

UNIVERSIDADE ESTDUAL DE CAMPINAS



Francisco José Andriotti Prada

**RESTRIÇÃO PROTÉICA E ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS OU NÃO
AO EXERCÍCIO FÍSICO.**

Este exemplar corresponde à redação
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FRANCISCO JOSÉ ANDRIOTTI PRADA
Nelson
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello

2005

i

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	P881r
V	EX
TOMBO BC/	63787
PROC.	6.P000605
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	13/05/05
Nº CPD	

libr-id 350546

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P881r

Prada, Francisco José Andriotti

Restrição protéica e estresse oxidativo em ratos submetidos ou não ao exercício físico / Francisco José Andriotti Prada. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Maria Alice Rostom de Mello.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Estresse oxidativo. 2. Desnutrição protéica. 3. Exercício físico.
4. Recuperação nutricional. I. Maria Alice Rostom de Mello.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 17/03/2005

Banca Examinadora:


Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello (Orientadora)


Prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto


Profa. Dra. Eliete Luciano


Prof. Dr. Armindo Antônio Alves


Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dr. José Camillo Novello

Profa. Dra. Denise Vaz Macedo

Agradecimentos

À Prof(a). Dr.(a). Maria Alice Rostom de Mello pelo apoio, orientação e confiança que depositou em minha pessoa.

Aos professores Dr. José Roberto Moreira de Azevedo, Dra. Eliete Luciano, Dr. Cláudio Alexandre Gobatto, Dr. Miguel Arcanjo Areas, Dr. Armindo Antônio Alves e Dra. Denise Vaz Macedo, pela amizade, auxílio e sabedoria que transmitiram durante todo o curso e desenvolvimento do trabalho.

Aos Técnicos de Laboratório Daniel Bosco, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva e Clarice Yoshiko Sibuya pela amizade, sinceridade e indispensável apoio técnico nas análises bioquímicas e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, meus genitores, por proporcionarem as condições fundamentais para que eu adquirisse o conhecimento acadêmico através da minha educação, ao mesmo tempo em que, pelo exemplo, possibilitaram que eu conquistasse algo: a audácia.

E a todos que estiveram por fora envolvidos no meu processo de Doutorado, Fabrício Azevedo Voltarelli, Camila Aparecida Machado de Oliveira, Fulvia, Amanda, Marcelo Papoti, e a minha querida esposa Profa. Ms. Adriana Cristina Barriviera Prada, e minha filha Marianna Barriviera Prada.

À todos que, de uma forma ou de outra, colaboram para a realização deste trabalho.

À FAPESP – Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS.....	1
RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
I – INTRODUÇÃO	6
II – REVISÃO DE LITERATURA	7
1. CONCEITO DE ESTRESSE OXIDATIVO	7
2. DESNUTRIÇÃO PROTÉICO CALÓRICA.....	8
3. DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E ESTRESSE OXIDATIVO.....	10
4. EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO	11
5. EXERCÍCIO FÍSICO E RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL	15
III – OBJETIVO	16
ESTUDO 1	18
PRADA, F.J.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. EVALUATION OF A PROTEIN DIFICIENT DIET IN RATS THROUGH BLOOD OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS. RESEARCH COMMUNICATION IN MOLECULAR PATHOLOGY AND PHARMACOLOGY v. 113-114, p. 213-228, 2003.....	18
ESTUDO 2	37
PRADA, F.J.A.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M.; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE NATAÇÃO EM INTENSIDADE EQUIVALENTE AO LIMAR ANAERÓBIO. REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DO MOVIMENTO v. 12, n. 2, p. 29-34, 2004.....	37
ESTUDO 3	45
PRADA, F.J.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. OXIDATIVE STRESS DURING REHABILITATION FROM PROTEIN MALNUTRITION ASSOCIATED OR NOT EXERCISE IN RATS. NUTRITION RESEARCH (ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO NUTRITION RESEARCH).....	45
ESTUDO 4	68
PRADA, F.J.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. EXERCISE MODE, SWIMMING VS RUNNING, BODY GROWTH AND OXIDATIVE STRESS IN YOUNG PROTEIN RESTRICTED RATS. (A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE)	68
VI – DISCUSSÃO GERAL	91
V – CONCLUSÕES GERAIS.....	106

Resumo

Seres humanos e animais desnutridos apresentam comprometimento funcional em diversos órgãos, o que não é revertido totalmente pela realimentação. O exercício físico, por sua vez, parece acelerar alguns aspectos da recuperação nutricional. São escassos os dados quanto ao envolvimento do estresse oxidativo no comprometimento funcional causado pela desnutrição. Mais raras ainda são as informações quanto aos efeitos do exercício durante a recuperação nutricional sobre o estresse oxidativo imposto ao organismo. O presente estudo visou avaliar o balanço entre ataque oxidativo e mecanismos antioxidantes em ratos jovens submetidos à restrição protéica alimentar e recuperados com dieta balanceada, associada ou não ao exercício aeróbio de corrida e natação. Os principais indicadores do ataque oxidativo foram os produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e as proteínas carboniladas (PC) enquanto que os indicadores do sistema de defesa antioxidante foram as atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) no sangue. Os animais deficientes em proteína apresentaram aumento dos danos oxidativos (TBARs) em relação aos controles, o que induziu aumento na atividade das enzimas antioxidantes. O treinamento físico aumentou os danos oxidativos (TBARs) e reduziu as enzimas antioxidantes (CAT e GR) nos animais controles. O treinamento físico durante a recuperação nutricional, independente do tipo de exercício, acelerou o crescimento corporal (ganho de peso) dos ratos deficientes em proteína sem aumentar os danos oxidativos (TBARs). Ambos os tipos de treinamento reduziram a atividade da CAT durante a realimentação. O treinamento por natação reduziu também a atividade GR. Em resumo, o conjunto de resultados sugere que a melhora do crescimento corporal durante a recuperação nutricional associada ao treinamento físico, pode estar relacionada, ao menos em parte, ao decréscimo do nível de estresse oxidativo.

ABSTRACT

Malnourished human beings and animals show impaired function in several organs, which is not fully reversed by nutritional recovery. Physical training, in turn, accelerates some aspects of nutritional recovery. There are few data on the participation of oxidative stress in the functional impairment imposed by malnutrition. The literature lacks information on the effects of physical training associated to nutritional recovery on oxidative stress. The present study was designed to evaluate the balance between oxidative attack and antioxidant mechanisms in young rats submitted to alimentary protein restriction and recovered with balanced diet associated or not to aerobic physical training (swimming and running). The main oxidative damage biomarkers were the blood thiobarbituric acid reactive substances amount (TBARs) and reactive carbonyl derivatives (RCD) amounts while the antioxidant system biomarkers were the blood catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities. Protein deficient animals showed an increase in oxidative damage (TBARs) in relation to controls that induced an increase in antioxidant enzymes activity (CAT and GR). Physical training increased oxidative damage (TBARs) and reduced antioxidant defense (CAT and GR) in control animals. Physical training during nutritional recovery accelerated body growth (weight gain) of protein restricted rats without increasing oxidative damage (TBARs). Both swim and run training reduced CAT activity during nutritional recovery. Swim training reduced also GR activity. In summary, taken together these results suggest that the improvement in body growth during nutritional recovery associated to physical training may be related, at least in part to a decrease in the oxidative stress levels.

I – INTRODUÇÃO

Durante o metabolismo celular, a maior parte do oxigênio molecular consumido nas mitocôndrias sofre completa redução à água. Contudo, uma pequena parte do O₂ normalmente é convertida a produtos parcialmente reduzidos como radical ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (·OH) (ARUOMA, 1994). Essas espécies, radicalares ou não, são oxidantes potentes e podem causar danos teciduais, sendo coletivamente chamadas de Espécies Reativas de O₂ (EROS)(SEN et al., 2001). A peroxidação lipídica, mediada por radicais tem sido associada a grande variedade de processos degenerativos, inclusive à desnutrição protéica (GOLDEN & RAMDATH, 1987; SEN et al., 2001). Por sua vez a suscetibilidade do organismo aos danos oxidativos é influenciada pelos mecanismos de defesa antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Toda situação de desbalanço entre a quantidade de EROS formada e o sistema de defesa antioxidante estabelece uma condição denominada de estresse oxidativo. O exercício físico também é fonte importante de estresse oxidativo. Entretanto, existem evidências de que o treinamento físico, principalmente o de endurance, realizado regularmente parece atenuar o estresse. (PEREIRA, 1996).

Baseados nos efeitos benéficos do exercício para a saúde e, em especial nos efeitos anabólicos sobre o crescimento muscular TORUN & VITERI (1994) e GALDINO et al. (2000), analisaram o papel do exercício crônico sobre o crescimento corporal de ratos desnutridos e constataram que ratos desnutridos ativos cresceram mais do que aqueles mantidos inativos. O mesmo efeito foi observado em crianças em fase de recuperação da desnutrição protéica (TORUN & VITERI, 1994). Isso sugere que o exercício pode exercer efeito benéfico no processo de recuperação nutricional. Entretanto faltam informações quanto aos efeitos do exercício crônico sobre o balanço entre fatores geradores de danos oxidativos e defesa antioxidante durante a recuperação nutricional. Além disso, faltam também informações mais consistentes em relação ao *status* antioxidante numa condição de desnutrição protéica.

II – REVISÃO DE LITERATURA

1. CONCEITO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Radical é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de valência (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; SEN et al., 2001). Exemplos de radicais são o próprio oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical peroxi ($ROO\cdot$), radical alcoxi ($RO\cdot$) e óxido nítrico ($\cdot NO$) (PEREIRA, 1994a; ARUOMA, 1994; YU, 1994; SJODIN et al., 1990; SEN et al., 2001). Destes radicais, o $\cdot OH$ e o $O_2^{\cdot -}$ possuem uma grande importância biológica porque são formados em várias situações durante o processo normal ou exacerbado de redução do O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993), durante a metabolização de bases purínicas a Xantina Oxidase (LOWENSTEIN, 1990) ou devido à redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo $O_2^{\cdot -}$ catalizada por redutores como o Fe^{2+} e Cu^+ ou ascorbato (YU, 1994). O H_2O_2 surge no interior das células quando o O_2 é reduzido divalentemente ou quando o $O_2^{\cdot -}$ sofre dismutação espontânea ou catalisada. Por não possuir elétrons desemparelhados, não é classificado como radical, sendo, portanto, menos reativo que os radicais citados anteriormente (PEREIRA, 1994a; PEREIRA, 1996; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A maior reatividade exibida pelos radicais, comparativamente a outros elementos é consequência do menor tempo de vida-média que possuem. Os radicais $\cdot OH$ e o $O_2^{\cdot -}$ possuem vida média de 1×10^{-9} e 1×10^{-6} segundos respectivamente, enquanto o H_2O_2 , superior a 10^{-2} segundos e o O_2 , superior a 10^2 segundos (YU, 1994). Esta meia vida extremamente curta deve-se à instabilidade eletrônica que apresentam. Isto resulta na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo formação de outras espécies radicalares, como por exemplo, os radicais $ROO\cdot$ e $RO\cdot$, formados durante a lipoperoxidação das membranas biológicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). De forma resumida todas as espécies que contém oxigênio e tem alta reatividade e alto potencial oxidante, sendo ou não radicalares, denominam-se espécies reativas de oxigênio (EROS).

