \pm 120.3 ^b	44.8 \pm 91.0	
IL-10 (pg/mL)	Control	129.4 \pm 229.3	229.2 \pm 555.9	505.7 \pm 811.7	136.9 \pm 252.9	164.1 \pm 238.9	
	CWI	39.5 \pm 99.7	98.9 \pm 178.3	85.5 \pm 249.5	436.4 \pm 1203.7	62.4 \pm 145.6	

Table 2. Changes in biochemical markers following exercise-induced muscle damage. Data are expressed as mean \pm SD. The differences between groups were analyzed by a Mann-Whitney test and the differences in time for each recovery modality by Wilcoxon test. ^aDifference when compared to pre-value of the control group; ^bdifference when compared to pre-value of the CWI group; ^cdifference between control and CWI groups. CK: creatine kinase; CRP: C-reactive protein; IL-6: interleukin-6; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; IL-1 α : interleukin-1 alpha; IL-10: interleukin-10; CWI: cold-water immersion.

measurements (Table 2). However, the control group did not return to pre-values at any investigated time period ($W = 63$, $p = 0.008$, $d = 0.442$, $\text{power} = 0.091$ at 168 h). There was a time-group difference in CK activity at 168 h ($U = 18$, $p = 0.016$, $d = 0.618$, $\text{power} = 0.162$), as the control group interestingly reached peak CK activity.

Markers of systemic inflammation. Changes in markers of systemic inflammation are presented in Table 2. There was a significant increase in CRP levels at 24 h post-exercise in the CWI group ($W = 52$, $p = 0.013$, $d = 0.430$, $\text{power} = 0.267$). In regards to IL-6 and IL-10 levels, there was no difference between groups at any time point ($p > 0.05$) and no time effect ($p > 0.05$) for both control and CWI groups. TNF- α levels significantly increased at 24 h post-exercise in the control group ($W = 28$, $p = 0.018$, $d = 0.334$, $\text{power} = 0.104$) and IL-1 α levels at 72 h in the CWI group ($W = 15$, $p = 0.043$, $d = 0.413$, $\text{power} = 0.304$).

Active MMP-2. MMP-2 activity showed no significant time \times group interaction [$F = 1.139$, $p = 0.356$, $\eta_p^2 = 0.125$, $\text{power} = 0.316$] and no main time effect following EIMD [$F = 1.415$, $p = 0.251$, $\eta_p^2 = 0.150$, $\text{power} = 0.389$] (Table 3).

Skin temperature, thermal sensation and thermal comfort. Skin temperature was similar between the control and CWI groups prior to the recovery procedures (control: $32.0 \pm 1.7^\circ\text{C}$ vs CWI: $32.5 \pm 1.4^\circ\text{C}$, $U = 95$, $p = 0.910$, $d = 0.316$, $\text{power} = 0.944$). Throughout the 20 min recovery period, no significant skin temperature change was observed in the control group ($p > 0.05$, for all time-points). On the other hand, the CWI group had a significant decrease in skin temperature after the first 5 min of immersion ($13.1 \pm 2.4^\circ\text{C}$, $W = 7$, $p = 0.004$, $d = 6.070$, $\text{power} = 1.000$). Over the remaining period of immersion, the skin temperature gradually reduced

Peak area	Group	Time				
		Pre	24h	48h	72h	168h
Active MMP-2 (p.d.u.)	Control	19,449 ± 4,767	21,774 ± 5,021	17,614 ± 8,067	19,963 ± 3,809	22,188 ± 4,733
	CWI	16,753 ± 9,275	21,988 ± 8,257	19,511 ± 8,431	19,420 ± 5,392	17,340 ± 5,877

Table 3. Changes in MMP-2 activity following exercise-induced muscle damage. Data are expressed as mean ± SD. The differences within and between groups were analyzed using the two-way mixed-model ANOVA. MMP-2: matrix metalloproteinase-2; p.d.u.: procedure defined unit; CWI: cold-water immersion. No difference was observed in the MMP-2 activity between groups ($p > 0.05$).

(10 min: $15.1 \pm 1.3^\circ\text{C}$; 15 min: $12.2 \pm 1.7^\circ\text{C}$; 20 min: $12.0 \pm 1.5^\circ\text{C}$), keeping relatively constant until the end and showing no difference between the time-points during the cooling procedures ($p > 0.05$).

Prior to recovery procedures, the median rates of thermal sensation were not different between both experimental groups ($U = 95$, $p = 0.683$, $d = 0.190$, $\text{power} = 0.733$). Participants from both groups rated their thermal sensation as “slightly warm”. However, the rates of thermal sensation were different between groups after 5 min of the recovery procedures ($U = 5$, $p < 0.001$, $d = 2.752$, $\text{power} = 0.914$). After 5 min into the cooling procedures, participants from the CWI group reported a “cool” sensation ($W = 0$, $p = 0.001$, $d = 1.850$, $\text{power} = 0.321$). Then, from 5 min until the end of the cooling procedures, they reported a “slightly cool” sensation ($p = 0.001$, for all time-points). Those from the control group reported a “neutral” sensation at 10 min and until the end of the recovery period ($p < 0.05$).

In regard to thermal comfort, there was no difference between groups prior to the recovery procedures, as both groups rated it as “comfortable” ($U = 98$, $p = 1.000$, $d = 0$, $\text{power} = 1.000$). After 5 min into the recovery procedures, a difference in thermal comfort rates between groups was observed ($U = 182$, $p < 0.001$, $d = 2.264$, $\text{power} = 0.962$). Compared to the baseline, the CWI group felt “slightly uncomfortable” during the cooling procedures ($p = 0.002$, for all time-points) while the control group continued feeling “comfortable” during the entire recovery period ($p > 0.05$).

