

LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA INDUZIDA POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO E INABITUAL

P. Magalhães¹, T. Barbosa¹, V. Lopes¹, M. Guerra², M. Neuparth³, J. Duarte³

¹ Escola Superior de Educação, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal;

² Hospital Distrital de Bragança, Portugal;

³ Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física, Universidade do Porto, Portugal.

e-mail: pmaga@ipb.pt

RESUMO

Após a realização de exercícios exaustivos e/ou inabituais, tem sido observado um aumento da concentração sanguínea de leucócitos, especialmente de neutrófilos. No entanto, esta constatação não tem uma correspondência directa no estado de activação destas células. Assim, os objectivos deste estudo foram: (1) Induzir diferentes intensidades de agressão/lesão muscular, nos elementos da amostra estudada; (2) Analisar as alterações agudas das concentrações sanguíneas de neutrófilos, induzidas por diferentes protocolos de exercício físico exaustivo e inabitual; (3) Analisar a actividade dos neutrófilos sanguíneos após a realização dos diferentes protocolos de exercício físico. A amostra foi constituída por 20 indivíduos do sexo masculino, não treinados, tendo sido divididos em dois grupos (n=10 cada). O grupo A (21,7±1,7 de idade) executou um exercício de elevação de um haltere (70% de 1RM), realizando apenas força concêntrica; o grupo B (21,8±1,7 de idade) executou um exercício de abaixamento do haltere (70% de 1RM), realizando apenas força excêntrica. Foram medidas a Força Máxima Isométrica Voluntária (FMIV), a concentração plasmática da Creatina Kinase (CK) - como indicadores de lesão muscular -, a concentração sanguínea de neutrófilos e a actividade plasmática da lactoferrina. Todas as avaliações foram realizadas nos momentos: pré-exercício, 0 horas, 1 hora, 3 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o exercício. A observação dos sinais e sintomas de lesão muscular, sugerem ter ocorrido maiores índices de lesão muscular no grupo B, relativamente ao grupo A, tendo evidenciado uma diminuição mais acentuada da FMIV e uma maior actividade da CK, em quase todos os momentos pós-exercício do protocolo experimental. Embora a variação percentual da concentração sanguínea de neutrófilos tenha sido superior no grupo B em todos os momentos, foi observada uma maior actividade plasmática da lactoferrina do grupo A, nos momentos 0 horas, 1 hora, 3 horas, 24 horas e 48 horas após o exercício. Estas observações sugerem que embora tenham sido observados indicadores indirectos de lesão muscular mais acentuados no grupo B após o exercício, assim como uma maior concentração sanguínea de neutrófilos, foi o grupo A que evidenciou uma maior actividade dos neutrófilos ao nível sistémico. Em conclusão, a actividade plasmática da lactoferrina não está correlacionada com o maior grau de lesão muscular evidenciado pelo grupo B e, a evidência de uma maior concentração percentual de neutrófilos no sangue, não implica que os mesmos estejam num estado activo.

INTRODUÇÃO

O exercício físico exaustivo e/ou inabitual, tem vindo a ser referido como uma fonte de stress para o tecido muscular esquelético, em especial aquele com predomínio de contracções excêntricas (Ebbeling e Clarkson, 1989; Duarte et al., 1999). Este tipo de lesão muscular é, normalmente, caracterizado por alterações histológicas ao nível estrutural e ultra-estrutural e por alterações bioquímicas, com um carácter reversível e focalizado (Pedersen e Bruunsgaard, 1995; Newham et al., 1987).

Tem sido descrito por vários investigadores (Almekinders e Almekinders, 1992; Northoff et al., 1995) que o exercício físico do tipo excêntrico é normalmente acompanhado por alterações fisiológicas sistémicas semelhantes, em alguns aspectos, às induzidas por traumas e infecções. Desta forma, após a realização de exercícios com estas características, é possível observar um aumento das concentrações sanguíneas de leucócitos (MacIntyre et al., 1996; Malm et al., 1999; Van Eeden et al., 1999), com uma maior expressão no aumento das concentrações sanguíneas de neutrófilos (Fielding et al., 1993; Roubenoff et al., 1999; Fielding et al., 2000).

