

Análise de biomarcadores séricos de lesão muscular durante competição de mountain bike

Analysis of muscle injury serum biomarkers during a mountain bike competition

Nayara Costa Araújo¹, Alexandre Magno França², Luiz Cláudio Cameron³, Aníbal Monteiro de Magalhães Neto⁴

¹Graduada em Educação Física pela Universidade Federal do Mato Grosso - Campus Araguaia - UFMT/CUA, aluna de mestrado da Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT e membro do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - LBP-UNIRIO. Barra do Garças, MT - Brasil.

²Mestre em operações especiais pela escola de aperfeiçoamento de oficiais do exército, aluno de doutorado da Universidade Federal de Uberlândia - UFU e membro do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - LBP-UNIRIO. Porto Alegre, RS - Brasil.

³Professor titular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO e coordenador do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - LBP-UNIRIO. Rio de Janeiro, RJ - Brasil.

⁴Professor adjunto do curso de Educação Física da Universidade Federal do Mato Grosso - CUA-UFMT e membro do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - LBP-UNIRIO. Barra do Garças, MT - Brasil.

Endereço de Correspondência

Aníbal Monteiro de Magalhães Neto

Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT - Campus Universitários do Araguaia /CUA - Barra do Garças Campus I - Rodovia MT-100, Km 3,5.

78698-000 - Pontal do Araguaia - MT [Brasil]

ammneto@ufmt.br ou professoranibal@yahoo.com.br

Resumo

Introdução: O estudo de biomarcadores musculares permite diagnóstico de futuras lesões no esporte de alto nível. **Objetivo:** Avaliar a creatinquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) em atletas Mountain Bike. **Métodos:** Foram coletadas amostras sanguíneas de dez atletas de Elite de Mountain Bike. As coletas de sangue foram realizadas 24 horas antes da prova (T1), imediatamente ao final da corrida (T2), uma hora após a corrida (T3) e 24 horas depois da competição (T4). **Resultados:** A CK se elevou da ordem de 100% em 24 horas após a competição. Já LDH aumentou 43% em T2, permanecendo elevado até 1h após competição. A correlação entre os dois marcadores apresentou o coeficiente $r = 0,80$. **Conclusão:** O acompanhamento das concentrações de CK e LDH neste experimento foi possível estimar a recuperação pós-competição dos atletas em níveis de lesão muscular, o que se converte em valiosa ferramenta para a planificação e periodização do treinamento.

Palavras-chave: Creatina quinase; Lactato Desidrogenase; Metabolismo; Ciclismo

Abstract

Introduction: Biomarkers muscles allows diagnosis of future injuries in overall sport. **Objective:** Evaluate the creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) in Mountain Bike athletes. **Methods:** Blood samples of ten athletes Elite Mountain Bike was collected. The samples of blood were taken 24 hours before (T1) immediately at the end (T2), one hour after the race (T3) and 24 hour after competition (T4). **Results:** The CK amounted to around 100 % in 24 hours after the competition. LDH already increased by 43 % and remaining high until 1 hour after competition. The correlation between the two biomarkers showed coefficient $r = 0.80$. **Conclusion:** The monitoring of concentrations of CK and LDH in this experiment it was possible to estimate muscle injury post-competition, which becomes a valuable tool for planning and periodization of training.

Key words: Creatine Kinase; Lactate Dehydrogenase; Metabolism; Cycling

Introdução

A modalidade de ciclismo Mountain Bike, referidas como cross-country, são eventos de ciclismo que ocorrem de 1 a 4 horas no qual os pilotos devem completar uma ou mais voltas em um percurso acidentado para completar a distância estabelecida. O “cross-country” olímpico (XCO) é uma das modalidades de Mountain Bike que é realizada em trilhas estreitas e sinuosas num percurso de estradas de terra¹. O Mountain Bike pode ser considerado um esporte extremo potencialmente perigosos resultando em lesões que variam em gravidade de pequenas escoriações e contusões para paralisia ou até mesmo a morte. De acordo com estudos na área isto ocorre devido, entre outros fatores, ao terreno acidentado em que estes atletas competem, a fadiga física e mental, o erro do piloto, tanto em cross-country quanto nas demais modalidades de mountain bike².