Discussion

The current study was conducted to determine the effects of a multiple CWIs recovery strategy on muscle function, markers of muscle damage, systemic inflammation and ECM degradation. The initial hypothesis was confirmed partially. Multiple CWIs during the first 72 h attenuated muscle damage by an early reduction of muscle thickness, and a delayed reduction of DOMS and CK activity. However, the recovery of maximal muscle strength, vertical jump height, systemic cytokine kinetics and ECM degradation did not differ between control and CWI groups. Our findings may help sports medicine professionals to better understand the effects of multiple CWI administrations on recovery following muscle-damaging exercise.

The present study demonstrated that four CWI administrations were not effective to accelerate the recovery of muscle function. Previous studies investigating the effectiveness of multiple CWIs during the first 72 h following a single bout of EIMD have reported conflicting results^{14–17}. Discrepancies between the findings may be attributed to the CWI protocol (i.e. water temperature and duration). In an attempt to investigate the effects of different water temperatures during a multiple-CWI protocol, Machado and coauthors¹⁷ found that four immersions with durations of 15 min at 14°C was more effective when compared to 9°C . Moreover, Vaile and coauthors¹⁶ found that four immersions with durations of 14 min at 15°C improved muscle function recovery. Therefore, a less harsh CWI temperature might optimize muscle function recovery^{7,17}. Secondly, in the present study, CWI was applied with a longer duration (20 min) in contrast to the above mentioned studies (14 min¹⁶ and 15 min¹⁷). Actually, Peiffer and coauthors²⁴ demonstrated that the magnitude of change in tissue temperature was associated with a longer CWI duration. Furthermore, it has been reported that an excessive tissue cooling could exacerbate the inflammatory response, which in consequence could even impair the recovery following EIMD⁶.

As expected, an increase in muscle thickness was observed immediately post-exercise in both groups. This parameter provides a measure of muscle swelling as a consequence of muscular and connective tissue damage, increased vessel permeability, or the combination of these factors². We observed different muscle thickness kinetics between groups with the control group returning toward pre-values at 168 h, whereas the CWI group returned at 24 h post-exercise. CWI may have potentially reduced lymphatic and capillary cell permeability through peripheral vasoconstriction induced by low temperatures²⁵ and/or the effect of hydrostatic pressure⁴. A decrease in fluid diffusion might assist in the reduction of the pro-inflammatory cell infiltration and edema formation⁵. In addition, time-course differences between CWI and control groups could be associated to the capacity of cryotherapy to decrease cellular metabolism and reduce pro-inflammatory cytokines and ROS release, which may minimize secondary muscle damage and preserve myofibers and other local muscle structures¹⁹.

Systematic reviews and meta-analyses have suggested that, for management of DOMS, CWI is better than conditions involving rest or no intervention^{3,8–10}. Accordingly, the present study showed lower rates of DOMS in the CWI group compared to the control group at 168 h. This prolonged effect of DOMS is in agreement with a previous study that administered the same damaging procedure, even though a single bout of CWI showed no significant effect on DOMS⁷. Although, there is an inconsistency between the time of peak serum CK activity and peak DOMS, the longer presence of DOMS can be partially explained by the magnitude of muscle damage²⁶. Among studies that investigated multiple CWIs effects^{15–17}, only one¹⁷ has shown beneficial results, particularly, on soreness ratings immediately post CWI and 40 min post-exercise. Short-term analgesia after cryotherapy has been associated with reductions in the neural conductance velocity of sensory and motor neurons, which limits

pain and reflexive spasms, respectively²⁷. Beyond the CWI-invoked physiological changes already mentioned, long term analgesia might be ascribed to alterations in intracellular-intravascular fluid shifts which favor nutrition and waste transportation²⁸ as well as attenuation of muscle edema, which prevents nerve compression¹². Moreover, lower levels of pro-inflammatory cytokines could reduce rates of DOMS, since nociceptor activity in muscle tissues might be mediated by IL-1 β , IL-6, and TNF- α ²⁹.

In accordance with previous studies, we observed that multiple CWIs were efficient in reducing CK activity following EIMD^{14,16}. However, the studies showed differences on the time-points of reduction in CK activity, which might be due to the fatiguing exercise, the training level of the participants, as well as the CWI protocol. For instance, Eston and Peters¹⁴ observed a reduction in CK activity at 48 h and 72 h following a bout of eccentric exercise on the elbow flexors of the dominant arm and seven immersions at 15 °C for 15 min. Vaile and coauthors¹⁶ found an earlier reduction in CK activity, at 24 h and 72 h following an eccentric bi-lateral leg press protocol and four immersions at 15 °C with for 14 min. On the other hand, the present study demonstrated a later effectiveness on reduction in CK activity following a drop jump protocol and four immersions at 10 °C for 20 min, once the CK activity reduced only at 168 h. Indeed, the upper limbs muscles are more susceptible to muscle damage than lower limbs³⁰. Moreover, the untrained participants of the present study were potentially more susceptible to muscle damage than the trained participants² from the Vaile and coauthors¹⁶ study. Interestingly, the control group of the present study demonstrated a biphasic pattern of CK activity with a peak at 24 h post-exercise and a greater second peak at 168 h. Previous studies^{2,31} that used a similar protocol to induce muscle damage also found this biphasic pattern. This may be related to CK being leaked from the interstitial fluid and conducted to the lymphatic system before reaching the blood stream². In addition, the time-course of CK may be related to the large inter-subject variability of CK release and clearance which can be influenced by many factors such as ethnicity, genetic factors, and ability to generate energy³².

