

Suzana Lima de Oliveira

**RESTRIÇÃO CALÓRICA E SUPLEMENTAÇÃO COM
VITAMINA E
NO RATO SUBMETIDO AO EXERCÍCIO FÍSICO
EXAUSTIVO**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência da
Nutrição*

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan
Orientador

CAMPINAS-SP

1999

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

OL4r Oliveira, Suzana Lima de
Restrição calórica e suplementação com vitamina E
no rato submetido ao exercício físico exaustivo. /
Suzana Lima de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Jaime Amaya-Farfan.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Vitamina E. 2. Exercícios. 3. Alimentos –
Conteúdo calórico. I. Amaya-Farfan, Jaime. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

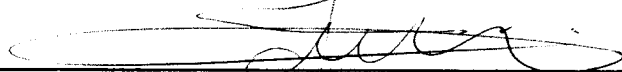
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan
Universidade Estadual de Campinas
Orientador



Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof. Dr. José Roberto Moreira de Azevedo
Universidade Estadual de São Paulo
Membro



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof.ª Dr.ª Semíramis Martins Álvares Domene
Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Membro

Prof.ª Dr.ª Carla Roberta Oliveira Carvalho
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
Universidade Estadual de Campinas
Membro

*A meus pais, esteio de minha existência,
e minhas irmãs, companheiras de jornada,
minha família, meu lar.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, através de sua orientação, amizade e gentileza;

A Derlange Belizário Diniz, amiga e colega de curso, parceira constante de trabalho, pelo companheirismo e dedicação na realização deste empreendimento conjunto;

A Prof^ª Dr^ª Denise Vaz de Macedo e sua equipe, pelo apoio e disponibilidade oferecidos em várias das etapas dessa pesquisa, sem os quais a mesma não se teria tomado possível;

A Prof. Dr. Everardo Magalhães Cameiro, por sua constante amabilidade e pela realização, juntamente com Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro e o Sr. Lécio Domingos Teixeira, das determinações de insulina;

A Prof^ª. Dr^ª Débora de Queiroz Tavares e Yara F. Onório, pela colaboração técnica e especial atenção dispensadas em várias etapas de nosso trabalho;

Aos funcionários e amigos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, especialmente Carla de Marco Gregghi e Iná Aparecida C. Dos Santos, pelo apoio às nossas atividades no Laboratório de Fontes Protéicas, Eliete Carvalho Leite e Esmeralda de Faria Melo, pela colaboração no trabalho realizado no Biotério, Francisco Carraro, pelo auxílio nas atividades desenvolvidas no Laboratório Central, e Liana Alba C. Dawwood e Soely Maria P. M. Reis, pela colaboração e prestabilidade constantes. A todos pela amizade, carinho e atenção dedicados;

Aos amigos e colegas de Laboratório, que ajudaram a tomar o trabalho um prazer, especialmente a Beatriz, Florência, Luciana e Érika, companheiras inesquecíveis nessa longa jornada de curso;

A Luís Abecia Soria, pela dedicada orientação e colaboração na utilização do equipamento de eletroforese capilar;

Às amigas e colegas Carla e Maria, Míriam e Rosângela, por todos os momentos especiais compartilhados, de trabalho e lazer, no desenrolar desse meu caminho;

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões na elaboração do trabalho de tese;

Aos amigos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, por propiciarem a realização deste trabalho, oferecendo apoio e tranqüilidade para sua conclusão;

A CAPES/PICD e FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	1
<i>Summary</i>	4
1. <i>Introdução</i>	6
1.1. <i>O estresse oxidativo</i>	7
1.2. <i>Dieta e estresse oxidativo: efeitos da restrição calórica</i>	11
1.3. <i>Dieta e estresse oxidativo: efeitos da Suplementação com vitamina E</i>	17
1.4: <i>Exercício e estresse oxidativo</i>	21
2. <i>Objetivos</i>	27
2.1. <i>Geral</i>	28
2.2. <i>Específicos</i>	28
3. <i>Artigo 1</i>	29
3.1. <i>Abstract</i>	30
3.2. <i>Introdução</i>	31
3..3 <i>Material e Métodos</i>	32
3.4. <i>Resultados</i>	40

3.5. Discussão.....	58
3.6. Referências Bibliográficas.....	66
4. Artigo 2.....	72
4.1. Abstract.....	73
4.2. Introdução.....	74
4.3. Material e Métodos.....	75
4.4. Resultados.....	80
4.5. Discussão.....	92
4.6. Referências Bibliográficas.....	99
5. Conclusões.....	103
6. Referências Bibliográficas.....	107

Resumo

A restrição calórica e a suplementação com vitamina E consistem em condutas dietéticas com potencial efeito antioxidante para limitar o prejuízo oxidativo aos tecidos do organismo, promovido por fatores como o exercício físico. Consistiu o objetivo do presente estudo comparar os efeitos da restrição calórica e da suplementação com vitamina E frente ao estresse oxidativo induzido pelo exercício exaustivo, investigando-se ainda seus efeitos nos substratos energéticos exigidos para aquela atividade. Para tanto, ratos *Wistar* machos de 11 semanas de idade foram divididos em três grupos de dieta: *controle* (AIN-93M), *restrita* (30% de restrição calórica, em carboidratos) ou *suplementada* (controle adicionada de 1425 UI de *all-rac- α -tocoferil acetato*). Após 5 meses nesses regimes dietéticos, os animais em cada grupo de dieta foram subdivididos em duas categorias: *exercitados* e *não exercitados*. Antes do sacrifício, estando todos os ratos em jejum, os animais do primeiro subgrupo foram submetidos, sem treinamento anterior, à corrida em esteira, até exaustão, registrando-se o tempo para alcançar tal condição. Posteriormente, efetuaram-se as determinações de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e carbonilas protéicas, para avaliação do prejuízo oxidativo, e das substâncias antioxidantes glutatona (GSH) e vitamina E, em fígado, músculo ou plasma; mediram-se ainda glicogênio hepático e muscular, glicose e insulina plasmática, bem como lactato sanguíneo. A restrição calórica aumentou a resistência à exaustão, enquanto a suplementação com vitamina E apresentou uma tendência em diminuí-la. A concentração de TBARS foi reduzida, em fígado e músculos, pela suplementação com aquela vitamina, ao mesmo tempo que não sofreu nenhum efeito da restrição calórica. A dieta, por outro lado, não exerceu influência sobre a concentração de carbonilas protéicas. No presente caso, o exercício parece não ter promovido estresse oxidativo, como se percebeu pelos valores não alterados dos indicadores de prejuízo oxidativo. A concentração de vitamina E apresentou-se aumentada naqueles animais que receberam suplementação da vitamina, em todos os tecidos analisados. O exercício promoveu redução da vitamina E plasmática, não alterando sua concentração em fígado e músculo. O teor de GSH não sofreu

influência de nenhum dos parâmetros analisados. A restrição calórica produziu aumento do glicogênio hepático, em animais não exercitados, enquanto que, no grupo exercitado os animais suplementados apresentaram maior concentração de glicogênio muscular. O exercício exaustivo associado à restrição calórica acarretou diminuição do glicogênio hepático, enquanto que no músculo essa redução apresentou-se independente da dieta administrada. Similar associação entre restrição e exercício ocasionou redução da glicemia. A concentração de insulina plasmática e lactato sanguíneo não sofreram influência da dieta, alterando-se apenas em razão do exercício aplicado, havendo uma redução no primeiro e um aumento no segundo parâmetro. Esses resultados nos permitiram concluir que a restrição calórica, embora não diminuindo o prejuízo lipídico, proporcionou maior resistência à exaustão, a qual correlacionou-se com a maior reserva hepática de glicogênio observada nos animais daquele grupo. Por outro lado, o fato de os animais com restrição e exercitados não apresentarem aumento da peroxidação lipídica pode ser interpretado como um aumento relativo da resistência à oxidação exacerbada, visto que a quantidade de trabalho físico executado foi consideravelmente maior. A suplementação com vitamina E, de forma diversa, embora tenha reduzido a peroxidação lipídica nos tecidos analisados, apresentou uma tendência a piorar a performance física. Percebe-se, portanto que as dietas empregadas com a mesma proposta, de potencial efeito protetor, apresentaram efeitos distintos. Entretanto, investigações adicionais são necessárias, envolvendo especialmente os diferentes modelos de dieta utilizados, para melhor compreensão dos fenômenos observados.

Palavras chave: restrição calórica, vitamina E, estresse oxidativo, exercício.

Summary

The present study was designed to investigate the effects of caloric (carbohydrate) restriction (CR) and vitamin E supplementation on stress oxidative and others exercise-induced metabolic modifications. Male *Wistar*, eleven-wk old rats were fed control (C)(AIN-93M), or restricted amounts of a modified control (R), or control plus vitamin E (1425 UI of all-*rac*- α -tocopheryl acetate)(S) diets. After feeding the diets for five months, the animals in each group were divided into exercised (E) and non-exercised (NE) categories. Before being killed, the rats of the exercised category were required to run on a treadmill to exhaustion. The time to reach exhaustion was registered and lipid peroxidation (thiobarbituric acid-reactive substances [TBARS]), protein damage (reactive protein carbonyls), GSH (glutathion) and vitamin E in *gastrocnemius*, liver or plasma, and hepatic and muscular glycogen, plasma glucose, insulin and lactate were determined. Caloric restriction increased resistance to exhaustion, whereas vitamin E supplementation presented tendency to decrease it. Lipid peroxidation was significantly lower in livers and muscles of rats fed S diet when compared to the others groups. Exercise slightly decreased TBARS in muscle, whereas GSH in liver and reactive protein carbonyls in liver and muscle were similar for all groups. Vitamin E supplementation increased vitamin E levels in liver, muscle and plasma, but exercise decreased it in plasma. Caloric restriction increased hepatic glycogen, but did not produce any effect in the insulin and lactate concentrations. When associated to exercise, CR lowered the glycemic levels. Caloric (carbohydrate) restriction increased resistance to exhaustive without depleting vitamin E stores or exacerbating oxidative damage. Although vitamin E supplementation showed a protective effect against lipid peroxidation, which was not afforded by caloric restriction, there was a decreased physical endurance, when compared to caloric restriction, but not to the normal diet. The biochemical basis for the choking effect shown by vitamin E supplementation is not known.

Key words: caloric restriction, vitamin E, oxidative stress, exercise.

1. Introdução

Dieta e atividade física constituem dois importantes fatores a influenciar a qualidade de vida do homem. Seus diversos modelos e suas implicações, separada ou conjuntamente, vêm sendo investigados por vários estudiosos. No presente trabalho, tratou-se especificamente dos efeitos de duas manipulações dietéticas, a restrição calórica e a suplementação com vitamina E, nas modificações induzidas pelo exercício exaustivo, particularmente no que se refere ao fenômeno do estresse oxidativo. Seus efeitos na performance física e na disposição de substratos energéticos fundamentais àquela atividade física também foram abordados. Para melhor compreensão do contexto apresentado, segue-se, portanto, uma revisão bibliográfica acerca dos principais pontos envolvidos nessa discussão e suas inter-relações: o estresse oxidativo, dieta -restrição calórica e suplementação com vitamina E- e exercício físico.

O estresse oxidativo

A relação da vida aeróbia com o oxigênio molecular envolve um interessante paradoxo: ao lado de sua essencialidade para a ocorrência das reações metabólicas que mantêm aquela existência, encontra-se sua potencial toxicidade para os componentes celulares que a constituem, levando à degradação ou inativação de moléculas essenciais, tais como DNA (ácido desoxiribonucleico), proteínas e lipídios. Estes danos devem-se à própria estrutura atômica do oxigênio, molécula dirradical que, sofrendo sucessivas reduções parciais (um único elétron), gera seqüencialmente O_2^{\bullet} (radical superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e $^{\bullet}OH$ (radical hidroxila). Esses produtos, por sua vez, podem originar várias outras espécies reativas de oxigênio (ERO), causando extenso prejuízo oxidativo às macromoléculas biológicas (Sohal e Weindruch, 1996).

As ERO, que incluem elementos radicais e não radicais, são constantemente formados no corpo humano, seja com um propósito funcional, como no caso da produção de O_2^{\bullet} por células fagocitárias, ou mesmo por geração acidental, como a captação de elétrons pelo O_2 em etapas intermediárias da cadeia respiratória, produzindo O_2^{\bullet} . Cerca de 1 a 3% do oxigênio que respiramos é desviado para produção de O_2^{\bullet} , que, por dismutação, espontânea ou enzimática, gera H_2O_2 (Halliwell, 1991; Halliwell, 1994a; Halliwell et al., 1995; Sohal e Weindruch, 1996). Este, por sua vez, sofre redução por intermédio de metais de transição, particularmente ferro e cobre, produzindo o relativamente inócuo HO^{\bullet} (ânion hidroxila) e o radical altamente reativo $^{\bullet}OH$, através da conhecida reação de Fenton (Farber, 1994).

Os prejuízos provocados pelas ERO incluem a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares, uma reação em cadeia que atinge outros ácidos graxos e também proteínas, alterando propriedades da membrana (como fluidez ou estrutura dinâmica) e, conseqüentemente, a atividade de enzimas e receptores a ela ligados; compreendem ainda modificações do DNA, envolvendo alterações das bases e ligações cruzadas com proteínas, bem como a oxidação de grupos tióis das proteínas e produção de derivados carbonila dos aminoácidos; estes últimos, especialmente, podem causar inativação enzimática e aumentar a proteólise (Sohal e Weindruch, 1996; Wiseman, 1996).

O risco de uma excessiva exposição aos efeitos dos radicais livres no organismo, entretanto, encontra a resistência de um complexo sistema de defesa antioxidante. Dele fazem parte tanto enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o sistema glutathiona peroxidase/glutathiona redutase (GSH-Px/GR), como outras classes de substâncias, incluindo tocoferol, ácido ascórbico e glutathiona (GSH) (Duthie et al., 1989; Chow, 1991; Halliwell, 1991; Halliwell et al., 1995). Esse grupo, assim formado, compreende a primeira linha de defesa. No entanto, por não ser completamente efetiva em todos os casos, a ela

associa-se uma segunda linha de defesa, constituída de enzimas encarregadas de reparar os danos produzidos por aquelas espécies, destruindo proteínas modificadas, removendo ácidos graxos oxidados das membranas e reparando o prejuízo oxidativo causado ao DNA (Crawford e Davies, 1994; Halliwell, 1994a). Outro importante mecanismo antioxidante consiste da manutenção de íons como ferro e cobre ligados a proteínas transportadoras ou de armazenamento, de forma a evitar o aumento dos danos oxidativos que seriam causados se estivessem no estado livre (Duthie et al., 1989; Chow, 1991; Halliwell, 1991; Halliwell et al., 1995).

Os diferentes mecanismos de defesa desempenham papéis específicos no combate aos radicais livres formados no organismo. A enzima SOD, encontrada na mitocôndria (forma contendo Mn em seu sítio ativo, MnSOD) e no citoplasma (Cu,ZnSOD), remove O_2^{\bullet} , por acelerar sua conversão a H_2O_2 , reação que pode ocorrer espontaneamente, porém a uma velocidade muito menor. O H_2O_2 formado, por sua vez, sofre redução a H_2O pela CAT, enzima encontrada nos peroxissomas, mas principalmente pela GSH-PX, uma enzima contendo selênio (embora exista outra forma, independente deste mineral), que oxida GSH a GSSG (glutathiona oxidada). GR, uma flavoproteína contendo FAD (flavina adenina dinucleotídeo), regenera o GSH a partir do GSSG produzido, utilizando NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Halliwell, 1994; Halliwell et al., 1995).

Como substância antioxidante, convém destacar o papel da vitamina E. O α -Tocoferol, principal e mais ativo constituinte das vitaminas lipossolúveis coletivamente conhecidas como vitamina E, é o mais importante seqüestrante de radicais livres em membranas e lipoproteínas (Halliwell, 1994b; Halliwell et al., 1995; Wiseman, 1996).

O estresse oxidativo, portanto, estabelece-se quando “um distúrbio no balanço de fatores prooxidantes e antioxidantes favorece os primeiros,

levando a um prejuízo potencial” (Sies, 1994). No organismo, normalmente, aquele balanço favorece, com pequena margem, as condições prooxidantes, em virtude dos papéis fisiológicos assumidos pelas ERO. Entretanto, quando sua produção é exacerbada ou ocorre falha na defesa antioxidante –as próprias enzimas que o compõem são susceptíveis à inibição por aquelas espécies–, tem-se o estresse oxidativo (Halliwell et al., 1995; Jenkins e Goldfarb, 1993). Quando este processo se apresenta moderado, o desequilíbrio pode ser suportado por um reforço no sistema de defesa antioxidante, no entanto, quando constitui-se um processo severo poderá causar dano e morte celular (Halliwell, 1994a; Halliwell et al., 1995). Na verdade, a presença das ERO, bem como de produtos de sua reação com macromoléculas, em condições “normais” (“steady-state”) indicariam que as células estão sob estresse oxidativo crônico e que o envelhecimento é uma consequência do prejuízo oxidativo (Sohal e Weindruch, 1996).

Vários mecanismos podem mediar o estresse oxidativo, quais sejam: elevada atividade das enzimas geradoras de radicais (por exemplo, xantina oxidase, enzima cuja atividade catalítica gera O_2^\bullet) e/ou seus substratos (por exemplo, hipoxantina); ativação dos fagócitos; ativação das fosfolipases, cicloxigenases e lipoxigenases; diluição ou destruição de antioxidantes; liberação dos metais dos sítios de seqüestro; liberação de proteínas heme (hemoglobina, mioglobina) e, finalmente, interrupção da cadeia respiratória, aumentando o desvio de elétrons para formar O_2^\bullet (Aruoma, 1994).

A relativa importância do prejuízo resultante dependerá, por outro lado, do grau de estresse, do mecanismo e do tempo durante o qual é imposto, bem como da natureza do sistema afetado (Halliwell et al., 1995). Há muitas condições que podem iniciar ou aumentar o estresse oxidativo no ambiente celular, tais como **desequilíbrio nutricional** -por exemplo, deficiência de vitaminas antioxidantes ou de minerais cofatores das enzimas antioxidantes (como Cu e Zn para a SOD citosólica)-, **exposição a substâncias químicas** como

álcool, tetracloreto de carbono e paraquat ou ainda a **poluentes do ar** como ozônio e dióxido de nitrogênio, **radiação**, **desordens hereditárias** (como a doença de Wilson, caracterizada por acúmulo de cobre), **lesões** e, ainda, **intensa atividade física** (Chow, 1991).

No contexto da influência da dieta na prevenção ou retardo desses fenômenos, destacam-se os efeitos da restrição calórica e da suplementação antioxidante, particularmente de vitamina E, temas que serão desenvolvidos nas seções seguintes.

Dieta e estresse oxidativo: efeitos da restrição calórica

A restrição calórica -sem má nutrição- constitui a única manipulação reconhecida, reproduzível, que aumenta o tempo máximo de vida (TMV) de espécies de mamíferos (Masoro, 1985). O efeito que a restrição alimentar exerce sobre a longevidade foi primeiramente evidenciado por McCay e Crowell em 1934, quando os autores colocaram a hipótese do retardo do crescimento e desenvolvimento por este regime alimentar. Entretanto, em virtude dos benefícios desse regime terem sido observados também em animais adultos, vários estudos se seguiram, contestando esta e apresentando novas hipóteses (Masoro, 1985). Destaca-se, por exemplo, a relação entre os efeitos da restrição na redução da concentração de glicose plasmática e a teoria da glicação, que enfoca a glicose como mediador do envelhecimento, através de sua reação com proteínas e ácidos nucleicos, alterando a atividade dessas substâncias (Masoro et al., 1991).

Recentemente, o argumento que tem somado suportes mais convincentes indica que a restrição calórica estende a sobrevivência e vitalidade

primariamente por limitar a injúria de radicais livres à mitocôndria, onde estes são principalmente gerados na maioria das células (Yu,1994; Weindruch, 1996). A teoria de radicais livres fornece a base celular mais razoável, relacionando a intervenção nutricional no processo de envelhecimento pela restrição dietética com a sua ação antioxidante (Yu, 1994). O mecanismo, pelo qual este fenômeno ocorre, entretanto, permanece desconhecido (Weindruch, 1996).

Vários efeitos da restrição calórica nas modificações fisiológicas associadas com a idade são relatados em diversos estudos. O retardo ou mesmo a prevenção de alterações fisiológicas tais como perda da resposta lipolítica de adipócitos a hormônios, modificação da estrutura e função do músculo esquelético, aumento nas concentrações séricas de calcitonina e hormônio paratireoidiano, bem como de triglicerídeos e colesterol, declínio na atividade locomotora espontânea e ainda, efeitos nos sistemas nervoso, imune e reprodutor encontram-se entre os benefícios atribuídos aquele regime (Masoro et al., 1991). Redução da glicemia e da concentração plasmática de insulina constituem outros efeitos observados (Reaven e Reaven, 1981; Cartee e Dean, 1994; Cartee et al., 1994; Weindruch, 1996), referindo-se ainda a melhora da sensibilidade à insulina (Wing et al., 1994; Kemnitz et al., 1994; Colman et al., 1995; Silva et al., 1998) e aumento do transporte de glicose estimulado pela insulina (Cartee et al., 1994).

Diversos modelos de restrição calórica têm sido empregados para se estudar os seus efeitos em animais experimentais. Um dos mais utilizados, a restrição dietética, caracteriza-se pela redução da quantidade de dieta oferecida em relação ao grupo controle, diminuindo a quota diária de ração ou alternando dias de alimentação e jejum. Outro modelo empregado, a restrição calórica propriamente dita, consiste na restrição de um ou de todos os nutrientes energéticos, carboidratos, lipídios e/ou proteínas, elaborando-se, para tanto, uma dieta modificada, equilibrada em relação aos demais nutrientes. Apesar de ser bastante utilizado (Rao et al., 1990; Dubey et al., 1996; Lee e Devi, 1996; Pieri et

al., 1996), ao primeiro modelo contrapõe-se o argumento de que a restrição é total, alterando-se calorias, mas igualmente nutrientes como vitaminas e minerais. Rojas e colaboradores (1993) advertiram a respeito de uma redução crônica na ingestão de vitaminas antioxidantes, levando a um aumento compensatório nos antioxidantes endógenos, o que não estaria relacionado diretamente com a restrição calórica. Sendo assim, diversos pesquisadores adotaram a redução na ingestão calórica, alterando unicamente um ou mais nutrientes energéticos.

Quanto à importância de cada um dos macronutrientes nos benefícios atribuídos à restrição calórica, Weindruch (1996) referiu que a restrição de lipídios, proteínas ou carboidratos, sem redução calórica não aumenta o TMV de roedores. A esse respeito, Yu (1994), relatando resultados obtidos por seu grupo, mencionou um efeito da restrição protéica (atribuído, na verdade, ao efeito da baixa ingestão protéica na nefropatia) de muito menor magnitude do que aquele promovido pela restrição calórica. Os autores concluíram ser a restrição calórica o fator determinante no prolongamento do período de vida obtido em seus estudos.

Outros aspectos relevantes no estudo dos efeitos da restrição calórica são a sua duração e a idade apropriada para sua introdução. O período pelo qual a restrição foi aplicada nas diversas pesquisas efetuadas, variou de semanas até a vida inteira do animal, dependendo do objetivo determinado. Estudos envolvendo longevidade exigem, obviamente, um acompanhamento prolongado, alcançando o final da vida do animal. Pesquisas enfocando o prejuízo oxidativo, por sua vez, tem sido realizadas em tempos variáveis. Rojas e colaboradores (1993) enfatizaram a importância de se considerar este aspecto quando da comparação dos resultados obtidos; os autores não encontraram benefícios da restrição de curta duração (8 semanas) sobre os indicadores de estresse oxidativo medidos -defesa antioxidante e peroxidação lipídica. Djuric e colaboradores (1992), por outro lado, encontraram efeitos antioxidantes da

restrição sobre o DNA, com apenas 2 semanas de experimento. Por este mesmo período, Habib e colaboradores (1990) administraram dieta de restrição alimentar a ratos e detectaram uma redução na taxa de exalação de etano -um índice *in vivo* da peroxidação lipídica.

Diante do exposto, percebe-se a diversidade de modelos que podem ser esquematizados para o estudo dos efeitos da restrição calórica em animais experimentais. Particularmente, aqueles relativos ao estresse oxidativo têm sido investigados em roedores por diversos autores, enfocando tanto a repercussão daquele regime na peroxidação lipídica, oxidação protéica e danos oxidativos ao DNA, como sobre a defesa antioxidante do organismo.