Estudos apontam que o estresse mecânico e o estresse metabólico são considerados os fatores iniciais mais importantes que levam a lesão muscular induzida pelo exercício^{3,4}. Segundo Cordova et al.⁵ a lesão muscular induzida pelo exercício é sucedida por alterações bioquímicas na corrente sanguínea que podem ser detectadas por medição de atividades enzimáticas musculares, tais como os níveis de Creatina Quinase (CK) e de Lactato Desidrogenase (LDH) no soro. Após a ruptura de membranas celulares do músculo esquelético causado pela lesão, estas proteínas extravasam para a corrente sanguínea, onde o dano muscular pode ser avaliado indiretamente por intermédio da análise das concentrações séricas destes marcadores bioquímicos⁶.

A CK é uma enzima que catalisa a fosforilação reversível de creatina para fosfocreatina e do ADP para ATP e tem sido um dos marcadores de dano muscular mais utilizados pela comunidade científica, sendo ainda empregada como um indicador de intensidade do treinamento físico^{7,8}. Entretanto, a existência de três isoformas de CK, presentes em grandes sítios de liberação, dificulta a utilização dessa enzima isoladamente como

marcador^{9,10}. Assim, é necessária a análise de outros parâmetros em conjunto, como a concentração de LDH, para a obtenção de maior acurácia nos estudos. A LDH é uma enzima tetramérica que participa da conversão reversível de piruvato em lactato dependente de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺), estando diretamente associada ao metabolismo glicolítico. O extravasamento da LDH para a circulação acontece quando o processo de lesão inicia nas células musculares, servindo a monitoração da concentração desta enzima para indicar a existência de danos teciduais agudos e crônicos¹¹. Assim, o estudo da LDH tem aplicação direta no entendimento do metabolismo durante o exercício, especialmente quando analisado em conjunto com a CK.

No entanto, embora a modalidade de Mountain Bike tenha índices de popularidade relevantes no Brasil e no exterior, acompanhados de diversos estudos que relatam lesões e fraturas em seus competidores^{2,12,13}. Estudos envolvendo marcadores bioquímicos de lesão muscular nessa modalidade ainda são escassos^{14,15}. Levando em conta que neste esporte há uma diversidade de exigências físicas durante a realização de uma prova, esta modalidade pode constituir um excelente modelo para a compreensão do metabolismo dos atletas durante um exercício de alta intensidade. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a cinética de CK e LDH no plasma sanguíneo e sua utilização como marcadores de lesão muscular em atletas de ciclismo de Mountain Bike durante uma prova de XCO e verificar se o exercício físico intenso realizado pelos atletas de ciclismo desta modalidade aumenta as concentrações séricas de CK e LDH indicando a possibilidade de lesão muscular nesta prática esportiva durante uma competição.

Materiais e Métodos

Seleção da amostra

A amostra do presente estudo foi composta por 10 atletas da categoria Elite Regional de

Mountain Bike, inscritos na Federação de ciclismo do estado do Mato Grosso. Todos os sujeitos eram do sexo masculino, com médias de idade ($23 \pm 2,3$) anos, de estatura ($175 \pm 7,8$) metro e de massa corporal ($68,5 \pm 6,1$) quilogramas. O experimento foi realizado numa parceria entre a Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), devidamente aprovado pelo comitê de ética de pesquisa com seres humanos (1.064.808 - UFMT). Os atletas que participaram da pesquisa assinaram individualmente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após uma breve explicação sobre a pesquisa e receberam instruções prévias de como seria feito a coleta.

Protocolo de exercício

Neste estudo foi utilizada uma etapa do Campeonato Mato-Grossense de Mountain Bike/2012, realizada na cidade de Barra do Garças baseados no modelo de competição de XCO. As competições de XCO são realizadas em circuito e consistem em um número definido de voltas, onde todos os participantes partem juntos em um único pelotão. A pista de competição possuía a extensão de 2,4 km, sendo a prova constituída por um total de 20 voltas.

Características do percurso

Todo o percurso tinha uma elevação da partida em relação a chegada de 25 metros em terreno acidentado. A pista foi realizada em um sábado de abril de 2012 às 9:00 horas da manhã. A temperatura estava a 28°C com 60% umidade no dia da competição. A velocidade média por volta foi de 23,2 km/h.