A peroxidação dos lipídios das membranas biológicas é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis a oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos moleculares e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH), entre outros cofatores das enzimas antioxidantes também estão selênio, cobre, zinco; que diminuem a ação tóxica das EROS produzidas intra e extracelularmente (Yu, 1994; SEN et al., 2001).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído principalmente por enzimas como as superóxido dismutases (CuZn-SOD - citosólica e extracelular, Mn-SOD - mitocondrial), catalase (heme-enzima específica para reduzir H_2O_2 , CAT) e glutathiona peroxidase (GR/GPX - dependentes e não dependentes de selênio, também específicas para combate de lipoperóxidos) para decomponem respectivamente o ânion O_2^- , H_2O_2 e lipoperóxidos (YU, 1994). A glutathiona redutase (GR) é outra enzima importante nesse processo. Esta enzima, mesmo não agindo diretamente na remoção de radicais é responsável pela regeneração da glutathiona oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH), utilizado como substrato da enzima GPX. Apesar dessas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROS, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Quando acontece um desbalanço entre a produção de EROS e defesa antioxidante se estabelece uma situação de estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

2. DESNUTRIÇÃO PROTÉICO CALÓRICA

Embora a incidência mundial de desnutrição tenha diminuído nas últimas décadas, sua prevalência ainda é muito elevada. Mais de um bilhão de pessoas no terceiro mundo são afetadas, fazendo dessa carência, grave problema médico-social nesses países ainda nos dias de hoje (UVIN, 1994; GALDINO et al., 2001). Na América latina, em nove países onde foi efetuado inquérito populacional, a desnutrição foi

responsável pela elevada morbidade e mortalidade em crianças abaixo de 5 anos de idade (ANGELIS, 1977). As soluções básicas para diminuir a incidência da desnutrição – distribuição de renda e, conseqüente disponibilidade adequada de alimentos – é alcançável a médio e longo prazo e não se pode garantir que essas medidas, por si só, corrigirão os casos já instalados.

Entre as diferentes deficiências que a desnutrição pode apresentar, TORUN & CHEW (1994) descreveram que deficiências protéicas e energéticas normalmente ocorrem juntas, embora possa haver a predominância de uma sobre outra. Quando manifestam-se de forma severa podem desencadear síndromes clínicas denominadas “kwashiorkor” e/ou “marasmo”. Kwashiorkor resulta sempre quando carboidratos e gorduras estão disponíveis em quantidades adequadas, mas as proteínas são ingeridas em quantidade insuficiente. O marasmo resulta principalmente da deficiência energética (NEWSHOLME & LEECH, 1984; TORUN & CHEW, 1994; GALDINO et al., 2001).

Na criança, em particular, a má nutrição reflete imediatamente na dinâmica do crescimento e do desenvolvimento (ANGELIS, 1977; NEWSHOLME & LEECH, 1984; TORUN & CHEW, 1994; ROLLAND-CACHERA, 1998). Isto também é verdadeiro para animais experimentais (REICHLING & GERMAN, 2000). Entretanto, a partir do momento em que as fontes protéicas alimentares deixam de suprir as necessidades estruturais e funcionais, desencadeia-se no organismo uma sucessão de mecanismos de adaptação, cuja finalidade é preservar a homeostase bioquímica intra e extra celular. A persistência das condições de carência acaba desorganizando tais mecanismos (ANGELIS, 1977; TORUN & CHEW, 1994; LIU et al., 2001). Aparentemente os mecanismos de defesa antioxidantes são exemplos de sistemas que sofrem efeitos diante da privação nutricional. Esse fato levou GOLDEN & RAMDATH (1987) a desenvolverem a teoria de que o kwashiorkor resultaria do desbalanço entre a produção de radicais tóxicos e dos mecanismos celulares antioxidantes. De acordo com os mesmos autores, os efeitos tóxicos dos radicais seriam responsáveis por danos celulares, levando à alterações observadas no kwashiorkor tais como edema, esteatose hepática e lesões cutâneas. Essa teoria vem sendo confirmada em estudos mais recentes. (BROOKS et al., 1994; FECHNER et al., 2001; MANARY et al., 2000).

3. DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E ESTRESSE OXIDATIVO

A nutrição exerce importante papel na determinação dos mecanismos celulares de defesa antioxidante (HALLIWELL & GUTERIDGE, 1994). Fatores dietéticos como vitamina E, vitamina C, selênio, cobre e zinco, sabidamente, afetam a capacidade oxidativa do organismo. Por outro lado, são mais raros os estudos em relação ao papel da proteína dietética sobre os mecanismos de defesa antioxidante, a despeito das indicações de que a desnutrição protéica pode deprimir o sistema de defesa antioxidante do organismo (SEN et al., 2001). Desta forma, foram observadas reduções nas concentrações plasmáticas de vitamina E (GOLDEN & RAMDATH, 1987; MATHIAS, 1992), carotenos (McLAREN & SHIRAJIAN, 1969) e selênio (BURKE et al., 1987). GOLDEN & RAMDATH (1987) observaram decréscimo da glutatona total em portadores de kwashiorkor.

DENECK et al. (1983) relataram redução significativa na atividade da enzima SOD no pulmão de ratos alimentados com dieta contendo 3% de proteína e expostos a oxigênio hiperbárico. DENECK et al. (1985) também demonstraram redução da atividade da catalase pulmonar em ratos mantidos com dieta de baixo teor protéico submetidos a essa mesma condição. Em ambos os estudos, os efeitos tóxicos do oxigênio foram potencializados pela ingestão da dieta deficiente em proteína. PELLESIER et al. (1993) relataram decréscimo do conteúdo de glutatona no intestino delgado e no fígado de ratos mantidos com dieta com 6% de proteína. HUANG et al. (1993) constataram que ratos alimentados com dietas hipoprotéicas (2 – 5% de proteína) apresentaram menor atividade das enzimas SOD e glicose-6 fosfato desidrogenase (G^6PD) no fígado quando expostos a dieta rica em gordura em comparação a ratos mantidos com dieta normoprotéica (HUANG & FWU, 1993). RANA et al. (1996) constataram redução dos tióis relacionadas à glutatona e das atividades das enzimas glutatona peroxidase, catalase e superóxido desmutase no fígado de ratos submetidos à restrição protéica durante a fase de crescimento. Tais alterações apareceram acompanhadas de aumento da peroxidação lipídica no órgão. Por outro

lado, observou-se que a ingestão crônica de dieta hiperprotéica (30% de proteína) não induz estresse oxidativo em ratos (PETZKE et al., 1999).

Os relatos sobre a produção de radicais na desnutrição protéica são conflitantes. Existem estudos apontando aumento das fontes de estresse oxidativo no kwashiorkor, principalmente em consequência de infecções, proliferação de bactérias intestinais e ingestão de toxinas (GOLDEN & RAMDATH, 1987). Por outro lado, alguns estudos sugerem que a produção de radicais possa estar reduzida pelo hipotireoidismo associado à condição de desnutrição (INGENBLEEK, 1986). Dados experimentais indicam também que as transferências de elétrons mitocondrial (monooxigenases são enzimas do complexo P-450) são atenuados no curso da deficiência protéica (CAMPBELL & HAYES, 1976; HARADA, 1967).

4. EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

O exercício físico é outra condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. Durante os exercícios físicos, ocorrem várias reações químicas que levam à formação de radicais tais como O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, ROO, RO e NO (PEREIRA, 1994; BALAKEISNAN & ANURADHA, 1998; SEN et al., 2001; VAN REMEN et al., 2003).

Numa situação de exercício, o $O_2^{\cdot -}$ pode ser formado no músculo de várias maneiras (HESS et al, 1984; SJÖDIN, 1990; ARUOMA, 1994; SEN et al., 2001; DIMEO & VENDIT, 2001): 1) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial principalmente quando esta se encontra numa situação de anóxia muscular e é "reperfundida" pelo oxigênio durante, por exemplo, pausa após um esforço de alta intensidade; 2) por enzimas como xantina oxidase e 3) pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase. O músculo esquelético também produz óxido nítrico ($NO\cdot$) pela reação da enzima óxido nítrico sintase (REID,1996). O óxido nítrico pode reagir com $O_2^{\cdot -}$ para formar peroxinitrito, um intermediário relativamente estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao radical hidroxila (BECKMAN et al, 1990, SEN et al., 2001), uma das espécies mais reativas que se conhece. Além disso, a

presença de ferro, na forma livre ou ligado a heme, pode converter o radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton, em radical hidroxila, uma das espécies mais reativas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989), (Figura 1).

Aumento na peroxidação lipídica tem sido relatado após o exercício (ALESSIO & GOLDFARB, 1980; MIYAZAKY et al., 2001) embora nem sempre seja constatado (SELMAN et al.; 2002; VIINIKKA, et al., 1984). O aumento na peroxidação lipídica parece ser tecido específico. AVULA e FERNANDES (1999) constataram redução da peroxidação lipídica nos rins e nas glândulas salivares e aumento da mesma no fígado de camundongos treinados por corrida em esteira analisados em repouso, em comparação dos sedentários. Nenhuma diferença foi constatada no músculo esquelético e cardíaco entre os dois grupos. RADÁK et al., (1999) também não verificaram qualquer diferença nos níveis de peroxidação lipídica no músculo esquelético de ratos treinados por natação e sedentários, analisados em repouso. Os níveis de pentano e etano apareceram 2 a 3 vezes mais elevados do que os valores de repouso em homogeneizados de fígado e músculo esquelético de ratos depois da corrida até a exaustão (GEE et al., 1981). ALESSIO e GOLDFARB (1980) constataram pequeno aumento na peroxidação tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos após exercício sub-máximo decorrida em esteira.