A ação antioxidante da restrição calórica sobre a oxidação lipídica foi estudada por Laganier e Yu (1987), em mitocôndria e microsoma de fígado de ratos em diferentes idades, demonstrando que a restrição dietética total crônica efetivamente inibiu o aumento associado a idade na oxidação lipídica em membranas subcelulares. Além disso, os autores destacaram que a restrição interferiu na composição em ácidos graxos da membrana, aumentando o índice de insaturação/saturação, o que manteve a integridade e fluidez de membrana, ao mesmo tempo que minimizou a oxidação lipídica associada à idade. Similarmente, Chen e Yu (1994) relataram que a restrição dietética total suprimia a alteração da fluidez da membrana induzida por hidroxinonenal (um dos produtos da oxidação lipídica), em fígado de ratos, provavelmente por reduzir a ligação daquele produto com os lipídios da membrana mitocondrial.

Koizumi e colaboradores(1987) evidenciaram que a restrição calórica em carboidratos de longo termo pode seletivamente aumentar a CAT no fígado de camundongos, o que foi acompanhado por uma diminuição da peroxidação lipídica naquele tecido. Por outro lado, Rojas e colaboradores (1993), estudaram os efeitos da restrição calórica, total e de carboidratos, sobre a

atividade de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica, além de medirem a GSH e GSSG, ascorbato e ácido úrico, em fígado de camundongos. Neste caso, não foi detectado nenhum benefício por influência da restrição; em sentido oposto, ambos os regimes ocasionaram uma redução no ascorbato e um aumento no GSSG, enquanto que a restrição em carboidratos ainda acarretou um aumento do prejuízo lipídico, como medido por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Os autores concluíram, desse modo, que a restrição por curto período de tempo não aumentou os antioxidantes endógenos nem reduziu a peroxidação e que a restrição em carboidratos provocou um desequilíbrio na dieta que desencadeou um forte aumento da peroxidação no fígado.

Estudando especificamente o efeito desse regime alimentar sobre o prejuízo oxidativo, Youngman e colaboradores (1992) verificaram que tanto a restrição calórica total como a protéica, por 6 ou 12 semanas, inibiram o prejuízo oxidativo a proteínas, medido através do conteúdo de carbonilas protéicas. A esse respeito, deve ser ressaltado que muitas afirmações baseadas na variação de carbonilas protéicas são controvertidas devido às dificuldades analíticas críticas já apontadas por Cao e Cutler (1995). Quanto ao dano oxidativo de DNA, Djuric e colaboradores (1992), administraram dietas de baixo e de alto teor de gordura ou de restrição calórica total a ratos, investigando seus efeitos sobre o conteúdo de 5-hidroximetiluracil -um produto de oxidação do DNA- no fígado e glândula mamária. Após duas semanas de experimento, concluíram que tanto a ingestão de gordura como a de calorias poderiam regular os níveis de prejuízo oxidativo do DNA.

Lee e Devi (1996) encontraram que a restrição dietética total conferiu maior resistência à mucosa gástrica de ratos submetidos a injúria experimental e atribuíram este efeito protetor à manutenção dos estoques de antioxidantes endógenos, tais como GSH, e energia (na forma de ATP). Estudando eritrócitos de ratos submetidos à hemólise, Pieri e colaboradores

(1996) constataram similar proteção, verificando que a maior susceptibilidade daquelas células a peroxidação lipídica associada à idade poderia ser prevenida pela restrição alimentar, imposta pelo esquema de jejum alternado com alimentação *ad libitum*.

Dubey e colaboradores (1996) observaram um aspecto muito interessante acerca dos benefícios promovidos pela restrição calórica total, no que diz respeito ao prejuízo oxidativo de proteínas associado à idade, em cérebro de ratos: sua reversibilidade. Após 6 semanas de alimentação *ad libitum*, os animais antes submetidos a 12 meses de restrição apresentaram no cérebro um teor de carbonilas equivalente ao do grupo que recebeu alimentação *ad libitum* por todo o experimento, ou seja, o efeito protetor exercido pela restrição por 12 meses foi perdido em pouco mais de um mês.

Percebe-se, portanto, que os benefícios da restrição calórica verificados em roedores e outras espécies potencialmente representam uma alternativa na milenar busca dos seres humanos pelos segredos da longevidade. Os efeitos adversos resultantes dessa prática alimentar parecem ser poucos; mencionam-se como únicas exceções conhecidas o retardo no processo de cicatrização e a baixa tolerância ao frio (Yu, 1994). Entretanto, segundo Weindruch (1996), a resposta definitiva àquela questão -os benefícios potenciais para seres humanos- pode levar mais 10 ou 20 anos para ser obtida. Paralelamente a isso, outros procedimentos vêm sendo estudados no combate ao estresse oxidativo, como a suplementação com vitamina E, tema que será desenvolvido na próxima seção.

Dieta e estresse oxidativo: efeitos da suplementação com vitamina E

Os primeiros relatos a respeito da vitamina E datam de 1922, quando Evans e Bishop demonstraram que um fator nutricional lipossolúvel prevenia morte e reabsorção fetal em ratos, sendo, portanto, essencial para a reprodução (Halliwell, 1991; Chow, 1991). Desde então, vários sintomas de sua deficiência têm sido relatados por alguns autores em numerosas espécies de animais jovens, como necrose hepática em ratos e porcos, destruição de eritrócitos em ratos e galinhas e doença muscular em bezerros, ovelhas e camundongos (Chow, 1991). Animais adultos, por outro lado, não desenvolvem sintomas de deficiência e mesmo em animais mais jovens é difícil depletar totalmente os tecidos de vitamina E, ainda que após uma prolongada exposição a uma dieta deficiente nesta vitamina (Packer e Landvik, 1989). Em humanos, nenhum efeito específico da deficiência aguda desse fator foi observado, a não ser por algumas evidências em bebês prematuros de uma predisposição a anemia hemolítica, devido provavelmente a maior fragilidade da membrana eritrocítica (Halliwell, 1991). Frequentemente, esses efeitos são exacerbados pela necessidade de aplicação da terapia de inalação (100 % oxigênio), em bebês de baixo peso ao nascer (Packer e Landvik, 1989).

Vitamina E consiste em um termo coletivo para um grupo de tocoferóis e tocotrienóis que ocorrem naturalmente em plantas; ambos contêm um anel cromanol e uma cadeia lateral fitila. As diferentes substituições metila no anel aromático originam os compostos α , β , γ e δ . A distinção entre os dois subgrupos se dá, então, pela existência, nos tocotrienóis, de três duplas ligações na cauda hidrofóbica, que ancora a molécula nas membranas ou lipoproteínas; nos tocoferóis, a cadeia é totalmente saturada. Essa diferença estrutural, portanto, responde pelas diferentes ações biológicas de ambos os tipos de compostos (Packer, 1995).

Embora existam pelo menos oito estruturas de tocoferol, o α -tocoferol predomina em muitas espécies vegetais, apresentando a mais alta atividade biológica (Bjørneboe et al., 1990; Chow, 1991). Seu sítio ativo consiste do grupo hidroxila, localizado em uma posição ótima para seqüestrar radicais livres e interromper a peroxidação lipídica (posição 6 do anel cromanol); a porção fitila (posição 2), por outro lado, facilita a incorporação e retenção da vitamina E em biomembranas (Packer, 1995). Entretanto, apesar da reconhecida superioridade deste composto no grupo, experimentos *in vitro* em membranas isoladas e lipoproteínas indicaram maior atividade antioxidante do α -tocotrienol (Packer, 1995).

O mecanismo pelo qual a vitamina E previne várias lesões metabólicas permanece obscuro. Neste contexto, seu papel primário na prevenção do prejuízo oxidativo aos tecidos, induzido por radicais livres, é aceito pela maioria dos investigadores. Outras funções são relacionadas a essa vitamina, como a participação na síntese protéica, nos mecanismos de sinalização transcelular e expressão gênica e ainda na regulação do metabolismo xenobiótico e da resposta imune; não se sabe, contudo, se esses efeitos são independentes da sua função antioxidante (Chow, 1991; Packer, 1995). Apesar de sua baixa concentração nas membranas, a vitamina E efetivamente desempenha o papel de principal antioxidante lipossolúvel, "interruptor da reação em cadeia", prevenindo a peroxidação lipídica (Packer e Landivik, 1989).

Os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidios de lipoproteínas ou nas membranas podem sofrer oxidação, através da abstração de um hidrogênio por um forte oxidante como o radical OH^{\bullet} , por exemplo, e assim desencadear a peroxidação lipídica. Esse processo destrói os lipídios, mas também moléculas vizinhas como proteínas e ácidos nucleicos, afetando a homeostase celular (Hiramatsu et al., 1990; Packer, 1995). No entanto, a vitamina E pode interromper a reação em cadeia iniciada pelos radicais livres, na fase de

propagação; para tanto, torna-se ela própria um radical livre, porém menos reativo, devido a sua localização no anel aromático. Por sua maior estabilidade, o radical tocoferila (ou cromanoxila) formado persiste nesta forma até ser regenerado a tocoferol através de mecanismos bioquímicos que incluem vitamina C, ubiquinóis ou reações enzimáticas, como as catalisadas pelo sistema GSH-Px/GR (Packer, 1995). O tocoferol também pode reagir com o oxigênio singlete e OH^{*}, mas sua principal ação antioxidante nas membranas biológicas é reagir com radicais lipídicos, interrompendo a peroxidação lipídica (Halliwell, 1991).

O α -tocoferol não parece ser homogeneamente distribuído na membrana; foi associado principalmente às regiões mais fluidas, provavelmente próximo aos ácidos graxos insaturados. Além disso, o seu “turnover” varia entre os diferentes tecidos, sendo o cérebro e a medula espinhal os de mais lento e pulmões e fígado os de mais rápido ritmo (Goldfarb, 1993).

Vários estudos, em diversas situações experimentais, têm sido realizados, destacando o papel protetor da vitamina E contra o estresse oxidativo. Garrido e colaboradores (1993), por exemplo, investigaram o papel do α -tocoferol na susceptibilidade de membranas de eritrócitos ao estresse oxidativo induzido pela ingestão de altas doses de óleo de peixe, em ratos jovens e idosos. Os autores verificaram uma menor susceptibilidade nos animais jovens que receberam suplementação vitamínica do que nos idosos. Essa diferença foi atribuída a uma reduzida capacidade do α -tocoferol em sequestrar radicais livres no segundo grupo, uma vez que sua concentração no plasma e eritrócitos encontrava-se elevada. Por outro lado, nos animais que não receberam suplementação, independente da idade, a susceptibilidade ao estresse apresentou-se aumentada. Em estudo anterior, Leibovitz e colegas (1990) similarmemente haviam detectado efeito protetor da vitamina E em fígado e coração de ratos alimentados com dieta contendo óleo de peixe ou uma mistura de óleo de milho e gordura animal (1:1). Convém mencionar ainda o estudo de Cruz Neira

(1997), que verificou um rápido e potente efeito da vitamina E na redução da oxidação da LDL (“low density lipoprotein”) nativa e daquela submetida a estresse oxidativo induzido por sulfato de cobre.

Em camundongos diabéticos não obesos (NOD [non-obese diabetic], que desenvolve espontaneamente uma forma de Diabetes Mellitus dependente de insulina), a suplementação com vitamina E, desde o desmame, retardou o início do Diabetes Mellitus, sem alterar a incidência geral da doença; esse efeito deveu-se provavelmente a ação da vitamina E contra a peroxidação lipídica em membranas celulares (Beales et al., 1994). Em contexto diverso, no plasma de pacientes diabéticos tipo I, essa suplementação resultou em benefício semelhante contra o prejuízo lipídico, além de reduzir os níveis de triacilgliceróis naquele tecido. Concluiu-se, desse fato, que a suplementação com vitamina E poderia ser benéfica na redução do risco de doença cardiovascular em pacientes diabéticos (Jain et al., 1996). Atribui-se também a essa suplementação uma melhora da captação da glicose e da resposta hepática a insulina em indivíduos normais e diabéticos (Caballero, 1993; Paolisso et al., 1993) envolvendo, provavelmente, seu papel antioxidante (Caballero, 1993).

Diversos outros trabalhos relativos aos efeitos antioxidantes da vitamina E nas células poderiam ser mencionados. O volume de pesquisas nessa área é grande, embora muitas questões relativas a sua capacidade de exercer a atividade antioxidante *in vivo* persistam sem resposta, principalmente devido a conclusões conflitantes obtidas pela comparação de estudos conduzidos de forma similar (Chow, 1991). Embora animais deficientes em vitamina E sejam mais susceptíveis aos efeitos adversos de agentes químicos e físicos associados ao estresse oxidativo, a suplementação com vitamina E em indivíduos nutricionalmente adequados, não necessariamente proporcionaria proteção adicional (Chow, 1991).

O estresse oxidativo é um fenômeno complexo envolvendo vários fatores. Aqueles de natureza antioxidante, como a restrição calórica e a vitamina E, representam apenas uma das faces do processo, trabalhando para inibi-lo ou minimizá-lo. No sentido oposto, encontram-se os fatores prooxidantes que incluem uma diversidade de condições, entre as quais destaca-se o exercício físico intenso, cujas implicações serão discutidas a seguir.

Exercício e estresse oxidativo

O exercício físico representa uma situação de especial demanda fisiológica para o organismo, em que as aumentadas necessidades energéticas, particularmente dos músculos, são satisfeitas pelas reservas de carboidratos, cuja utilização depende de vários elementos, tais como intensidade e duração da atividade física, treinamento e dieta, entre outros (Hargreaves, 1991). Tal condição encontra-se entre os diversos fatores que podem interferir no estresse oxidativo (Chow, 1991).

Na verdade, o exercício físico intenso ou exaustivo, em indivíduos não treinados, mais provavelmente induz aquele prejuízo. Muitas evidências existem acerca do aumento da produção de radicais livres durante o exercício (Novelli et al., 1990; Kumar et al., 1992; Alessio, 1993; Jenkins et al., 1993; Witt et al., 1992; Goldfarb, 1993) e o dano oxidativo ocasionado atinge músculos, fígado, sangue e talvez outros tecidos (Witt et al., 1992). O sistema de defesa antioxidante preserva a homeostase para as funções normais da célula em repouso e, talvez, durante o exercício moderado; quando a produção de ERO é excessiva, no entanto, como durante um exercício aeróbio prolongado, o sistema de defesa é superado por aquelas espécies, levando a dano celular. Sendo assim, o exercício fornece um excelente modelo para se estudar o balanço dinâmico

entre dano oxidativo e defesa antioxidante nos sistemas biológicos (Ji, 1995), sendo que uma única bateria de exercício exaustivo poderia induzir prejuízo oxidativo em diversos tecidos (Sumida et al., 1989; Viguie et al., 1993; Ji et al., 1988; Reznick et al., 1992; Radák et al., 1995).

Parece haver poucas dúvidas acerca dos efeitos danosos que o exercício drástico pode exercer sobre as estruturas celulares, entretanto, as implicações patológicas dessas alterações necessitam de investigação adicional (Ji, 1995).

Os mecanismos pelos quais as ERO podem ser produzidas durante o exercício incluem tanto a cadeia respiratória, considerada a principal fonte, como também a reação catalisada pela xantina oxidase e a ativação de neutrófilos (Witt et al., 1992; Singh, 1992; Ji, 1995). No primeiro caso, o desvio de elétrons, provavelmente na etapa ubiquinona-citocromo b, levaria à produção de O_2^\bullet ; em virtude do aumento do consumo de oxigênio durante o exercício, a produção daquele radical livre, conseqüentemente, estaria muito aumentada (Witt et al., 1992). O segundo mecanismo, envolvendo a xantina oxidase, assemelha-se à injúria de isquemia e reperfusão, devido a hipóxia que pode ser produzida em alguns tecidos durante o exercício e a subsequente reoxigenação quando do seu término, o que promoveria o conhecido "burst" da produção de ERO (Witt et al., 1992; Singh, 1992; Ji, 1995). No entanto, há poucas evidências de que o músculo sofra isquemia no exercício dinâmico, sendo este caminho discutível (Ji, 1995). Quanto ao papel dos neutrófilos, deve ser considerada a produção de O_2^\bullet e H_2O_2 por estas células, quando são atraídas por miócitos e células endoteliais, como resultado do prejuízo da célula muscular; contudo, este mecanismo não explica a produção aguda daquelas espécies e o estresse oxidativo durante o exercício, podendo servir, por outro lado, como importante fonte secundária de ERO (Ji, 1995).

Singh (1992) apresenta ainda dois outros mecanismos para a produção das ERO durante o exercício. A hiperventilação resultante da atividade física extenuante, podendo aumentar a exposição aos radicais livres associados à poluição ambiental, consistiria o primeiro. O segundo mecanismo envolveria o estímulo à secreção e circulação das catecolaminas ocasionado por exercício daquela intensidade. As catecolaminas, por sua vez, poderiam gerar radicais livres por autooxidação ou através da oxidação catalisada por O_2^\bullet ou íons de metais de transição.

Os resultados relativos ao estresse oxidativo promovido pelo exercício parecem depender, além de sua intensidade, da modalidade praticada, do tecido, do biomarcador analisado e do estado de saúde e treinamento do indivíduo. O treinamento, inclusive, reduz o prejuízo oxidativo. A atividade de alta intensidade, sem preparo prévio, por outro lado, induz dano muscular e miopatia necrótica aguda. Desse modo, o estresse em questão é melhor tolerado por indivíduos treinados, trabalhando em uma intensidade moderada, o que é confirmado pelo mais baixo conteúdo de produtos da peroxidação lipídica em indivíduos treinados em comparação aos não treinados. O treinamento traz o benefício de estimular determinados componentes do sistema de defesa (Alessio, 1993; Utsuyama et al., 1996).

Os produtos da oxidação lipídica, como o MDA, e gases hidrocarbonetos leves, como etano e pentano, são os marcadores mais freqüentemente estudados do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (Witt et al., 1992). Em relação aos primeiros, a maioria dos trabalhos utilizando TBARS para mensurar a peroxidação lipídica indicam um aumento nesse parâmetro após o exercício, em músculo, fígado ou cérebro; desse modo, este método é considerado um bom índice geral de estresse oxidativo em sistemas biológicos (Alessio et al., 1988; Alessio, 1993). Diferentemente, a medição de dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos, outras técnicas utilizadas para

aquele fim, têm produzido resultados conflitantes (Alessio, 1993). No que diz respeito ao efeito do exercício sobre o prejuízo oxidativo protéico, existem poucos dados (Witt et al., 1992; Ji, 1995).

Muitos trabalhos já foram realizados relacionando exercício físico e estresse oxidativo. Davies e colaboradores (1982), investigando as consequências do exercício exaustivo, detectaram, em músculos e fígado de ratos submetidos a corrida em esteira, um aumento de duas a três vezes na concentração de radicais livres; os autores observaram ainda diminuição no controle respiratório mitocondrial, perda da integridade dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático e maior concentração de produtos da peroxidação lipídica. Estas modificações foram igualmente encontradas naqueles animais não exercitados deficientes em vitamina E, indicando um mecanismo comum de prejuízo entre as duas condições.

Alessio e colaboradores (1988), pesquisaram a influência da intensidade do exercício e do tipo de fibra muscular no prejuízo oxidativo por ele ocasionado. Nos dois tipos de fibras musculares estudados -fibras oxidativas ou glicolíticas de rápida contração- os autores encontraram aumentada concentração de TBARS como resultado do exercício agudo, nas duas intensidades analisadas, alta e moderada; constataram ainda que o aumento apresentou-se menor no exercício moderado. Assim, concluíram esses autores que o aumento de TBARS foi dependente da intensidade do exercício executado. Similarmente, Ji e colaboradores (1992) registraram uma relação direta entre o efeito do exercício agudo sobre a concentração de GSH no músculo e a sua intensidade, na porção mais profunda do músculo *vastus lateralis* (fibra do tipo oxidativa de rápida contração).

Um aspecto de especial interesse nesse tema consiste da suplementação antioxidante. Tem-se demonstrado que a deficiência de vários

sistemas antioxidantes exacerba a injúria oxidativa ao tecido, enquanto que a suplementação de antioxidantes tem produzido resultados variáveis (Ji, 1995). A maioria dos estudos, porém, sustentam a hipótese de que a suplementação com vitamina E exerce efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício. Quanto a sua influência na performance, os dados produzidos ainda não são claros (Witt et al., 1992), embora muitos estudos em humanos não tenham demonstrado efeitos benéficos (Goldfarb, 1993).

A vitamina E representa um papel de maior importância que o sistema glutatona na execução do exercício, em intensidade abaixo da máxima; portanto, os animais com deficiência nessa vitamina começariam a atividade física já apresentando comprometimento das membranas pelo prejuízo oxidativo, o que os faria alcançar a exaustão mais rapidamente (Witt et al., 1992). A sua suplementação, por outro lado, embora reduza a peroxidação lipídica, provavelmente não aumenta a capacidade aeróbia máxima nem a habilidade de tolerar o exercício de alta intensidade (Witt et al., 1992). Devido à possibilidade de regeneração no uso das vitaminas nas reações metabólicas, acredita-se que as necessidades desses nutrientes para pessoas fisicamente ativas não sejam maiores do que aquelas para pessoas sedentárias (Armstrong e Maresh, 1996).

Entre os relatos de efeitos protetores da vitamina E suplementar contra o dano promovido pelo exercício exaustivo, encontram-se o do efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica em sangue coletado de humanos (Sumida et al., 1989), efeito protetor do músculo cardíaco através da ação seqüestradora de radicais, inibição das lipoxigenases e redução dos peróxidos em associação com as lipoxigenases (Kumar et al., 1992) e redução no conteúdo de carbonilas protéicas em músculo esquelético (Reznick et al., 1992). Goldfarb e colaboradores (1994) verificaram que além de proteger o plasma e os três tipos de fibras estudadas contra o prejuízo induzido pelo exercício, a vitamina E reduziu também os efeitos promovidos por DHEA (desidroepiandrosterona, um esteróide

lipolítico que estimula a peroxidação). Hartmann e colaboradores (1995) notificaram ainda uma redução do dano ao DNA em leucócitos periféricos de humanos.

Apesar de haver muitas indicações dos efeitos benéficos da vitamina E contra os potenciais prejuízos ocasionados pelo exercício, ainda não está claro se uma dose adicional representaria uma maior proteção. Contribuindo para esta incógnita, encontra-se a falta de uniformidade nas condições experimentais empregadas, notadamente dose, período e forma de suplementação, o que dificulta a obtenção de resultados mais conclusivos da literatura. Em virtude desse fato, faz-se necessária a obtenção de evidências mais definitivas, somando-se investigações que possam esclarecer as diversas lacunas ainda existentes quanto ao papel desta importante vitamina antioxidante.

Percebe-se, diante da literatura consultada, que a natureza extremamente complexa do fenômeno do estresse oxidativo e dos fatores a ele relacionados, ou que o determinam, dificulta a recomendação de medidas para contorná-lo, especialmente no que se refere à dieta. Neste contexto, a importância das duas manipulações dietéticas anteriormente abordadas, restrição calórica e suplementação com vitamina E, merece destaque, em virtude de seus potenciais benefícios. Por outro lado, não foram ainda produzidas evidências de como melhor aproveitar esse potencial ao incorporá-lo aos hábitos humanos, nem a respeito das possíveis diferenças de eficiência entre os dois tratamentos frente aquele processo. Justifica-se, portanto, empreender estudos comparativos dos efeitos da restrição calórica e da suplementação com vitamina E no estresse oxidativo, particularmente naquele promovido pelo exercício físico intenso.

2. Objetivos

▣ Geral:

Comparar os efeitos das dietas de restrição calórica e de suplementação com vitamina E sobre o estresse oxidativo e modificações nos substratos energéticos induzidas pelo exercício físico exaustivo em ratos.

▣ Específicos:

Ratos *Wistar* de onze semanas de idade, submetidos à dieta experimental de restrição calórica ou de suplementação com vitamina E foram empregados para:

- ▣ analisar a performance física;
- ▣ determinar a peroxidação lipídica em fígado e músculo;
- ▣ mensurar o prejuízo oxidativo protéico naqueles tecidos;
- ▣ medir a concentração das substâncias antioxidantes glutathiona, formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), em fígado e músculo, e vitamina E, em fígado, músculo e plasma;
- ▣ determinar glicogênio hepático e muscular;
- ▣ medir glicose e insulina plasmáticas e lactato sanguíneo.

3. Artigo 1

***Efeitos da restrição calórica e suplementação com vitamina E
no estresse oxidativo induzido pelo exercício exaustivo***

**Effect of caloric restriction and vitamin E supplementation on exercised-
induced oxidative stress**

Oliveira, S. L. de, Diniz, D. B., Macedo, D. V. de, Amaya-Farfan, J.