A lactoferrina constitui uma proteína com actividade antibacterial que, quando libertada pelos neutrófilos ao nível sistémico, poderá representar um bom indicador da variação do estado de activação destas células (Cannon et al., 1990). O facto, por si só, de as concentrações sanguíneas de neutrófilos aumentarem após a realização de exercícios exaustivos do tipo excêntrico, não implica que os mesmos estejam num estado activo.

Os objectivos deste estudo foram: (1) Induzir diferentes intensidades de agressão/lesão muscular, nos elementos da amostra estudada; (2) Analisar as alterações agudas das concentrações sanguíneas de neutrófilos, induzidas por diferentes protocolos de exercício físico exaustivo e inabitual; (3) Analisar a actividade dos neutrófilos sanguíneos após a realização dos diferentes protocolos de exercício físico.

MATERIAL E MÉTODOS

Colaboraram neste estudo, de forma voluntária, 20 indivíduos do sexo masculino, alunos do 1º, 2º, e 3º anos do curso de Professores do Ensino Básico variante de Educação Física, da Escola Superior de Educação do Instituto Politécnico de Bragança. Para além da componente prática de algumas disciplinas do curso de Educação Física, estes elementos não praticavam nenhuma outra actividade física e desportiva. Antes do protocolo experimental foi solicitado, aos elementos constituintes da amostra, que não realizassem qualquer tipo de actividade física duas semanas antes, e durante o tempo de duração do mesmo.

Os indivíduos foram distribuídos em dois grupos (A e B), de forma aleatória, com n=10 elementos em cada.

Quadro 1. Médias e desvios-padrão das variáveis idade, altura, peso, uma repetição máxima (1RM) e 70 % de uma repetição máxima (70%), dos elementos dos dois grupos.

| | n | Idade | Altura | Peso | 1 RM | 70% |
|---------|----|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Grupo A | 10 | 21,70±1,70 | 171,35±5,34 | 68,26±11,70 | 33,75±6,61 | 23,63±4,63 |
| Grupo B | 10 | 21,80±1,69 | 170,45±7,07 | 68,07±9,16 | 33,75±6,29 | 23,63±4,40 |

Foi realizada, 7 dias antes da execução do exercício proposto, a determinação de uma repetição máxima (1RM) em ambos os grupos.

Para o grupo A, o protocolo experimental consistiu na execução de um exercício até à exaustão, da elevação de um haltere com ambos os braços, utilizando uma resistência de 70% de (1RM) realizando, assim, apenas contracções concêntricas dos músculos flexores de ambos os braços. Para que os indivíduos realizassem apenas este tipo de contracções, foram assistidos por dois elementos de apoio que, colocados em cada uma das extremidades do haltere, realizaram o movimento contrário (abaixamento do haltere).

Para o grupo B, o protocolo experimental consistiu também na execução de um exercício até à exaustão, mas de abaixamento do haltere, com uma resistência de 70% de 1RM, realizando apenas contracções excêntricas dos músculos flexores dos braços. Ao contrário do exemplo anterior, os dois elementos de apoio realizaram o movimento de elevação do haltere.

Ambos os exercícios propostos foram realizados com os indivíduos a adoptarem uma posição sentada, com ambos os braços apoiados na sua região posterior. Desta forma foi possível eliminar possíveis contracções parasitas, não directamente envolvidas na realização do movimento.

O movimento, no grupo A, consistiu na flexão completa dos cotovelos e, no grupo B, na extensão completa dos mesmos.

Em ambos os exercícios do protocolo experimental os indivíduos acompanharam o ritmo estabelecido, executando um movimento em cada 2 segundos, havendo lugar a uma pausa de 30 segundos entre as séries para descanso quando, por fadiga muscular, os sujeitos não conseguiam acompanhar o ritmo de execução estipulado. Para o controlo da velocidade de execução dos exercícios, os indivíduos foram auxiliados por um metrónomo com uma cadência de dois segundos.