Coleta de sangue

O método de coleta foi baseado no modelo Esportômico, onde a coleta de sangue é realizada no ambiente real do atleta. O sangue foi extraído da fossa antecubital do braço direito, sendo cole-

tados cerca de 10 ml em tubos para coleta de sangue a vácuo, de vidro, com solução aquosa de etilenodiaminotetracetado dissódico a 10% (EDTA). As amostras de sangue foram assim ordenadas: tempo 1 (24 horas antes da prova), tempo 2 (imediatamente após a competição), tempo 3 (1 hora depois da prova) e tempo 4 (24 horas após o término do percurso). Em todas as fases da Coletas foram realizadas por profissionais experientes formados em enfermagem e biomedicina que trabalham com coleta rotineiramente.

Análises do sangue

O sangue foi centrifugado a 2500 rpm em uma centrífuga clínica por 10 minutos, sendo o soro obtido usado imediatamente para a determinação quantitativa dos níveis séricos das enzimas CK e LDH. Para essa determinação foram utilizados kits comerciais Bioclin®.

Análise Estatística

Testamos a normalidade de nossos dados pelo teste de Kolmogorov - Smirnov. Após este teste a análise estatística foi expressa por mediana e desvio padrão, enquanto a significância estatística entre grupos foi calculada utilizando a análise de variância One Way (ANOVA) com a aplicação do teste Kruskal-Wallis. Já a significância intragrupos foi estabelecida pelo teste de Tukey. As correlações dos dados foram estabelecidas utilizando-se o coeficiente de Spearman. Assume-se que as diferenças significativas foram estabelecidas com $P < 0,05$.

Resultados

Os resultados mostraram uma elevação nas concentrações de CK após 24 horas do término do exercício em (T4) ao redor de 100% em todos os sujeitos testados. Tal aumento na concentração de CK apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com o primeiro tempo de coleta (T1) (Figura 1).

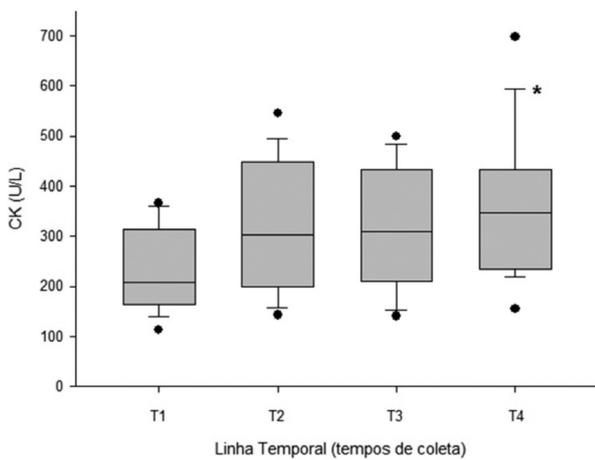


Figura 1

No eixo Y apresenta as concentrações séricas de CK expressas em medianas e desvio padrão. No eixo X expressa os quatro tempos que ocorreram as coletas T1- 24 horas antes da competição, T2 - imediatamente no final da corrida, T3 - 1 hora após corrida e T4 - 24 horas depois da competição. O asterisco (*) apresenta a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos T1 e T4.

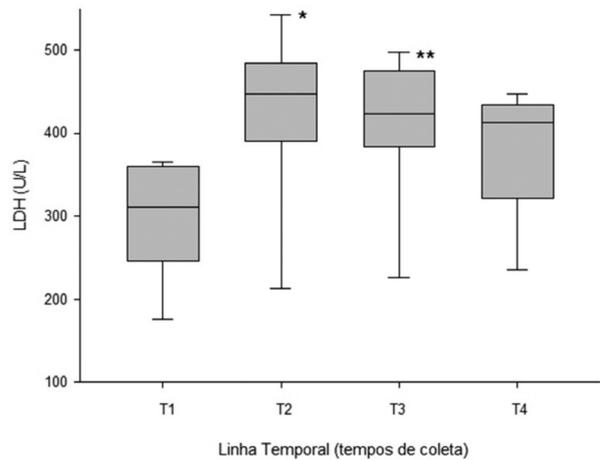


Figura 2

No eixo Y apresenta as concentrações séricas de LDH expressas em medianas e desvio padrão. No eixo X expressa os quatro tempos que ocorreram as coletas T1- 24 horas antes da competição, T2 - imediatamente no final da corrida, T3 - 1 hora após corrida e T4 - 24 horas depois da competição. Os símbolos asteriscos apresentam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos T1 e T2 (*) e entre os tempos T1 e T3 (**).