Abstract

The present study was designed to investigate the effects of caloric (carbohydrate) restriction and vitamin E supplementation on one-time exercise-induced oxidative stress. Eleven-wk old male *Wistar* rats 11wk old were fed control (C) (AIN-93M), or restricted amounts of a modified control (R), or control plus vitamin E (S) (1425 UI of all-*rac*- α -tocopheryl acetate) diets. After being on the diets for five months, the animals in each diet group were divided in exercised (E) and non-exercised (NE) categories. Before being killed, the rats of the exercised category were required to run on a treadmill to exhaustion. Exhaustion points were reached at 39 ± 6 , 69 ± 11 and 18 ± 2 minutes for the C, R and S groups, respectively. Lipid peroxidation (thiobarbituric acid-reactive substances [TBARS]), protein damage (reactive protein carbonyls), GSH (glutathion) and vitamin E were determined in *gastrocnemius*, liver or plasma. Lipid peroxidation was significantly lower in livers and muscles of rats fed S diet when compared to the others groups. Exercise slightly decreased TBARS in muscle, whereas GSH in liver and reactive protein carbonyls in liver and muscle were similar for all groups. Vitamin E supplementation increased vitamin E levels in liver, muscle and plasma, but exercise decreased it in plasma. Caloric restriction increased resistance to exhaustive exercise without depleting stores vitamin E or exacerbating oxidative damage. Although vitamin E supplementation resulted in a tendency in decreased physical endurance, there was a protective effect against lipid peroxidation, which was not afford by caloric restriction.

Key words: caloric restriction, vitamin E, oxidative stress, exercise.

Introdução

A restrição calórica, sem má nutrição, tem sido objeto de diversos estudos por constituir-se a única manipulação reconhecida a promover aumento de longevidade em várias espécies animais (Masoro, 1985). Embora o mecanismo detalhado desse efeito permaneça desconhecido, o argumento que tem somado evidências mais convincentes indica que a restrição calórica prolonga a sobrevivência por limitar a injúria de radicais livres à mitocôndria, principal lugar onde são gerados na maioria das células (Yu, 1994; Weindruch, 1996). Quando essa injúria supera a capacidade do mecanismo de defesa antioxidante, o resultado é um dano potencial a célula, ou seja, o processo de estresse oxidativo (Sies, 1994).

As pesquisas relativas à influência da restrição calórica no estresse oxidativo têm produzido resultados divergentes. Referem-se tanto efeitos benéficos, medidos por vários indicadores do prejuízo oxidativo (Koizumi et al., 1987; Rao, et al., 1990; Djuric et al., 1992; Youngman et al., 1992; Chen e Yu, 1994), como nenhuma alteração após estabelecida a restrição calórica (Masoro et al., 1991; Rojas et al., 1993; Venkatraman et al., 1998). Vale salientar que dois importantes fatores a serem considerados na análise dos resultados e comparação dos vários estudos, são o modelo e o período de restrição (Rojas et al., 1993), que têm variado nas diferentes pesquisas.

Neste contexto, outra intervenção dietética que poderia representar um potencial benefício na prevenção ou redução do estresse oxidativo é a suplementação dietética com substâncias como a vitamina E, principal antioxidante lipossolúvel na prevenção da peroxidação lipídica nas membranas celulares (Packer e Landivik, 1989). Vários estudos, em diversas situações experimentais, têm destacado o seu papel protetor contra o dano oxidativo de

lipídeos, proteínas e DNA (Leibovitz et al., 1990; Garrido et al., 1993; Haegele et al., 1994; Beales et al., 1994; Jain et al., 1996; Ibrahim et al., 1997; Sen et al., 1997; Zhang et al., 1997).

O estresse oxidativo pode ser estimulado ou agravado por muitos fatores, dentre os quais a atividade física intensa (Chow, 1991). Existem diversas evidências acerca do aumento da produção de radicais livres durante o exercício (Novelli et al., 1990; Kumar et al., 1992; Alessio, 1992; Goldfarb, 1993), sendo que o prejuízo ocasionado atinge músculos, fígado, sangue e talvez outros tecidos (Witt et al., 1992). Na verdade, segundo Witt e colaboradores (1992), o exercício exaustivo em indivíduos não treinados mais provavelmente induz aquele prejuízo, sendo uma única bateria deste tipo de exercício suficiente para ocasioná-lo em diversos tecidos (Reznick et al., 1992; Viguie et al., 1993; Ji, 1995).

A proposta do presente trabalho consistiu em estudar os efeitos da restrição calórica e da suplementação com vitamina E no estresse oxidativo induzido por exercício exaustivo em ratos, analisando-se, para tanto, a peroxidação lipídica, o prejuízo oxidativo protéico, como indicadores do dano oxidativo, bem como a concentração de dois importantes componentes do sistema de defesa antioxidante do organismo, glutathiona (GSH) e vitamina E, em fígado, músculo ou plasma.

Material e Métodos

Animais e dietas

Sessenta ratos *Wistar* machos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, de 21 dias de idade, foram mantidos em

dieta comercial (Labina, Ralston Purina do Brasil LTDA), com livre acesso a ração, em gaiolas coletivas, nas condições do biotério (ciclo de claro/escuro de 12 h, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), até atingirem aproximadamente 11 semanas de idade. Nesta fase, os animais foram transferidos para gaiolas individuais e divididos em três grupos (n=20), por sorteio, conforme três diferentes dietas: Controle (C), formulada conforme AIN-93 M (Reeves et al, 1993); Restrita (R), elaborada a partir de modificação da controle, com restrição de 30% de calorias, em termos de carboidratos, e Suplementada (S), obtida acrescentando-se 1425 UI de vitamina E (All-*rac*- α tocoferil acetato, 50 % de atividade) à dieta controle (Tabela 1).

A dieta de restrição foi constituída de modo que os animais, consumindo 30% menos ração que o grupo controle, recebessem a mesma quantidade dos demais nutrientes, sofrendo redução exclusiva no aporte calórico em carboidratos. Desse modo, a restrição calórica total de 30% foi obtida mediante diminuição no consumo (30%) de uma dieta com menor teor glicídico, resultando em decréscimo de 40% na ingestão de carboidratos. A dieta de suplementação com vitamina E, caracterizada por uma concentração vinte vezes superior à recomendada (dieta controle), foi selecionada com o objetivo de simular situação de elevado consumo defendido recentemente pela medicina ortomolecular (cerca de quarenta vezes). Tal recomendação tem por finalidade aumentar a proteção do organismo humano contra o estresse oxidativo e retardar o envelhecimento.

Para mais eficiente controle da ingestão calórica, efetuou-se a determinação das calorias das dietas oferecidas, em bomba calorimétrica (PARR modelo 1261, acoplada a um banho PARR modelo 1563).

Inicialmente, todos os grupos receberam dieta controle, por um período de 8 dias, com a finalidade de ambientar os animais às novas condições: diferente apresentação da dieta e isolamento em nova gaiola.

Tabela 1- Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas (g/ 100g)		
	Controle	Restrita	Suplementada
Caseína (85 %)	14,00	20,00	14,00
Amido de milho (87,6%)	62,07	54,15	62,07
Sacarose (99,5%)	10,00	7,22	10,00
Óleo de soja	4,00	5,71	4,00
Fibra (celulose)	5,00	5,86	5,00
Mistura mineral AIN-93 M ^a	3,50	5,00	3,50
Mistura vitamínica AIN-93 M ^b	1,00	1,43	1,00
L-cistina	0,18	0,26	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,36	0,25
Ter-butildidroquinona	0,0008	0,0011	0,0008
Todo-rac- α -tocoferil acetato (50 % de atividade)	—	—	0,285 ^c
Calorias totais	347,71	347,62	347,71

^a contém 20,98% de sacarose

^b contém 97,47% de sacarose

^c para dar uma suplementação de 1425UI / kg de dieta (total de 1500UI/kg)

Terminada esta etapa, as respectivas dietas experimentais foram então oferecidas, permitindo-se uma adaptação de 4 dias, após a qual iniciou-se o período experimental propriamente dito, cuja duração foi de 21 semanas. Os animais dos grupos controle e suplementado tiveram livre acesso à dieta, enquanto que àqueles do grupo restrito ofereceu-se 70% da quantidade média diária de ração ingerida pelo grupo controle, calculada a partir dos dados de ingestão e rejeito, obtidos periodicamente (três vezes por semana). O peso dos animais foi acompanhado semanalmente. A água (livre acesso) e a ração eram renovadas no dia do controle da ingestão. O manuseio e o procedimento experimental seguiram as normas estabelecidas pela Comissão de Ética da FEA (Faculdade de engenharia de Alimentos) para o Uso de Animais de Experimentação.

Procedimento

Ao final do período experimental, entre a 20^a e a 21^a semana, os ratos de cada grupo foram subdivididos, por sorteio, em duas categorias: Exercitados (*E*) e Não Exercitados (*NE*). Após uma noite sem alimento, o primeiro subgrupo foi submetido a exercício, sem treinamento, em bateria única, em esteira rolante com 15° de inclinação, à velocidade de 27 m/min, até a exaustão, condição definida em função da prostração assumida pelo animal na esteira. O estímulo para a corrida foi proporcionado por choque elétrico de baixa intensidade, disparado a cada vez que o animal parasse no início da plataforma de corrida. O segundo foi deixado em repouso. Os ratos foram exercitados em conjuntos de seis componentes dos diferentes grupos experimentais, sendo cronometrado o tempo de corrida. Os animais não exercitados também permaneceram na sala de exercício, a fim de se uniformizar a interferência do ambiente. Após exaustão, procedeu-se ao sacrifício, por deslocamento cervical, submetendo-se os não exercitados ao mesmo processo. Ratos de ambos os subgrupos foram sacrificados de maneira intercalada.

Coletaram-se amostras de sangue (punção cardíaca), bem como o fígado e os músculos *gastrocnemius*. O sangue foi tratado com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, solução a 10% em cloreto de sódio 0,9%, para uma concentração final de 1%; Sigma), seguido por repouso e posterior centrifugação a 1514 x g, por 15 min. O plasma assim obtido e os demais tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, até posteriores análises.

Análises bioquímicas

Peroxidação lipídica. A determinação de peróxidos lipídicos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma), em fígado e músculo, seguiu o método de Ohkawa e colaboradores (1979), com modificações. O tecido foi homogeneizado (10%, p/v) em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, contendo butilidroxitolueno (BHT, concentração final de 90 µM; Sigma), em homogeneizador de pistilo de Teflon (Potter-Elvehjem), em gelo. A uma alíquota de 0,5 mL do homogenato, foram adicionados 1 mL de H₂SO₄ 0,04 M (Merck) e 1 mL da solução de TBA (0,67% TBA, 0,4% dodecilsulfato de sódio [SDS, Sigma] em NaOH 0,06M [Merck]), sendo a mistura homogeneizada e levada a banho-maria de 90°C, por 20 minutos. O branco continha NaOH 0,06M, em vez da solução de TBA. Após esse período, as amostras foram colocadas em banho de gelo por 10 minutos, seguindo-se a adição de 3 mL de *n*-butanol (Merck, p.a.), com vigorosa agitação. Procedeu-se, então, à centrifugação a 1978 x g, por 15 minutos. A camada orgânica assim separada foi coletada, medindo-se sua absorbância a 532 nm, em espectrofotômetro modelo Beckman DU^R-70. Os resultados foram expressos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em termos de nmoles de malonaldeído (MDA) por mg de proteína. Para o cálculo da concentração de MDA, utilizou-se uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina bovina (Sigma) como padrão.

Prejuízo oxidativo protéico. A quantificação de carbonilas protéicas reativas, como medida da modificação oxidativa de proteínas, em amostras de fígado e músculo obedeceu o método espectrofotométrico da 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), conforme Reznick e Packer (1994). O tecido analisado (150-200 mg) foi homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, contendo digitonina (Calbiochem) (1%), um coquetel de antiproteases (phenylmethylsulfonyl fluoreto, 40µg/mL; leupeptina, 5µg/mL; pepstatina, 7µg/mL e aprotinina, 5µg/mL; Sigma) e EDTA 1mM. O homogenato foi incubado, na temperatura ambiente, por 15 minutos, e centrifugado a 6000 x g, por 10 minutos. Para remoção dos ácidos nucléicos (compostos interferentes, cuja presença pode acarretar superestimação da quantidade de carbonilas), incubaram-se as amostras com solução de sulfato de estreptomicina a 10% (Sigma, concentração final de 1%), deixando-as à temperatura ambiente por mais 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 6000 x g, por 10 minutos e o sobrenadante coletado para a reação com DNPH (Sigma). Para tal, transferiu-se 1 mL do extrato protéico para cada um de dois tubos (12 mL); a um deles foi adicionado 4 mL de solução de DNPH (10 mM em HCL 2,5 M) e ao outro, 4 mL de HCL 2,5 M. Os tubos foram deixados por 1 hora, à temperatura ambiente, no escuro, sendo agitados a cada 15 minutos. Ao final deste período, adicionou-se 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% a ambos os tubos (concentração final de 10%), deixando-os em gelo, por 10 minutos e centrifugando-os, a seguir, por 5 minutos; os precipitados protéicos foram reservados, descartando-se os sobrenadantes. Os precipitados resultantes foram então tratados com solução de TCA a 10%, sendo desintegrados com bastão de vidro e submetidos a três lavagens com 4 mL de etanol/acetato de etila (Merck, 1:1), para remoção de DNPH livre e contaminantes lipídicos. O precipitado final foi dissolvido em 2 mL de hidrocloreto de guanidina 6M (Calbiochem), com agitação a 37°C, por 10 minutos e sua absorbância registrada na faixa de 355-390 nm, contra o branco, representado pela amostra tratada com HCL. A absorbância máxima foi empregada na fórmula:

$C = \text{Abs}(355-390) \times 45,45 \text{ nmol/mL}$. Os resultados foram expressos em nmol de carbonilas protéicas reativas por mg de proteína. Para a determinação de proteína, procedeu-se à leitura das amostras tratadas com HCL, a 280 nm, utilizando-se uma curva padrão de albumina bovina. A denominação de carbonilas protéicas reativas justifica-se pelo fato dos grupos carbonilas naturalmente presentes nas ligações peptídicas não reagirem com DNPH (Cao e Cutler, 1995).

Vitamina E. A concentração de vitamina E, em fígado, músculo e plasma foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), segundo o método de Sharma & Kumar (1990), com modificações. A preparação dos tecidos obedeceu o seguinte procedimento: a 400 μ L de homogenato (obtido conforme descrito para TBARS) de fígado ou músculo ou a 200 μ L de plasma (+ BHT 9,1mM) adicionou-se 400 μ L de etanol absoluto, agitando-se em vortex por 1 minuto. Acrescentou-se ao meio de extração 480 μ L de hexano (EM SCIENCE, grau HPLC), agitando-se a mistura por 45 segundos e centrifugando-se, em seguida, a 1112 x g, por 5 minutos. Coletou-se 320 μ L da camada de hexano, o qual foi evaporado sob fluxo de N₂, sendo o resíduo dissolvido em 100 μ L de metanol (EM SCIENCE, grau HPLC). Finalmente, uma amostra de 20 μ L foi injetada na coluna, a um fluxo de 1mL/min, utilizando-se metanol 100% como fase móvel, e a fluorescência monitorada por 6 minutos (excitação, 290 nm; emissão, 330nm). Utilizou-se o cromatógrafo Solvent Delivery System, Varian, modelo 9012, equipado com detector de fluorescência, modelo 9075 e com o software Star Chromatography Workstation. A coluna constituiu-se uma C-18, 125 x 4 mm (LiChorospher 100RP-18, 5 μ M, Merck). (\pm)- α -Tocoferol (Sigma) foi utilizado como padrão externo. Os resultados foram expressos em μ g/mg de proteína, para fígado e músculo, e em μ g/mL de plasma, para este tecido.

Glutathiona. O tripeptídeo glutathiona (GSH) foi determinado em fígado, por eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE), segundo procedimento modificado de Ercal e colaboradores (1996). No preparo da amostra, aproximadamente 250 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de água ultra pura, acrescentando-se em seguida igual quantidade de acetonitrila (EM SCIENCE, grau HPLC), para precipitação de proteínas; a mistura foi agitada em vortex, por 30 segundos, e centrifugada a 10.000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado (Millipore, 13mm, 0.22 µm) e injetado no capilar. O equipamento empregado para as determinações consistiu-se do sistema de eletroforese capilar HP^{3D}, controlado pelo software HP ChemStation System (Hewlett Packard). Utilizou-se um capilar de sílica fundida, sem revestimento, com comprimento efetivo de 72 cm e diâmetro interno de 75µm, empregando-se como eletrólito tampão fosfato 50mM, pH 7.0 (Hewlett Packard). A temperatura do capilar foi de 23°C e o comprimento de onda de detecção, 214 nm. As amostras foram introduzidas por pressão (50 mBar, 5 segundos), sendo aplicada voltagem de 30 kV. No início de cada corrida, estabelecia-se um pré-condicionamento, com NaOH 0.1 N (Hewlett Packard), por 2 minutos, seguido de água ultra pura, por 1 minuto e, finalmente, tampão fosfato por 2 minutos, para equilibrar o capilar. Glutathiona reduzido e oxidado(Sigma) foram utilizados para confecção das respectivas curvas padrão. O resultado foi expresso em µg/mg de proteína.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de duas vias, para determinar a significância ($P < 0,05$) das diferenças devidas aos principais efeitos, dieta e exercício, bem como sua interação. Quando F resultou significativo, seguiu-se o teste de classificação de Duncan. Com a finalidade de analisar as possíveis correlações entre as variáveis estudadas, o método de correlação simples de Pearson foi selecionado, verificando-se a

significância do r calculado ($P < 0,05$). Para tais análises, utilizou-se o programa STATISTICA para Windows, versão 5.0 (StatSoft, Inc.).

Resultados

Ponto de exaustão. Os tempos de resistência ao exercício variaram consideravelmente com o tipo de dieta. Enquanto os grupos mantidos nas dietas controle e de suplementação atingiram a exaustão aos 39 ± 6 e 18 ± 2 min, respectivamente, a média do grupo restrito apresentou-se significativamente superior a ambos, com 69 ± 11 min ($P < 0,0025$). Apesar de não diferir do grupo controle, os animais que receberam suplementação com vitamina E apresentaram uma tendência a pior performance. Essas diferenças evidenciaram a vantagem da restrição calórica e a potencial desvantagem da suplementação com vitamina E na performance física dos animais.

Peroxidação lipídica. Os valores de TBARS, para o fígado, obtidos no presente estudo, encontram-se na Figura 1. No que se refere a este parâmetro, houve diferença significativa entre as diversas dietas ($P < 0,0001$), não ocorrendo, entretanto, efeito do exercício isoladamente, nem interação entre os dois fatores ($P > 0,05$). Percebe-se que o grupo suplementado com vitamina E, independentemente do exercício, apresentou menor peroxidação lipídica ($0,26 \pm 0,01$ nmoles MDA/mg proteína), enquanto que a restrição calórica não mostrou efeito protetor ($0,33 \pm 0,01$ nmoles MDA/mg proteína), em relação ao grupo controle ($0,32 \pm 0,01$ nmoles MDA/mg proteína). Analisando-se esses resultados e aqueles referentes ao ponto de exaustão, verifica-se que os animais sob restrição, apesar de terem desenvolvido uma atividade física de maior magnitude, por resistirem maior tempo até alcançar a exaustão, não apresentaram maior peroxidação lipídica. Por outro lado, foi notável a tendência à diminuição da

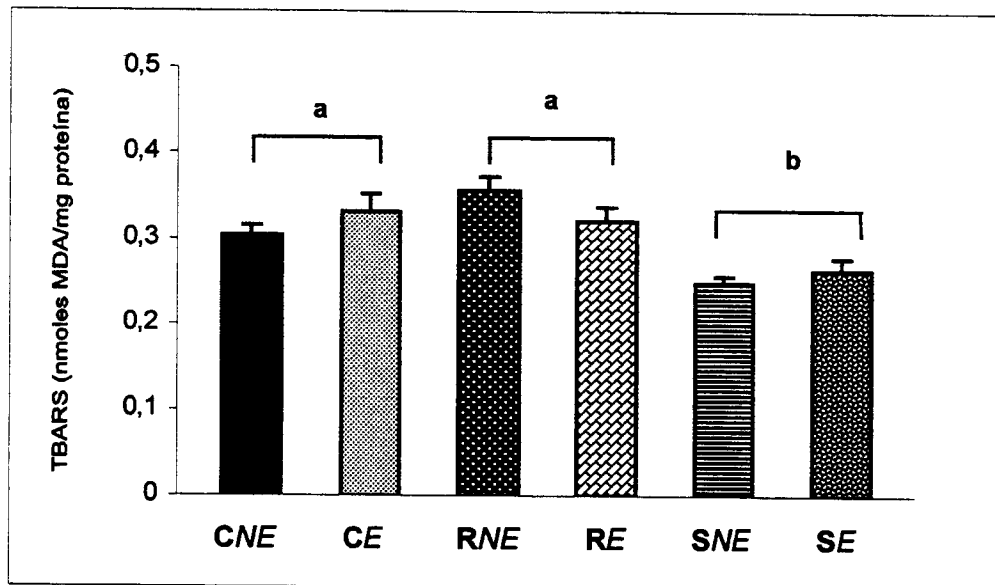


Figura 1 – Efeito da dieta na peroxidação lipídica no fígado. Os valores consistem em média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P < 0,0001$). C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado, E: exercitado).

resistência física pelos animais suplementados, embora a dieta, isoladamente, tenha promovido menor prejuízo lipídico.

No músculo, similarmente, dieta e exercício não interferiram de forma conjunta (Figura 2), mas detectou-se a influência individual de ambos os fatores ($P < 0,02$). A suplementação com vitamina E reduziu a concentração de TBARS (S: $0,14 \pm 0,003$ nmoles MDA/mg proteína), quando comparada aos outros dois grupos de dieta (C: $0,15 \pm 0,004$; R: $0,16 \pm 0,004$ nmoles MDA/mg proteína), efeito semelhante ao produzido pelo exercício (E: $0,15 \pm 0,003$; NE: $0,16 \pm 0,004$ nmoles MDA/mg proteína).

Prejuízo oxidativo protéico. Os resultados relativos à concentração de carbonilas protéicas reativas no fígado e no músculo dos grupos estudados podem ser observados na Tabela 2. Analisando este parâmetro como medida da extensão do dano oxidativo de proteínas, verifica-se que tanto no fígado como no músculo, nem a suplementação com vitamina E nem a restrição calórica demonstraram qualquer efeito ($P > 0,05$). De modo semelhante, o exercício não influenciou no dano protéico ($P > 0,05$).

Vitamina E. A concentração de vitamina E dos diferentes grupos variou em função do tecido analisado. O fígado e músculo de animais suplementados, como consequência do maior aporte recebido na dieta, apresentaram maiores concentrações de α -tocoferol ($3,25 \pm 0,22$ e $0,25 \pm 0,006$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente) do que os grupos controle e restrito (C: $0,25 \pm 0,006$ e $0,14 \pm 0,005$; R: $0,31 \pm 0,012$ e $0,13 \pm 0,006$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente), independentemente do exercício aplicado ($P < 0,0001$) (Figuras 3 e 4). Do mesmo modo que a atividade física não apresentou influência neste parâmetro, não houve interação entre este fator e a dieta ($P > 0,05$).

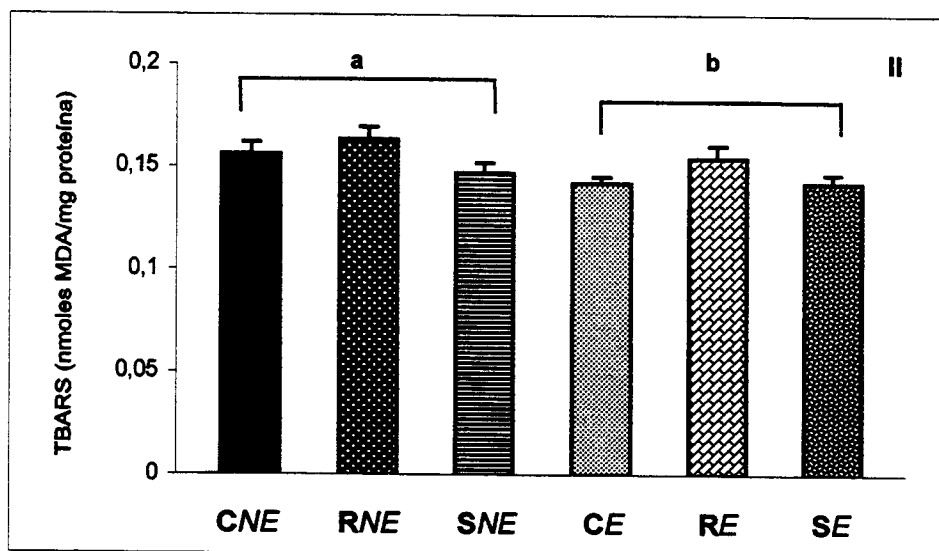
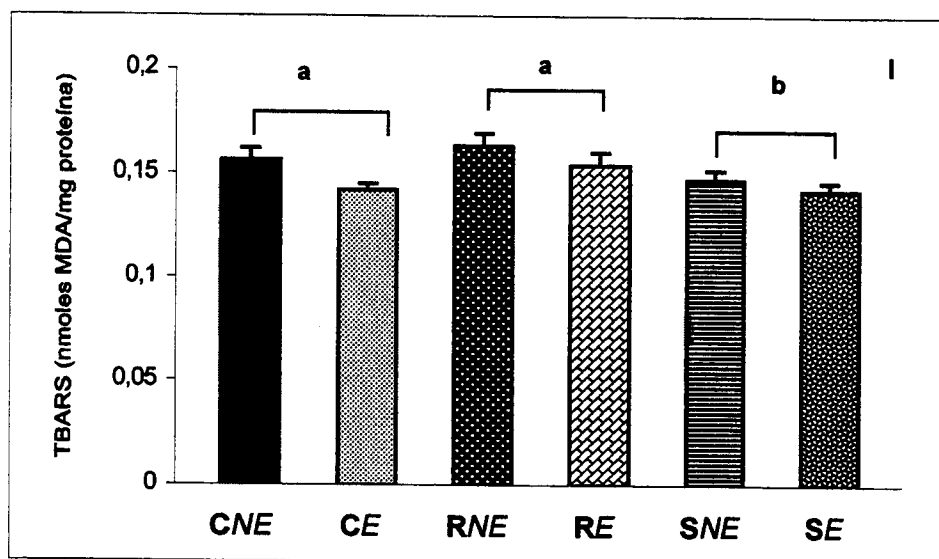


Figura 2 – Efeito da dieta (I) e do exercício (II) na peroxidação lipídica no músculo. Os valores consistem em média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,02$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado, E: exercitado).