An adequate balance between pro-inflammatory (such as TNF- α , IL-1 α) and anti-inflammatory (such as IL-10) cytokines is important for muscle and surrounding connective tissue regeneration²⁰. Furthermore, the magnitude of the inflammatory response affects muscle function²³. In general, the ambiguous findings of inflammatory cytokines in the present study do not suggest that our multiple CWIs protocol would be more effective in reducing inflammatory responses than passive recovery. The results presented here showed that the CWI group had a significant increase in CRP levels at 24 h. In general, CRP is associated with the inflammatory response, because it would attract macrophages to the damaged tissue, among other roles³³. Our results disagree with a recent meta-analysis that found differences in CRP levels favoring cooling at 48 h after EIMD⁹. Nevertheless, we must stress the heterogeneity of cooling modalities among the studies included in this meta-analysis⁹. Furthermore, the authors highlighted that this result may not represent the true effect of cryotherapy, since the few studies which measured CRP levels had only small sample sizes, and in the presence of one more inflammatory markers, no statistical difference between groups were found⁹.

IL-6 has been termed an "inflammation-responsive" myokine, since IL-6 is responsive to the mechanical loading associated with exercise, suggesting that it exerts a pro-inflammatory effect²⁰; and on the other hand, IL-6 inhibits TNF- α production and enhances IL-10 production, suggesting that it plays a part in the anti-inflammatory effect²⁰. White and coauthors⁶ noticed a relationship between long time periods (30 min) of a single bout of CWI protocols and significant increases in IL-6 levels immediately post and 2 h post immersion. The authors hypothesized that a longer duration of a single bout of CWI could lead multiple cell types, not only muscle cells, to produce IL-6, resulting in a sustained highly inflammatory process within 2 h post-exercise⁶. Previous studies showed that systemic concentrations of IL-6 usually return to baseline within 24 h post-exercise^{6,34,35}. According to our data and others¹⁶, it remains unclear whether multiple CWIs could exacerbate IL-6 concentrations, since blood samples were not collected within 24 h post-exercise and immediately after each cooling procedure either. Moreover, a study into multiple whole body cryotherapy *versus* passive recovery, analyzing inflammatory markers within 24 h post-exercise, indicated no differences in IL-6 and IL-10 levels but revealed a significant increase in CRP and IL-1 receptor alpha and suppression of IL-1 β in favor of the cryotherapy group³⁶.

At 24 h post-exercise, the control group showed an increase in TNF- α levels. In fact, TNF- α mediates macrophage activation (to M1 phenotype), which in turn produces potent pro-inflammatory mediators, which together could start a breakdown of the damaged muscle and induce local edema³⁷. Interestingly, it is possible to observe that changes in some biochemical markers (TNF- α and CK levels) during the early inflammatory phase coupled with long lasting edema and muscle performance impairment in the control group. The IL-1 α increase observed in the CWI group at 72 h corroborates the hypothesis that reductions in muscle temperature by cryotherapy could delay the inflammatory cascade³⁸. Muscle damage can cause the cell membrane to rupture and allow calcium ions to invade damaged tissue and activate calpain. Calpain performs the catalysis of the IL-1 α precursor, making this molecule active³⁹. Therefore, multiple cryotherapy administrations might have delayed IL-1 α activation, until it was observed to peak in the blood stream at 72 h in the CWI group. Takagi and coauthors³⁸ described that this delay in the inflammatory cascade after cryotherapy might be associated with an excessive deposition of collagen in damaged tissue. However, as the MMP-2 activity assessed in the present study was not changed even by exercise, it was not possible to suggest that collagen deposition was altered by CWI during muscle regeneration. Likewise, Tayebjee and coauthors⁴⁰ found no alteration in MMP-2 following treadmill exercise testing. However, it was observed, even without any intervention, that there were participants showing high levels of MMP-2, in contrast to others being undetectable⁴⁰. The authors highlighted the importance to elucidate the categorical distribution of MMP-2 concentration which remains unclear to date⁴⁰. Interestingly, a study using an animal model showed that only high-intensity exercise promoted an increase in MMP-2 expression and mainly in muscles composed predominantly of fast fibers⁴¹. Most likely, these incongruent findings of MMP-2 following exercise also indicate the differences between intramuscular *versus* systemic analyses, as ECM degradation and remodeling have been explored using both plasma and muscle sample analyses^{40,41}.

All recovery strategies, including CWI, have been challenged by the placebo effect⁴². Due to the popularity of CWI for recovery, it can be assumed that most participants had heard about CWI's purported advantages, leading to a confounding influence on the assessments¹⁰. It has been demonstrated that the placebo effect not only influences subjective measures, but also muscle performance⁴³. Broatch and coauthors³⁴ performed a study that supported, at least in part, the placebo effect on the beneficial effects attributed to CWI. The experimental procedure made participants to believe that a liquid added to the thermoneutral water immersion was advantageous to muscle recovery³⁴. Surprisingly, the placebo strategy was as effective as CWI on muscle strength recovery and ratings of readiness for exercise, pain, and vigor³⁴. Whether the placebo effect affected the data from studies on CWI is an important issue that remains to be elucidated. Moreover, as previously observed⁴⁴, subjective feeling during and after recovery modalities is of paramount importance. Even if no effect on performance was obtained, CWI could be perceived as effective. This feeling could bolster individuals' positive attitudes toward subsequent exercises.