As concentrações de LDH, por sua vez, estiveram elevadas em torno de 43% ao final da corrida (T2), e mantiveram-se elevadas 38% uma hora após o final do percurso (T3). Em ambos os tempos, as concentrações da LDH apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparadas entre si. (Figura 2).

A fim de se investigar a relação entre as duas variáveis estudadas (CK e LDH) durante todo experimento adotou-se o coeficiente de Spearman aplicado nos quatro tempos (T1, T2, T3 e T4) de coleta. Assim obtive o resultado $r = 0,80$ com $p = 0,197$.

Discussão

O exercício físico causa alterações fisiológicas e bioquímicas, dentre elas as provocadas por microlesões no tecido muscular esquelético¹⁶. Fatores como a intensidade, a duração e a frequência da atividade realizada contribuem para a ocorrência da injúria muscular, que pode prejudicar a função do músculo e, consequente-

mente, o desempenho de um atleta^{17,18}. Alguns estudos indicam um quadro de diminuição do rendimento esportivo associado a lesões musculares partindo de micro traumas adaptativos da musculatura esquelética e articulações para um estágio de dano sub-clínico em atletas submetidos a exercícios intensos^{19,20}. No entanto, há poucos estudos comprovando este quadro em atletas de Mountain Bike²¹.

Devido as inúmeras exigências físicas em que o atleta é submetido durante a realização de uma prova da modalidade de ciclismo em estudo, esse esporte pode constituir um excelente modelo para a compreensão do metabolismo dos atletas durante um exercício de alta intensidade. Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de CK medidos 24 horas depois do exercício, quando comparados aos valores coletados em repouso. Elevações na concentração dessa enzima são detectadas a partir de poucas horas após o exercício, atingindo um pico após 24 horas^{22,23,24}. O que foi evidenciado neste estudo corroborando com investigações anteriores sobre esta tendência. Os níveis elevados de CK

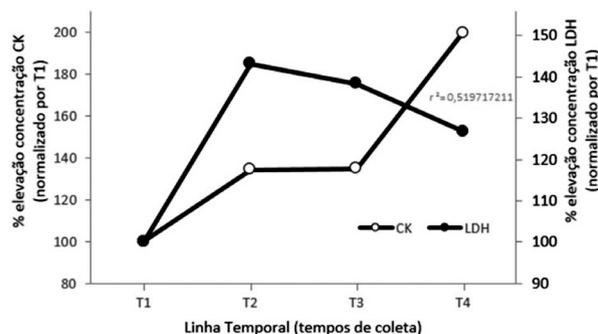


Figura 3: Correlação das enzimas CK (círculo aberto) e LDH (círculo fechado) como marcadores de lesão muscular encontradas nas amostras de sangues dos atletas de Mountain Bike

As linhas mostram aparecimento não linear dos parâmetros CK e LDH expressos em porcentagens a partir do aparecimento em T1 e sua cinética durante todo experimento. Por serem marcadores inversamente proporcionais em T4 não foi possível encontrar significância mesmo que apresente correlação de $r = 0,80$.

medidos no sangue estão intimamente associados ao seu extravasamento após a ruptura da membrana, ocasionada pela lesão das células musculares, bem como às doenças relacionadas com o músculo²⁵.

A LDH tem sido outra enzima utilizada como ferramenta para o monitoramento da lesão muscular induzida pelo exercício intenso. A cinética de aparecimento da LDH no plasma sanguíneo é mais veloz do que ocorre com a CK, a despeito da concentração daquela enzima, que apresenta valores absolutos inferiores aos da creatinoquinase²⁵. As elevações na atividade da LDH observadas neste estudo estão de acordo com esses parâmetros sendo observadas ao final do exercício, bem como uma hora depois do encerramento da corrida. Esse incremento nas concentrações de LDH, ocorridos em T2 e T3, apresentou diferença significativa quando confrontado com a coleta em repouso (T1). Esses resultados estão em acordo com as mudanças relatadas nas concentrações de LDH, quando comparadas com baselines de atletas de mountain bike submetidos a corrida de 171 km^{14,15}.