Tabela 2 – Efeito da dieta e exercício no dano oxidativo protéico em fígado e músculo.

Grupo	Carbonilas protéicas (nmoles/mg de proteína)	
	Fígado	Músculo
<i>CNE</i>	4,80 ± 0,20	5,51 ± 0,21
<i>CE</i>	4,89 ± 0,18	5,82 ± 0,17
<i>RNE</i>	5,03 ± 0,10	5,52 ± 0,24
<i>RE</i>	5,02 ± 0,30	5,60 ± 0,11
<i>SNE</i>	4,80 ± 0,25	5,20 ± 0,23
<i>SE</i>	4,92 ± 0,23	5,58 ± 0,25

Os valores consistem na média ± erro padrão (*CNE*, $n = 8$; *RE*, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Resultados de uma mesma coluna não apresentaram diferença significativa entre si ($P > 0,05$). C: controle; R: restrito; S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado.

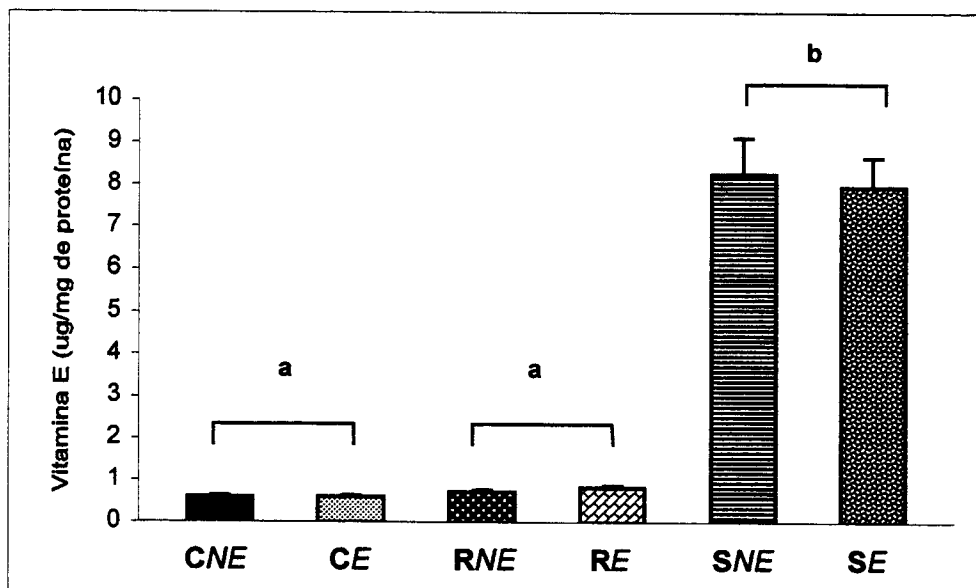


Figura 3 – Efeito da dieta na concentração de vitamina E no fígado. Os valores consistem da média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE; $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,0001$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado).

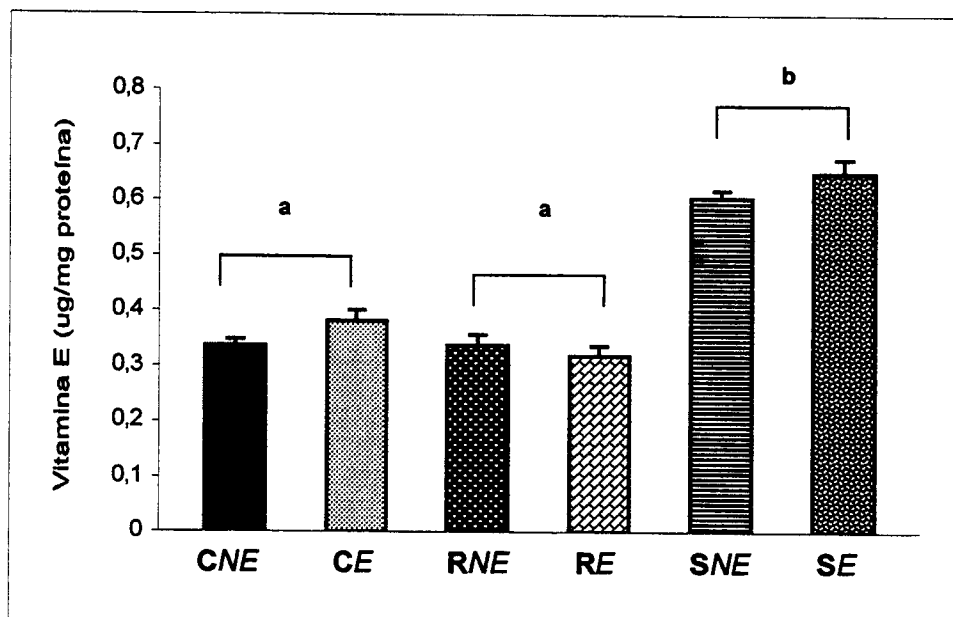


Figura 4 – Efeito da dieta na concentração de vitamina E no músculo. Os valores consistem da média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,0001$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado).

No plasma, por outro lado, o exercício ($P < 0,006$), bem como a dieta ($p < 0,0001$), isoladamente, exerceram influência na concentração de vitamina E, não sendo detectada, entretanto, interação entre os dois fatores ($P > 0,05$) (Figura 5). Animais suplementados apresentaram maiores concentrações deste antioxidante ($6,35 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), comparado àqueles sob dieta controle ($2,92 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e de restrição ($3,28 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), da mesma forma que não exercitados ($4,91 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) em relação aos que sofreram exercício exaustivo ($3,63 \pm 0,30 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).

Os resultados obtidos para o plasma correlacionaram-se significativamente com aqueles de fígado e músculo, apesar do distinto efeito do exercício nesses tecidos (Figura 6). Por outro lado, a proporção do aumento da concentração de vitamina E nos animais suplementados em relação aos demais grupos mostrou-se diferente: o fígado demonstrou uma maior elevação (da ordem de 10 x) do que em músculo e plasma (de aproximadamente 2 x), superioridade esperada em virtude do papel de armazenamento desempenhado pelo tecido hepático.

Com o intuito de verificar a relação entre proteção antioxidante e dano oxidativo nos tecidos analisados, obtiveram-se os dados de correlação entre a concentração de vitamina E e o prejuízo lipídico, em fígado e músculo (Figura 7). Observa-se que, em ambos os tecidos, estabeleceu-se uma pequena correlação negativa, porém significativa (fígado: $r = - 0,50$ $P < 0,001$; músculo: $r = - 0,32$ $P < 0,03$).

Na Figura 8 podem ser observados os cromatogramas típicos obtidos para o padrão e os tecidos analisados.

Glutathione. Os resultados relativos aos teores de GSH no fígado podem ser observados na Tabela 3. Tal como a formação de carbonilas

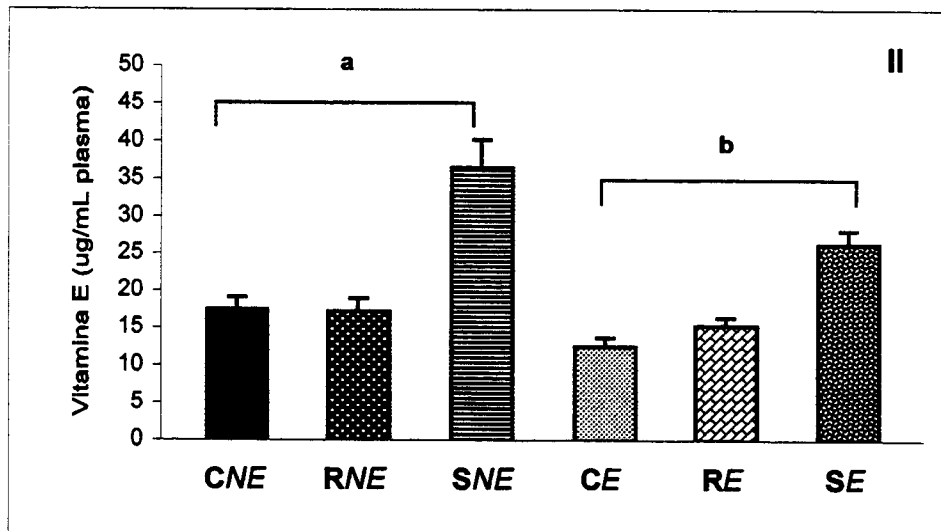
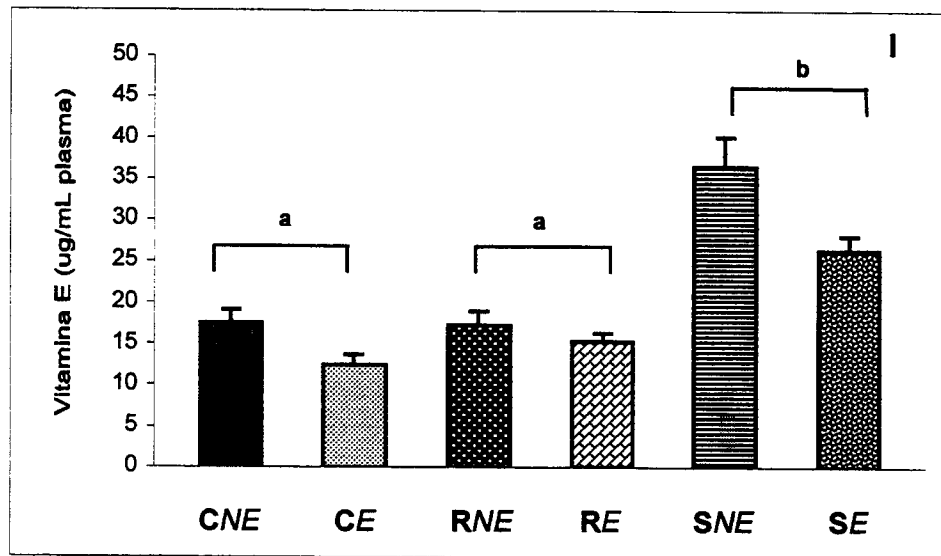


Figura 5 – Efeito da dieta (I) e exercício (II) na concentração de vitamina E do plasma. Os valores consistem da média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa (dieta, $P < 0,0001$; exercício, $P < 0,004$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado).

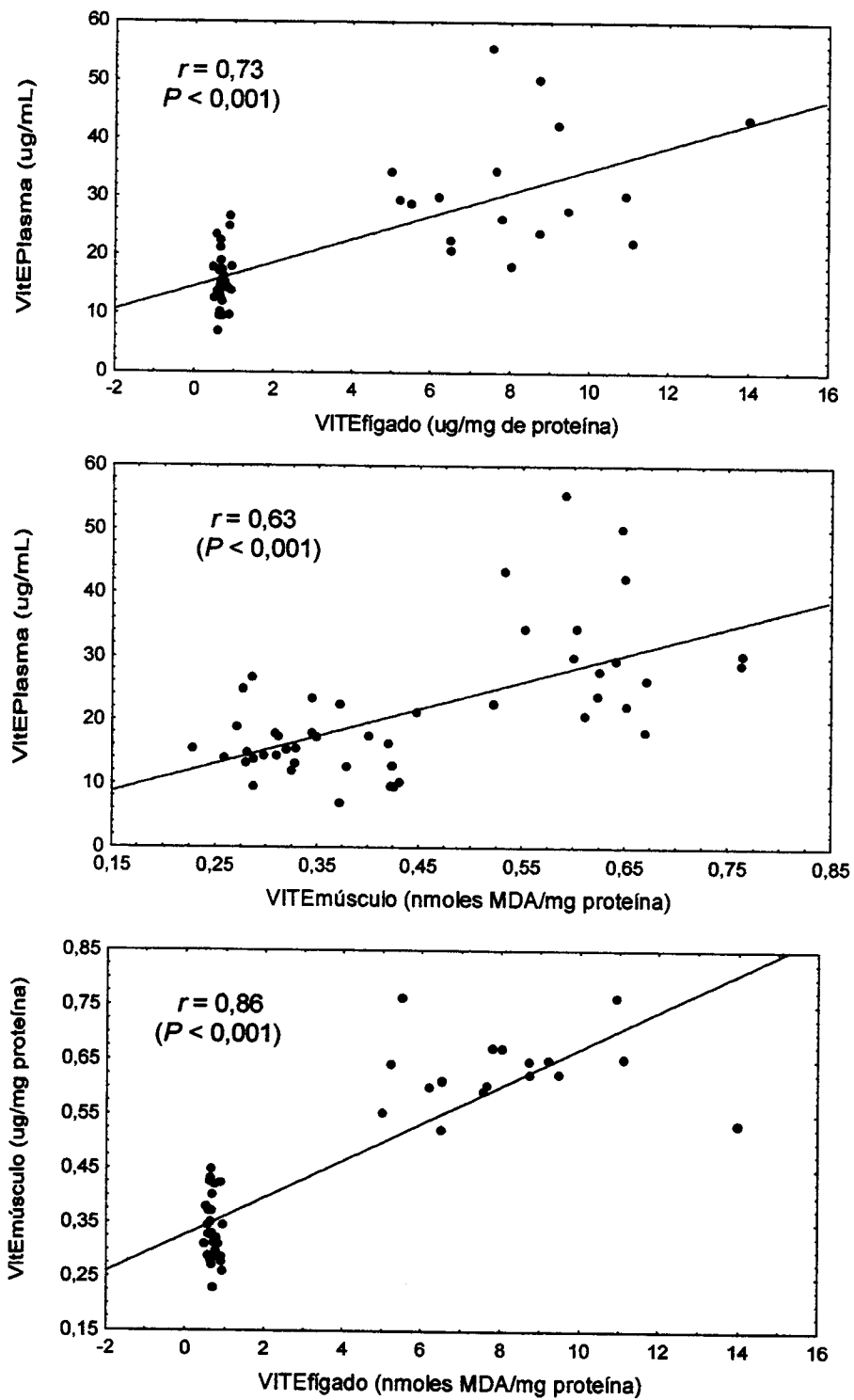


Figura 6 – Correlação entre as concentrações de Vitamina E de fígado, músculo e plasma.

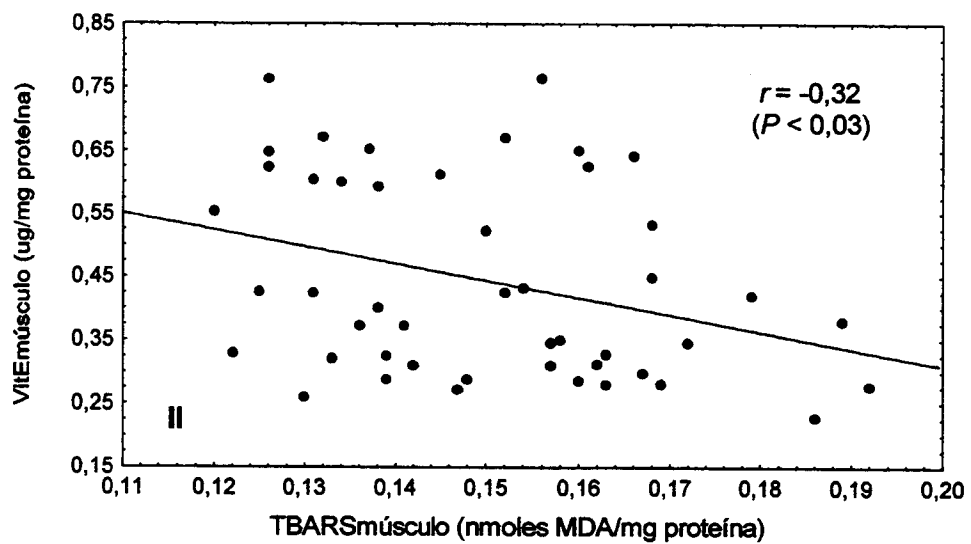
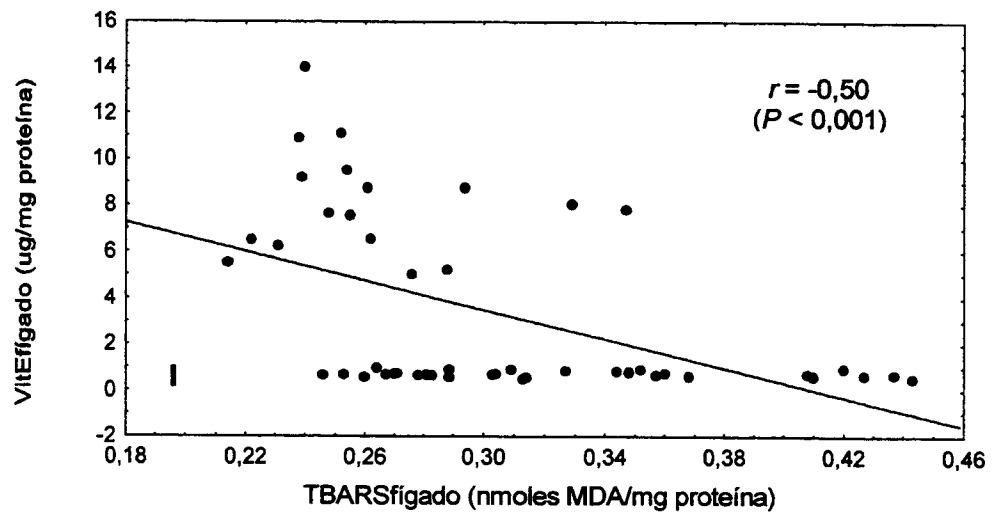


Figura 7 – Correlação entre a concentração de vitamina E e a peroxidação lipídica (TBARS) no fígado (I) e no músculo (II).

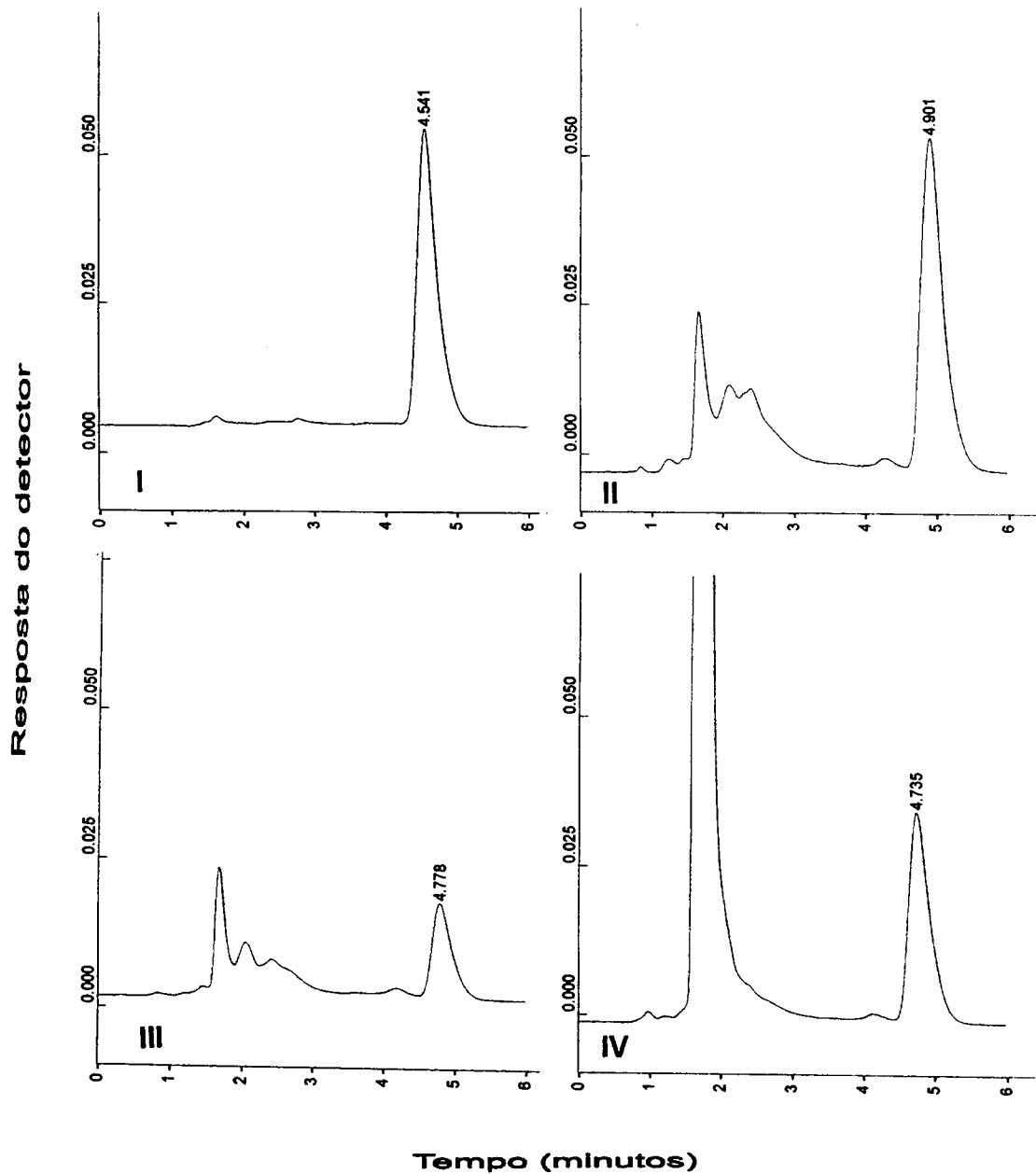


Figura 8 – Cromatogramas de amostras de padrão (\pm)- α -tocoferol (5 μ g/mL de metanol) (I), fígado(II), músculo(III) e plasma (IV). Os picos marcados pelo tempo de retenção correspondem ao α -tocoferol.

Tabela 3 – Efeito da dieta e do exercício na concentração de glutathiona (GSH) no fígado.

Grupo	GSH (ug GSH/ mg proteína)
<i>CNE</i>	6,15 ± 0,67
<i>CE</i>	5,15 ± 0,44
<i>RNE</i>	6,28 ± 0,66
<i>RE</i>	5,75 ± 0,21
<i>SNE</i>	6,13 ± 0,81
<i>SE</i>	6,09 ± 0,68

Os valores consistem da média ± erro padrão (*CNE*, $n = 8$; *RE*, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). (**C**: controle, **R**: restrito, **S**: suplementado; **NE**: não exercitado; **E**: exercitado).

protéicas reativas, seus valores não sofreram alteração em função de nenhum dos dois fatores estudados ($P > 0,05$), apesar de ser verificada uma leve tendência à redução com o exercício. A quantificação da forma oxidada deste tripeptídeo, GSSG, que constitui valiosa informação na caracterização do estresse oxidativo, também foi objeto do presente estudo, uma vez que o método se destinava a identificar ambos os compostos, de forma simultânea. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram imensa variabilidade (Tabela 4). As determinações de ambas as formas, no músculo, também foram efetuadas; neste tecido a forma oxidada não foi nem detectada pelo método e a reduzida, presente em quantidades menores do que no fígado (Tabela 4), demonstrou, além de elevada variabilidade, limitada reprodutibilidade entre repetições de uma mesma amostra (Tabela 5). Os eletroferogramas característicos dos padrões e fígados analisados encontram-se nas Figuras 9 e 10.

Tabela 4– Resultados de glutathiona reduzida (GSH) no músculo e oxidada (GSSG) no fígado, por HPCE.