It is important to highlight the limitations in the present study. Firstly, we only focused on the use of multiple CWIs in young and healthy individuals. Although, the majority of participants in studies on CWI for preventing and treating DOMS were untrained, trained athletes are more likely to use CWI regularly⁷. Therefore, additional comparative studies are required investigating this population. Secondly, in order to determine regeneration processes, additional measurements would have been interesting. For example, muscle biopsies⁴⁵ and intramuscular temperature⁴⁶ measurements would have provided greater insight of local changes. Nonetheless, multiple immersions could increase the risk of contamination of the wound due to the invasive procedures. Also, exploring neuromuscular function using evoked contractile properties, voluntary activation measurements, and motoneuronal excitability would have helped to clarify the real physiological effects of CWI rather than any placebo effect. Thirdly, the addition of a single CWI group would have been interesting to determine whether a beneficial or a harmful magnitude effect exists between single and multiple immersions, especially regarding systemic inflammation and ECM degradation. Finally, although MMP-9 activity was detected in the zymography gels, MMP-9 was not measured because of the interference by coagulation/fibrinolytic pathways that may have increased the MMP-9 content in serum⁴⁷.

In summary, multiple CWIs were effective to attenuate indirect markers of muscle damage, such as DOMS, muscle thickness, and CK activity. However, this recovery strategy appears to be ineffective on systemic inflammation and ECM degradation markers and muscle function recovery. Thus, the use of multiple CWIs could be recommended as a strategy that may reduce muscle damage following exercises, but without the expectation to enhance recovery between training sessions or competitive events.

Methods

Study design. Thirty physically active males voluntarily participated in this parallel randomized controlled trial study and were allocated into one of the two parallel groups: (1) control group or (2) CWI group. The cross-over design was not applied to avoid the influence of the repeated bout effect (faster recovery of muscle function after a second bout of similar eccentric-type exercise) on the magnitude of muscle damage between conditions^{31,48}. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki and approval for the project was obtained from the local ethics committee (University of Brasilia Research Ethics Committee, Brasilia, Brazil, protocol number 243/13). The trial was retrospectively registered at the US National Institutes of Health (ClinicalTrials.gov, on 16/12/2014, protocol number NCT02341612).

Study population. Study inclusion required participants to be physically active males, practicing mild to moderate intensity aerobic activities (e.g. running and cycling) and/or recreational sports (such as soccer), 2–3 times per week. Participants were excluded if they: (1) had participated in regular strength training or intensive plyometric exercise during the last 3 months; (2) answered "yes" to any Physical-Activity Readiness Questionnaire (PAR-Q) questions⁴⁹; (3) had any inflammatory disease or had taken any anti-inflammatory medications during the last 4 weeks; (4) had history of adverse reactions to cold temperatures; (5) had a thigh skinfold greater than 20 mm, as the amount of adipose tissue affects intramuscular cooling⁵⁰; (6) had knee extensor torque less than 185 Nm, in order to achieve paired values between participants. Participants were instructed to maintain their usual hydration regimen; not to consume stimulants (e.g. alcohol, caffeine, chocolate) and anti-inflammatory medications; and not to exercise during their participation in the experiment. To avoid circadian influences, participants were asked to visit the Strength Laboratory of Physical Education Faculty at the same time of day each day, between 1 and 4 pm. Once informed of the purpose, procedures, discomforts, risks, and benefits, each participant signed an informed consent form.

Sample size was calculated based on the knee extensor peak torque data (considered the study's primary outcome) that was reported in a similar study⁵¹, using G*Power (version 3.1.9.2; Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany). The following design specifications were taken into account: $\alpha = 0.05$; $(1-\beta) = 0.8$; effect size $f = 0.2$; test family = F test, and statistical test = analysis of variance (ANOVA) repeated measures, within-between interaction, groups = 2 and measurements = 7. Sample size estimation indicated 20 participants (10 per group). However, we decided to include more participants in order to increase statistical power.

Randomization. Following the participants' eligibility screening, the randomization scheme was generated using the website Randomization.com.

Study interventions. The participants visited the laboratory on seven occasions (Fig. 4). The first visit consisted of: (1) anthropometric measurements; and (2) familiarization with the experimental procedures. At three to seven days after familiarization, participants performed a muscle damaging protocol. In order to investigate the effects of multiple CWIs during the first 72 h following EIMD on muscle function, markers of muscle damage, systemic inflammation, and ECM degradation, were assessed in this sequence: (1) ultrasound assessment;

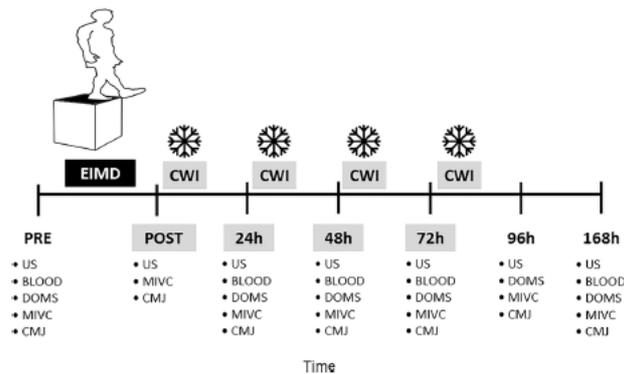


Figure 4. Experimental design. Represented are the times of each assessment procedure and multiple cold-water immersion (CWI) administrations. Maximum isometric voluntary contraction (MIVC), counter-movement jump (CMJ) and ultrasound (US) were measured at pre-exercise (Pre), immediately post (Post), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 168 h post exercise-induced muscle damage (EIMD). Delayed onset muscle soreness (DOMS) was not measured at Post and blood samples (BLOOD) were not collected at Post and 96 h. Cold-water immersion (CWI) was performed 10 min post-exercise and every 24 h thereafter for the following 3 days after EIMD.