QUINDRY et al., (2003) constataram que 2 horas após sessão única de exercício máximo, em indivíduos jovens do sexo masculino, ocorreu aumento na concentração de ânions superóxidos (O_2^-) e decréscimo do teor de ácido ascórbico e ácido nítrico, indicando ocorrência de estresse oxidativo sanguíneo. RADÁK et al., (2003), verificaram que o exercício aeróbico exaustivo (corrida de super maratona) causa estresse oxidativo e aumenta a nitração e a carbonilação das proteínas séricas. OWEN et al., (2003), verificaram em um modelo com ratos, que o exercício agudo elevou os níveis cardíacos de peroxidação lipídica.

PEREZ et al., (2003), relataram que em ratos, a fluidez da membrana mitocondrial, medida pelo método de polarização por fluorescência, foi significativamente aumentada após exercício agudo no coração e em músculos oxidativos. O treinamento físico, por sua vez, estabilizou e preservou fluidez das

membranas mitocôndriais em ambos os tecidos. Os mesmos autores constataram, também, aumento de proteínas carboniladas no coração após exercício agudo exaustivo, quadro que não foi observado após o treinamento físico.

Para proteger os tecidos contra os danos causados pelos radicais produzidos durante o exercício físico as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPX/GR parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de animais e seres humanos treinados (PEREIRA et al., 1994; JENKINS, 1988; CASE et al., 1994; CLARKSON & THOMPSON, 2000). Isso ocorre principalmente em treinamentos do tipo de endurance (SEN et al., 2001; MIYAZAKI et al., 2001; AVULA et al., 1999). Por outro lado existem também relatos de aumento da peroxidação lipídica associada à não compensação completa ou a redução de componentes do sistema antioxidante (glutathiona, ácido ascórbico e atividade glutathiona peroxidase) (BENZI et al., 1993; BALAKRISHNAN & ANURADHA, 1998; SEN et al., 2001).

OSORIO et al. (2003), avaliaram as concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), glutathiona total (GSH) e vitamina E em ratos submetidos a exercício agudo e treinamento em exercício de natação realizados em condição de hipo ou hipertermia. Foi calculado um índice de estresse oxidativo através das razões TBARs/GSH e TBARs/VIT-E. Os resultados mostraram uma grande complexidade de interação entre o treinamento físico e estresse térmico. Aparentemente, hipotermia produz aumento do índice de estresse oxidativo somente em ratos sedentários. O treinamento físico permitiu uma ativação mais eficiente dos mecanismos antioxidantes sob estresse térmico.

RUSH e SANTIFORD (2003), reportaram que a população jovem, saudável, mas sedentária, feminina apresenta concentrações plasmáticas de enzima antioxidante GPX, ligeiramente maior que a população masculina, mas o significado funcional disso não foi estabelecido. GROUSSARD et al. (2003), constataram que após sessão de exercício supra-máximo (teste de Wingate 30-s), sujeitos ativos mas não atletas mostraram aumento significativo da peroxidação lipídica (radicais lipídicos séricos detectados por ressonância paramagnética de spins - EPR), bem como redução das atividades das enzimas antioxidantes GPX e SOD nas hemácias. Concluíram, então, que o exercício supra-máximo induz estresse oxidativo. Por outro lado, OOKAWARA et

al. (2003), verificaram que nem treinamento de endurance nem exercício agudo exaustivo alteraram a atividade plasmática da enzima antioxidante CuZn-SOD. Exercício agudo após o treinamento, mas não antes, aumentou os níveis plasmáticos de liperóxidos, indicando alto nível de estresse oxidativo nos sujeitos treinados durante exercício exaustivo.

Os níveis de GPX não se acham associados com o condicionamento aeróbio e nem com as concentrações séricas de estradiol. Além disso, exercício agudo leve e prolongado não afetou a atividade sérica de GPX nessa população.

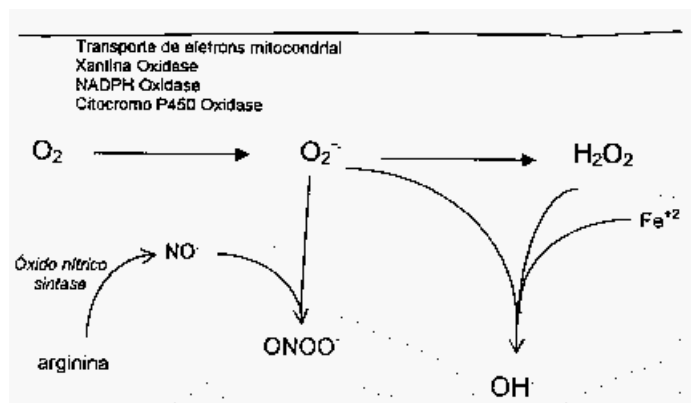


FIGURA 1 - Vias de formação de EROs no músculo esquelético. $O_2^{\cdot-}$ (Radical ânion superóxido); OH^{\cdot} (radical hidroxila); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); NO (óxido nítrico); $ONOO^-$ (ânion peroxinitrito)(retirado de ESSIG e NOSEK, 1997).

5. EXERCÍCIO FÍSICO E RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL

O restabelecimento das variáveis fisiológicas com a recuperação nutricional é lento. Sabe-se que a prática regular de exercícios físicos exerce efeitos benéficos para a saúde, tais como aumento da massa muscular e da capacidade oxidativa (MARCONDES, 1985). De acordo com a literatura, o exercício físico pode também trazer benefícios no processo de recuperação nutricional tanto em humanos quanto em animais de laboratório. Ao serem comparados os ritmos de crescimento de crianças entre 2 e 4 anos, enquanto se recuperavam de desnutrição em hospitais, verificou-se que crianças ativas, que participavam de jogos envolvendo gasto energético moderado, apresentavam mais massa magra e cresciam mais rapidamente do que as que seguiam o nível de atividade física dos hospitais (jogos Dietas) (TORUN & VITERI, 1994). Os resultados referentes a estudos realizados em modelos animais de má-nutrição são conflitantes. Alguns apontam efeitos positivos do exercício sobre o crescimento e desenvolvimento de animais desnutridos (ORTON et al., 1985; SAKAMOTO & GRUNEWALD, 1987) enquanto outros não verificaram nenhum efeito (BARBIRAK et al., 1974; CREWS et al., 1969; ZANELATTO et al., 1992).

Nos últimos anos vimos desenvolvendo, em nosso laboratório, um modelo experimental para o estudo das alterações fisiológicas impostas pela desnutrição, utilizando ratos alimentados com dieta hipoprotéica. Constatamos que estes animais apresentam comprometimento funcional em diferentes órgãos como fígado (MELLO et al., 1987), músculo esquelético estriado (GALDINO et al., 2000; LATORRACA et al., 1998) e pâncreas endócrino (LATORRACA et al., 1998), que não é completamente revertido pela realimentação (LATORRACA et al., 1998). No mesmo modelo, constatamos que o exercício físico acelera alguns aspectos do processo de recuperação nutricional (GALDINO et al., 2000). São escassos, entretanto, dados quanto ao possível envolvimento de níveis elevados de estresse oxidativo no comprometimento funcional causado pela desnutrição nos referidos órgãos em modelo animal. Mais raras ainda são as informações quanto aos efeitos do exercício sobre a recuperação nutricional (GALDINO et al., 2000). A hipótese do envolvimento de

desbalanço entre produção de radicais tóxicos e dos mecanismos antioxidantes de defesa na patogênese da desnutrição protéica severa, bem como de possíveis efeitos benéficos do exercício sobre a recuperação nutricional atrai a atenção para fatores e processos previamente negligenciados. A confirmação dessa teoria pode ter implicações importantes para procedimentos mais efetivos no tratamento dessa carência.

III – OBJETIVO

Esta pesquisa visou avaliar o balanço entre danos oxidativos e mecanismos celulares de defesa antioxidante em ratos submetidos às seguintes condições:

- Desnutrição protéica;
- Recuperação nutricional;
- Treinamento físico;
- Recuperação nutricional associada ao treinamento físico.

Para atingir tais objetivos, foram efetuados 4 estudos:

- O primeiro intitulado “EVALUATION OF A PROTEIN DIET IN RATS THROUGH BLOOD OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS”, foi delineado para verificar a sensibilidade de biomarcadores sanguíneos do estresse oxidativo à restrição protéica alimentar;
- O segundo estudo, “ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE NATAÇÃO EM INTENSIDADE EQUIVALENTE AO LIMAR ANAERÓBIO” teve por objetivo analisar indicadores de estresse oxidativo em ratos eutróficos submetidos ao treinamento físico por natação em intensidade moderada;
- O terceiro, intitulado “OXIDATIVE STRESS DURING REHABILITATION FROM PROTEIN MALNUTRITION ASSOCIATED OR NOT TO EXERCISE IN RATS” visou avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ou não ao exercício físico de natação durante a recuperação da desnutrição protéica;

- O Quarto estudo, intitulado “Effects of exercise mode, swimming vs running” foi delineado para comparar os efeitos de dois protocolos de exercício sobre indicadores de crescimento corporal, de danos oxidativo e de enzimas antioxidantes de ratos durante a recuperação da desnutrição protéica.

ESTUDO 1

PRADA, F.J.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Evaluation of a protein deficient diet in rats through blood oxidative stress biomarkers. **Research communication in Molecular Pathology and Pharmacology** v. 113-114, p. 213-228, 2003.

RESEARCH COMMUNICATIONS IN Molecular Pathology and Pharmacology

VOLS. 113-114

TABLE OF CONTENTS

2003

Protective Effect of Ketoconazole Against Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rats. <i>Ahmed R. Al Moutaery</i>	5
Studies on Antisecretory and Gastric Antiulcer Activity of Thimerosal. <i>Ahmed R. Al Moutaery</i>	24
Effect of Centrophenoxine on Water-Immersion Restraint Stress- And Chemically-Induced Gastric Ulcers in Rats. <i>Ahmed R. Al Moutaery</i>	39
N³-Phenacyluridine as a New Type of Antinociceptive Compound in Mice. <i>Toshiyuki Kimura, Tomomi Shimizu, Tatsuya Funahashi, Mayumi Nagakura, Kazuhito Watanabe, Kuniomi Tachibana, Shigemi Kondo, Ing Kang Ho, and Ikuo Yamamoto</i>	57
Enhanced Expression of Protein Phosphatase 2A Associated With Hyper-Phosphorylation of Histone H1 in Alzheimer's Disease Brain. <i>Satoshi Mori, Yongping Cao, Kenichi Sogawa, Kazuya Kondo, Tohru Sakai, Norifumi Hino, Hisakazu Yamashiro, Masanao Okada, Kazuo Miyamoto, Yoji Kawaguchi, Tasuku Mashiba and Hiromichi Norimatsu</i>	67
Excretion Measurement of Porphyrins and Their Precursors After Topical Administration of 5-Aminolaevulinic Acid for Fluorescence Endoscopy in Head and Neck Cancer. <i>Lippert, B.M., Groß, U., Klein, M., Kulkens, C., Klahr, N., Brossmann, P., Teymoortash, A, Ney, M., Doss, M.O., Werner, J.A.</i>	75
The Risk of Atherosclerosis in Patients With Impaired Glucose Tolerance. <i>B. Okopien, A. Stachura-Kulach, A. Kulach, J. Kowalski, M. Zielinski, M. Wisniewska-Wanad, Z. Kalina, Z. Stanislaw Herman</i>	87
5-Hydroxytryptamine (5-HT) Concentrations in the Hippocampus, The Hypothalamus and the Medulla Oblongata Related to Cisplatin-Induced PICA of Rats. <i>Yanxia Liu, Naoya Hamaue, Toru Endo, Masahiko Hirafuji and Masaru Minami</i>	97
Effects of Fluvoxamine, a Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitor, On Serotonin Release From the Mouse Isolated Ileum. <i>Masaru Minami, Shin Taguchi, Takuro Kikuchi, Toru Endo, Naoya Hamaue, Tsutomu Hiroshige, Yanxia Liu, Wang Yue and Masahiko Hirafuji</i>	115

....continued from previous page....