Os exercícios foram realizados até à exaustão, tendo sido definitivamente interrompidos quando, após uma pausa de 30 segundos, existiu manifesta incapacidade de os indivíduos realizarem mais de duas repetições, durante três séries consecutivas.

Previamente à realização do protocolo experimental, todos os sujeitos da amostra observaram uma demonstração da correcta execução do exercício, realizando em seguida uma adaptação prévia à situação experimental. Pretendeu-se, assim, efectuar algumas correcções, de forma a uniformizar a realização dos exercícios.

Foram realizadas medições da força máxima isométrica voluntária (FMIV), da creatina kinase (CK), da concentração sanguínea de neutrófilos e da actividade plasmática da lactoferrina, antes da realização dos exercícios (pré-exercício), logo após (0 horas), 1 hora após, 3 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas após os exercícios físicos.

As colheitas foram realizadas através de punção venosa em ambos os braços alternadamente, após desinfeção da região antecubital anterior com álcool a 95%. Foram retirados

5ml de sangue venoso de uma veia antecubital, utilizando seringas BRAUN esterilizadas, com agulhas MICROLANCE 3.

As amostras foram parcialmente recolhidas para tubos de hemograma de 3ml com EDTA (dipotásico) que, após agitação suave, foram destinados à quantificação neutrofilica, através de um contador de células de cinco populações, modelo SYSMEX-SF-3000). O restante sangue de cada indivíduo (2ml) foi depositado em tubos de ensaio de 3ml com citrato de sódio a 3,8%, de onde posteriormente, após centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos, foi retirado o plasma para a medição da CK, através de um Refreton® Analyser da Boehringer Mannheim (onde foram utilizadas fitas com reagentes específicos), e da lactoferrina, utilizando um leitor de placas (kit Bioxytech MPO Enzyme Immunoassay – cat. n.º 21015).

A FMIV foi avaliada utilizando um dinamómetro manual, modelo TSD121C da Biopac Systems, com os indivíduos a adoptarem uma postura sentada, com ambos os braços apoiados na sua região posterior, formando um ângulo de 90°.

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa Statview 4.5 para Windows. Foi utilizada uma estatística descritiva dos dados, com média e desvio-padrão. A análise para cada grupo entre os diferentes momentos de cada variável e entre cada momento e a situação pré-exercício, foi realizada através da ANOVA de Medidas Repetidas.

Para a comparação entre os grupos nos diferentes momentos estudados foi utilizado o t-teste (emparelhado).

Foi ainda determinado o coeficiente de correlação de Pearson (r) para descrever o grau de relação e/ou associação entre algumas das variáveis consideradas.

O nível de significância adoptado foi de 5%.

Todos os valores, à excepção do número de repetições por série efectuadas durante o exercício, foram calculados e apresentados em valores percentuais, utilizando a fórmula:

$$\text{Porcentagem de Variação} = \frac{\text{Valor final} - \text{Valor inicial}}{\text{Valor inicial}} \times 100$$

RESULTADOS

Na análise do quadro 2, é possível observar relativamente ao tempo total de exercitação, que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,01$), com o grupo B a realizar um maior número de repetições. As diferenças inter-grupais verificadas no tempo total de exercitação concêntrica ($p < 0,01$) e excêntricas ($p < 0,01$) devem-se ao facto do grupo A ter realizado apenas contracções concêntricas e o grupo B apenas contracções do tipo excêntrico. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no tempo total de repouso.