Grupo	GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) músculo	GSSG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) fígado
CNE	$0,187 \pm 0,016$ (20)	$0,197 \pm 0,084$ (85)
CE	$0,501 \pm 0,077$ (38)	$0,552 \pm 0,364$ (147)
RNE	$0,321 \pm 0,131$ (60)	$0,992 \pm 0,354$ (80)
RE	$0,294 \pm 0,028$ (21)	$0,498 \pm 0,452$ (91)
SNE	$0,342 \pm 0,050$ (36)	$0,656 \pm 0,271$ (72)
SE	$0,384 \pm 0,059$ (34)	$0,984 \pm 0,532$ (121)

Os valores representam a média \pm erro padrão (entre parênteses encontram-se os coeficientes de variação%) (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado).

Tabela 5 - Determinação de glutathiona reduzida (GSH) em músculo, por HPCE

Repetição	Amostra								
	1 (CNE)	2 (CE)	3 (CE)	4 (RNE)	5 (RNE)	6 (RE)	7 (SNE)	8 (SE)	9 (SE)
1	1,29	0,85	0,44	0,13	0,67	0,31	0,34	0,60	0,44
2	0,46	1,59	0,42	0,30	0,85	0,84	1,43	0,95	0,59
Md ± ep	0,88 ± 0,29	1,22 ± 0,26	0,43 ± 0,007	0,22 ± 0,06	0,76 ± 0,06	0,58 ± 0,19	0,88 ± 0,39	0,78 ± 0,12	0,52 ± 0,05

C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado, E: exercitado.
Md ± ep: média ± erro padrão das repetições em cada coluna.

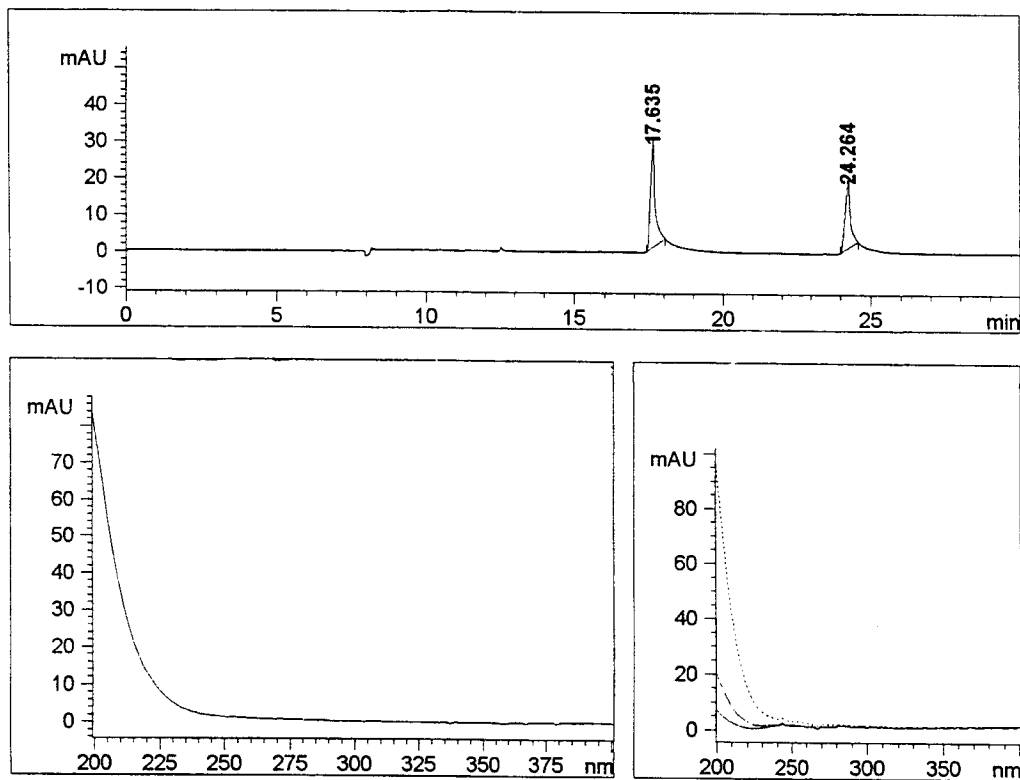


Figura 9 – Eletroferograma de amostra padrão de glutathiona reduzida (GSH; 0,2 mg/mL de água ultra pura) [tempo de retenção: 17,635 min] e glutathiona oxidada (GSSG; 0,2 mg/mL) [tempo: 24,264 min].

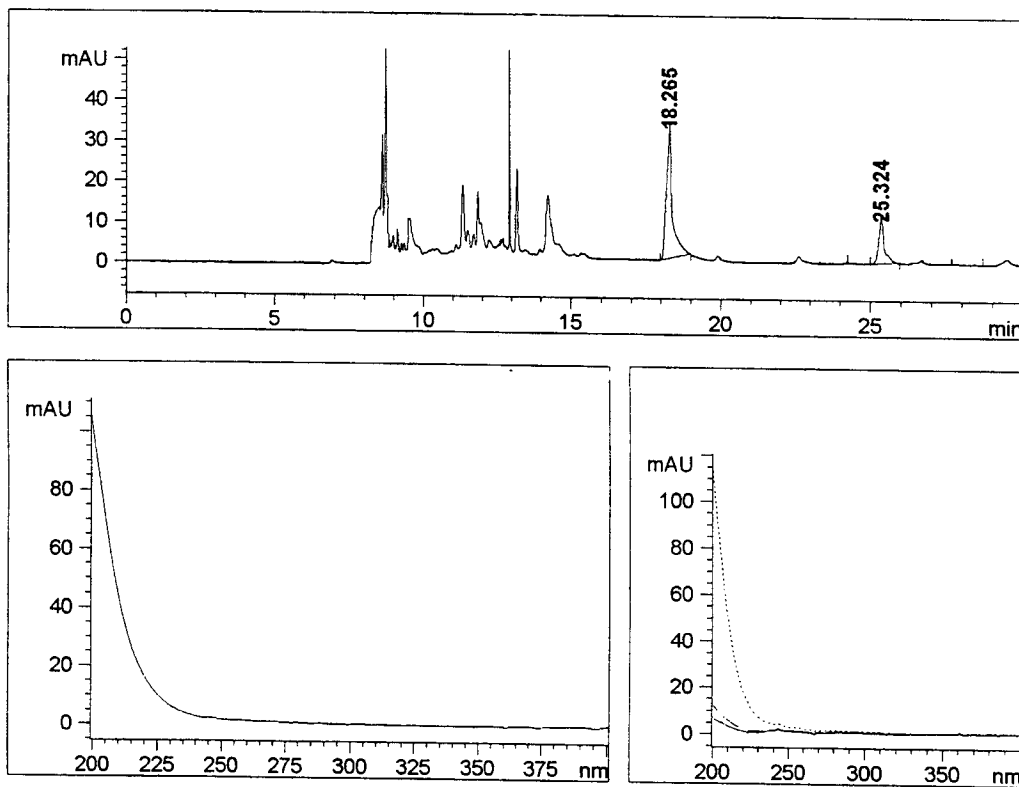


Figura 10 – Eletroferograma de amostra de fígado (250 mg/mL de água ultra pura). (GSH: tempo de retenção 18,265min; GSSG: 25,324 min).

Discussão

As evidências experimentais do aumento de longevidade produzido pela restrição calórica têm suscitado inúmeros estudos. Entre os quais, aqueles que investigam seu efeito específico no combate ao estresse oxidativo, como mecanismo para explicar aqueles resultados. Neste sentido, os trabalhos relacionando a restrição calórica com os parâmetros indicadores de estresse oxidativo têm produzido informações contraditórias. O papel da vitamina E na proteção contra o dano oxidativo também tem sugerido várias discussões.

Cabe enfatizar, inicialmente, as diferenças observadas na performance física entre os três grupos de dieta. A restrição aumentou a resistência à exaustão, enquanto a suplementação, apesar de não ter produzido diferença em relação à alimentação normal, mostrou tendência a diminuí-la. Percebe-se que, independente do efeito daquelas dietas nos parâmetros bioquímicos, as diferenças de magnitude do trabalho físico realizado entre os três grupos já demonstram distinta repercussão dos regimes.

No presente estudo, analisando-se particularmente o papel da dieta na peroxidação lipídica, independente do exercício, a suplementação com vitamina E reduziu os valores de TBARS encontrados para fígado e músculo, em relação a alimentação normal, efeito não detectado para a restrição calórica. Empregando igual modelo de restrição a camundongos, por um período de 8 semanas, Rojas e colaboradores (1993) detectaram mesmo um aumento nos valores de TBARS, bem como na sensibilidade à peroxidação lipídica, atribuídos a restrição. Esses autores também estudaram o efeito da restrição alimentar global, não encontrando alteração desses valores em relação ao grupo controle. Tais resultados levaram os pesquisadores à conclusão de que a restrição de curta duração não exerceu efeito antioxidante. Concluíram ainda que a redução nos

carboidratos ocasionou um desequilíbrio na dieta, levando a um forte aumento na peroxidação lipídica. Em trabalho anterior, Koizumi e colaboradores (1987), por outro lado, verificaram redução da peroxidação lipídica pela restrição calórica em carboidratos, após 11 meses de imposição do regime.

Ainda a respeito da influência do tempo de restrição e seu efeito na peroxidação, Rao e colaboradores (1990) não detectaram alteração com aproximadamente 3 meses de restrição calórica global, mas foi perceptível uma redução nos valores de TBARS em fígado dos animais sob este regime por 11 e 20 meses. Efeito similar foi detectado anteriormente (Koizumi e colaboradores, 1987), em camundongos, aos 11 meses, mas não aos 23 meses de restrição calórica. Por outro lado, Armeni e colaboradores (1997), mesmo em animais sob restrição durante 25 meses, não verificaram seu efeito protetor contra o dano lipídico. Venkatraman e colaboradores (1998), estudando a restrição com diferentes tipos de dieta, por 4 meses, também concluíram não exercer a restrição, de forma geral, nenhum efeito benéfico sobre a peroxidação lipídica.

O efeito protetor da vitamina E, ora relatado, assemelha-se ao referido por outros estudos. Leibovitz e colaboradores (1990) verificaram uma redução dos valores de TBARS, em amostras de fígado e coração de ratos que receberam suplementação com vitamina E. Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos em eritrócitos (Zamora et al., 1991; Garrido et al., 1993), em plasma e músculo (Goldfarb et al., 1994; Sen et al., 1997) e em fígado de animais que receberam diferentes tipos de lipídeos na dieta (Ibrahim et al., 1997; Sen et al., 1997). Torna-se interessante ressaltar que a via e, especialmente, a dosagem de vitamina administrada variaram bastante entre os diversos estudos.

Analisando o efeito da atividade física na peroxidação lipídica, verificou-se que o exercício físico exaustivo, nas condições do presente estudo,

não aumentou os valores de TBARS no fígado e mesmo os reduziu no músculo, diferentemente de muitos relatos encontrados na literatura, em que se encontra uma associação entre o aumento da peroxidação lipídica em diversos tecidos e a atividade física intensa em animais não treinados (Alessio et al., 1988; Goldfarb et al., 1994; Venditti e Meo, 1996; Sen et al., 1997). Entretanto, nem todos os trabalhos, tal como no presente, demonstram essa associação (Alessio, 1993).

Convém destacar que a intensidade do exercício consiste em importante fator a influenciar o estresse oxidativo (Witt et al., 1992; Alessio, 1993; Ji, 1995). Ji e colaboradores (1992), avaliando os efeitos de uma bateria aguda de exercício em esteira, executada em cinco diferentes graus de intensidade, verificaram aumento na peroxidação apenas em dois dos tratamentos (de ordem 3 e 5). No presente caso, em teste físico único, o tempo para alcançar a exaustão variou entre os diferentes grupos de dieta, alterando conseqüentemente a magnitude do trabalho físico realizado. Deve-se destacar que o grupo restrito, apesar de se ter exercitado por tempo significativamente maior, não apresentou diferentes valores de TBARS, o que poderia sugerir algum efeito protetor desse regime. Nesse sentido, estes resultados estão de acordo com os de Venkatraman e colaboradores (1998), que não observaram aumento da peroxidação lipídica em fígado de ratos, mesmo após serem submetidos, por dois meses, a sessões diárias de exercício exaustivo.

No que diz respeito ao dano oxidativo de proteínas, expresso no aumento da formação de grupos carbonila reativos, não se detectou nenhuma diferença entre os diferentes grupos de dieta e nem interferência do exercício físico, no presente estudo. Entretanto, encontram-se trabalhos relatando a redução dessas substâncias em diversas situações experimentais, como pela restrição calórica em fígado de ratos (Youngman et al., 1992) e cérebro de camundongos (Dubey et al., 1996), bem como através da suplementação com vitamina E (Reznick et al., 1992; Ibrahim et al., 1997; Sen et al., 1997). Embora o

dano protéico decorrente da atividade física tenha sido pouco estudado, existem também referências de aumento daquele prejuízo causado pelo exercício extenuante (Reznick et al., 1992; Sen et al., 1997). Por outro lado, Cao e Cutler (1995) não encontraram variação desse parâmetro entre os ratos de diferentes idades, nem detectaram a influência de PBN (*N-tert-butyl- α -fenilnitrona*), uma substância que demonstrou, em estudos precedentes, reverter o aumento de grupos carbonilas associado à idade.

A quantificação de carbonilas protéicas reativas pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina, utilizado neste e nos trabalhos anteriormente citados, entretanto, têm merecido críticas. Cao e Cutler (1995) estudaram esse procedimento, concluindo que não poderia medir, de forma confiável, as carbonilas reativas em extratos brutos de tecidos, apresentando como um dos principais problemas a interferência dos ácidos nucléicos. Os autores argumentaram, inclusive, que estudos relatando aumentos de carbonilas protéicas com a idade, não introduziram no procedimento analítico etapa para remoção desses interferentes. Para minimizar o problema, portanto, adicionaram sulfato de estreptomicina, seguida de uma etapa de diálise, o que reduziu muito a concentração de carbonilas no extrato. No presente trabalho, empregou-se o sulfato de estreptomicina, mas não a etapa de diálise e os valores ora encontrados, em fígado de ratos, apresentaram-se superiores aos daquele estudo; as elevadas concentrações presentes em vários trabalhos são atribuídas, pelos autores, à contaminação com o DNPH não eliminado, um outro importante problema nesse método. Portanto, as limitações do método da 2,4-dinitrofenilhidrazina devem ser consideradas nos resultados aqui encontrados.

O papel da vitamina E no combate ao estresse oxidativo nas membranas celulares encontra-se bem definido e tem sido objeto de estudo nos mais diversos contextos experimentais. A expectativa de incrementar sua ação antioxidante através do aumento de seu aporte na dieta constituiu o interesse de

muitos pesquisadores. Na presente investigação a concentração de vitamina E, em todos os tecidos analisados, apresentou-se, conforme esperado, significativamente maior nos ratos que receberam suplementação desta vitamina na dieta, aumento que repercutiu em menores valores de TBARS, conforme descrito anteriormente. A restrição calórica não apresentou nenhum efeito nesse parâmetro antioxidante. Rojas et al. (1993) encontraram mesmo uma redução, não de vitamina E, mas de outra importante vitamina do sistema de defesa antioxidante, a vitamina C, em animais submetidos tanto à restrição alimentar como à calórica, em termos de carboidratos.

No que se refere à influência do exercício, somente a concentração plasmática de vitamina E mostrou-se alterada, sofrendo uma redução pela atividade física exaustiva. Neste contexto, a literatura reúne relatos de diferentes resultados: nenhum efeito do trabalho físico no conteúdo de vitamina E em músculo, após exercício em esteira (Warren et al., 1992), tal como no presente caso ou, contrariamente, redução neste tecido (Reznick et al., 1992; Sen et al., 1997) e no fígado (Sen et al., 1997) e ainda, elevação no fígado e músculo e redução no plasma de animais submetidos a treinamento antes da bateria de exercício exaustivo (Benderitter et al., 1996). Viguie e colaboradores (1993), submetendo voluntários a exercício progressivo, não detectaram alteração na concentração plasmática de vitamina E antes, durante e após a atividade física realizada. Pincemail e colaboradores (1988), por outro lado, observaram um aumento nessa concentração na metade do exercício, seguida por uma redução na exaustão, voltando aos valores iniciais após 10 minutos de repouso posterior ao exercício.

Os estoques de vitamina E podem sofrer redistribuição entre os diferentes tecidos. O jejum e o exercício constituem fatores que podem interferir nessa transferência (Parker, 1989). No presente estudo, sua menor concentração no plasma de animais exercitados, sem alteração das concentrações hepática e

muscular, poderia sugerir uma captação aumentada pelo músculo, para dispêndio e manutenção de seu próprio pool, sem que tivesse havido ainda a reposição plasmática a partir do estoque hepático. Isto pode significar rápida mobilização do sangue para o músculo e lenta do fígado para o sangue. Verificou-se, desse modo, a mobilização do pool de vitamina E por ocasião do exercício aplicado.

A concentração de outro importante antioxidante, GSH, consiste uma valiosa informação no estudo do estresse oxidativo. Mais do que a glutatona total, a quantificação das duas formas separadamente, reduzida e oxidada, indica, por diminuição da primeira e aumento da segunda, aumento do dano oxidativo. No presente caso, os valores de GSH não variaram em decorrência de nenhum dos fatores presentemente estudados. A dieta, particularmente, seja a restrição calórica ou a suplementação com vitamina E, aparentemente não exerceu qualquer interferência neste parâmetro. Consistentemente com o observado para os níveis de peroxidação lipídica, dano protéico e estoques de vitamina E, os valores inalterados de GSH podem reforçar a possibilidade de um efeito protetor da restrição, por não se detectar prejuízo apesar do trabalho físico de maior magnitude realizado. Estudos investigando restrição calórica de curto (Rojas et al., 1993) e longo prazo (Masoro et al., 1991) verificaram efeito semelhante, embora haja relatos de um aumento de GSH em consequência deste tipo de regime (Albrecht et al., 1992; Armeni et al., 1997). A suplementação com vitamina E, por quatro semanas, similarmente, não produziu alteração na concentração de GSH, em fígado de camundongos (Ibrahim et al., 1997).

O exercício exaustivo, tal como a dieta, no presente caso, não produziu alteração no teor hepático de GSH. A carga e a intensidade do exercício parecem ser importantes no seu efeito na concentração deste antioxidante (Ji et al., 1992). Em estudo realizado com ratos exercitados com diferentes cargas de trabalho, em esteira, Ji e colaboradores (1992) detectaram elevação na

concentração de GSH, em um dos músculos analisados, apenas nos dois tratamentos de maior intensidade. Outros relatos indicaram uma severa depleção de glutathiona total (GSH+GSSG) (Pyke et al., 1986) e GSH (Leeuwenburgh e Ji, 1995) em fígado, mas não em músculo, de animais submetidos a exercício exaustivo. No presente caso, entretanto, após os animais restritos terem realizado exercício de maior magnitude que os demais, em condições comparáveis às dos estudos citados, não foi detectada alteração na concentração hepática de GSH.

Um outro ponto que merece discussão é a metodologia empregada para quantificar o GSH. A eletroforese capilar de alta performance constitui uma promissora técnica na separação de pequenas moléculas biológicas, mesmo diante de desvantagens como a interferência do material do capilar na separação dos componentes (Ercal et al., 1996; Deyl e Struzinsky, 1991). O procedimento empregado no presente estudo permite a determinação simultânea das duas formas do tripeptídeo, sem etapa prévia de derivatização, o que resulta em vantagem considerável, dada a importância da razão GSH/GSSG para estudos de estresse oxidativo.

Realizaram-se determinações de GSH e GSSG em fígado e músculo dos animais estudados. Entretanto, apenas os resultados de GSH em fígado foram considerados. Os dados de GSSG, neste tecido, apresentaram elevada variabilidade; as concentrações muito mais baixas desse composto, normalmente encontradas nos tecidos, quando comparadas as da forma reduzida, podem ter contribuído para este resultado. Ercal e colaboradores (1996) mencionaram esta limitação, recomendando este método para situações de estresse oxidativo, quando o GSSG aumenta (a razão GSH:GSSG é de aproximadamente 250 na ausência de estresse oxidativo). No músculo, o GSSG não foi nem mesmo detectado; a determinação de GSH neste tecido, por outro lado, apresentou considerável variabilidade, a que pode ser entendida pela dificuldade de homogeneização do músculo apenas em água. A introdução de

substâncias no meio de homogeneização que permitam a solubilização das proteínas musculares, sem, no entanto, ocasionar alteração na parede do capilar, deverá ser um interessante objeto de estudo.

Dos resultados apresentados, verifica-se que, nas condições do presente trabalho, o exercício exaustivo imposto aos animais não promoveu estresse oxidativo; de forma oposta, reduziu, embora levemente, os valores de TBARS, no músculo. Por outro lado, a suplementação com vitamina E, independentemente do exercício aplicado, porém não a restrição calórica, em termos de carboidratos, exerceu efeito protetor, no que diz respeito à peroxidação lipídica, no fígado e no músculo dos animais estudados, aumentando ainda a concentração desta vitamina em todos os tecidos analisados. Não deve ser esquecido, ainda, o potencial efeito protetor da restrição calórica, em virtude de não ter permitido aumento do prejuízo oxidativo, apesar do trabalho físico de maior magnitude realizado pelo grupo de animais submetidos a esse regime.

Referências Bibliográficas

- ALBRECHT, R.; PELISSIER, M. A.; ATTEBA, S.; SMAILI, M. Dietary restriction decreases thiobarbituric acid-reactive substances generation in the small intestine and in the liver of young rats. **Toxicology Letters**, v. 63, p.91-96, 1992.
- ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 218-224, 1993.
- ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H.; CUTLER, R. G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat . **American Journal of Physiology** , v. 255, p. C874-C877, 1988.
- ARMENI, T.; TOMASETTI, M.; BARONI, S. S.; SACCUCCI, F.; MARRA, M.; PIERI, C.; LITTARRU, G. P.; PRINCIPATO, G.; BATTINO, M. Dietary restriction affects antioxidants levels in rat liver mitochondria during ageing. **Molecular Aspects of Medicine.**, v. 18, p. s247-s250, 1997.
- BEALES, P. E.; WILLIAMS, A. J. K.; ALBERTINI, M. C.; POZZILLI, P. Vitamin E delays diabetes onset in the non-obese diabetic mouse. **Hormonal Metabolism Research**, v. 26, p. 450-452, 1994.
- BENDERITTER, M.; HADJ-SAAD, F.; LHUISSIER, M.; MAUPOIL, V.; GUILLAND, J-C.; ROCHETTE, L. Effects of exhaustive exercise and vitamin B₆ deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 541-549, 1996.
- CAO, G.; CUTLER, R. Protein Oxidation and Aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 320, n.1, p. 106-114, 1995.
- CHEN, J.J.; YU, B.P. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, n. 5, p. 411-418, 1994.
- CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p.215-232, 1991.
- DEYL, Z.; STRUZINSK, R. Capillary zone electrophoresis: its applicability and potencial in biochemical analysis. **Journal of Chromatography**, v.569, p. 63-122, 1991.

- DJURIC, Z.; LU, M.H.; LEWIS, S.M.; LUONGO, D.A.; CHEN, X.W.; HEILBRUN, L.K.; READING, B.A.; DUFFY, P.H.; HART, R.W. Oxidative DNA damage levels in rats fed low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, p. 156-160, 1992.
- DUBEY, A.; FORSTER, M. J.; LAL, H.; SOHAL, R. S. Effect of age on caloric intake on protein oxidation on different brain regions and on behavioral functions of the mouse. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 189-197, 1996.
- ERCAL, N.; LE, K.; TREERATPHAN, P.; MATTHEWS, R. Analysis of thiol-containing compounds in biological samples by capillary zone electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 10, p. 15-18, 1996.
- GARRIDO, A.; GÁRATE, M.; CAMPOS, R.; VILLA, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Increased susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress after ingestion of high doses of fish oil: effect of aging and protective action of dl- α -tocopherol supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 118-122, 1993.
- GOLDFARB, A. H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 232-236, 1993.
- GOLDFARB, A. H.; McINTOSH, M. K.; BOYER, B. T.; FATOUROS, J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 4, p. 1630-1635, 1994.
- HAEGELE, A.D.; BRIGGS, S.P.; THOMPSON, H.J. Antioxidant status and dietary lipid unsaturation modulate oxidative DNA damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, p. 111-115, 1994.
- IBRAHIM, W.; LEE, U-S., YEH, C-C., SZABO, J.; BRUCKNER, G.; CHOW, C.K. Oxidative stress and antioxidants status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 1401-1406, 1997.
- JAIN, S. K.; McVIE, R.; JARAMILLO, J. J.; PALMER, M.; SMITH, T.; MEACHUM, Z. D.; LITTLE, R. L. The effect of modest vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in diabetic patients. **Lipids**, v. 31, S-87-S-90, 1996.