(2) blood collection; (3) DOMS during seat-to-stand task; (4) peak torque and DOMS during MIVC; and (5) CMJ. These assessments were repeated: before exercise (Pre), and immediately (Post), 24, 48, 72, 96 and 168 h post-exercise. DOMS was not measured at Post, as it increases several hours' post-exercise²⁶. Blood samples were not collected at Post and 96 h, to limit the number of invasive measurements.

Protocol to induce muscle damage. The exercise protocol consisted of five sets of 20 drop jumps from a 60-cm box with two minutes of rest between sets³¹. After dropping down from the box and landing on the floor, participants were instructed to perform a maximal explosive vertical jump and then land on the floor. They were instructed to flex their knees to at least 90° (0° = full extension) during all landings and to keep their hands on their hips during the jumps. They were verbally encouraged to exert maximal effort during each jump repetition.

Cold-water immersion and passive recovery. CWI was applied 10 min post-exercise and every 24 h thereafter for the following three days. In total participants completed four bouts of immersion at $10 \pm 1^\circ\text{C}$ for a duration of 20 min each. The duration was chosen based on studies that investigated a similar population^{7,52}. Water temperature was selected based upon the most popular CWI range of 10 to 15 °C³. During the cooling procedure, participants remained seated with knees extended, while immersed up to the iliac crest, ensuring the lower limbs were fully submerged in the water bath. Water temperature was checked every 5 min and was maintained at the target temperature by adding crushed ice when necessary. Participants were instructed to make movements with their legs every 2 min to prevent the formation of the warmer boundary layer of water that forms immediately surrounding the skin. Participants in the control group remained comfortably seated at room temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) during the corresponding periods of CWI sessions. After completing their respective interventions, subjects could continue with their regular daily activities.

Study outcomes. *Muscle function.* **Muscle strength:** Maximal isometric voluntary knee extensor torque was measured at 60° (0° = full extension), using a commercial dynamometer (Biodex System 3, Biodex Medical, Inc., Shirley, New York, USA). Participants were comfortably positioned on the dynamometer seat with belts fastened across the trunk and pelvis to minimize body movements that could affect torque output⁵³. The lateral epicondyle of the femur was aligned to the dynamometer's axis and the chair and dynamometer settings for each subject were recorded during the familiarization session and were used throughout the study. Subjects were asked to cross their arms across the chest⁵⁴ and to maximally contract their right knee extensors for 4 s⁵⁵. They had two attempts to achieve their maximal isometric torque with 1 min of rest between attempts and received verbal encouragements throughout the tests⁵⁶. Testing procedures were conducted by the same blinded examiner each time. The greatest torque was retained for further analysis.

Vertical jump height: CMJ height was measured using an AMTI force plate (model BP400600-HF-2000; Advanced Mechanical Technology, Inc., Watertown, MA, USA) with a sampling rate of 1,000 Hz. Subjects were asked to keep their hands on their hips and jump as high as possible. They had three attempts to achieve their best jump performance with 1 min of rest between attempts⁷. The greatest vertical displacement was considered as the maximal jump height, which was used for further analysis. A self-determined range of motion for the knee was permitted and they received verbal encouragement by the same blinded examiner. Data obtained during vertical jumps were captured from the manufacturer's software (AMTI Acquisition Software, v 4.2; Advanced Mechanical

Technology, Inc.) and processed using a custom MATLAB code (v R2008a7, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). From the ground reaction force, the force-displacement curve was calculated and then integrated to obtain the displacement of the center of mass at each instant of movement⁵⁷.

Indirect markers of muscle damage. Muscle thickness: All sonograms were acquired by a portable ultrasound device (Philips-VMI, Ultra Vision Flip, Model BF, Minas Gerais, Brazil) equipped with a 7.5 MHz linear array transducer. A standardized protocol (including transducer placement, anatomic landmarks, and subject position) was set by the same examiner. It also included ultrasound settings (e.g. frequency, gain, tissue compression) that were kept constant between subjects and across all time periods, except the depth that was adjusted for each subject to display the entire muscle. Subjects were assessed in the supine position with their knee in maximal extension and neutral rotation. A water-soluble transmission gel was applied to the ultrasound probe to allow acoustic contact without depressing the dermal surface. The anterior images of the anterior thigh were obtained with the transducer placed perpendicular to the long axis of the thigh on its anterior surface, at 60% of the distance from the greater trochanter to the lateral epicondyle and 3 cm lateral to the midline of the anterior thigh⁵⁸. Once the technician was satisfied with image quality, the image was kept for further analysis⁵⁹. In order to assure replication of image location on repeated ultrasound assessments, a mark was drawn on the subject's leg using indelible ink. All image measurements were performed by a blinded examiner in triplicate using Image J Software (NIH, Bethesda, MD, USA). Mean values were used as representative of the thigh muscles (rectus femoris and vastus intermedius) thickness. Muscle thickness, expressed in mm, was defined as the distance from the subcutaneous adipose tissue interface to the muscle-bone interface⁶⁰.

Delayed-onset muscle soreness: Perceived muscle soreness of quadriceps muscles was assessed using a 100-mm visual analog scale. The scale ranged from "no soreness" (0) to "severe soreness" (100)³¹. Subjects rated their quadriceps soreness during two situations: (1) sit-to-stand task: three consecutive sit-to-stand movements from a 43-cm chair, which were performed with constant cadence (2 s to sit and 2 s to stand) and (2) MIVC⁷.