Nos últimos anos, a utilização de ambientes não controlados para verificação das respostas metabólicas ao exercício vem ganhando espaço. A chamada análise esportômica, é usada para entender as modificações celulares e metabólicas induzidas pelo exercício, caracterizando-se por estudos conduzidos diretamente no campo que simulam os reais desafios enfrentados durante as situações esportivas. Devido à singularidade de tal enfoque e às diferenças entre o mesmo e os protocolos experimentais, atribuiu-se à essa abordagem a terminologia “esportômica”²⁶. Nesse sentido, esportômica é o uso do termo ciências “ômicas”, tais como proteômica e metabolômica, associado às análises clínicas laboratoriais clássicas. Recentemente, o termo esportômica começou a ganhar espaço e reconhecimento pela comunidade científica após revisão publicada por Bassini & Cameron²⁷.

É extensamente descrito que o exercício físico prolongado e intenso eleva os níveis de marcadores bioquímicos de lesão muscular. Essa elevação é variável entre os indivíduos e depende do sexo, da raça e do tipo de treinamento físico²⁸. O nível de elevação também depende da duração e da intensidade do exercício, além do condicionamento físico, sendo que a duração da atividade física é um importante fator a ser considerado^{29,30}. No presente estudo, o modelo esportômico de ambiente não controlado fez da competição de Mountain Bike XCO um excelente modelo para entender as respostas metabólicas induzidas pelo exercício intenso. O modelo em questão foi capaz de induzir a elevação das enzimas CK e LDH, apresentando correlação ($r=0,80$) entre ambos. Apesar da não existência de outro trabalho que correlacione CK e LDH utilizando o Mountain Bike como modelo, Bessa et al.²⁵ mostraram a correlação entre as duas enzimas utilizando como modelo o ciclismo em provas de estrada.

De acordo com os dados obtidos, o aumento da atividade da enzima LDH poderá estar ligado a uma conversão mais rápida de piruvato a lactato, bem como à reposição do NAD⁺ para

atender à demanda da degradação anaeróbica⁶. A hiperlactacidemia acumula durante o exercício, sendo um importante combustível como fonte de energia para outros órgãos vitais como o coração e o sistema nervoso central³⁰. No entanto, este metabólito não foi foco deste estudo. Dessa forma, a análise da cinética da LDH em conjunto com a CK, que é tradicionalmente um marcador bioquímico utilizado para mensurar a intensidade do exercício²⁹ pode nos trazer importantes informações para o entendimento do metabolismo durante o exercício.

Conclusões

Os resultados da presente pesquisa levam a concluir que o exercício físico realizado aumentou significativamente a concentração da LDH no plasma sanguíneo, permitindo afirmar que a atividade ocorreu de forma intensa. O exercício, da mesma forma, elevou temporariamente a taxa plasmática de CK, trazendo indicações sobre a extensão da lesão muscular. O estudo das enzimas aqui descritas no momento pós-competição apresenta grande utilidade para o aperfeiçoamento da performance de atletas, principalmente no que tange à avaliação do uso de cargas de treinamento e na estimativa do tempo de recuperação necessário para a próxima sessão de treino/competição.

Dado o apresentado, ao unir-se os referenciais teóricos existentes com o estudo das alterações metabólicas ocorridas no experimento em tela, conclui-se que as enzimas CK e LDH apresentam-se como marcadores de lesão muscular úteis para a avaliação da intensidade do exercício. O acompanhamento da CK pode auxiliar na prescrição de uma recuperação muscular adequada, enquanto o acompanhamento da LDH apresenta utilidade no estudo da resposta do músculo ao treinamento, permitindo obter maiores indicações sobre a adaptação metabólica ao exercício físico.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso – FAMPEMAT pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Referências

1. Costa VP, Oliveira FR de. A resposta de frequência cardíaca durante as competições de “mountain bike cross-country”. *Rev. bras. educ. fís. Esporte*. 2010; 24(3): 379-387.
2. Lareau SA, Mcginnis HD. Injuries in mountain bike racing: frequency of injuries in endurance versus cross country mountain bike races. *Wilderness Environ Med*. 2011 Sep;22(3):222-7.
3. Tee JC, Bosch NA, Lambert MI. Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* (2007); 37: 827–836.
4. Córdova MA, Martorell PM, Sureda GA, Tur Marí JA, Pons B. Changes in circulating cytokines and markers of muscle damage in elite cyclists during a multi-stage competition. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2015 Sep;35(5):351-8.
5. Cordova MA, MonserraT J, Villa G, Reyes E, Soto MA. Effects of AM3 (Inmunoferon) on increased serum concentrations of interleukin-6 and tumour necrosis factor receptors I and II in cyclists. *J Sports Sci* (2006); 24: 565–573.
6. Rebalka IA, Hawke TJ. Potential biomarkers of skeletal muscle damage. *Biomark Med*. 2014;8(3):375-8.
7. Katiriji B, Al Jaber MM. Creatine Kinase revisited. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2001;2(3):158-64
8. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E; Tumour and Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol*. 2003;24(4):199-202.
9. Bassini-Cameron A, Sweet E, Bottino A, Bittar C, Veiga C, Cameron LC. Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions. *Br J Sports Med*. 2007;41(8):523-30.