Quadro 2. Médias e desvios-padrão, em segundos, do tempo total de execução, do tempo total de execução concêntrica, do tempo total de execução excêntrica e do tempo total de repouso entre as séries, realizados pelos elementos dos dois grupos.

| | Grupo A | p | Grupo B |
|-------------------------------------|-----------------|-------|-----------------|
| Tempo total de execução | 91,40 ± 48,07 | <0,01 | 372,60 ± 97,83 |
| Tempo total de execução concêntrica | 1,40 ± 48,07 | <0,01 | 0 ± 0 |
| Tempo total de execução excêntrica | 0 ± 0 | <0,01 | 372,60 ± 97,83 |
| Tempo total de repouso | 342,00 ± 240,08 | | 483,00 ± 136,71 |

p – valor de significância.

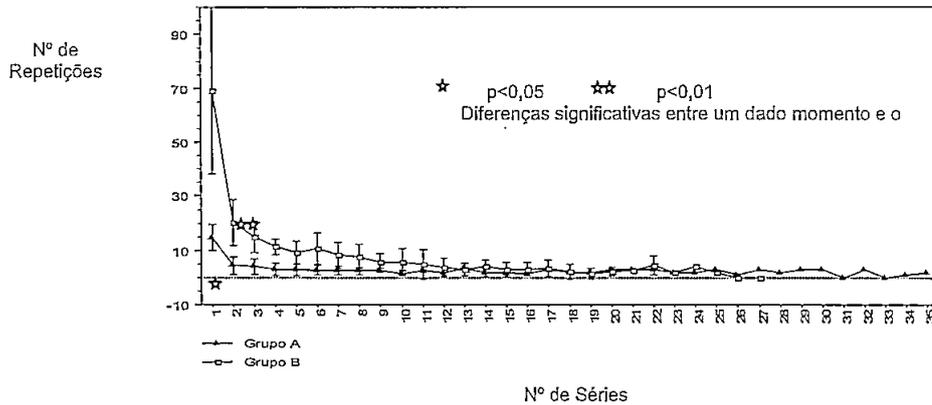


Figura 1. Médias e respectivos desvios-padrão do número de repetições por série, efectuadas por cada grupo, durante o protocolo experimental.

No número médio de repetições de ambos os exercícios, o grupo B apresenta um maior número médio da 1ª à 12ª série, comparativamente ao grupo A. O grupo B, embora tenha realizado um maior número de repetições nas primeiras 12 séries, executou o exercício apenas até à 27ª série, com apenas 1 elemento. O grupo A terminou o exercício à 35ª série, também com apenas 1 elemento. Todos os indivíduos da amostra realizaram repetições até à 6ª série. A partir da 23ª série, apenas 2 elementos prolongaram o exercício, pertencendo 1 ao grupo A e outro ao grupo B.

Quadro 3. Valores médios e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da força máxima isométrica voluntária, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

| | Pré-exerc. | 0h | 1h | 3h | 24h | 48h | 72h |
|---------|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|----------------|
| Grupo A | 0 ± 0 | -22,08 ± 8,00 [■] | -16,85 ± 7,03 [■] | -14,05 ± 8,06 [■] | -6,99 ± 5,81 [■] | -3,01 ± 8,81 | -1,01 ± 9,36 |
| | | p<0,01 | p<0,01 | p<0,01 | p<0,01 | p<0,01 | p<0,01 |
| Grupo B | 0 ± 0 | -55,09 ± 9,32 [■] | -57,50 ± 8,86 [■] | -55,60 ± 8,32 [■] | -59,06 ± 9,60 [■] | -56,45 ± 19,19 | -59,47 ± 11,37 |

■ p<0,05; ■■ p<0,01 - Diferenças significativas intra-grupais entre cada momento e a situação pré-exercício.

Na variação percentual da FMIV, foram encontradas diferenças significativas inter-grupais em todos os momentos considerados após os exercícios.

Na evolução percentual da FMIV ao longo dos vários momentos do protocolo experimental, é possível observar um decréscimo significativo em ambos os grupos do momento pré-exercício para as 0 horas, sendo mais acentuado no grupo B.

Enquanto que no grupo A, observam-se posteriormente melhorias progressivas a partir das 0 horas, até atingir os valores iniciais às 72 horas, no grupo B, verificam-se ligeiras oscilações da força muscular, sem que haja melhorias.