Antioxidant Activities of Novel α-Lipoic Acid Derivatives: N-(6, 8-Dimercaptooctanoyl)-2-Aminoethanesulfonate- And N-(6, 8-Dimercaptooctanoyl)-L-Aspartate-Zinc Complex. Yasuko Noda, Kazumi Ogata, and Akitane Mori.....	133
Genistein, A Soy Isoflavone, Enhances Necrotic- Like Cell Death in a Breast Cancer Cell Treated With a Chemotherapeutic Agent. Haruna Satoh, Kazuhiro Nishikawa, Kazuyuki Suzuki, Ryuji Asano, Nantiga Virgona, Tomio Ichikawa, Kiyokazu Hagiwara, and Tomohiro Yano	149
Overview of Resistance Training, Diet, Hormone Replacement and Nutritional Supplements on Age-Related Sarcopenia – A Minireview. Alexander D. De Los Reyes, Debasis Bagchi, Harry G. Preuss.....	159
Hepatocellular Accumulation of Poly(ADP-Ribose) in Male ICR Mice Treated With a Necrogenic Dose of Carbon Tetrachloride. Phi-Huynh Su, Masanori Takehashi, Seigo Tanaka, Marek Banasik, Todd Stedeford, Kunihiro Ueda, Carlos Muro-Cacho, and Raymond D. Harbison.....	171
The Relationship Between Oxidative Metabolism and Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes. Bin Ji, Y. Masubuchi and T. Horie.....	181
Effects of Acute Renal Failure Induced by Uranyl Nitrate on The Pharmacokinetics of Intravenous Torasemide in Rats. Ae K. Lee, Eun J. Kim and Myung G. Lee.....	193
Accelerated Acetylcholine Metabolism in the Lung After Infusion of Phenylephrine in Dogs. Tsutomu Nakahara, Hiroaki Nejishima, Koichi Nakayama and Kunio Ishii.....	201
Perfusion Pressure in Kidneys of Arthritic Rats and the Influence of L-NAME. Willian S. Taguchi, Jurandir F. Comar, Djalma J. Fagundes, Adelar Bracht and Fumie Suzuki-Kemmelmeier... 	207
Evaluation of a Protein Deficient Diet in Rats Through Blood Oxidative Stress Biomarkers. F.J.A. Prada, D.V. Macedo, and M.A.R. Mello.....	213
Glucose Homeostasis in Pregnant Rats Submitted to Dietary Protein Restriction. Maria Alice Rostom De Mello, Eliete Luciano, Everardo Magalhães Carneiro, Márcia Queiroz Latorraca, Camila Aparecida Machado De Oliveira, and Antonio Carlos Boschero.....	229

....continued on next page....

EVALUATION OF A PROTEIN DEFICIENT DIET IN RATS THROUGH BLOOD OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS.

¹Prada, F.J.A., ¹Macedo, D.V., ²Mello, M.A.R. ¹Universidade de Campinas (UNICAMP/SP), ¹Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), E-mail: labex@unicamp.br; ²Universidade Estadual Paulista (UNESP/RC); Depto. de Educação Física. E-mail: mellomar@rc.unesp.br or f_jprada@hotmail.com

Corresponding author: Maria Alice Rostom de Mello, Departamento de Educação Física, IB – UNESP – Av. 24-A, 1515, 13506-900 - Rio Claro/SP – Brazil, phone: (+5519) 3526-4165 Fax: (+5519) 3534-0009, E-mail: mellomar@rc.unesp.br

Abstract

Protein malnutrition leads to functional impairment in several organs, which is not fully restored with nutritional recovery. Little is known about the role of oxidative stress in the genesis of these alterations. This study was designed to assess the sensitivity of blood oxidative stress biomarkers to a dietary protein restriction. Male Wistar rats were divided into two groups, according to the diet fed from weaning (21 days) to 60 day old: normal protein (17% protein) and low protein (6% protein). Serum protein, albumin, free fatty acid and liver glycogen and lipids were evaluated to assess the nutritional status. Blood glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) activities, plasma total sulfhydryl groups concentration (TSG) as well as plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) and reactive carbonyl derivatives (RCD) were measured as biomarkers of the antioxidant system and oxidative damage, respectively. The glucose metabolism in soleus muscle was also evaluated as an index of stress severity imposed to muscular mass by protein malnutrition. No difference was observed in muscle glucose metabolism or plasma RCD concentration between both groups. However, our results showed that the low protein group had higher plasma TBARs (62%) concentration and lower TSG (44%) concentration than control group, indicating increased reactive oxygen species production in low protein group. The increasing of erythrocyte GR (29%) and CAT (28%) activities in this group also suggest an

adaptation to the stress generated by the protein deficiency. Taken together, the results presented here show that the biomarkers used were able to reflect the oxidative stress level induced by this specific protein deficient diet.

Key words: protein malnutrition, oxidative stress, blood glutathione reductase, blood catalase, TBARs

INTRODUCTION

During the course of cellular metabolism molecular oxygen undergoes complete reduction to water. However, a small part (3-5%) is converted to reduced products such as hydrogen peroxide, superoxide anion and hydroxyl radicals. These reactive oxygen species (ROS) may, mainly in high concentrations, exert damaging effects on cellular structures such as lipids, proteins or DNA and may be responsible for some aspects of disease pathology (Halliwell and Gutteridge, 1990). Nutritional factors can influence the susceptibility of tissue to oxidative stress and the effects tend to be more marked in deficiencies involving biochemical processes, that determine tissue antioxidant status (Fwo, 1993; Halliwell, 1990).

Malnutrition is one of the devastating nutritional problems affecting children in most underdeveloped countries (Uvin, 1994). The physiopathology of protein energy malnutrition is complicated (Torun and Viteri, 1994) and has substantial effects on the vulnerability of individuals to oxidative stress (Becker, Leichsenring et al., 1994; Deneke, Lynch et al., 1985; Pélissier, Darmon et al., 1993) and other toxicological insults (Campbell and Hayes, 1976). It has been suggested that kwashiorkor, a severe form of protein energy malnutrition, may be a product of free radical initiated tissue damage in the malnourished Child (Fechner, Böhme et al., 2001; Golden and Ramdath, 1987; Manary, Leeuwenburg et al., 2000; Sive, Subotzky et al., 1993). Despite of the importance of the problem there are still few data about the effects of low protein intake on the balance between ROS production and antioxidant defense or oxidative stress level in animal models.

The present study was designed to assess the sensitivity of blood oxidative stress biomarkers and skeletal muscle glucose metabolism to a dietary protein restriction in rats, indicating the severity of the damage induced by a relatively short-term exposure to protein deficiency early in the life. Muscle glucose uptake and oxidation, glycogen synthesis and lactate

production rates as well as the erythrocyte antioxidant defense enzymes catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities and the plasma oxidative attack products, determined by the amount of total sulfhydryl groups (TSG), thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and reactive carbonyl derivatives (RCD) are among the biomarkers evaluated in young protein-restricted rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Diets:

Weanling (21 days) male Wistar rats (n=50) were divided at random into two groups, housed individually, and fed an isocaloric (3948 Kcal/Kg) normal (NP= 17%) or low (LP=6%) protein diets ad libitum for 6 weeks. Table I shows the composition of both diets. The normal protein diet follows the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendations for rodents (Reeves, Nielsen et al., 1993). Detailed mineral and vitamin mix composition were described elsewhere (Reeves, Nielsen et al., 1993). The animals were weight and had food intake registered once a week along the experiment. The experimental procedures with the animals were approved by The Committee for Animals Use in Research of Biological Institute at Unicamp.

Table I: Diet composition (g/kg).

Components	Normal protein (AIN-93)	Low protein
Casein (84% protein)	202	71.5
Cornstarch	397	480
Dextrinized cornstarch	130.5	159
Sucrose	100	121
Soybean oil	70	70
L-cystine	3	1
choline chloridrate	2.5	2.5
mineral mix (AIN-93)	35	35
vitamin mix (AIN-93)	10	10
Fiber (mycrocellulose)	50	50

Samples Preparation:

Animals were anesthetized without previous fasting with an intraperitoneal injection of chloral hydrate 10% (wt/vol), 0.3 ml for each 100 g of body weight for tissue and blood extraction. They were used in experiments as soon as anesthesia was assured by loss of pedal and corneal reflexes. Heparinized blood samples were obtained from portal vein. After sample extraction, the animals were sacrificed. The whole blood was centrifuged for 15 min at 3,000 rpm and 2 portions of 250 μ L of plasma were withdrawn and stored at -80°C until analyses for thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), total sulfhydryl groups (TSG) and reactive carbonyl derivatives (RCD). Erythrocytes were washed three times in 0.9 % NaCl. Washed erythrocytes were lysed (1:1) and stored at -80°C until analyses of catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities. Non-heparinized blood samples were also obtained for serum protein, albumin and free fatty acid (FFA) determinations (for details, see Nogueira, Strufaldi et al., 1990). Liver samples were taken immediately after blood collection for glycogen (for details, see Dubois, Gilles et al., 1956) and lipids (for details see Nogueira, Strufaldi et al., 1990) evaluations. Soleus muscle was excised immediately after blood collection and longitudinal strips (25-35 mg) were carefully obtained.