10. Foschini D, Prestes J, Charro MA. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. *Rev. Bras. Cineantropom Desenvolvimento Hum.* 2007; 9(1):101-6.
11. Russ DW, Lanza IR. The impact of old age on skeletal muscle energetics: supply and demand. *Curr Aging Sci.* 2011;4(3):234-47.
12. Becker J, Runer A, Neunhäuserer D, Frick N, Resch H, Moroder P. A prospective study of downhill mountain biking injuries. *Br J Sports Med.* 2013 May;47(7):458-62.
13. Roberts DJ, Ouellet JF, Sutherland FR, Kirkpatrick AW, Lall RN, Ball CG. Severe street and mountain bicycling injuries in adults: a comparison of the incidence, risk factors and injury patterns over 14 years. *Can J Surg.* 2013 Jun;56(3):E32-8.
14. Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguiló A, Rodrigues-Marroyo JA, Villa G, et al. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem.* 2006;17(10):665-71.
15. Nishii T, Umemura Y, Kitagawa K. Full suspension mountain bike improves off-road cycling performance. *J Sports Med Phys Fitness.* 2004;44(4):356-60.
16. Skenderi KP, Kavouras SA, Anastasiou CA, Yiannakouris N, Matalas AL. Exertional Rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38(6):1054-7.
17. Pokora I, Kempa K, Chrapusta SJ, Langfort J. Effects of downhill and uphill exercises of equivalent submaximal intensities on selected blood cytokine levels and blood creatine kinase activity. *Biol Sport.* 2014;31(3):173-8
18. Zajac A, Poprzecki S, Maszczyk A, Czuba M, Michalczyk M, Zydek G. The effects of a ketogenic diet on exercise metabolism and physical performance in off-road cyclists. *Nutrients.* 2014;27(7):2493-508.
19. Smith LL. Cytokines hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sport Exercise.* 2000. Mar; 32(2): 317-31
20. Smith LL. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? *J. Strength Cond. Res.* 2004. Feb; 18(1): 185-93.
21. Ortega FB, Ruiz JR, Gutiérrez A, Castillo MJ. Extreme mountain bike challenges may induce sub-clinical myocardial damage. *J Sports Med Phys Fitness.* 2006;46(3):489-93.
22. Pfeiffer RP, Kronisch RL. Off road cycling injuries. An overview. *Sports Med.* 1995;19(50):311-25.
23. Kim HJ, Lee YH, Kim CK. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. *Eur J Appl Physiol.* 2007;99(4):443-7.
24. Colombini A, Corsetti R, Machado M, Graziani R, Lombardi G, Lanteri P, Banfi G. Serum creatine kinase activity and its relationship with renal function indices in professional cyclists during the Giro d'Italia 3-week stage race. *Clin J Sport Med.* 2012 Sep;22(5):408-13.
25. Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LS, Bassini-Cameron A. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med.* 2008;42(11):889-93.
26. Resende NM, de Magalhães Neto AM, Bachini F, de Castro LE, Bassini A, Cameron LC. Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. *OMICS.* 2011;15(10):695-704.
27. Bassini A, Cameron LC. Sportomics: building a new concept in metabolic studies and exercise science. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(4):708-16.
28. Munjal DD, McFadden JA, Matix PA, Coffman KD, Cattaneo SM. Changes in serum myoglobin, total creatine kinase, lactate dehydrogenase and creatine kinase MB levels in runners. *Clin Biochem.* 1983;16(3):195-9.
29. Kłapcińska B, Waśkiewicz Z, Chrapusta SJ, Sadowska-Krępa E, Czuba M, Langfort J. Metabolic responses to a 48-h ultra-marathon run in middle-aged male amateur runners. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(11):2781-93.
30. Wirnitzer KC, Kornexl E. Exercise intensity during an 8-day mountain bike marathon race. *Eur J Appl Physiol.* 2008;104(6):999-1005.