Biochemical markers of muscle damage, systemic inflammation and ECM degradation. Blood samples and biochemical analyses: Approximately 12 mL of blood was collected from the antecubital vein by the standard venipuncture technique using a commercially produced vacuum sealed kit. Tubes were centrifuged (Centrifugal machine, 3250 RPM, Model Centurion, São Paulo, Brazil) at room temperature for 20 min at 2500 rotations per minute ($\approx 1000 \times g$). Serum was aliquoted (250 μ L) and directly stored at -20°C until analyzed by a blinded examiner. Blood analyses included biochemical markers of: muscle damage by measurements of creatine kinase (CK) activity; systemic inflammation by measurements of C-reactive protein (CRP) levels and cytokine levels, among them interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 alpha (IL-1 α) and interleukin-10 (IL-10); and ECM degradation by measurements of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity.

The biochemical analyses were done in duplicate, according to the manufacturers' protocols by a blinded examiner. All calibration curves displayed linear coefficients (R^2) ≥ 0.95 and inter-assay coefficients of variation $< 5\%$. CK activity was determined by enzymatic assay using a test kit for total CK (Siemens Medical System, Erlangen, Germany) with a limit of detection of zero (U/L) and linearity of the measurement of 1300 U/L. CRP levels were analyzed by latex particle enhanced immunoturbidimetric assay using a test kit for the wide-range C-reactive protein (Siemens Medical Systems, Erlanger, Germany) with a limit of detection of 0.003 mg/L and linearity of the measurement of 156–164 mg/L. Serum levels of IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-10 were obtained by commercial test kits from Quantikine[®] ELISA Human Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) using an absorbance plate reader (ELx800, BioTek instruments, Inc., Winooski, EUA). Thresholds of detection were experimentally determined at 1.0 pg/mL for IL-6 and IL-10, 1.5 pg/mL for TNF- α and 0.4 pg/mL for IL-1 α .

MMP-2 gelatinolytic activity was measured by zymography. Samples containing 0.5 μ L of serum were added to 0.5 μ L of SDS (8%) (v:v) and subsequently added 10 μ L of buffer without β -mercaptoethanol-containing SDS (20%). Samples were resolved by electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS 10% (SDS_PAGE) and gelatin at a final concentration of 1 mg/mL. After electrophoresis, the gels were washed twice for 20 min in 2.5% of Triton X-100 to remove SDS. Gels were incubated in buffer substrate (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 5 mM of CaCl_2 and 0.02% NaN_3) at 37°C for 20 h. Gels were stained with Coomassie brilliant-blue for 1.5 h and destained with acetic acid: methanol: water (1:4:5) for activity bands visualization. The gelatinolytic activity was visualized as clear bands in the stained gel⁶¹. Densitometric semi-quantitative analysis of the MMPs protein bands was performed as previously described by Hu and Beeton⁶². The analyses were done in triplicate by a single blinded examiner using Image J Software (NIH, Bethesda, MD, USA) and the mean value of peak area were used in the final analysis.

Thermal comfort, thermal sensation, and skin temperature: Subjects were asked to rate their thermal sensation and thermal comfort before and every 5 min throughout the 20 min of each recovery procedure. Thermal sensation was rated on a nine-point Likert-type scale where "−4" = very cold, "−3" = cold, "−2" = cool, "−1" = slightly cool, "0" = neutral, "1" = slightly warm, "2" = warm, "3" = hot, and "4" = very hot. Thermal comfort was rated on a five-point Likert-type scale where "0" = comfortable, "1" = slightly uncomfortable, "2" = uncomfortable, "3" = very uncomfortable, and "4" = extremely uncomfortable⁶³. Every 5 min, subjects were also asked to stand up and gently towel-dry their right thigh to have their skin temperature measured. The anterior thigh temperature was measured in the drawn landmark for ultrasound measurements (above the *rectus femoris* muscle). An infrared thermometer was used (Fluke, 566, China), which was kept perpendicularly positioned 8 cm from the skin. Over the 4 days, the mean value of skin temperature was calculated at each time-point in each group, as well as the median value of Likert-type scales.

Statistical analysis. Data are described as means and standard deviation, except Likert-type measurement scales used for rates of thermal comfort and thermal sensation that are described as medians. The Shapiro-Wilk test was used to verify data distribution. Peak torque, CMJ height, muscle thickness and MMP-2 activity presented normal distributions. Thereby, they were analyzed using a two-way (group \times time) mixed-model ANOVA. In case of significant main effect or interaction (time \times group), a Tukey post-hoc test was applied. DOMS, CK, markers of systemic inflammation, skin temperature, and rates of thermal comfort and thermal sensation did not show a normal distribution and were analyzed using nonparametric tests. The Mann-Whitney test was performed to assess differences between groups and the Wilcoxon test was undertaken to evaluate differences in time for each recovery modality. The subjects' physical characteristics, baseline peak torque and CMJ height were evaluated using an independent t-test. SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 20.0 (IBM, USA) was used for statistical analyses with an alpha level set at 5%. Additionally, effect sizes and statistical power were calculated. Effect sizes from data analyzed by ANOVA were determined using partial eta squared (η_p^2). Cohen⁶⁴ has provided benchmarks to define small ($\eta_p^2 = 0.01$), medium ($\eta_p^2 = 0.06$) and large ($\eta_p^2 = 0.14$) effects⁶⁴. To calculate the effect sizes and power from the data analyzed by non-parametric test, it was used the G*Power (version 3.1.9.2; Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany). Effect sizes (d) from the data analyzed by non-parametric test were calculated with values of 0.2, 0.5 and above 0.8 considered to represent small, medium and large differences, respectively⁶⁴. Power were calculated by the asymptotic relative efficiency (A.R.E.) method⁶⁵.