Muscle Glucose Metabolism Measurement:

The strips obtained from soleus muscle were first incubated for 30 min at 37°C in 1.5 mL of a Krebs bicarbonate buffer (NaCl 0.6%; HEPES 6.64 mM; KCl 0.032%; CaCl_2 1.14 mM; KH_2PO_4 0.015%; NaHCO_3 0.19%; MgSO_4 0.03% equilibrated with a mixture of 95% O_2 -5% CO_2 , pH 7.4). After this time, the muscle strips were transferred to glass scintillation vials (outer vials) containing 1.5 mL of Krebs-bicarbonate buffer supplemented with glucose 5.5mM, containing [U^{14}C] glucose (0.25 mCi/mL) and [3H^+] 2-deoxyglucose (2 DG, 0.5 μ Ci/mL) and insulin (100 μ U/mL). Inside these scintillation vials, other glass vials (inner vials), which are formed like a scoop with an upwards-directed straight shaft, containing 700 μ L of hyamine 10-x were installed.

The shafts of the inner vials were squeezed about 1 cm through a small hole in a round rubber membrane. The outer vials were sealed with the rubber membranes and locked with plastic rings. The muscle strips were incubated in this system for 60 min. The release of CO_2 was

stimulated by the injection of 200 μL of trichloroacetic acid (TCA) 25% into the outer vial and the CO_2 was trapped in hyamine 10-x during a further 3 h incubation at 37°C .

Lactate production was determined by measuring the radioactivity of the ^{14}C in the outer vial incubation medium after separation of the substrate using Dowex-2 ion exchange columns. Glucose incorporation to glycogen (glycogen synthesis) was determined by measuring the radioactivity of the ^{14}C in the precipitated obtained during muscle glycogen extraction process (Sjorgreen, Nordenskjoli et al., 1938). Glucose oxidation was estimated by the measurement of the radioactivity of the ^{14}C in the inner vial liquid. Glucose (2-DG) uptake was evaluated in the alkaline phase obtained during muscle glycogen extraction process, by measuring the radioactivity of the $^3\text{H}^+$.

Enzyme Assays

The hemolysate was diluted 1:20 in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0 before assaying. All enzyme assays were performed in triplicate, according to the following methods. Catalase (CAT) activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm for 30 sec after the addition of 10 mM hydrogen peroxide (Aebi, 1984). One unit of catalase activity is the amount of enzyme present that decomposes 1 μM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ at 25°C (Aebi, 1984). The erythrocyte CAT activity was expressed as IU/g Hb. Glutathione Reductase (GR) activity was measured in a 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM EDTA, 0.1 mM NADPH and 0.75 mM DTNB. GSSG 1mM was added into the cuvette to start the reaction and the absorbance was followed at 412 nm for 3 min (Smith, Vierheller et al., 1988). The erythrocyte GR activity was expressed as IU/g Hb (Beutler, 1975).

Plasma Total Sulfhydryl Groups (TSG) Determination

The plasma total Sulfhydryl groups (TSG) were estimated according to Faure and Lafond (1995). Samples of 50 μL of plasma were diluted in 0.25M Tris[hydroxymethyl]-aminomethane and 20 mM EDTA buffer, pH 8.2 and the absorbance was measured at 412 nm. Immediately after this first measurement, 20 μL of DTNB diluted with methanol (4mg/mL) were added to the cuvette and a second measurement was done after 15 min. The TSG concentrations were calculated as follows:

$(A_2 - A_1) - B \times \text{dilution factor (mM)} \times \text{final vol. of the sample } (\mu\text{L}).$

The dilution factor was 1.57 mM, calculated using $\epsilon = 13600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ and the final volume of the sample was 1000 μL . The TSG concentration was expressed as μM .

Plasma Reactive Carbonyl Derivatives (RCD) evaluation

We measured the plasma reactive carbonyl derivatives (RCD) by carbonyl reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) using a spectrophotometric method (Eston, Finney et al., 1996). Plasma (200 μL) was mixed with 1 mL of H_2O and 2 mL of 20% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was resuspended in 1 mL of 10 mM DNPH and incubated for 60 min at 37°C . For blank it was used 1 mL of 1M HCl instead DNPH. Subsequently, 1mL of 20% TCA was added and the sample was centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was washed with 1:1 ethanol/ethyl acetate solution and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was mixed with 1 mL of 6 M guanidine (diluted in 20 mM H_2PO_4 , pH 2.3). Finally the sample was incubated for 40 min at 37°C . The absorbance was measured at 380 nm. The results were expressed as μmol s RCD/mL of plasma. The analyses were done in triplicate and the mean was used to statistical analysis.

Plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARs) Determination

The plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARs) were measured by fluorometry, according to Yagi (1987). Plasma (20 μL) was mixed with 4.0 mL of H_2SO_4 . Phosphotungstic acid 10% (0,5 mL) was added and mixed to this solution, which was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The pellet was mixed with 2.0 mL of H_2SO_4 and 0.3 mL of 10% phosphotungstic acid and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Four mL of distilled water and 1.0 mL of thiobarbituric acid (TBA) (1:1 0.67 % TBA aqueous solution and glacial acetic acid) suspended the pellet. This mixture was heated at 95°C for 60 min. After cooling, 5.0 mL of *n*-butanol was added, and the mixture was shaken vigorously. After centrifugation at 3,000 rpm for 15 min, the *n*-butanol layer was measured at 553 nm with excitation at 515 nm.

Statistical Analysis:

The results were expressed as means \pm SD for the number of rats (n) indicated. When working with muscle strips, n refers to the number of strips. The data were analyzed by Students' unpaired t-test and $P < 0.05$ values to indicated significant difference.

RESULTS

Effects of the low protein diet on nutritional status

We can observe from Table II that after 6 weeks the LP rats showed reduced body weight gain, low serum protein and albumin, high serum FFA levels and elevated liver lipid and glycogen contents compared to the NP rats. Despite of the low body weight gain observed in LP animals, no significant difference in food intake per gram of body weight gain was observed during the experimental period between the two groups.

Effects of the low protein diet on soleus muscle glucose metabolism.

No differences on glucose uptake, lactate production, glycogen synthesis and glucose oxidation was observed between the two groups (Table III).

Effects of the low protein diet on blood oxidative stress biomarkers.

The Figure 1 shows the activity of erythrocyte enzymes GR, CAT, and plasma TSG concentration as markers of the antioxidant status. It can be observed that both enzyme activities were increased in the LP when compared to the NP group, although the plasma TSG concentration was significantly lower in LP animals.

The Figure 2 shows plasma RCD and TBARS concentrations as biomarkers of protein and lipid oxidation, respectively. There were no alterations on RCD concentration comparing both groups but we found a significant increase in plasma TBARS concentration in LP in relation to NP rats.

DATA

Table II: Body weight gain (g) and food intake (g/100g body weight per day) during the experiment; serum total protein (g/dL); albumin (g/dL); FFA ($\mu\text{Eq/L}$) and liver total lipid (g/100g) and glycogen (g/100g) contents of rats fed the low (LP) and the normal (NP) protein diets at the end of the experiment.

Groups	NP	LP
Body weight gain	149.60 \pm 4.94	55.40 \pm 3.94 *
Food intake	20.50 \pm 3.12	22.90 \pm 4.50
Serum total protein	6.40 \pm 0.90	5.50 \pm 0.10 *
Serum albumin	5.80 \pm 0.11	4.70 \pm 0.13 *
Serum FFA	259.20 \pm 11.70	322.20 \pm 45.4 *
Liver lipid	2.60 \pm 0.11	7.20 \pm 0.44 *
Liver glycogen	9.10 \pm 0.48	10.80 \pm 0.42 *

Results are mean \pm standard deviation from 10 rats in the each group.

(*) Significantly in ($P < 0,05$, t-test) different from NP group.

Table III: Glucose uptake and oxidation, glycogen synthesis and lactate production ($\mu\text{mol/g.60min}$) by soleus muscle isolated from the rats fed the low (LP) and the normal (NP) protein diets.

Groups	NP	LP
Glucose uptake	1.50 \pm 0.12	1.81 \pm 0.13
Glucose oxidation	8.32 \pm 1.17	7.99 \pm 0.92
Glycogen synthesis	0.89 \pm 0.18	0.78 \pm 0.15
Lactate production	0.37 \pm 0.05	0.33 \pm 0.03

Results are mean \pm standard deviation from 10 muscle strips in each group.

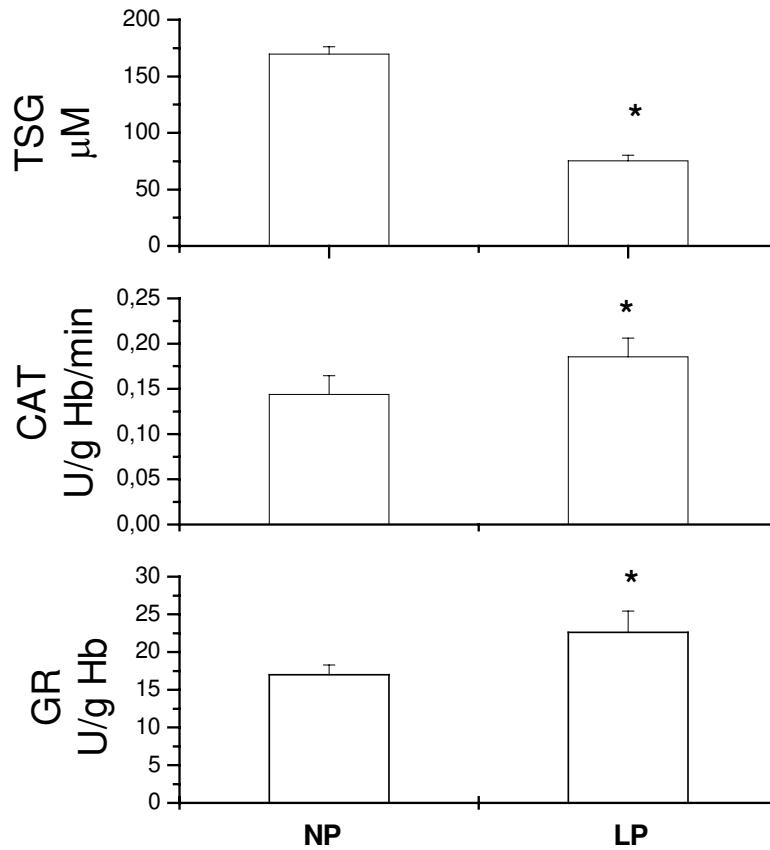


FIGURE 1 – Plasma Total Sulphydryl groups (TSG), Catalase (CAT) and Glutathione Reductase (GR) activities of rats submitted to a normal protein or low protein diet. Results expressed as mean \pm standard deviation of 10 rats for group. (*) significant difference ($P < 0,05$, test-t) in relation to NP.