Se o primeiro decréscimo, em ambos os grupos, pode ser explicado por factores de origem metabólica associados a factores de lesão muscular, a partir das 24 horas no grupo B, poderão ser os mecanismos de reacção inflamatória tecidual, os principais responsáveis pela diminuição da função muscular.

Quadro 4. Valores médios e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade plasmática da CK, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

| | Pré-exerc. | 0h | 1h | 3h | 24h | 48h | 72h |
|---------|------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Grupo A | 0 ± 0 | 29,1 ± 21,6 [▯] | 53,4 ± 33,6 ^{▯▯} | 117,3 ± 97,1 [▯] | 252,1 ± 254,8 [▯] | 134,1 ± 183,2 [▯] | 213,6 ± 567,1 [▯] |
| Grupo B | 0 ± 0 | 6,3 ± 33,4 | 42,4 ± 29,1 [▯] | 126,2 ± 143,8 [▯] | 1509,6 ± 2076,5 [▯] | 1958,7 ± 1815,2 [▯] | 3833,3 ± 4790,8 [▯] |

▯ p<0,05; ▯▯ p<0,01 - Diferenças significativas intra-grupais entre cada momento e a situação pré-exercício.

A actividade plasmática da CK aumenta de forma mais ou menos progressiva em ambos os grupos, comparativamente à situação pré-exercício.

A partir das 3 horas após o exercício até às 72 horas, o grupo B evidencia uma evolução percentual acima do grupo A, com diferenças significativas entre os grupos às 48 e 72 horas.

Este aumento mais acentuado no grupo B a partir das 3 horas, sugere a existência de uma elevada agressão sobre as fibras musculares, levando à sua ruptura e consequente libertação destas enzimas para o plasma.

Os valores da CK em ambos os grupos, sugerem uma grande variabilidade inter-individual, demonstrada pelos elevados desvios-padrão.

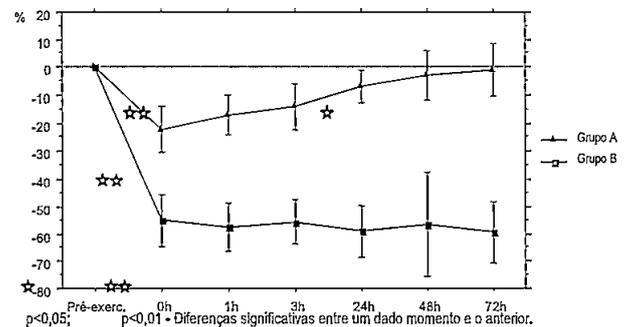
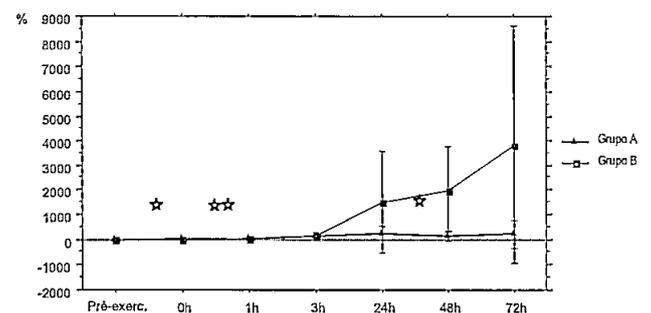


Figura 2. Médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da força máxima isométrica voluntária, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.



▯ p<0,05; ▯▯ p<0,01 - Diferenças significativas entre um dado momento e o anterior.