- JI, L. L.; FU, R.; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, n. 5, p. 1854-1859, 1992.
- JI, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1079-1086, 1995.
- KOIZUMI, A.; WEINDRUCH, R.; WALFORD, R.L. Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 361-367, 1987.
- KUMAR, C. T.; REDDY, V. K.; PRASAD, M.; THYAGARAJU, K.; REDDANNA, P. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 111, p. 109-115, 1992.
- LEEUWENBURGH, C.; JI, L. L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n.2, p. 941-949, 1995.
- LEIBOVITZ, B. E.; HU, M-L.; TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil. **Lipids**, v. 25, n. 3, p. 125-129, 1990.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MASORO, E. J. Nutrition and Aging - A current assessment. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 842-848, 1985.
- MASORO, E. J.; SHIMOKAWA, I.; YU, B. P. Retardation of the aging processes in rats by food restriction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 621, p. 337-352, 1991.
- NOVELLI, G. P. ; BRACCIOTTI, G.; FALSINI, S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 9-13, 1990.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

- PACKER, L.; LANDVIK, S. Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 1-6, 1989.
- PARKER, R. S. Dietary and Biochemical Aspects of Vitamin E. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 33, p. 157- 232, 1989.
- PINCEMAIL, J. C.; DELBY, C.; CAMUS, G.; PIRNAY, F.; BOUCHEZ, R.; MASSAUX, L.; GOUTIER, R. Tocopherol mobilization during intensive exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 57, p. 189-191, 1988.
- PYKE, S.; LEW, H.; QUINTANILHA, A. Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 139, n.3, p. 926-931, 1986.
- RAO, G.; XIA, E.; NADAKAVUKAREN, M.J.; RICHARDSON, A. Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. **Journal of Nutrition**, v. 120, p. 602-609, 1990.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, Jr. G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- REZNICK, A. Z.; WITT, E.; MATSUMOTO, M.; PACKER, L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 2, p. 801-806, 1992.
- REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357-363, 1994.
- ROJAS, C.; CADENAS, S.; PÉREZ-CAMPO, R.; LOPEZ-TORRES, M.; PAMPLONA, R.; PRAT, J.; BARZA, G. Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 306, n. 1, p. 59-64, 1993.
- SEN, C. K.; ATALAY, M.; AGREN, J.; LAAKSONEN, D. E.; ROY, S.; HANNINEN, O. Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 1, p.189-195, 1997.

- SHARMA, A.; KUMAR, A. Concurrent analysis of plasma retinol and α -tocopherol by isocratic HPLC. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 780-782, 1990.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical medicine. In: FAVIER, A.E.; NÉVE, J.; FAURE, P. Trace elements and free radicals in oxidative stress. Champaign: AOCS PRESS, 1994. cap. 1, p. 1-6.
- VENDITTI, P.; MEO, S. Di. Antioxidants, Tissue Damage, and Endurance in Trained and Untrained Young Male Rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, n. 1, p. 63-68, 1996.
- VENKATRAMAN, J. T.; ANGKEOW, P.; FERNANDES, G. Effects of food restriction on antioxidant defense system in exercised rats. **Nutrition Research**, v. 18, n. 2, p. 283-298, 1998.
- VIGUIE, C. A.; FREI, B.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N.; PACKER, L.; BROOKS, G. A. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. **Journal Applied Physiology**, v. 75, n. 2, p. 566-572, 1993.
- YOUNGMAN, L.D.; PARK, J-Y.; AMES, B.N. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 9112-9116, 1992.
- YU, B. P. How diet influences the aging process of the rat. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 205, p. 97-105, 1994.
- WARREN, J. A.; JENKINS, R. R.; PACKER, L.; WITT, E. H.; ARMSTRONG, R. B. Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 6, p. 2168-2175, 1992.
- WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. **Scientific American**, v. 274, n. 1, p.32-38, 1996.
- WITT, E. H.; REZNICK, A. Z.; VIGUIE, C. A.; STARKE-REED, P.; PACKER, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 766-773, 1992.

ZAMORA, R.; HIDALGO, F. J.; TAPPEL, A. L. Comparative antioxidant effectiveness of dietary β -carotene, vitamin E, selenium and coenzyme Q₁₀ in rat erythrocytes and plasma. **Journal of Nutrition**, v. 121, p. 50-56, 1991.

ZHANG, D.; OKADA, S.; YU, Y.; ZHENG, P.; YAMAGUCHI, R.; KASAI, H. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification, and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. **Cancer research**, v. 57, p. 2410-2414, 1997.

4. Artigo 2

Alterações metabólicas induzidas no rato exercitado por restrição calórica e suplementação com vitamina E

Metabolic changes induced by caloric restriction and vitamin E supplementation in the exercised rat

Oliveira, S. L. de, Diniz, D. B., Macedo, D. V. De, Amaya-Farfan, J.

Abstract

The effects of caloric (carbohydrate) restriction (CR) and vitamin E supplementation on some exercise-induced metabolic modifications in rats were studied. Male *Wistar*, eleven-wk old rats were fed control (C)(AIN-93M), or restricted amounts of a modified control (R), or control plus vitamin E (1425 UI of all-*rac*- α -tocopheryl acetate)(S) diets. After feeding the diets for five months, the animals in each group were divided into exercised (E) and non-exercised (NE) categories. Before being killed, the rats of the exercised category were required to run on a treadmill to exhaustion. Hepatic and muscular glycogen, plasma glucose, insulin and lactate were determined and the time to reach exhaustion was registered. Caloric (carbohydrate) restriction increased hepatic glycogen and resistance to exhaustive exercise, but not produce any effect in the insulin and lactate concentrations. When associated to exercise, CR lowered the glycemic levels. Vitamin E supplementation decreased the resistance to exhaustion in the exercised animals, when compared to caloric restriction, but not to the normal diet. The biochemical basis for the choking effect shown by vitamin E supplementation is not known. These results indicate that caloric restriction improved physical performance, whereas vitamin E supplementation showed a tendency to decreased it.

Key words: caloric restriction, vitamin E, exercise, glycogen.

Introdução

O impacto da dieta na nutrição humana e seu papel na qualidade de vida constituem tema de especial interesse de diversas áreas da pesquisa científica. Neste contexto, a restrição calórica vem se destacando por seu reconhecido efeito sobre a longevidade, aumentando o tempo de vida de várias espécies estudadas (Weindruch, 1996).

Encontram-se descritos na literatura os benefícios da restrição calórica na prevenção de várias modificações relacionadas a idade, tais como perda da resposta lipolítica de adipócitos a hormônios, alteração da estrutura e função do músculo esquelético, aumento dos níveis de calcitonina sérica e declínio na atividade locomotora espontânea. Seus efeitos no sistema nervoso central, função reprodutora e sistema imune também têm sido objetos de investigação (Masoro et al., 1991). Descrevem-se ainda alterações metabólicas como redução da glicemia, da insulina circulante (Reaven e Reaven, 1981; Cartee and Dean, 1994; Cartee et al., 1994; McDonald, 1997) e da concentração plasmática de colesterol e triacilgliceróis (Masoro et al., 1991).

Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual essa manipulação dietética promove retardo das mudanças fisiológicas e patológicas associadas ao envelhecimento, algumas teorias foram propostas (Masoro et al., 1991). Entre elas, tem merecido particular enfoque aquela que discute o papel antioxidante da restrição calórica no prejuízo oxidativo acumulado no decorrer da vida (Masoro et al., 1991; Yu, 1994; Weindruch, 1996). Desse modo, uma outra alternativa dietética que tem sido bastante investigada compreende a suplementação com substâncias como a vitamina E, importante antioxidante lipofílico das membranas celulares. Relatam-se diversos efeitos benéficos desse procedimento, incluindo efeito protetor contra o prejuízo oxidativo em eritrócitos,

figado e coração de ratos (Leibovitz et al., 1990; Garrido et al., 1993), inibição da modificação do DNA e incidência de câncer (Zhang et al., 1997) melhora da utilização de glicose e resposta hepática à insulina em humanos (Paolisso et al., 1993) e retardo do início da diabetes em camundongos (Beales et al., 1994).

A influência da dieta em situações de alterada demanda fisiológica, como o exercício físico, também tem despertado a atenção de alguns pesquisadores (Slentz et al., 1990; Koubi et al., 1991; Spriet e Peters, 1998). Neste sentido, os efeitos da suplementação com vitamina E vêm sendo mais exaustivamente investigados do que aqueles da restrição, especialmente seu papel antioxidante no prejuízo induzido por aquela atividade física (Reznick et al., 1992; Witt et al., 1992; Ji, 1995; Sen et al., 1997). No entanto, poucos estudos são encontrados acerca da repercussão de ambos os regimes nas modificações metabólicas induzidas pelo exercício.

O objetivo do presente trabalho, portanto, consistiu no estudo dos efeitos da restrição calórica e da suplementação com vitamina E em alguns parâmetros relacionados ao exercício físico exaustivo, a saber, estoques hepático e muscular de glicogênio, performance física, glicemia, insulinemia e lactato sanguíneo.

Material e Métodos

Animais e dietas

Sessenta ratos *Wistar* machos, do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, de 21 dias de idade, foram mantidos com dieta comercial (Labina, Ralston Purina do Brasil LTDA), com livre acesso a

ração, em gaiolas coletivas, nas condições do biotério (ciclo de claro/escuro de 12 h, $22 \pm 2^\circ\text{C}$), até atingirem aproximadamente 11 semanas de idade. Nesta fase, os animais foram transferidos para gaiolas individuais e divididos em três grupos (n=20), por sorteio, conforme três diferentes dietas (Tabela 1): Controle (C), formulada conforme AIN-93 M (Reeves et al, 1993), Restrita (R), elaborada a partir de modificação da controle, com restrição de 30% de calorias, em termos de carboidratos, e Suplementada (S), obtida acrescentando-se 1425 UI de vitamina E (All-*rac*- α -tocoferil acetato, 50% de atividade) à dieta controle.

A dieta de restrição foi constituída de modo que os animais, consumindo 30% menos ração que o grupo controle, recebessem a mesma quantidade dos demais nutrientes, sofrendo redução exclusiva no aporte calórico em carboidratos. Desse modo, a restrição calórica total de 30% foi obtida mediante diminuição no consumo (30%) de uma dieta com menor teor glicídico, resultando em decréscimo de 40% na ingestão de carboidratos. A dieta de suplementação com vitamina E, caracterizada por uma concentração vinte vezes superior à recomendada (dieta controle), foi selecionada com o objetivo de simular situação de elevado consumo, defendido recentemente pela medicina ortomolecular (cerca de quarenta vezes). Tal recomendação tem por finalidade aumentar a proteção do organismo humano contra o estresse oxidativo e retardar o envelhecimento.

Para mais eficiente controle da ingestão calórica, efetuou-se a determinação energética das dietas, em bomba calorimétrica (PARR modelo 1261, acoplada a um banho PARR modelo 1563).

Inicialmente, todos os grupos receberam dieta controle, por um período de 8 dias, com a finalidade de ambientar os animais às novas condições: diferente apresentação da dieta e isolamento em nova gaiola. Terminada esta etapa, as respectivas dietas experimentais foram então

Tabela 1- Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas (g/ 100g)		
	Controle	Restrita	Suplementada
Caseína (85 %)	14,00	20,00	14,00
Amido de milho (87,6%)	62,07	54,15	62,07
Sacarose (99,5%)	10,00	7,22	10,00
Óleo de soja	4,00	5,71	4,00
Fibra (celulose)	5,00	5,86	5,00
Mistura mineral AIN-93 M ^a	3,50	5,00	3,50
Mistura vitamínica AIN-93 M ^b	1,00	1,43	1,00
L-cistina	0,18	0,26	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,36	0,25
Ter-butildidroquinona	0,0008	0,0011	0,0008
Todo-rac- α -tocoferil acetato 50% de atividade)	—	—	0,285 ^c
Calorias totais	347,71	347,62	347,71

^a contém 20,98% de sacarose

^b contém 97,47% de sacarose

^c para dar uma suplementação de 1425UI / kg de dieta (total de 1500UI /kg)

introduzidas, permitindo-se uma adaptação de 4 dias, após a qual iniciou-se o período experimental propriamente dito, cuja duração foi de 21 semanas. Os animais dos grupos controle e suplementado tiveram livre acesso à dieta, enquanto que àqueles do grupo restrito ofereceu-se 70% da quantidade média diária de ração ingerida pelo grupo controle, calculada a partir dos dados de ingestão e rejeito, obtidos periodicamente (três vezes por semana). O peso dos animais foi acompanhado semanalmente. A água (livre acesso) e a ração eram renovadas no dia do controle da ingestão. O manuseio e o procedimento experimental seguiram as normas estabelecidas pela Comissão de Ética da FEA (Faculdade de engenharia de Alimentos) para Uso de Animais de Experimentação.

Procedimento

Ao final do período experimental, entre a 20^a e a 21^a semana, os ratos de cada grupo foram subdivididos, por sorteio, em duas categorias: Exercitados (*E*) e Não Exercitados (*NE*). Após uma noite de jejum (15 h), o primeiro subgrupo foi submetido a exercício, sem treinamento, em bateria única, em esteira rolante com 15° de inclinação, à velocidade de 27 m/min, até a exaustão, condição definida em função da prostração assumida pelo animal na esteira. O estímulo para a corrida foi proporcionado por choque elétrico de baixa intensidade, disparado a cada vez que o animal parasse no início da plataforma de corrida. O segundo subgrupo foi deixado em repouso. Os ratos foram exercitados em conjuntos de seis componentes dos diferentes grupos experimentais, sendo cronometrado o tempo de corrida. Os animais não exercitados também permaneceram na sala de exercício, a fim de se uniformizar a interferência do ambiente. Após exaustão, procedeu-se à medição de lactato no sangue retirado da cauda, seguindo-se, imediatamente, o sacrifício, por deslocamento cervical e submetendo-se os não exercitados ao mesmo processo. Ratos de ambos os subgrupos foram sacrificados de maneira intercalada. Coletaram-se amostras de sangue (punção cardíaca), bem como o fígado e os músculos *gastrocnemius*.

O sangue foi tratado com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, solução a 10% em cloreto de sódio 0,9%, para uma concentração final de 1%), seguido por repouso e posterior centrifugação a 1514 x g, por 15 min. O plasma assim obtido e os demais tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, até posteriores análises.

Análises bioquímicas

Glicogênio. As determinações de glicogênio muscular e hepático obedeceram o procedimento de extração de Sjorgreen e colaboradores (1938) e do ensaio colorimétrico de Hassid & Abrahams (1957). Amostras de músculo (200 mg) ou fígado (500 mg) foram adicionadas a 1 mL de KOH 30% (tubos de 15 mL) e colocadas em banho maria fervente, por 60 minutos, para digestão do tecido. Após este período, acrescentou-se 0,1 mL de Na₂SO₄ saturado e, em seguida, 3,5 (músculo) ou 7 mL (fígado) de etanol (Merck, p.a.), sendo deixados em banho fervente até o início da ebulição do álcool, quando o material foi centrifugado a 1112 x g, por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi dissolvido em 1 mL de água destilada, previamente aquecida, seguindo-se nova adição de 3,5 ou 7 mL de etanol e posterior centrifugação. Dissolveu-se o precipitado assim obtido em 5 mL de água destilada (músculo) ou 25 mL de água deionizada (fígado) e a uma alíquota de 0,2 mL dessa solução, acrescentou-se 0,8 mL de água destilada e 2 mL de solução de antrona (0,2%). A mistura foi colocada em banho fervente, por 15 minutos, e a absorbância medida a 650 nm. Utilizou-se como padrão D-glicose anidra (Sigma) e os resultados foram expressos em mg de glicogênio por 100 mg de tecido.

Insulina. Procedeu-se à quantificação de insulina no plasma coletado, por radioimunoensaio, conforme método de Desbuquois & Aurbach (1971). Os resultados foram expressos em $\mu\text{U/mL}$ de plasma (1 ng = 24 μU).

Glicose e lactato. A concentração plasmática de glicose foi medida através da utilização de kit específico (Glicose GOD–ANA, Labtest), sendo o resultado expresso em mg/dL de plasma. O lactato das amostras de sangue foi determinado em lactímetro (ACUSPORT, Boehring Mannheim), através da disposição de uma gota da amostra em fita apropriada e os resultados foram expressos em nmoles/mL de sangue.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, para determinar a significância ($P < 0,05$) das diferenças devidas aos principais efeitos, dieta e exercício, bem como sua interação. Quando F resultou significativo, seguiu-se o teste de classificação de Duncan. Com a finalidade de analisar as possíveis correlações entre as variáveis estudadas, o método de correlação simples de Pearson foi selecionado, verificando-se a significância do r calculado ($P < 0,05$). Para tais análises, utilizou-se o programa STATISTICA para Windows, versão 5.0 (StatSoft, Inc.).

Resultados

Peso e ingestão. No início do experimento, os animais apresentavam médias de peso equivalentes (C: 323 ± 25 ; R: 332 ± 25 ; S: 326 ± 27 g; $P > 0,05$). Após a primeira semana, aqueles submetidos a restrição já apresentavam peso significativamente menor do que os das demais dietas ($p < 0,003$). Ao final, o grupo restrito exibiu 78 % do peso (382 ± 14 g) do controle (489 ± 38 g), enquanto que animais suplementados mantiveram-se equiparados a este grupo (493 ± 40 g) ($P < 0,0001$). O dados de evolução do peso podem ser

observados na Figura 1. O ganho em peso dos animais restritos correspondeu a aproximadamente 30% daquele adquirido por cada um dos outros dois grupos.

A média de ingestão diária de ração dos animais, no período, foi de 21 ± 1 g, para o grupo controle e 20 ± 1 g para o suplementado; os animais restritos, com fornecimento de ração limitado a 70 % da quantidade ingerida pelo primeiro grupo, apresentaram uma média de $15 \pm 0,3$ g. Analisando-se os resultados da bomba calorimétrica (dieta C: 405 ± 12 ; R: 419 ± 12 e S: 404 ± 11 cal/100g ração), tem-se que o grupo sob restrição calórica consumiu 73,6 % das calorias ingeridas pelo controle. A pequena diferença encontrada entre o consumo real (73,6%) e aquele planejado (70%), deveu-se à leve superioridade energética da dieta de restrição que, em relação às demais, desviou-se ligeiramente do padrão isocalórico calculado (Tabela 1).

Performance física e glicogênio. Os resultados relativos ao tempo de exaustão registrado na esteira, indicaram uma diferença significativa ($P < 0,0025$) entre os diferentes grupos de dieta (Figura 2). Animais restritos resistiram mais tempo até alcançar a exaustão (69 ± 11 min), do que aqueles sob dieta controle (39 ± 6 min) e suplementada (18 ± 2 min). Por outro lado, a reserva hepática de glicogênio do grupo sob restrição calórica apresentou-se superior, ($0,68 \pm 0,21$ mg/100 g de tecido), quando comparada aos demais grupos de dieta (CNE: $0,18 \pm 0,02$; SNE: $0,14 \pm 0,02$ mg/100 g de tecido) ($P < 0,013$). Com o exercício, esses valores se igualaram (CE: $0,08 \pm 0,008$; RE: $0,10 \pm 0,009$; SE: $0,08 \pm 0,01$ mg/100 g de tecido, Figura 3). Portanto, o exercício apenas promoveu redução no glicogênio hepático de animais sob restrição calórica, não alterando os valores dos outros grupos de dieta. O glicogênio muscular, por sua vez, semelhante para todos os grupos de dieta, não exercitados (CNE: $0,53 \pm 0,05$; RNE: $0,54 \pm 0,03$; SNE: $0,53 \pm 0,01$ mg/100 g de tecido), diminuiu significativamente ($P < 0,05$) com a atividade física, sendo significativamente

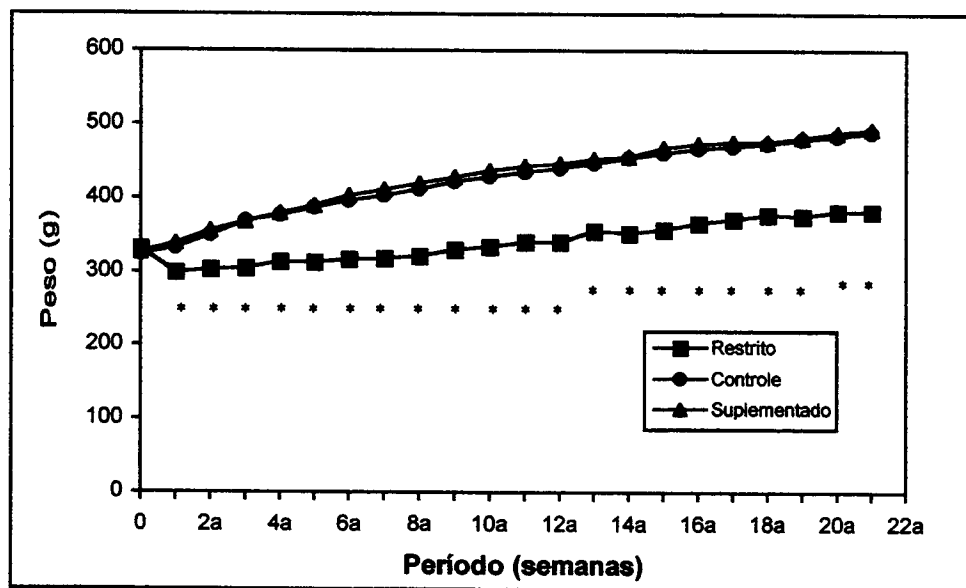


Figura 1 - Variação semanal de peso dos animais em dieta controle, restrita ou suplementada. O asterístico indica diferença significativa entre as dietas ($P < 0,003$). (Grupo controle, $n = 18$; restrito, $n = 20$; suplementado, $n = 20$).

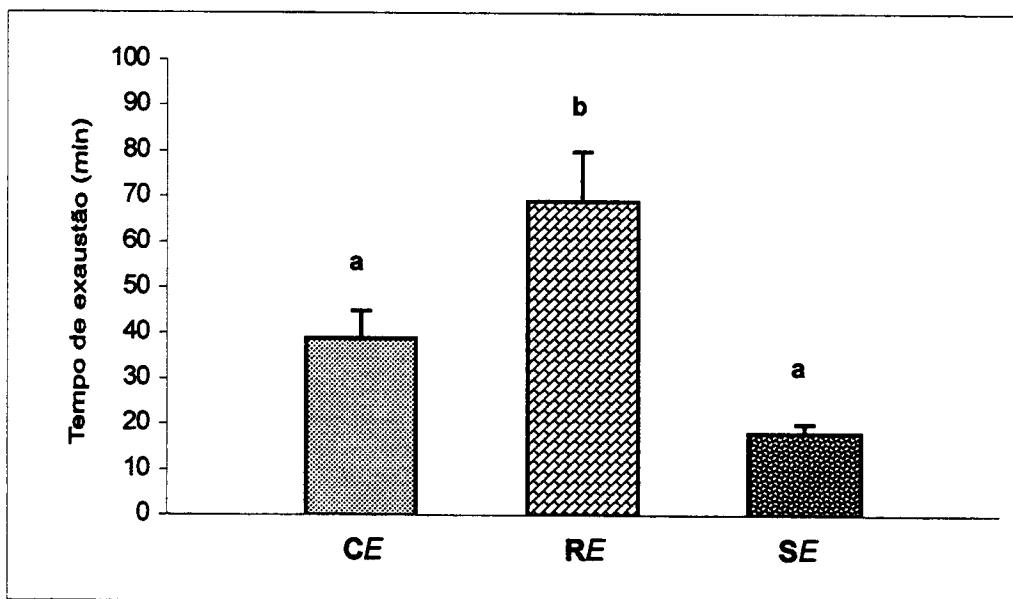


Figura 2 – Efeito da dieta na performance física dos ratos na corrida em esteira. Os valores representam a média e erro padrão (RE, $n = 9$; demais grupos $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,0025$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; E: exercitado).