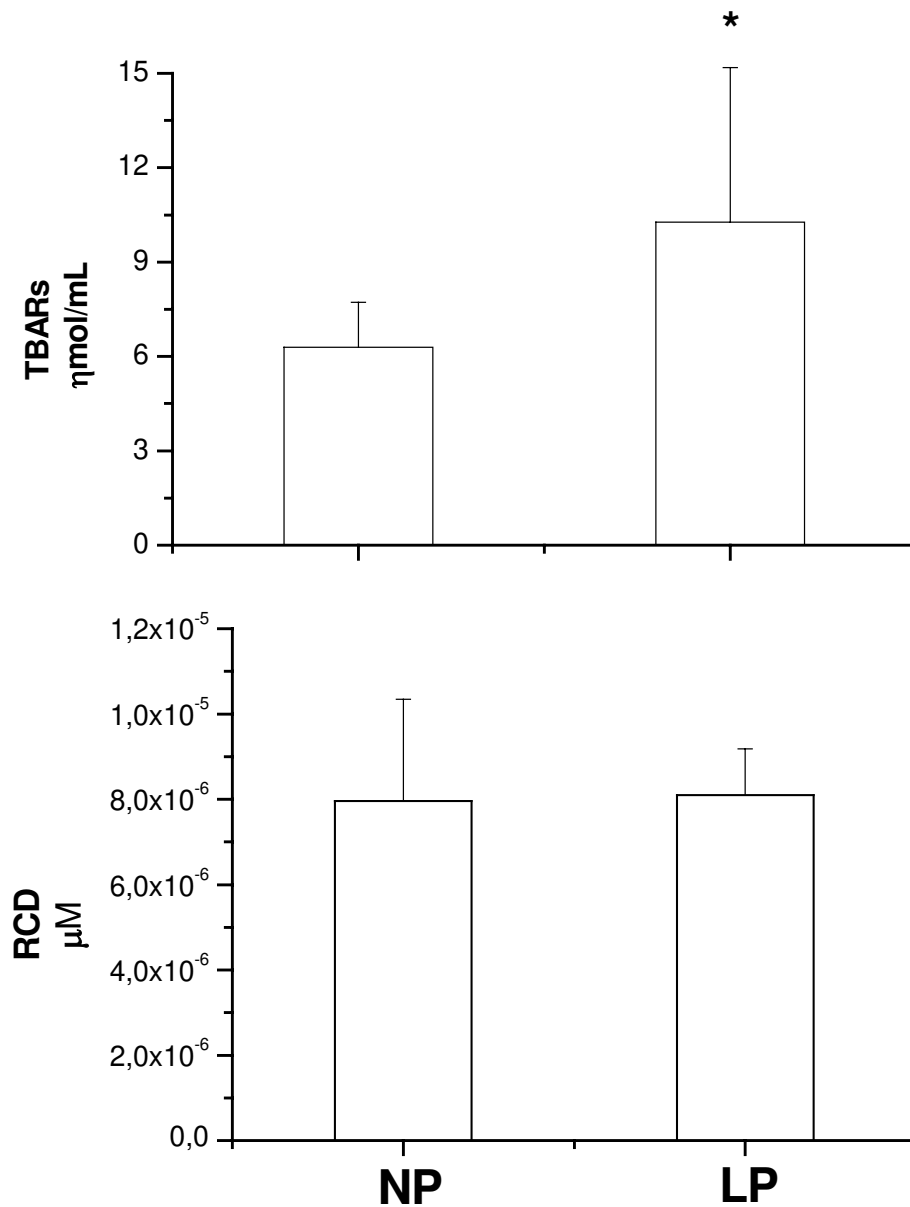


FIGURE 2 – Plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARs) and Reactive Carbonyl Derivatives (RCD) concentrations of rats submitted to a normal protein or low protein diet. Results expressed as mean \pm standard deviation of 10 rats for group. (*) Significant difference ($P < 0,05$, test-t) in relation to NP.

DISCUSSION

Low body weight gain, hypoalbuminemia, hypoproteinemia, elevated serum FFA and high liver lipid and glycogen contents as observed in our experimental rats maintained with a low protein diet are features commonly found in protein malnourished children (Torun & Chew, 1994) and experimental animals (Galdino, Almeida et al., 2000). This indicates the adequacy of the animal model of protein malnutrition used in the present work. As there was no significant difference in food intake per gram of body weight between the rats fed the normal and the low protein diet, the model represents protein deficiency and not protein-energy deficiency.

Skeletal muscle is one target tissue that can be affected by protein malnutrition. Several studies have suggested that low protein intake induces subtle effects on this tissue (Goldspink, 1966; Lopes, Russell et al., 1982; Russell, Shike et al., 1984), leading to structural changes as a significant reduction in fiber diameter (Haj, Lewis et al., 1986; Roy, Singh et al., 1972). There are also evidences that long-term exposition to protein restriction (intrauterine and post natal) may lead to increase in the first steps of the insulin signaling system (Latorraca, Reis et al., 1998) and muscle glucose metabolism and lactate production (Galdino, Almeida et al., 2000). The present data indicate that relatively short-term exposure to protein deficiency early in life did not compromise glucose uptake and oxidation as well as glycogen synthesis and lactate production by rat skeletal muscle. Despite this, we observed that plasma TBARs concentration increased significantly in the LP in relation to the NP group, suggesting a higher oxidative damage to plasma or tissue lipids in the first group as showed by others (Rana, Sodhi et al., 1996; Sodhi, Rana et al ,1996) This finding suggests a higher ROS production in LP than in NP rats, although we found no differences on the plasma RCD concentration between both groups.

The plasma TSG concentration of biological molecules, proceeding mainly from proteins and the reduced form of glutathione (GSH) are important targets for free radicals, and decreased concentrations may indicate high oxidative attack level (Faure & Lafond, 1995). It is important to remember that our LP animals had not only reduced plasma TSG but also a reduced plasma albumin and protein concentrations. Albumin is an important antioxidant, because it guarantees the bilirubin, which protects the transport of unsaturated fatty acids in blood. In addition, albumin seems to be self-sacrificing to scavenger ROS (Faure & Lafond, 1995). Fechner, Böhme

et al. (2001) showed that the amount of serum albumin was positively correlated with the protection against free radicals and that in the case of nutritional recovery, the patients' rehabilitation was faster when supplemented with albumin and glutathione.

The most important enzymatic antioxidants are superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation of the superoxide anion into H_2O_2 , which is then deactivated to H_2O by catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). GSH-Px uses GSH as a hydrogen donor whereby GSH is oxidized. The regeneration of GSH is catalyzed by glutathione reductase (GR). In previous studies Huang and Fwu (1993) and Rana, Sodhi et al. (1996) observed decreased SOD, CAT, GP and GR activities in different tissues of protein restricted animals (fed 5 to 8% casein or lactoalbumin diets) in association with increased lipid peroxidation levels. Also, Tatli, Vural et al. (2000) reported reduced red cell glutathione levels and GP activity in protein calorie malnourished (marasmic) children while SOD activity was not affected. Malondialdehyde concentration, used as an index of lipid peroxidation, was significantly higher in marasmic group compared to controls, in agreement with our results. However, in the present study, we observed an increased erythrocyte GR and CAT activities, suggesting that our protein deficient diet increased the oxidative stress level, which itself was able to up-regulate both these antioxidant enzymes, as stated by Finkel and Holbrook (2000).

The discrepancies observed between our and the previous rat studies may be, at least in part, consequence of differences in mineral diet and vitamin mix composition. In the present study, normal and low protein diets were prepared in accordance with the AIN-93G recommendations for vitamins and mineral elements contents (Reeves, Nielsen et al., 1993) whereas the other (Huang and Fwu 1993) followed the AIN-76 recommendations (American Institute Of Nutrition, 1977). The major changes in the AIN-93 mineral mix compared to AIN-76 include lowered manganese contents, changes in the form and amount of selenium and addition of ultratrace elements, which were not present in the AIN-76. In relation to the vitamin mix, the amounts of vitamins E and K are higher in AIN-93 than in AIN-76. These elements have direct participation in the regulation of the antioxidant enzyme activities (Harris, 1992). To reinforce our hypothesis, it was observed that the reduced GP activity of the marasmic children appeared in association with a decrease in serum selenium concentration (Tatli, Vural et al., 2000). Probably, the adequate dietary mineral supplies of our LP rats enabled them to up-regulate the antioxidant enzyme activities in response to increasing ROS production induced by protein malnutrition.

The case-fatality rate in protein malnutrition kwashiorkor is higher than in other forms of malnutrition (Mclaren, Shirajian et al., 1969). According to Manary, Leeuvenburg et al (2000), developing therapeutic strategies to improve the antioxidant status of populations at risk for protein malnutrition may lower the number of malnutrition-related childhood deaths. Reliable animal models of protein malnutrition may of value for the development of such therapies. The results presented here show that the animal model evaluated is adequate for the study of protein malnutrition and that the biomarkers used were able to reflect the oxidative stress level induced by this specific protein deficient diet.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva, Aline Cristina Casonato, Amanda Paula Pedroso, Luciana de Lima and Corn Product Brazil. Research supported by the Brazilian Foundations FAPESP (proc. 00/08110-0, 00/07962-2 and 02/02354-0), FUNDUNESP (proc.00154/03-DFP) and CNPq (proc. 522755/96-8).

REFERENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.*, 105: 121-126.
- American Institute of Nutrition. (1977). Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, 107: 1340-1348.
- Athens, M.; Valdez, R.; Stern, M. (1993). Effect of birth weight on future development of syndrome X in adult life. *Diabetes.*, 42(suppl. 1):61a (abs).
- Becker, K.; Leichsenring, M.; Gana, L.; Bremer, H.J.; Schirmer, R.H. (1994). Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: Results of a study in Nigeria. *Free Rad. Biol. Med.*, 18:257-263.
- Beutler, E. *Red Cell Metabolism In: A manual of biochemical methods*, 2^o ed., Grune & Stratton publishers, London, 1975.
- Campbell, T.C., Hayes, J.R. (1976). The effect of quantity and quality of dietary protein on drug metabolism. *Fed. Proc.*, 35(13): 2470-2474.