References

- Ebbeling, C. B. & Clarkson, P. M. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sport. Med.* **7**, 207–234 (1989).
- Clarkson, P. M. & Hubal, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **81**, S52–S69 (2002).
- Bleakley, C. *et al.* Cold-water immersion (cryotherapy) for preventing and treating muscle soreness after exercise (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.* CD0088262 (2012).
- Wilcock, I. M., Cronin, J. B. & Hing, W. A. Physiological response to water immersion: a method for sport recovery? *Sport. Med.* **36**, 747–765 (2006).
- White, G. E. & Wells, G. D. Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affecting recovery from high-intensity exercise. *Extrem. Physiol. Med.* **2**, 26 (2013).
- White, G. E., Rhind, S. G. & Wells, G. D. The effect of various cold-water immersion protocols on exercise-induced inflammatory response and functional recovery from high-intensity sprint exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **114**, 2353–2367 (2014).
- Vieira, A. *et al.* The effect of water temperature during cold-water immersion on recovery from exercise-induced muscle damage. *Int. J. Sports Med.* **37**, 937–943 (2016).
- Machado, A. F. *et al.* Can water temperature and immersion time influence the effect of cold water immersion on muscle soreness? A systematic review and meta-analysis. *Sport. Med.* **46**, 503–514 (2016).
- Hohenauer, E., Taeymans, J., Baeyens, J. P., Clarys, P. & Clijse, R. The effect of post-exercise cryotherapy on recovery characteristics: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).
- Leeder, J., Gissane, C., van Someren, K., Gregson, W. & Howatson, G. Cold water immersion and recovery from strenuous exercise: a meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* **46**, 233–240 (2012).
- Kellett, J. Acute soft tissue injuries - a review of the literature. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **18**, 489–500 (1986).
- Swenson, C., Swärd, L. & Karlsson, J. Cryotherapy in sports medicine. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **193**–200 (1996).
- Järvinen, T. A. H. *et al.* Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **21**, 317–331 (2007).
- Eston, R. & Peters, D. Effects of cold water immersion on the symptoms of exercise-induced muscle damage. *J. Sports Sci.* **17**, 231–238 (1999).
- Goodall, S. & Howatson, G. The effects of multiple cold water immersions on indices of muscle damage. *J. Sport. Sci. Med.* **7**, 235–241 (2008).
- Vaile, J., Halson, S., Gill, N. & Dawson, B. Effect of hydrotherapy on the signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. *Eur. J. Appl. Physiol.* **102**, 447–455 (2008).
- Machado, A. F. *et al.* Dosages of cold-water immersion post exercise on functional and clinical responses: a randomized controlled trial. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **27**, 1356–1363 (2017).
- Ramos, G. V. *et al.* Cryotherapy reduces inflammatory response without altering muscle regeneration process and extracellular matrix remodeling of rat muscle. *Sci. Rep.* **6**, 18525 (2016).
- Siqueira, A. F. *et al.* Multiple cryotherapy applications attenuate oxidative stress following skeletal muscle injury. *Redox Rep.* **22**, 323–329 (2016).
- Peake, J., Nosaka, K. & Suzuki, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc. Immunol. Rev.* **11**, 64–85 (2005).
- Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R345–R353 (2005).
- Urso, M. L., Pierce, J. R., Alemany, J. A., Harman, E. A. & Nindl, B. C. Effects of exercise training on the matrix metalloproteinase response to acute exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **106**, 655–663 (2009).
- Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T. & Peake, J. M. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exerc. Immunol. Rev.* **18**, 42–97 (2012).
- Peiffer, J. J., Abbiss, C. R., Watson, G., Nosaka, K. & Laursen, P. B. Effect of cold-water immersion duration on body temperature and muscle function. *J. Sports Sci.* **27**, 987–993 (2009).
- Yanagisawa, O., Kudo, H., Takahashi, N. & Yoshioka, H. Magnetic resonance imaging evaluation of cooling on blood flow and oedema in skeletal muscles after exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **91**, 737–740 (2004).
- Cheung, K., Hume, P. A. & Maxwell, L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. *Sport. Med.* **33**, 145–164 (2003).
- Herrera, E., Sandoval, M. C., Camargo, D. M. & Salvini, T. F. Motor and sensory nerve conduction are affected differently by ice pack, ice massage, and cold water immersion. *Phys. Ther.* **90**, 581–591 (2010).
- Yeung, S. S. *et al.* Effects of cold water immersion on muscle oxygenation during repeated bouts of fatiguing exercise: a randomized controlled study. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e2455 (2016).
- Zhang, J. M. & An, J. Cytokines, inflammation and pain. *Int. Anesth. Clin.* **45**, 27–37 (2007).
- Nosaka, K. & Aoki, M. S. Repeated bout effect: research update and future perspective. *Brazilian J. Biomechanics* **5**, 5–15 (2011).
- Miyama, M. & Nosaka, K. Influence of surface on muscle damage and soreness induced by consecutive drop jumps. *J. Strength Cond. Res.* **18**, 206–211 (2004).
- Baird, M. E., Graham, S. M., Baker, J. S. & Bickerstaff, G. F. Creatine-kinase and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J. Nutr. Metab.* **2012**, 960363 (2012).
- Kasapis, C. & Thompson, P. D. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1563–1569 (2005).