Figura 3. Médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da actividade plasmática da CK, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

Quadro 5. Valores médios e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da concentração sanguínea de neutrófilos, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

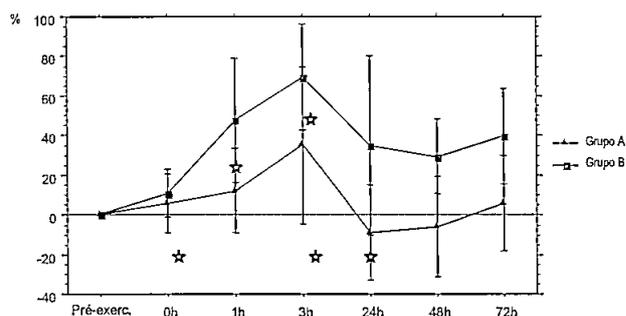
| | Pré-exerc. | 0h | 1h | 3h | 24h | 48h | 72h |
|---------|------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Grupo A | 0 ± 0 | 5,77 ± 14,86 | 12,11 ± 21,51 | 35,00 ± 39,71 [▫] | -9,23 ± 23,85 | -6,15 ± 25,40 | 5,60 ± 23,99 |
| | | | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 |
| Grupo B | 0 ± 0 | 10,85 ± 12,03 [▫] | 47,47 ± 31,58 [▫] | 69,45 ± 26,71 ^{▫▫} | 34,93 ± 45,16 [▫] | 29,35 ± 18,68 ^{▫▫} | 39,63 ± 24,18 ^{▫▫} |

▫ p<0,05; ▫▫ p<0,01 - Diferenças significativas intra-grupais entre cada momento e a situação pré-exercício.

Também na variação da concentração sanguínea de neutrófilos, verifica-se uma evolução máxima 3 horas após o exercício em ambos os grupos.

Este pico máximo poderá estar relacionado com um aumento da libertação destas células pela medula óssea, essencialmente devido à influência do cortisol.

O decréscimo destas concentrações entre as 3 e as 24 horas após o exercício, sugere uma marginalização e consequente infiltração tecidal destas células para as áreas lesadas, mediante a influência de substâncias quimiotácticas.



★ p<0,05 - Diferenças significativas entre um dado momento e o anterior.

Figura 4. Médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da concentração sanguínea de neutrófilos, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

Quadro 6. Valores médios e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da concentração plasmática da Lactoferrina, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

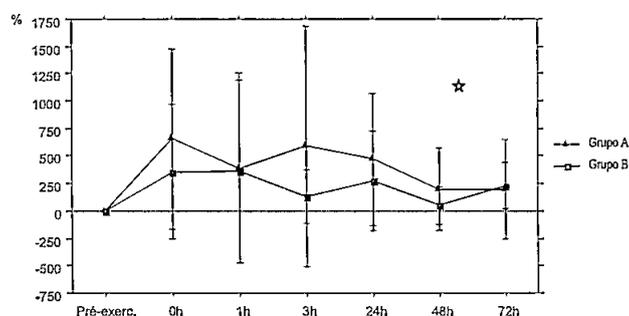
| | Pré-exerc. | 0h | 1h | 3h | 24h | 48h | 72h |
|---------|------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| Grupo A | 0 ± 0 | 655,28 ± 822,35 | 389,83 ± 866,55 | 590,08 ± 1093,50 | 472,00 ± 600,20 | 199,37 ± 371,28 | 194,59 ± 450,30 |
| Grupo B | 0 ± 0 | 353,94 ± 611,06 | 359,54 ± 832,99 | 131,78 ± 244,31 | 275,31 ± 450,05 | 52,72 ± 171,10 | 229,15 ± 207,65 [▫] |

▫ p<0,05; ▫▫ p<0,01 - Diferenças significativas intra-grupais entre cada momento e a situação pré-exercício.

Relativamente ao estado de activação dos neutrófilos ao nível sistémico, determinado a partir da actividade plasmática da lactoferrina, os resultados mostram claramente um aumento importante deste mediador químico no plasma, em ambos os grupos.

O grupo A, embora tenha evidenciado resultados inferiores nos parâmetros indirectos de lesão muscular, apresenta, em quase todos os momentos considerados, valores mais elevados da activação destas células ao nível sistémico.