- Deneke, S.M., Lynch, B.A., Fanburg, B.L. (1985). Effect of low protein diets or feed restriction on rat lung glutathione and oxygen toxicity. *J. Nutr.*, 115: 726-732.
- Dubois, B., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Eston, Finney, R. G., S. Finney, S. Baker, And V. Baltzopoulos. (1996). Muscle tenderness and peak torque changes after downhill running following a prior bout of isokinetic eccentric exercise. *J. Sports Sci.*, 14: 291-299.
- Faure, P., Lafond, J.-L. (1995). Measurement of plasma Sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave, J.-L. Pierre (Eds.) Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, p. 237-248.
- Fechner, A.; Böhme, C.C.; Gromer, S.; Funk, M.; Schimer, R.H.; Becker, Leichsenring, K. (2001). Antioxidant status and nitric oxide in malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediat. Res.*, 49: 237-243.
- Finkel and Holbrook. (2000). *Nature*: 408:239-247.
- Galdino, R.; Almeida, C.C.S.; Luciano, E.; Mello, M.A.R. (2000). Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise-training. *Nutr. Res.*, 20:527-535.
- Golden, M.H.N. and Ramadath, D. (1987). Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc. Nutr. Soc.*, 46:53-68.
- Goldspink, G. (1966). An attempt at estimating extrafiber fluid in small skeletal muscles by a simple physical method. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Sep; 44(5):765-75.
- Haj, A.J., Lewis, S.E., Goldspink, G., D.F., Merry, B.J., Holehan, A.M. (1986). The effect of chronic and acute dietary restriction on the growth and protein turnover of fast and slow types of rat skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, A. 85(2):281-7.
- Halliwell, B. (1988). Albumin: An important extra cellular antioxidant? *Bioch. Pharmacol.*, 37:569-571.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 14S-22S.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzym.*, 186: 1-4.
- Hassiss, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.*, 6: 2675-2683

- Huang, C.J., Fwu, M.L. (1993). Degree of protein deficiency affects the extent of the depression of the antioxidant enzyme activities and the enhancement of tissue lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.*, 123: 803-810.
- Latorraca, Reis, M.Q., Reis, M.A.B.; Carneiro, E.M., Mello, M.A.R., Velloso, L.A.; Saad, M.J.; Boschero, A.C. (1998). Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin recreation and early steps of insulin action in rats. *J. Nutr.*, 128:1643-1649.
- Lopes, Russell, Shikel, J., Russell, Shikel, D.M., Whitwell, J., Jeejeebhoy, K.M. (1982). Skeletal muscle function in malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, Oct; 36(4):602-10.
- Manary, Leeuvenburg, M.J.; Leeuvenburg, C.; Heinecke, W. (2000). Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J. Pediatr.*, 137:421-4.
- Maughan, R. J., A. E. Donnelly, M. Gleeson, P. H. Whiting, K. A. Walker, And P. J. Clough. (1989). Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve*, 12: 332-336.
- Mccance, D.R.; Pettit, D.J.; Hanson R.L.; Jacobson, L.T.H.; Knowler, W.C.; Bennett, H. (1993). Low birth weight and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabet.*, 36(supl. 1):A4 (abs).
- Mclaren, A.A.; Shirajian, E.; Loshkajian, H.; Shadarevian, S. (1986). Short term prognosis in protein-calorie malnutrition. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, 80: 911-913.
- Nogueira, D. M., Strufaldi, B.; Hirata, M. H.; Abdalla, D. S. P. & Hirata, R. D. C. (1990). *Métodos em Bioquímica Clínica*, 468p.
- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J. Sports Sci.*, 15: 353-363.
- Phillips, D.Z.W.; Hrst, S.; Clarek, .N.S.; Hales, C.N.; Osmon, D.C. (1994). Fetal growth and insulin secretion in adult life. *Diabet.*, 37:592-596.
- Pélissier, M.A., Darmon, N., Desjeux, J.F., Albrecht. R. Effects of protein deficiency on lipid peroxidation in the small intestine and liver of rats. *Chem. Toxic.*, 31(1): 59-62, 1993.
- Quiroga, G.B. (1992). Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? *Free Rad. Biol. & Med.*, 13: 325-340.
- Rana, S.; Sodhi, C.P.; Metha, S.; Vaiphei, K.; Katyal, R.; Thakur, S.; Metha, S.K. (1996). Protein-energy malnutrition and oxidative injury in growing rats. *Hum. Exp. Tox.*, 15: 810-814.

- Reeves, P.G.,Nielsen, F.H., Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoe Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. *J. Nutr.*, 123:1939-1951.
- Roy, S., Singh, M., Deo, M.G., Ramalingaswami, V. (1972). Ultrastructure of skeletal muscle and peripheral nerve in experimental protein deficiency and its correlation with nerve conduction studies. *J. Neurol. Sci.*, Dec; 17(4):399-409.
- Russell, D.M.,Shike, M., Detsky, A.S, Harrison, J.E., Mcneill, K.G., Shepherd, F.A., Feld, R., Evans, W.K., Jeejeebhoy, K.N. (1984). Changes in body composition in patients with small-cell lung cancer. The effect of total parenteral nutrition as an adjunct to chemotherapy. *Ann. Intern. Med.*, Sep; 101(3):303-9.
- Sive, A.A.; Subotzky, E.F.; Malan, H.; Demster, W.S.; Heese, H.D. (1993). Red blood cell antioxidant enzyme concentration in kwashiorkor and marasmus. *Ann. Trop. Paediatr.*, 13(1): 33-8.
- Sjorgreen, B., Nordenskjoli, T., Holmgren, H., Wollerstrom, J. (1938). Bertragzur kennis des le berriythmik. *Pflugers Arch. Gesaute. Physiol. Menschen. Tiere.*, 240-247.
- Smith, I. K., T. L.Vierheller, And C. A. Thorne. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.*, 175: 408-413.
- Sodhi, C.P., Rana, S.V., Mehta, S.K., Vaidphei, K., Attri, S., Thakur, S., Mehta, S. (1996). Study of oxidative stress in sioniazid-induced hepatic injury in young rats with and without protein-energy malnutrition. *J. Biochem. Toxicol.*, 11(3): 139-46.
- Tatli, M.M; Vural, H.; Koc, A.; Kosecik, M.; Atas, A. (2000). Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. *Pedr. Int.*, 42: 289-292.
- Torun, B. & Chew, F. (1994). Protein-energy malnutrition. In Shils, M.; Olson, J.A.; shike, M. (eds) *Modern Nutrition in Health and Disease*, v.2, Philadelphia, Lea & Febiger, p. 950-976.
- Uvin, P. (1994). The state of world hunger. *Nutr. Rev.*, 52:151-161.
- Yagi, K. (1987). Lipid peroxides and human diseases. *Chem. Phys. Lip.*, 45: 337-351.
- Yokoyama, Y., J. S. Beckman, T. K. Beckman, J. K. Wheat, T. G. Cash, B. A. Freeman, And D. A. Parks. (1990). Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.*, 258: G564-G570.

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74: 139-162.

Zwart, L. L., J. H. N. Meerman, J. N. M. Commandeur, And N. P. E. Vermeulen. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 202-226.

ESTUDO 2

PRADA, F.J.A.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M.; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento de natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira de Ciências do Movimento** v. 12, n. 2, p. 29-34, 2004.

CIÊNCIA & MOVIMENTO

ARTIGO ORIGINAL

Análise da percepção de lesões em academias de ginástica de Belo Horizonte: um estudo exploratório
Analysis of injuries perception in fitness center in Belo Horizonte: an exploratory study

Comparação dos efeitos da ginástica aeróbica e da hidroginástica na composição corporal de mulheres idosas
The effects of aerobic gymnastics and water gymnastics in body composition of older women

Risco cardiovascular, aptidão física e prática de atividade física de idosos de um parque de São Paulo
Cardiovascular risk, physical activity, and physical fitness in elderly population from a park in São Paulo

Análise dos efeitos de diferentes protocolos de eletroestimulação neuromuscular através da frequência mediana
Analysis of the effects different protocols in the neuromuscular electrical stimulation through median frequency

Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio
Aerobic condition and oxidative stress in rats swim-trained at the anaerobic threshold intensity

Mecanismos neuromusculares de controle da estabilidade articular
Neuromuscular mechanisms of joint stability control

Efeitos de um programa de atividades físicas e educacionais para idosos sobre o desempenho em testes de atividades da vida diária
Effects of a program of physical and educational activities for elderly people under the performance in daily activities tests

Estabilidade: aspecto significativo na previsão do talento no basquetebol feminino
Stability: a significant aspect in foreseeing talent in female basketball

Dieta lipídica e sua relação com os níveis séricos lipídicos/lipoprotéicos em cadetes da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN)
Lipidic diet and its relationship with the lipidic/lipoproteic serum levels in cadets of Military Academy of Agulhas Negras (AMAN)

Atitudes dos professores de educação física do ensino regular com relação a alunos portadores de deficiência
Attitudes of physical education teachers from regular schools toward handicapped children

Restrição moderada de energia e dieta hiperprotéica promovem redução ponderal em atletas de elite do Karatê
Restricted energy intake and high protein diet promote body weight reduction in Karatê athlete

Frequência cardíaca na prescrição de treinamento de corredores de fundo
Heart Rate in prescription of train to long distance runners

Abordagem cinesiológica do chute no futsal e suas implicações clínicas
Kinesiologic approach of the kick in indoor soccer and your clinic implications

Hidratação pós-exercício: Recomendações e Fundamentação Científica
Hydration Post-Exercise Recommendation and Scientific Evidence

Relações entre o limiar anaeróbio, limiar anaeróbio individual e máxima fase estável de lactato em ciclistas
The relationship between anaerobic threshold, individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in cyclists

Impacto da menarca nas variáveis antropométricas e neuromotoras da aptidão física, analisado longitudinalmente
Impact of menarche on anthropometric and neuromotor variables of physical fitness, using a longitudinal approach

ARTIGO DE REVISÃO

Sob o signo de Ludens: interfaces entre brincadeira, jogo e os significados do esporte de competição
Under the sign of Ludens: interfaces between play, game, and the meanings of competition sport

PONTO DE VISTA

A história do uso político do esporte
The history of sport's political use

QUEM SABE LÊ

TOME NOTA

CIÊNCIA DO LEITOR

volume **12**

NÚMERO 2 - ABRIL/JUNHO 2004



Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio

Aerobic condition and oxidative stress in rats swim-trained at the anaerobic threshold intensity

Francisco José Andreotti Prada¹; Fabricio Azevedo Voltarelli²; Camila Aparecida Machado de Oliveira²; Cláudio Alexandre Gobatto²; Denise Vaz Macedo¹; Maria Alice Rostom de Mello²

Resumo

PRADA, F. J. A., VOLTARELLI, F. A., OLIVEIRA, C. A. M., GOBATTO, C. A., MACEDO, D. V., MELLO, M. A. R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. *R. bras. Ci e Mov.* 2004; 12(2): 29-34.