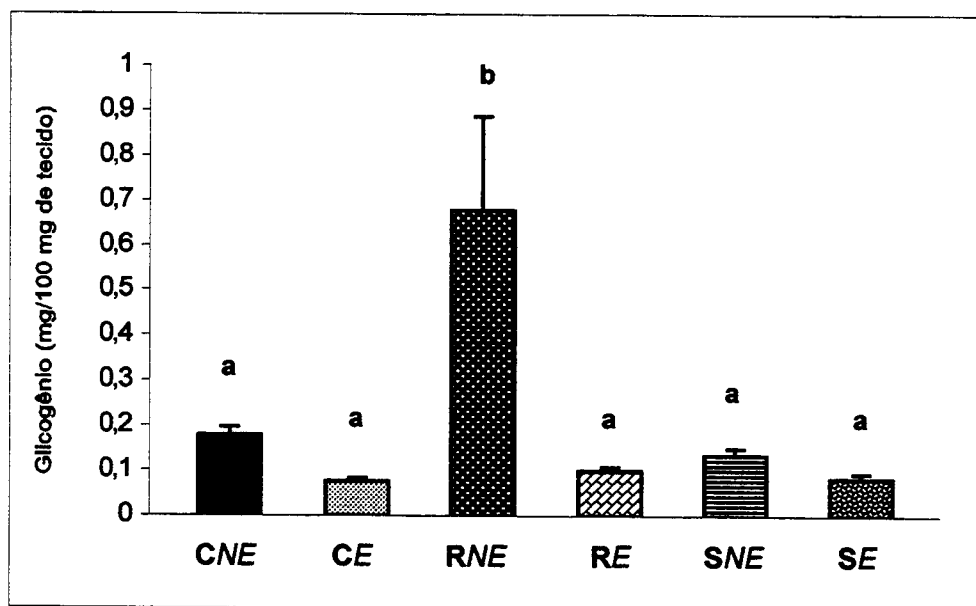


Figura 3 – Efeito da dieta e exercício sobre o glicogênio hepático. Os valores representam a média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,013$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado, E: exercitado).

menor a redução no caso do grupo sob suplementação com vitamina E (CE: $0,25 \pm 0,03$; RE: $0,24 \pm 0,04$; SE: $0,41 \pm 0,05$, Figura 4). Os dados de glicogênio muscular dos animais exercitados apresentaram uma correlação negativa significativa com seu tempo de exaustão ($r = -0,54$; $p = 0,014$) (Figura 5).

Glicemia, insulina e lactato. A glicemia de animais restritos exercitados (RE) mostrou-se significativamente menor (43 ± 3 mg/dL de plasma; $P < 0,035$) que a dos demais grupos (CNE: 72 ± 5 ; CE: 75 ± 9 ; RNE: 66 ± 4 ; SNE: 73 ± 4 ; SE: 78 ± 2 mg/dL de plasma; Figura 6). Tendo em vista que os animais não exercitados apresentaram iguais valores para este parâmetro, pode se afirmar que a glicemia não sofreu qualquer influência do tipo de dieta. Este parâmetro também não foi alterado pelo exercício, nos animais controle e suplementados. Constatou-se ainda, a existência de uma correlação negativa significativa entre o tempo de exaustão e a glicemia dos animais exercitados ($r = -0,54$; $P = 0,013$).

No que se refere aos dados de insulina e lactato (Figuras 7 e 8, respectivamente), verificou-se que, em ambos os casos, apenas o exercício influenciou nos resultados ($P < 0,0125$), apresentando o grupo exercitado menores valores de insulina (26 ± 3 μ U/mL de plasma) e maiores de lactato ($4,8 \pm 2,0$ nmoles/mL de sangue) do que aqueles exibidos pelos animais em repouso ($35,9 \pm 2,2$ μ U/mL de plasma e $1,8 \pm 0,5$ nmoles/mL de sangue, respectivamente). Tanto a diminuição da insulinemia como o aumento do lactato, com o exercício, eram esperados. Não foi observada interação entre a atividade física e a dieta, nem a interferência deste fator isoladamente ($P > 0,05$).

Também os dados relativos à insulina correlacionaram-se significativamente com aqueles de glicose ($r = 0,41$; $P = 0,006$), bem como os do glicogênio muscular ($r = 0,33$; $P = 0,027$) e lactato ($r = -0,50$; $P = 0,002$) (Figura 9), mas não com os do glicogênio hepático ($r = 0,19$; $P = 0,22$).

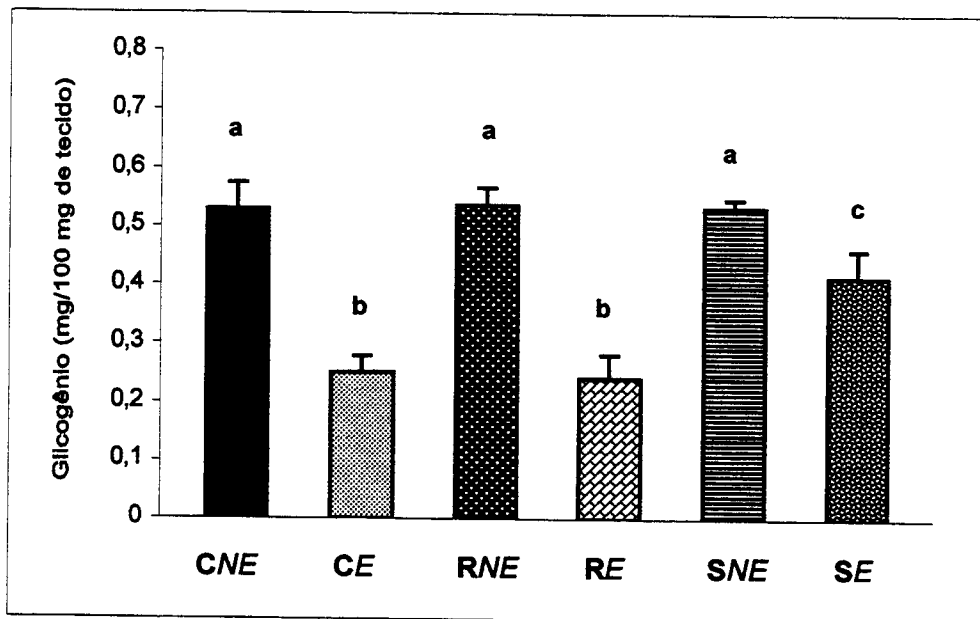


Figura 4 – Efeito da dieta e exercício sobre o glicogênio muscular. Os valores representam a média e erro padrão (CNE, $n=8$; RE, $n=9$; demais grupos, $n=10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado, E: exercitado).

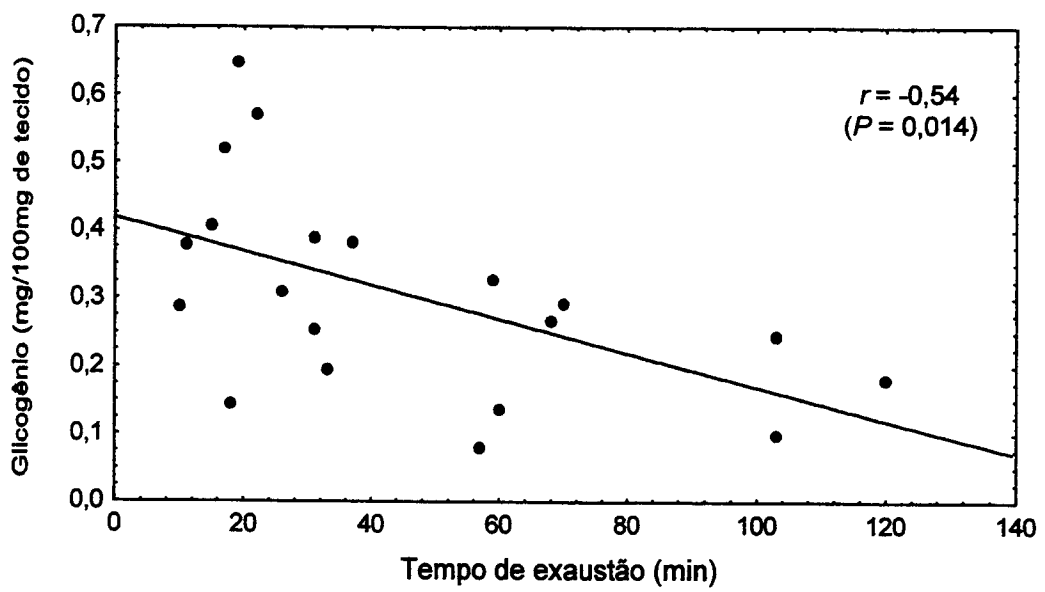


Figura 5 – Correlação entre o tempo de exaustão e a concentração de glicogênio muscular de animais exercitados.

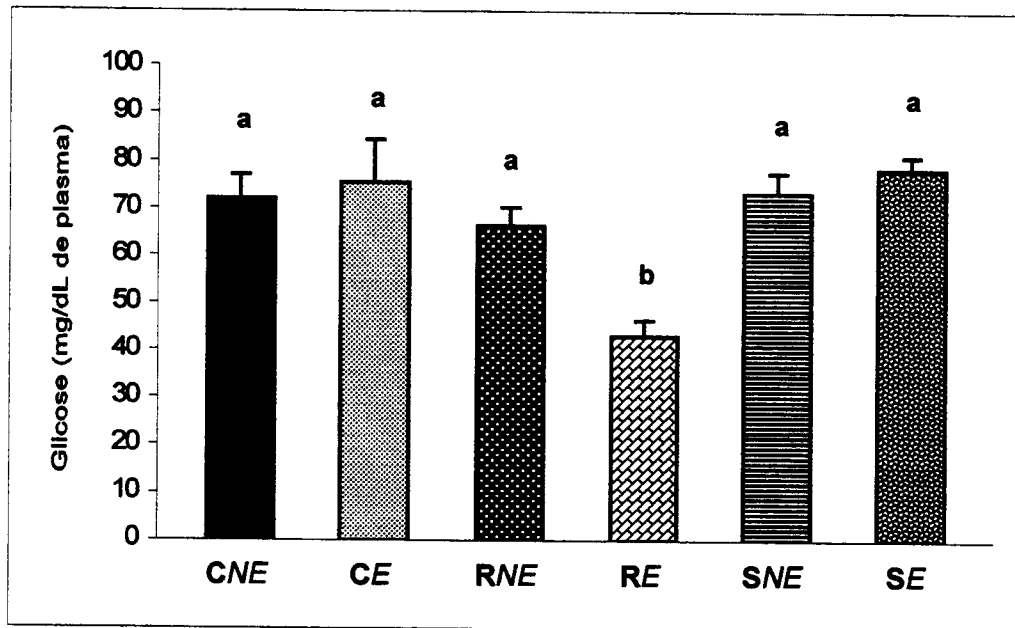


Figura 6 – Efeito da dieta e exercício sobre a glicemia. Os valores representam a média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). C: controle; R: restrito; S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado.

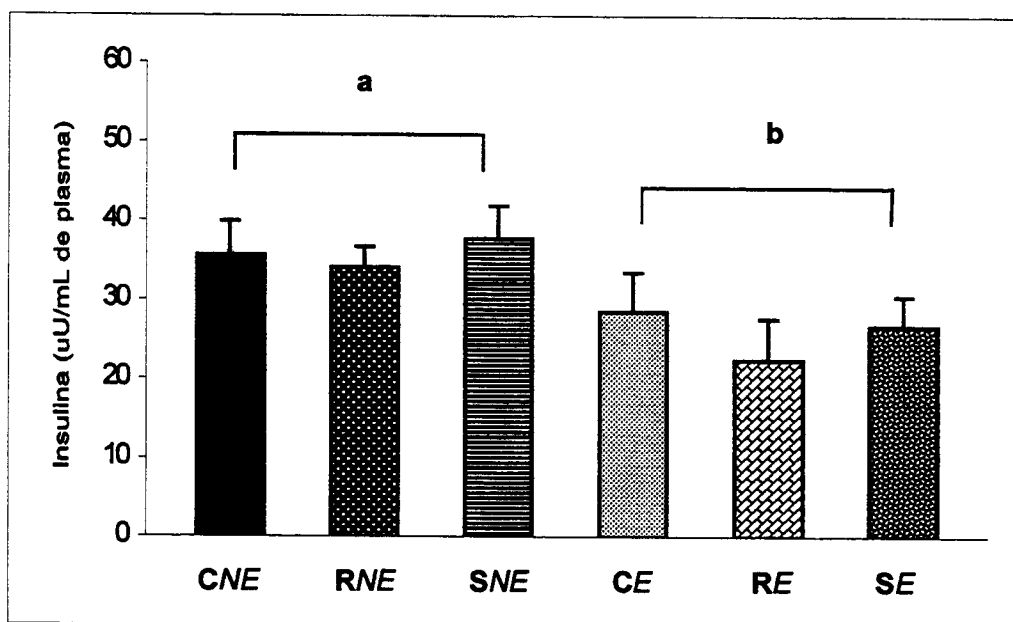


Figura 7 – Efeito do exercício sobre a concentração de insulina no plasma. Os valores representam a média e erro padrão (CNE, $n = 8$; RE, $n = 9$; demais grupos, $n = 10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado, E: exercitado).

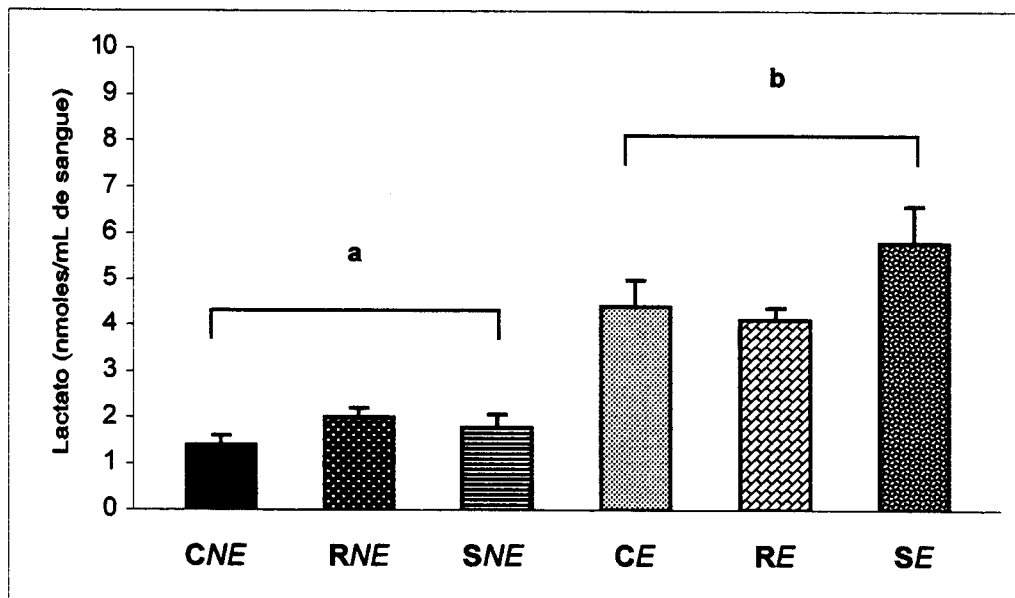


Figura 8 – Efeito do exercício sobre a concentração de lactato no sangue. Os valores representam a média \pm erro padrão (CNE, $n=8$; RE, $n=9$; demais grupos, $n=10$). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). (C: controle, R: restrito, S: suplementado; NE: não exercitado; E: exercitado).

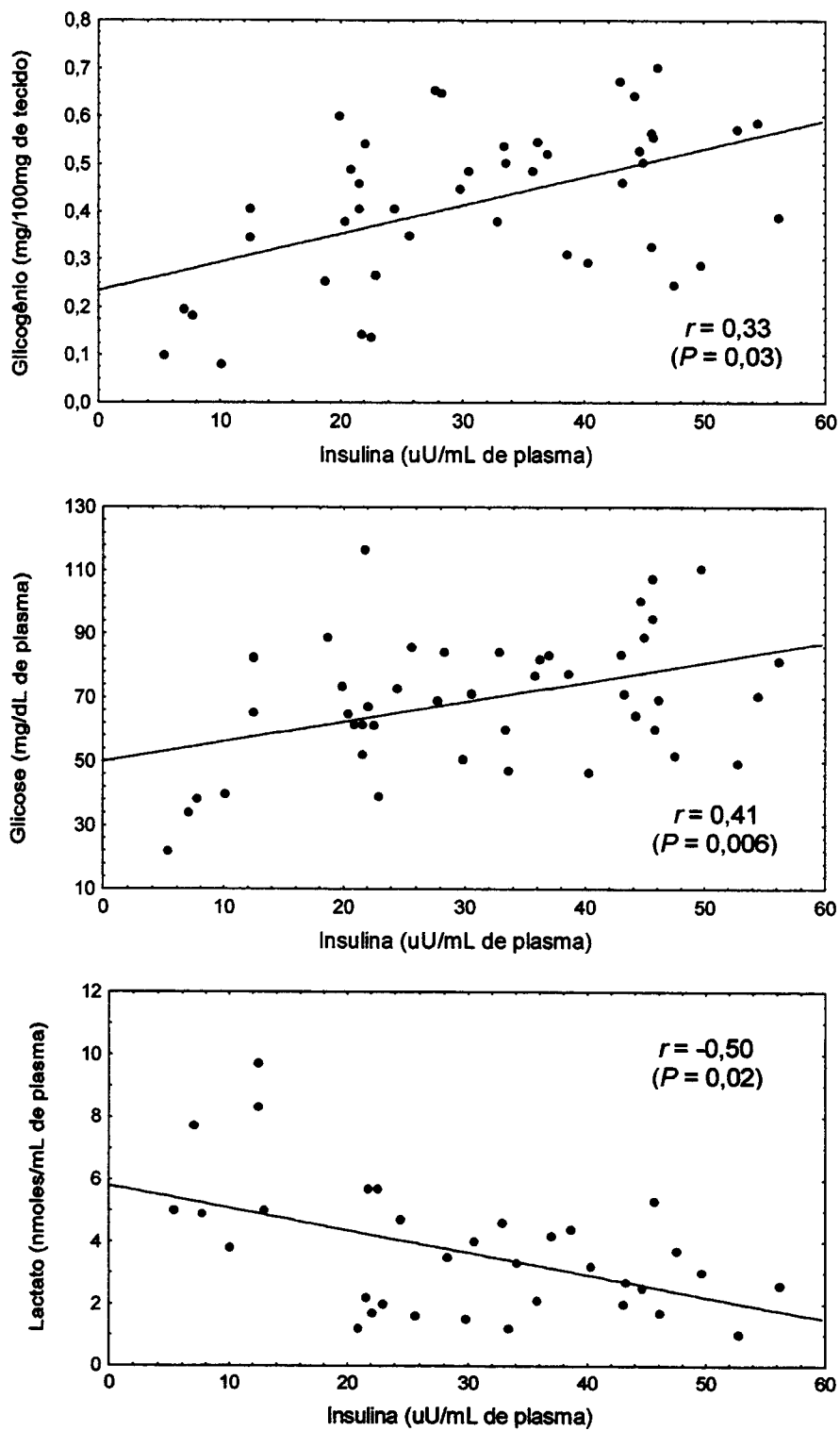


Figura 9 – Correlações entre concentração de insulina e os dados de glicose, glicogênio muscular e lactato.

Discussão

O músculo esquelético em atividade contrátil, durante o exercício, têm suas necessidades energéticas satisfeitas pelos estoques intracelulares de glicogênio ou pela glicose plasmática (Hargreaves, 1991; Gunderson et al., 1996). Em tal condição, a utilização dessas reservas de carboidrato pelo organismo dependerá de fatores como intensidade e duração do exercício realizado, treinamento e dieta, entre outros. A fadiga freqüentemente coincide com a depleção desses estoques (Hargreaves, 1991).

No presente caso, no que se refere aos estoques de glicogênio em animais não exercitados, verificou-se uma maior reserva hepática promovida pela restrição calórica, sem alteração da concentração muscular. Ao mesmo tempo, os animais sob aquele regime dietético apresentaram maior resistência à exaustão, quando submetidos ao exercício em esteira. Desse modo, embora o glicogênio muscular tenha um papel crítico como determinante da performance em exercício de longa duração (Hargreaves, 1991), o glicogênio hepático parece ter representado uma importante influência naquele resultado. Em realidade, o fígado desempenha uma destacada função durante o exercício, satisfazendo as necessidades aumentadas do músculo e mantendo a glicemia (Spriet e Peters, 1998).

Por outro lado, em animais exercitados, a diferença atribuída à dieta nos valores desse parâmetro foi eliminada. Na verdade, o exercício apenas produziu alteração no estoque hepático de animais restritos, havendo uma tendência à redução nos demais grupos de dieta, porém não significativa.

Uma interessante questão que se apresenta, mediante esses dados, consiste na razão pela qual os animais restritos mostraram uma maior

reserva hepática de glicogênio anterior ao exercício. O modelo de restrição ora utilizado caracterizou-se justamente por uma redução calórica em termos de carboidratos, preservando o aporte dos demais macronutrientes, resultando, dessa forma, em modificação das proporções relativas dos três componentes energéticos (veja Tabela 1). Além disso, no sistema de alimentação estabelecido, com reposição de dieta três vezes por semana, os animais sob restrição permaneciam algum tempo sem alimento até a reposição seguinte, submetendo-se, de certa forma, a um “jejum regular”. Se o organismo desenvolve uma “economia” de glicogênio e de que maneira esses fatores podem estar associados aquele resultado, não está claro à luz da pouca informação relativa às repercussões metabólicas dos diferentes modelos de restrição calórica que tem sido empregados.

Cartee e Dean (1994) relataram a pouca disponibilidade de informação acerca do impacto da restrição alimentar sobre a concentração do glicogênio muscular. Tal como no presente trabalho, os autores, em seu estudo, não detectaram redução deste parâmetro, nos dois músculos estudados, como consequência da restrição de curto prazo (1, 5 e 20 dias) imposta a ratos de 8 meses de idade. Discutiram, ainda, a possibilidade da restrição dietética reduzir a utilização de carboidrato como fonte de energia pelo músculo. Cartee e colaboradores (1994), por outro lado, estudando o efeito de restrição calórica de longo prazo, em ratos de diferentes idades, verificaram uma redução do glicogênio muscular de animais submetidos à dieta de restrição, quando comparados àqueles alimentados *ad libitum*, concluindo ser esta redução provavelmente consequência da diminuição observada nas concentrações plasmáticas de glicose e insulina, parâmetros que, no presente caso, também não se alteraram com a dieta e que serão discutidos adiante.

No músculo, além do efeito da restrição calórica, apresentaram-se ainda outros resultados distintos do fígado, quanto ao glicogênio.

A suplementação com vitamina E, em animais exercitados quando comparados àqueles não exercitados, promoveu uma menor redução na reserva de glicogênio do que as outras dietas. Paralelamente, os animais suplementados demonstraram uma tendência à menor resistência a exaustão, atingindo o esgotamento físico em aproximadamente $\frac{1}{4}$ do tempo dos restritos e metade (embora não significativo neste caso) daquele do grupo controle.

No que se refere ao papel da suplementação com vitamina E na performance física, a literatura guarda algumas controvérsias. Encontram-se tanto relatos de diminuição do tempo para alcançar a exaustão em ratos com deficiência em vitamina E, como de nenhuma alteração neste tempo em animais com a mesma deficiência (Goldfarb, 1993). Em contexto diverso, em animais e humanos recebendo suplementação com a vitamina, não detectou-se alteração da performance física, quando comparados aos indivíduos controle (Witt et al, 1992). Em outro estudo porém, a injeção intramuscular de vitamina E, antes do exercício de natação até a exaustão, melhorou a performance de ratos, quando comparados aqueles que receberam solução salina (Novelli et al, 1990). Convém destacar, entretanto, as diferentes condições de suplementação empregadas pelos diversos trabalhos, como dose, tempo e via de administração da vitamina, dificultando conclusões definitivas acerca do tema.

Um interessante ponto que merece ser levantado acerca da influência da vitamina E no resultado de performance ora obtido consiste de sua potencial associação a analgesia, uma vez que a motivação para a corrida foi oferecida através de choque elétrico. Kryzhanovskii e colaboradores (1988) detectaram um efeito analgésico rápido (15-20 minutos), após injeção intramuscular em pacientes com dismenorréia. Os autores evidenciaram que o mecanismo para tal efeito se explicaria possivelmente pela ativação de um sistema analgésico rápido, envolvendo a mobilização de β -endorfina. Não se encontram muitos outros trabalhos acerca do tema, mas não deve ser descartada

a possibilidade, no presente, da suplementação com vitamina E ter amenizado a motivação oferecida pelo choque, embora os animais desse grupo tenham realizado o exercício e alcançado a exaustão. Vale salientar, uma vez mais, que, embora animais suplementados tenham apresentado um tempo de exaustão menor que os do grupo controle, essa diferença não foi significativa.

Na análise dos resultados da performance física, o peso dos animais constitui outro fator que não pode deixar de ser considerado. Pyke e colaboradores (1986) argumentaram que a maior resistência dos animais mais jovens, no exercício prolongado em esteira, atribuíam-se ao menor peso deste grupo, implicando em menor carga de trabalho dos animais mais leves. No presente caso, a redução de peso constituiu-se uma consequência característica do regime de restrição calórica, podendo ter contribuído para, ou mesmo determinado a melhor performance exibida pelo grupo submetido a essa dieta, uma vez que os animais restritos pesavam aproximadamente 100 g menos que os demais ratos. Animais controle e sob regime de suplementação apresentaram mesmo peso, não diferindo quanto ao de tempo de exaustão registrado.