Por outro lado, parece não haver uma relação directa entre a severidade da lesão e a actividade plasmática da lactoferrina.



★0,05 - Diferenças significativas entre um dado momento e o anterior.

Figura 5. Médias e respectivos desvios-padrão da percentagem de variação da concentração plasmática de lactoferrina, em ambos os grupos, nos diferentes momentos de avaliação.

CONCLUSÕES

Da análise dos resultados observados neste estudo, podemos retirar as seguintes conclusões:

- Foi observada uma grande variabilidade inter-individual no seio de cada grupo da actividade plasmática da CK;
- Após a realização do exercício excêntrico pelo grupo B, não foram observadas melhorias nos níveis de FMIV, até 72 horas após o exercício;
- O grupo B evidenciou valores superiores da concentração sanguínea de neutrófilos em todos os momentos considerados após as 0 horas;
- A actividade plasmática da lactoferrina foi sempre superior no grupo A, com excepção do momentos 72 horas;
- A actividade plasmática da lactoferrina não se correlaciona com a severidade da lesão muscular;
- A maior concentração sanguínea de neutrófilos, observada no grupo B em todos os momentos pós-exercício, não corresponde a uma activação destas células.

REFERÊNCIAS

- Almekinders, L.C.; Almekinders, S.V. (1992): Immune function in exercise-induced injuries. In: R. Watson e M. Eisinger (eds.), *Exercise and disease*, pp. 149-158. CRC Press. USA.
- Cannon, J.G.; Orencole, S.F.; Fielding, R.A.; Meydani, M.; Meydani, S.N.; Fiatarone, M.A.; Blumberg, J.B.; Evans, W.J. (1990): Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. *Am. J. Physiol.* 259: R1214-R1219.
- Duarte, J.A.; Magalhães, J.F.; Monteiro, L.; Almeida-Dias, A.; Soares, J.M.; Appell, H.J. (1999): Exercise-induced signs of muscle overuse in children. *J. Sports Med.* 20: 103-108.
- Ebbeling, C.B.; Clarkson, P.M. (1989): Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med.* 7: 207-234.
- Fielding, R.A.; Manfredi, T.J.; Ding, W.; Fiatarone, M.A.; Evans, W.J.; Cannon, J.G. (1993): Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 β accumulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 265: R166-172.
- Fielding, R.A.; Violan, M.A.; Svetkey, L.; Abad, L.W.; Manfredi, T.J.; Cosmas, A.; Bean, J. (2000): Effects of prior exercise on eccentric exercise-induced neutrophilia and enzyme release. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: 359-364.
- MacIntyre, D.L.; Reid, W.D.; Lyster, D.M.; Szasz, I.J.; McKenzie, D.C. (1996): Presence of WBC, decreased strength, and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. *J. Appl. Physiol.* 80: 1006-1013.
- Malm, C.; Lenkei, R.; Sjödín, B. (1999): Effects of eccentric exercise on the immune system in man. *J. Appl. Physiol.* 86: 461-468.

- Newham, D.J.; Jones, D.A.; Clarkson, P.M. (1987): Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. *J. Appl. Physiol.* 63: 1381-1386.
- Northoff, H.; Enkel, S.; Weinstock, C. (1995): Exercise, injury, and immune function. *Exerc. Immun. Rev.* 1: 1-25.
- pedersen, b.k.; bruunsgaard, H. (1995): How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Med.* 19: 393-400.
- Roubenoff, R.; Skolnik, P.R.; Shevitz, A.; Snyderman, L.; Wang, A.; Melanson, S.; Gorbach, S. (1999): Effect of a single bout of acute exercise on plasma human immunodeficiency virus RNA levels. *J. Appl. Physiol.* 86: 1197-1201.
- Van Eeden, S.F.; Granton, J.; Hards, J.M.; Moore, B.; Hogg, J.C. (1999): Expression of the cell adhesion molecules on leucocytes that demarginate during acute maximal exercise. *J. Appl. Physiol.* 86: 970-976.