34. Broatch, J. R., Petersen, A. & Bishop, D. J. Postexercise cold water immersion benefits are not greater than the placebo effect. *Med. Sci. Sports Exerc.* **46**, 2139–2147 (2014).
35. Peake, J. M. *et al.* The effects of cold water immersion and active recovery on inflammation and cell stress responses in human skeletal muscle after resistance exercise. *J. Physiol.* **595**, 695–711 (2017).
36. Pournot, H. *et al.* Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS ONE* **6**, e22748 (2011).
37. Forbes, S. J. & Rosenthal, N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat. Med.* **20**, 857–869 (2014).
38. Takagi, R. *et al.* Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J. Appl. Physiol.* **110**, 382–388 (2011).
39. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
40. Tayebee, M. H., Lip, G. Y. H., Blann, A. D. & MacFadyen, R. J. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thromb. Res.* **115**, 205–210 (2005).
41. Carmeli, E., Moas, M., Lennon, S. & Powers, S. K. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp. Physiol.* **90**, 613–619 (2005).
42. Rattray, B., Argus, C., Martin, K. & Northey, J. & Driller, M. Is it time to turn our attention toward central mechanisms for post-exertional recovery strategies and performance? *Front Physiol* **6**, 79 (2015).
43. Beedie, C. J. & Foad, A. J. The placebo effect in sports performance: a brief review. *Sports Med.* **39**, 313–329 (2009).
44. Peake, J. M. *et al.* The effects of cold water immersion and active recovery on inflammation and cell stress responses in human skeletal muscle after resistance exercise. **3**, 695–711 (2017).
45. Sarver, D. C. Cryotherapy minimally impacts the metabolome and transcriptome of human skeletal muscle (2017).
46. Mawhinney, C. *et al.* Cold-water mediates greater reductions in limb blood flow than whole body cryotherapy. *Med. Sci. Sports Exerc.* **49**, 1252–1260 (2017).
47. Mannello, F. Serum or plasma samples? The ‘cinderella’ role of blood collection procedures preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 611–614 (2008).
48. Miyama, M. & Nosaka, K. Protection against muscle damage following fifty drop jumps conferred by ten drop jumps. *J. Strength Cond. Res.* **21**, 1087–1092 (2007).
49. Thomas, S., Reading, J. & Shephard, R. J. Revision of the physical activity readiness questionnaire (PAR-Q). *Can. J. Sport Sci.* **17**, 338–345 (1992).
50. Myrer, J. W., Myrer, K. A., Measom, G. J., Fellingham, G. W. & Evers, S. L. Muscle temperature is affected by overlying adipose when cryotherapy is administered. *J. Athl. Train.* **36**, 32–36 (2001).
51. Ferreira-Junior, J. B. *et al.* One session of partial-body cryotherapy (–110°C) improves muscle damage recovery. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **25**, e524–e530 (2015).
52. Crystal, N. J., Townson, D. H., Cook, S. B. & Laroche, D. P. Effect of cryotherapy on muscle recovery and inflammation following a bout of damaging exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **113**, 2577–2586 (2013).
53. Weir, J. P., Evans, S. A. & Housh, M. L. The effect of extraneous movements on peak torque and constant joint angle torque-velocity curves. *J. Orthop. Sport. Phys. Ther.* **23**, 302–308 (1996).
54. Stumbo, T. A. *et al.* The effect of hand-grip stabilization on isokinetic torque at the knee. *J. Strength Cond. Res.* **15**, 372–377 (2001).
55. Brown, L. E. & Weir, J. P. ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. *J. Exerc. Physiol.* **4**, (2001).
56. Mcnair, P. J., Depledge, J., Brett Kelly, M. & Stanley, S. N. Verbal encouragement: effects on maximum effort voluntary muscle action. *Br. J. Sports Med.* **30**, 243–245 (1996).
57. Linthorne, N. P. Analysis of standing vertical jumps using a force platform. *Am. J. Phys.* **69**, 1198–1204 (2001).
58. Chillbeck, P. D., Stride, D., Farthing, J. P. & Burke, D. G. Effect of creatine ingestion after exercise on muscle thickness in males and females. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**, 1781–1788 (2004).
59. Bemben, M. G. Use of diagnostic ultrasound for assessing muscle size. *J. Strength Cond. Res.* **16**, 103–108 (2002).
60. Abe, T., DeHoyos, D. V., Pollock, M. L. & Garzarella, L. Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. *Eur. J. Appl. Physiol.* **81**, 174–80 (2000).
61. de Souza Neto, L. V. *et al.* Effects of resistance training volume on MMPs in circulation, muscle and adipose tissue. *Int. J. Sports Med.* **38**, 307–313 (2017).
62. Hu, X. & Beeton, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *JoVE* **45**, 2445 (2010).
63. Costello, J. T., Culligan, K., Selve, J. & Donnelly, A. E. Muscle, skin and core temperature after –110°C cold air and 8°C water treatment. *PLoS One* **7**, e48190 (2012).
64. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. (Lawrence Erlbaum Associates, 1988).
65. Lehmann, E. L. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. (McGraw-Hill, 1975).

Acknowledgements

The authors acknowledge the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” that supported the study under Grant number 401453/2013-8, Brazil; and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” for providing PhD scholarship for Amilton Vieira under Process number BEX 5191/14-9, Brazil. We also wish to thank Sabin Laboratory of Clinical Analyses (Brasília, Brazil) that measured CK activity and CRP levels; Andrei Alkmim Teixeira & José Humberto de Souza Borges for the medical assistance during the study; and Derrick Jason Mulder for the English review. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, grant number 401453/2013-8 and 310359/2014-7.

Author Contributions

A.F.S., A.V., J.B.F.J., M.B. and J.L.Q.D. were responsible for the study design. A.F.S., A.V. and J.B.F.J. were involved in the experimental procedure and performed data collection. A.F.S., A.V., O.T.N., V.C.S., R.C.M. were involved in data analyses. A.F.S., A.V. and N.B. performed the statistical analysis. And all authors were involved in manuscript preparation and agree with its submission. We declare that this manuscript is not under consideration for publication by any other journal or scientific event.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018