Outro efeito atribuído à restrição calórica, a redução da glicemia, tem sido objeto de algumas investigações. No presente estudo, embora o grupo restrito não exercitado tenha apresentado menor glicemia que os demais grupos de dieta nessa condição, esta diferença não foi significativa. Contrariamente, Masoro e colaboradores (1991) verificaram que a restrição dietética em ratos diminuiu significativamente a concentração de glicose plasmática durante um dia (24 h), quando comparada a alimentação *ad libitum*. Cartee e Dean (1994) detectaram efeito semelhante após 5 e 20 dias de restrição dietética, bem como Cartee e colaboradores (1994) em ratos de 8, 18 e 23 meses, mantidos nesse regime desde 14 semanas de idade. Por outro lado, Reaven e Reaven (1981), em ratos em regime de restrição calórica desde 6 semanas de idade, observaram alteração neste parâmetro apenas no grupo de 10-12 meses.

Silva e colaboradores (1998), em ratos de 2 e 14 meses, não registraram alteração na glicemia após 28 dias de restrição.

No exercício severo, a produção hepática de glicose pode ser superada pela sua utilização periférica, acarretando hipoglicemia (Field, 1989; Hargreaves, 1991). No presente caso, animais restritos submetidos ao exercício exaustivo, apresentaram mais baixa concentração de glicose plasmática que os demais grupos, traduzindo-se em hipoglicemia. Torna-se conveniente lembrar que, em primeira instância, este grupo executou trabalho físico de maior magnitude, visto que correram na esteira por um tempo notavelmente maior que os demais grupos.

Similarmente aos efeitos na glicemia, a restrição calórica tem sido associada a uma redução na concentração plasmática de insulina. Os resultados que ora se apresentam, entretanto, não mostraram tal efeito, não havendo diferença significativa entre os distintos grupos de dieta quanto a dosagem deste hormônio. De forma diversa, Reaven e Reaven (1981) detectaram não exatamente uma redução, mas uma manutenção da insulina sérica em ratos sob restrição calórica, em contraposição ao aumento observado, com a idade, nos animais em dieta controle. Carteen e Dean (1994), por sua vez, estudando um período menor, demonstraram uma redução nesse parâmetro, com apenas 20 dias de restrição. Silva (1998), por outro lado, verificou uma alteração nesse sentido em ratos de 14 meses, mas não naqueles de 2 meses de idade, após 28 dias de restrição calórica. Cabe destacar ainda que os modelos de restrição utilizados nesses estudos basearam-se em restrição dietética, diferente do ora utilizado, que se caracterizou pela restrição exclusiva de carboidratos. Apesar de não haver mais elementos para analisar as implicações dessa diferença, torna-se indispensável mantê-la em mente.

O fato da restrição calórica não ter influenciado a concentração de insulina circulante, não significa necessariamente que não tenha produzido nenhum efeito sobre sua ação hormonal. A repercussão da restrição calórica, no que diz respeito à sensibilidade dos tecidos a ação da insulina merece ser mencionada, embora não tenha sido analisada no presente estudo. Sua melhora como consequência daquele regime encontra-se relatada em algumas pesquisas, em várias espécies de animais (Kemnitz et al., 1994; Colman et al., 1995). Silva (1998), por exemplo, encontrou melhor sensibilidade à insulina em ratos de 2 meses submetidos a restrição calórica, sem alteração da insulina plasmática. Neste contexto, a suplementação com vitamina E também tem produzido efeitos semelhantes (Paolisso et al., 1993; Faure et al., 1997), provavelmente devido ao seu papel como antioxidante (Caballero, 1993).

O exercício exaustivo, em contraposição à dieta, promoveu uma redução da insulina circulante, no presente estudo. Na verdade, o exercício encontra-se associado a uma queda de insulina no plasma, acarretando também uma aumentada captação de glicose pelo músculo, apesar da redução no hormônio, fato que estaria provavelmente associado a uma aumentada sensibilidade a insulina (Field, 1989). Entretanto, nem todos os resultados apontam para essa tendência (King et al., 1993).

Outro processo observado durante o exercício de alta intensidade consiste no aumento da produção de ácido lático, decorrente das mais altas taxas de utilização do glicogênio muscular, produto que se acumula no músculo e sangue (Coyle, 1995). No presente, observou-se tal aumento na concentração de lactato no sangue, como consequência do exercício exaustivo, resultado semelhante ao relatado por outros autores (Slentz et al., 1990; Koubi et al., 1991). Gunderson e colaboradores (1996), por outro lado, investigando os destinos da glicose administrada a ratos em jejum, encontraram concentrações relativamente baixas de lactato no sangue dos animais submetidos a exercício

exaustivo, indicando que a exaustão provavelmente não se constituiu um resultado de trabalho anaeróbio.

Diante dos resultados ora colocados, verifica-se, portanto, que a restrição calórica melhorou a performance dos animais submetidos a exaustão, quando comparada à dos grupos suplementados com vitamina E e controle. A promoção do aumento da reserva hepática de glicogênio e a redução do peso parecem estar associados àquele efeito. O grupo suplementado com vitamina E apresentou uma tendência a menor resistência a exaustão, embora seu tempo não tenha sido diferente estatisticamente daquele do grupo controle. Por outro lado, animais restritos não apresentaram redução da glicemia e insulinemia, efeito benéfico freqüentemente associado a esse regime dietético. Entretanto, nos diversos estudos realizados, são utilizados diferentes modelos de restrição calórica, cujas implicações metabólicas não se encontram claramente definidas, constituindo-se um interessante campo a se explorar.

Referências Bibliográficas

- BEALES, P. E.; WILLIAMS, A. J. K.; ALBERTINI, M. C.; POZZILLI, P. Vitamin E delays diabetes onset in the non-obese diabetic mouse. **Hormonal Metabolism Research**, v. 26, p. 450-452, 1994.
- CABALLERO, B. Vitamin E improves the action of insulin. **Nutrition Reviews**, v. 51(11), p. 339-340, 1993.
- CARTEE, G. D.; DEAN, D. J. Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. E946-E952, 1994.
- CARTEE, G. D.; KIETZKE, E. W.; BRIGGS-TUNG, C. Adaptation of muscle glucose transport with caloric restriction in adult, middle-aged, and old rats. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. R1443-R1447, 1994.
- COLMAN, E.; KATZEL, L. I.; ROGUS, E.; COON, P.; MULLER, D.; GOLDBERG, A. P. Weight loss reduces abdominal fat and improves insulin action in middle-aged and older men with impaired glucose tolerance. **Metabolism**, v. 44 (11), p. 1502-1508, 1995.
- COYLE, E. F. Substrate utilization during exercise in active people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61 (suppl), p. 968S-979S, 1995.
- DESBUQUOIS, B.; AURBACH, G. D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormone in radioimmunoassays. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, v. 33, p. 732-738, 1971.
- FAURE, P.; ROSSINI, E.; LAFOND, J. L.; RICHARD, M. J.; FAVIER, A.; HALIMI, S. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensivity of rats fed high fructose diets. **Journal of Nutrition**, v. 127, p.103-107, 1997.
- FIELD, J. Exercise and deficient carbohydrate storage and intake as causes of hipoglycemia. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 18 (1), p.155-161, 1989.

- GARRIDO, A.; GÁRATE, M.; CAMPOS, R.; VILLA, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Increased susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress after ingestion of high doses of fish oil: effect of aging and protective action of dl- α -tocopherol supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 118-122, 1993.
- GOLDFARB, A. H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 232-236, 1993.
- GUNDERSON, H.; WEHMEYER, N.; BURNETT, D.; NAUMAN, J.; HARTZELL, C.; SAVAGE, S. Exercise and exhaustion effects on glycogen synthesis pathways. **Journal of Applied Physiology**, v. 81(5), p. 2020-2026, 1996.
- HARGREAVES, M. Carbohydrates and exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 9, p. 17-28, 1991.
- HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polisaccharides. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 34-36, 1957.
- JI, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1079-1086, 1995.
- KEMNITZ, J. W.; ROECKER, E. B.; WEINDRUCH, R.; ELSON, D. F.; BAUM, S. T.; BERGMAN, R. N. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. **American Journal of Physiology**, v. 266, p.E540-E547, 1994.
- KING, D. S.; FELTMEYER, T. L.; BALDUS, P.J.; SHARP, R. L.; NESPOR, J. Effects of eccentric exercise on insulin secretion and action in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 75 (5), p. 2151-2156, 1993.
- KOUBI, H. E.; DESPLANCHES, D.; GABRIELLE, C.; COTTET-EMARD, J-M., SEMPORE, B.; FAVIER, R.J. Exercise endurance and fuel utilization: a reevaluation of the effects of fasting. **Journal of Applied Physiology**, v.70(3), p.1337-1343, 1991.
- KRYZHANOVSKII, G. N.; BAKULEVA, L. P.; LUZINA, N. L.; VINOGRADOV, V. A.; YARYGIN, K. N.; KUBATIEV, A. A. Role of the endogenous opioid system in the analgesic effect of α -tocopherol in dysmenorrhea. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 105, n. 2, p.162-164, 1988.

- LEIBOVITZ, B. E.; HU, M-L.; TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil. **Lipids**, v. 25, n. 3, p. 125-129, 1990.
- MASORO, E. J.; SHIMOKAWA, I.; YU, B. P. Retardation of the aging processes in rats by food restriction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 621, p. 337-352, 1991.
- MCDONALD, R. B. Some considerations for the development of diets for mature rodents used in long-term investigations. **Journal of Nutrition**, v. 127 (5):847S-850S, 1997.
- NOVELLI, G. P. ; BRACCIOTTI, G.; FALSINI, S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 9-13, 1990.
- PAOLISSO, G.; D'AMORE, A.; GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; VARRICCHIO, M.; D'ONOFRIO, F. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 650-656, 1993.
- PYKE, S.; LEW, H.; QUINTANILHA, A. Severe Depletion in Liver Glutathione during Physical Exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 139, n.3, p. 926-931, 1986.
- REAVEN, E. P.; REAVEN, G. M. Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, p. 75-84, 1981.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, Jr. G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- REZNICK, A. Z.; WITT, E.; MATSUMOTO, M.; PACKER, L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 2, p. 801-806, 1992.
- SEN, C. K.; ATALAY, M.; AGREN, J.; LAAKSONEN, D. E.; ROY, S.; HANNINEN, O. Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 1, p.189-195, 1997.

SILVA, M. S. Efeito da restrição dietética nas etapas iniciais da ação insulínica em ratos *Wistar* machos com 2 e 14 meses de idade. Campinas, 1998. 80p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SJÖRGREEN, N. B.; NORDENSKJOLD, T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. **Pflügers Arch Gesante Physiol. Menschen Tiere**, v. 240, p.247, 1938.

SLENTZ, C. A.; DAVIS, J. M.; SETTLES, D. L.; PATE, R. R.; SETTLES, S. J. Glucose feedings and exercise in rats: glycogen use, hormone responses and performance. **Journal of Applied Physiology**, v. 69(3), p.989-994, 1990.

SPRIET, L. L.; PETERS, S. J. Influence of diet on the metabolic responses to exercise. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.57, p. 25-33, 1998.

YU, B. P. How diet influences the aging process of the rat. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 205, p. 97-105, 1994.

WITT, E. C.; REZNICK, A. Z.; VIGUIE, C. A.; STARKE-REED, P.; PACKER, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 766-773, 1992.

WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. **Scientific American**, v. 274, n. 1, p.32-38, 1996.

ZHANG, D.; OKADA, S.; YU, Y.; ZHENG, P.; YAMAGUCHI, R.; KASAI, H. Vitamin e Inhibits Apoptosis, DNA Modification, and Cancer Incidence Induced by Iron-mediated Peroxidation in Wistar Rat Kidney. **Cancer research**, v. 57, p. 2410-2414, 1997.

5. Conclusões

Os resultados presentemente obtidos permitiram tecer as seguintes conclusões:

1. A dieta de restrição calórica melhorou significativamente a performance física dos animais, como constatado pelo maior tempo para alcançar a exaustão, quando comparada às dietas controle e de suplementação com vitamina E. Por outro lado, a dieta de suplementação apresentou uma tendência, embora não significativa, a diminuir a resistência à exaustão em relação à controle;
2. A suplementação com vitamina E exerceu efeito protetor contra a peroxidação lipídica no fígado e músculo dos animais, efeito que não foi observado para a dieta de restrição calórica. No que diz respeito ao prejuízo oxidativo protéico, porém, a dieta não exerceu nenhum efeito;
3. O exercício não induziu aumento de TBARS no fígado, enquanto que produziu leve redução no músculo. Por outro lado, este parâmetro, não produziu nenhuma modificação no teor de carbonilas protéicas, em nenhum dos dois tecidos analisados. Este dados indicam que, nas condições do estudo, o exercício parece não ter induzido estresse oxidativo.
4. O grupo restrito exercitado, apesar do maior volume de trabalho desenvolvido, não apresentou aumento do prejuízo lipídico ou protéico, em relação aos outros grupos de dieta, o que sugere a possibilidade de um efeito protetor daquela dieta frente ao exercício mais extenuante executado pelo grupo;

5. A concentração de vitamina E no fígado, músculo e plasma dos animais que receberam suplementação desta vitamina apresentou-se superior aos dos outros grupos de dieta, indicando que aquele procedimento resultou efetivamente em incorporação e estocagem aumentadas da vitamina nos tecidos analisados.
6. O exercício reduziu a quantidade da vitamina E no plasma, enquanto que não promoveu modificação nos outros tecidos, o que pareceu indicar uma captação aumentada pelos músculos para manutenção de seu próprio pool, sem que houvesse reposição plasmática proporcional a partir do estoque hepático. Isso pode sugerir uma mobilização mais lenta do fígado para o plasma do que do plasma para o músculo;
7. O teor hepático de GSH não se alterou em função de nenhum dos parâmetros estudados, o que foi consistente com as demais observações;
8. A dieta de restrição calórica promoveu grande acúmulo de glicogênio hepático nos animais, quando comparada às dietas controle e de suplementação com vitamina E. No ponto de exaustão, os níveis deste carboidrato naquele órgão caíram para o mesmo valor nos três grupos. O glicogênio muscular não mostrou alteração por influência da dieta;
9. O exercício físico apenas produziu redução substancial do glicogênio hepático nos animais submetidos à restrição calórica, tendo ocasionado diminuição do glicogênio muscular em todos os grupos de dieta;

10. A dieta de restrição calórica, associada ao exercício exaustivo, acarretou a redução da glicemia, traduzindo-se em hipoglicemia, provavelmente em função do trabalho de maior magnitude executado pelo grupo;
11. As concentrações de insulina plasmática e lactato sanguíneo não sofreram influência da dieta, mas sim do exercício. Animais exercitados apresentaram menores valores da primeira e maiores do segundo, quando comparados àqueles não exercitados.

Percebe-se, portanto, que, no que se refere ao fenômeno do estresse oxidativo, apenas a dieta representada pela suplementação com vitamina E, exerceu algum efeito. Por outro lado, a performance física e os substratos energéticos importantes para a execução do exercício sofreram influência da dieta administrada, notadamente da restrição calórica. Interessantemente, as dietas empregadas com a mesma proposta, de potencial efeito protetor, apresentaram também resultados diversos. Entretanto, face às lacunas ainda existentes, fazem-se necessárias investigações adicionais, levando em consideração, especialmente, os diferentes modelos de dieta empregados, tanto de restrição calórica como de suplementação de vitamina E.

6. Referências Bibliográficas

- ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H.; CUTLER, R. G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. **American Journal of Physiology**, v. 255, p. C874-C877, 1988.
- ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 218-224, 1993.
- ARMSTRONG, L. E.; MARESH, C. M. Vitamin and mineral supplements as nutritional aids to exercise performance and health. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 4, p. S149-S158, 1996.
- ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidant strategies in sports. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 5, p. 370-381, 1994.
- BEALES, P. E.; WILLIAMS, A. J. K.; ALBERTINI, M. C.; POZZILLI, P. Vitamin E delays diabetes onset in the non-obese diabetic mouse. **Hormon. Metab. Research**, v. 26, p. 450-452, 1994.
- BJØRNEBOE, A.; BJØRNEBOE, G-E. Aa.; DREVON, C.A. Absorption, transport and distribution of vitamin E. **Journal of Nutrition**, v. 120, p. 233-242, 1990.
- CABALLERO, B. Vitamin E improves the action of insulin. **Nutrition Reviews**, v. 51(11), p. 339-340, 1993.
- CARTEE, G. D.; DEAN, D. J. Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. E946-E952, 1994.
- CARTEE, G. D.; KIETZKE, E. W.; BRIGGS-TUNG, C. Adaptation of muscle glucose transport with caloric restriction in adult, middle-aged, and old rats. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. R1443-R1447, 1994.
- CAO, G.; CUTLER, R. G. Protein oxidation and aging. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 320, n.1, p. 106-114, 1995.
- CHEN, J.J.; YU, B.P. Alterations in Mitochondrial Membrane Fluidity by Lipid Peroxidation Products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, n. 5, p. 411-418, 1994.
- CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p.215-232, 1991.

- COLMAN, E.; KATZEL, L. I.; ROGUS, E.; COON, P.; MULLER, D.; GOLDBERG, A. P. Weight loss reduces abdominal fat and improves insulin action in middle-aged and older men with impaired glucose tolerance. **Metabolism**, v. 44 (11), p. 1502-1508, 1995.
- CRAWFORD, D. R.; DAVIES, J. A. Adaptative Response and Oxidative Stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, suppl. 10, p. 25-28, 1994.
- CRUZ NEYRA, L. L. Efeito da vitamina E isolada e em associação com drogas redutoras do colesterol plasmático sobre o perfil lipídico e a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em coelhos hipercolesterolêmicos. Campinas, 1997. 100p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- DAVIES, K. J. A.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.
- DJURIC, Z.; LU, M.H.; LEWIS, S.M.; LUONGO, D.A.; CHEN, X.W.; HEILBRUN, L.K.; READING, B.A.; DUFFY, P.H.; HART, R.W. Oxidative DNA damage levels in rats fed low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, p. 156-160, 1992.
- DUBEY, A.; FORSTER, M. J.; LAL, H.; SOHAL, R. S. Effect of age on caloric intake on protein oxidation on different brain regions and on behavioral functions of the mouse. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 189-197, 1996.
- DUTHIE, G.G.; WAHLE, K.W.J.; JAMES, W.P.T. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. **Nutrition Research Reviews**, v. 2, p. 51-62, 1989.
- FARBER, J. L. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, suppl. 10, p. 17-24, 1994.
- GARRIDO, A.; GÁRATE, M.; CAMPOS, R.; VILLA, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Increased susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress after ingestion of high doses of fish oil: effect of aging and protective action of dl- α -tocopherol supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 118-122, 1993.

- GOLDFARB, A. H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 232-236, 1993.
- GOLDFARB, A. H.; McINTOSH, M. K.; BOYER, B. T.; FATOUROS, J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. **Journal Applied Physiology**, v. 76, n. 4, p. 1630-1635, 1994.
- HABIB, M.P.; DICKERSON, F.; MOORADIAN, A.D. Ethane production rate in vivo is reduced with dietary restriction. **Journal Applied Physiology**, v. 68, n. 6, p. 2588-2590, 1990.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human. **The American Journal of Medicine**, v. 91 suppl. 3C, p. 14S-22S, 1991.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, n. 10, p. 721-724, 1994a.
- HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994b.
- HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.35, n. 1 e 2, P. 7-20, 1995.
- HARTMANN, A.; NIEß, A. M.; GRÜNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. **Mutation Research**, v. 346, p. 195-202, 1995.
- HARGREAVES, M. Carbohydrates and exercise. **Journal of Sports Sciences**, v. 9, p. 17-28, 1991.
- HIRAMATSU, M.; VELASCO, R. D.; PACKER, L. Vitamin E radical reaction with antioxidants in rat liver membranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 459-464, 1990.
- JAIN, S. K.; McVIE, R.; JARAMILLO, J. J.; PALMER, M.; SMITH, T.; MEACHUM, Z. D.; LITTLE, R. L. The effect of modest vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in diabetic patients. **Lipids**, v. 31, S-87-S-90, 1996.

- JENKINS, R. R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 210-212, 1993.
- JENKINS, R. R.; KRAUSE, K.; SCHOFIELD, L. S. Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 213-217, 1993.
- JI, L. L.; STRATMAN, F. W.; LARDY, H. A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, n. 1, p. 150-160, 1988.
- JI, L. L.; FU, R.; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **Journal Applied Physiology**, v. 73, n. 5, p. 1854-1859, 1992.
- JI, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1079-1086, 1995.
- KEMNITZ, J. W.; ROECKER, E. B.; WEINDRUCH, R.; ELSON, D. F.; BAUM, S. T.; BERGMAN, R. N. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. **American Journal of Physiology**, v. 266, p.E540-E547, 1994.
- KOIZUMI, A.; WEINDRUCH, R.; WALFORD, R.L. Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 361-367, 1987.
- KUMAR, C. T.; REDDY, V. K.; PRASAD, M.; THYAGARAJU, K.; REDDANNA, P. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 111, p. 109-115, 1992.
- LAGANIERE, S.; YU, B.P. Anti-lipoperoxidation action of food restriction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 145, n. 3, p. 1185-1191, 1987.
- LEE, M.; DEVI, B. G. Effects of dietary restriction on experimental gastric mucosal injury in Fischer 344 rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 89, p. 11-20, 1996.
- LEIBOVITZ, B. E.; HU, M-L.; TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil. **Lipids**, v. 25, n. 3, p. 125-129, 1990.

- MASORO, E.J. Nutrition and Aging - A current assessment. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 842-848, 1985.
- MASORO, E. J.; SHIMOKAWA, I.; YU, B. P. Retardation of the aging processes in rats by food restriction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 621, p. 337-352, 1991.
- NOVELLI, G. P. ; BRACCIOTTI, G.; FALSINI, S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 9-13, 1990.
- PACKER, L. Nutrition and biochemistry of the lipophilic antioxidants vitamin E and carotenoids. In: ONG, A. S. H.; NIKI, E.; PACKER, L. Nutrition, Lipids, Health, and Disease. Champaign: AOCS PRESS, 1995. cap. 2, p. 8-35.
- PACKER, L.; LANDVIK, S. Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 1-6, 1989.
- PAOLISSO, G.; D'AMORE, A.; GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; VARRICCHIO, M.; D'ONOFRIO, F. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 650-656, 1993.
- PIERI, C.; MORONI, F.; MARRA, M. Food restriction increases the protection of erythrocytes against the hemolysis induced by peroxyl radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 87, p. 15-23, 1996.
- RADÁK, Z.; ASANO, K.; INOUE, M.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; SUZUKI, K.; TANIGUCHI, N.; OHNO, H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **Journal Applied Physiology**, v. 79, n. 1, p. 129-135, 1995.
- RAO, G.; XIA, E.; NADAKAVUKAREN, M.J.; RICHARDSON, A. Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. **Journal of Nutrition**, v. 120, p. 602-609, 1990.
- REAVEN, E. P.; REAVEN, G. M. Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, p. 75-84, 1981.

REZNICK, A. Z.; WITT, E.; MATSUMOTO, M.; PACKER, L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 2, p. 801-806, 1992.

RADÁK, Z.; ASANO, K.; INOUE, M.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; SUZUKI, K.; TANIGUCHI, N.; OHNO, H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **Journal Applied Physiology**, v. 79, n. 1, p. 129-135, 1995.

ROJAS, C.; CADENAS, S.; PÉREZ-CAMPO, R.; LOPEZ-TORRES, M.; PAMPLONA, R.; PRAT, J.; BARZA, G. Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 306, n. 1, p. 59-64, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical medicine. In: FAVIER, A.E.; NÉVE, J.; FAURE, P. Trace elements and free radicals in oxidative stress. Champaign: AOCS PRESS, 1994. cap. 1, p. 1-6.

SINGH, V. N. A current perspective on nutrition and exercise. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 760-765, 1992.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, p. 59-63, 1996.

SUMIDA, S.; TANAKA, K. KITAO, H.; NAKADOMO, F. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. **International Journal of Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 835-838, 1989.

UTSUYAMA, M.; ICHIKAWA, M.; KONNO-SHIRAKAWA, A.; FUJITA, Y.; HIROKAWA, K. Retardation of the age-associated decline of immune functions in aging rats under dietary restriction and daily physical exercise. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 91, p. 219-228, 1996.

VIGUIE, C. A.; FREI, B.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N.; PACKER, L.; BROOKS, G. A. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. **Journal Applied Physiology**, v. 75, n. 2, p. 566-572, 1993.

YOUNGMAN, L.D.; PARK, J-Y.; AMES, B.N. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 9112-9116, 1992.

YU, B. P. How diet influences the aging process of the rat. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 205, p. 97-105, 1994.

WING, R. R.; BLAIR, E. H.; BONONI, P.; MARCUS, M. D.; WATANABE, R.; BERGMAN, R. N. Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. **Diabetes Care**, v. 17, n. 1, p. 30-36, 1994.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 7, p. 2-15, 1996.

WITT, E. C.; REZNICK, A. Z.; VIGUIE, C. A.; STARKE-REED, P.; PACKER, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 766-773, 1992.

WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. **Scientific American**, v. 274, n. 1, p.32-38, 1996.