Poucos estudos associam variáveis metabólicas com a intensidade do esforço em ratos, especialmente durante exercício de natação. O presente estudo tem por objetivo analisar biomarcadores de condicionamento aeróbio e de estresse oxidativo em ratos treinados por natação na intensidade correspondente ao limiar anaeróbio (LAN). Métodos: Foram utilizados ratos adultos (90 dias) da linhagem Wistar, adaptados ao meio líquido. Primeiramente o LAN dos animais foi determinado pelo teste do lactato mínimo. Em seguida, os mesmos foram separados em 2 grupos. Controles (C) e Treinados (T = natação 1 hora/dia, 5 dias/semana, suportando sobrecarga de peso correspondente ao LAN). Após 4 semanas os animais de ambos os grupos foram submetidos a teste de esforço com carga fixa na intensidade equivalente ao LAN, para análise do lactato sanguíneo, visando inferir sobre o condicionamento aeróbio. Quarenta e oito horas depois, foram sacrificados, em repouso, para análise, no sangue, de biomarcadores de ataque oxidativo (produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico [TBARS]) e do sistema de defesa antioxidante (atividade das enzimas catalase [CAT] e glutatona redutase [GR]). Resultados: O LAN médio dos animais foi estimado na carga 4.99 ± 0.22 % do peso corporal à concentração interpolada de 7.28 ± 0.19 mmol/L de lactato sanguíneo. Durante o teste de esforço, a concentração de lactato sanguíneo foi menor (teste t, $p < 0.05$) nos ratos treinados do que nos controles. Os valores de TBARS foram maiores nos ratos Treinados que nos Controles. O inverso ocorreu com CAT e GR. Conclusões: O protocolo de treinamento utilizado mostrou-se eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais, conforme indicam as baixas concentrações de lactato sanguíneo dos ratos treinados durante o teste de esforço. Por outro lado, não desencadeou adaptações favoráveis nas atividades das enzimas antioxidantes.

PALAVRAS-CHAVE: limiar anaeróbio, lactato, condicionamento aeróbio, estresse oxidativo.

Abstract

PRADA, F. J. A., VOLTARELLI, F. A., OLIVEIRA, C. A. M., GOBATTO, C. A., MACEDO, D. V., MELLO, M. A. R. Aerobic condition and oxidative stress in rats swim-trained at the anaerobic threshold intensity. *R. bras. Ci e Mov.* 2004; 12(2): 29-34.

There are few studies in the literature associating metabolic variables and effort intensity in rats, especially during swimming exercise. The present study was designed to analyze biomarkers of aerobic condition and oxidative stress in rats submitted to swimming training at the intensity equivalent to the anaerobic threshold (AT). Methods: Adult (90 days) male wistar rats, adapted to the water, were used. First, AT was determined by the lactate minimum test. Then, the animals were separated into 2 groups: Control (C) and Trained (T = swimming, 1 h/day, 5 days/week, supporting a load equivalent to the AT). After 4 weeks, the animals from both groups were submitted to an exercise test supporting a constant load equivalent to the AT for blood lactate determination, aiming evaluation of the aerobic condition. Forty eight hours later, they were sacrificed, at rest, for the analyze of biomarkers of oxidative damage (plasma thiobarbituric acid reactive substances [TBARS]) and of the antioxidant system (blood glutathione reductase [GR] and catalase [CAT] activities). Results: Mean AT was calculated at 4.97 ± 0.22 % of b.w. load at an estimated blood lactate concentration of 7.28 ± 0.19 mmol/L. Blood lactate during the exercise test were lower (t test, $p < 0.05$) in trained than in control rats. TBARS values were higher in trained than in control rats. The opposite occurred with CAT and GR activities. Conclusions: The training protocol used was efficient in improving the aerobic condition of the animals, as indicates the low blood lactate concentrations of the trained rats during the exercise test. On the other hand, exercise training did not induce positive adaptations in the antioxidant enzyme activities.

KEYWORDS: Anaerobic threshold, lactate, aerobic condition, oxidative stress.

¹ Labex, UNICAMP, Campinas.

² Departamento de Educação Física, UNESP, Rio Claro, SP – Brasil.

Recebido: 24/06/2003

Aceite: 16/12/2003

Introdução

Durante o metabolismo celular, a maior parte do oxigênio molecular sofre completa redução à água. Contudo uma pequena parte do O_2 é convertida a produtos parcialmente reduzidos como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Essas espécies, radicalares ou não, são oxidantes potentes e podem causar danos teciduais, sendo coletivamente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROS) (7). Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (pro-vitamina A), selênio, cobre, zinco, ácido ascórbico, vitamina E e glutatona reduzida (GSR) diminuem a ação tóxica das EROS produzidas intra e extracelularmente (26).

O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases (CuZn-SOD - citosólica e extracelular, Mn-SOD - mitocondrial), catalase (heme-enzima) e glutatona peroxidase (GR/GPX - dependentes e não dependentes de selênio) para decompor, respectivamente, o ânion O_2^- , H_2O_2 e lipoperóxidos (26). A glutatona redutase (GR) é outra enzima importante nesse processo. Esta enzima, mesmo não agindo diretamente na remoção de radicais é responsável pela regeneração da glutatona em sua forma reduzida (GSH), utilizado como substrato da enzima GPX. Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROS, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Quando acontece um desbalanço entre a produção de EROS e defesa antioxidante se estabelece a situação de estresse oxidativo (7).

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. Durante os exercícios físicos, ocorrem várias reações químicas que levam à formação de EROS. Para proteger os tecidos contra os danos causados pelas EROS produzidos durante o exercício físico as enzimas antioxidantes como SOD, catalase e GPX/GR parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados. Isso ocorre principalmente em treinamentos do tipo de endurance (4; 8; 13).

Por motivos óbvios, estudos envolvendo exercício têm sido realizados com ratos, sendo o lactato sanguíneo usado para a determinação da intensidade de esforço. Recentemente, nosso grupo de pesquisa constatou que ratos sedentários, durante exercício de natação com sobrecarga fixa, apresentam máxima fase estável de lactato (MLSS), definida como a mais alta concentração de lactato durante exercício onde a entrada do substrato na corrente sanguínea iguala-se à remoção, com sobrecargas de 5 e 6% do peso corporal, à concentração sanguínea de lactato de 5,5 mMol/L (6). Em outro estudo, constatamos que existe, nesses animais, coincidência entre o MLSS e o limiar anaeróbio (LAN), definido como a carga de trabalho na qual o lactato começa a se acumular desproporcionalmente no sangue durante exercícios com cargas progressivas (25). Tais achados permitiram avaliação mais precisa da intensidade do exercício de natação realizada por ratos em diferentes circunstâncias.

Poucos são os estudos que associam variáveis metabólicas com a intensidade do esforço, especialmente durante a natação, nesses animais. O presente trabalho tem como objetivo analisar biomarcadores de condicionamento aeróbio e de estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento físico de natação na intensidade equivalente ao LAN.

Metodologia

1. Animais: Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar, com 80 dias de idades no início do experimento, que tiveram livre acesso a água e ao alimento (ração comercial para roedores) durante todo o experimento. Os procedimentos realizados, com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, Campinas, SP.
2. Adaptação ao meio líquido: Os ratos foram adaptados ao meio líquido por 2 semanas, 5 dias por semana em tanques coletivos (100 X 80 X 80 cm) contendo água rasa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 60 minutos diários. Na segunda semana, os animais portaram sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal, atada ao tórax.
3. Determinação do limiar anaeróbio (Teste do lactato mínimo): Após o período de adaptação, 10 animais tiveram o LAN determinado pelo teste do lactato mínimo, descrito originalmente para seres humanos (23) e adaptado às condições do rato (25). Esse teste baseia-se no princípio que durante teste de exercício com cargas progressivas realizadas imediatamente após uma sessão de exercício máximo, que induz hiperlactecemia, o lactato sanguíneo inicialmente declina para um valor mínimo para em seguida, aumentar novamente. Esse valor mínimo de lactato sanguíneo (LMS) indica o limiar anaeróbio (23). Inicialmente, os animais foram colocados individualmente em tanques (100 X 80 X 80cm) contendo água a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ suportando sobrecarga de 50% do peso corporal (sobrecarga utilizada para provocar hiperlactecemia) e exercitaram-se (saltos) durante 6 minutos (30 s de atividade, interrompidos por 30 s de repouso). Em seguida, foram coletadas amostras de sangue (25 μl) através de corte na extremidade distal da cauda, para a determinação da concentração do substrato. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício com cargas progressivamente maiores. A carga inicial foi de 4,5% do peso corporal, sendo acrescido de 0,5% a cada 5 minutos, até a exaustão. A cada troca de carga foi coletado amostra de sangue (25 μl) para dosagem de lactato. LMS foi determinado a partir de uma tangente zero grau a uma função "SPLINE" ajustada à curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho (25).
4. Teste de esforço com carga fixa: Esse teste foi efetuado para a verificação da ocorrência de estabilização do lactato sanguíneo durante o exercício. Uma semana após a determinação do LAN, os animais foram submetidos a uma sessão de 20 minutos de natação suportando carga equivalente ao mesmo em tanques coletivos (100 X 80 X 80cm) contendo água a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, com coleta de sangue (25 μl) a cada 5 minutos para dosagem de lactato

- (6). Durante a semana decorrida entre a determinação do LAN e o teste de esforço, todos os ratos continuaram o processo de adaptação ao meio líquido.
5. **Treinamento físico:** Decorrida uma semana do teste de esforço com carga fixa, os 10 ratos foram submetidos aos testes de lactato mínimo e ao teste de carga fixa (Grupo Treinado) iniciaram treinamento de natação suportando sobrecarga equivalente ao LAN. 1 hora por dia, 5 dias por semana, por período de 4 semanas. Os 10 animais restantes foram mantidos inativos sendo apenas submetidos ao protocolo de adaptação ao meio líquido (Grupo Controle). Ao final desse período, todos os ratos (Controles e Treinados) foram novamente submetidos ao teste de esforço com carga fixa.
 6. **Sacrifício dos animais:** Decorridas 48 horas do último teste de esforço com carga fixa, todos os animais foram sacrificados com éter etílico e logo após o sangue (cerca de 8 mL) foi coletado da veia hepática para determinação de: 1) concentração de produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), como biomarcador de ataque oxidativo; 2) atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona redutase (GR), como biomarcadores do sistema de defesa antioxidante; 3) atividade da enzima creatinaquinase (CK) como biomarcador de lesões musculares.
 7. **Atividades enzimáticas:** Os ensaios para a determinação da atividade GR foram conduzidos de acordo com Smith et al. (19) e aqueles para determinação da atividade CAT, de acordo com Aebi (1). As dosagens de CK foram executadas com auxílio do aparelho Reflotron (Böehringer Mannheim). A atividade de CK é determinada indiretamente, através de reações acopladas, seguindo a decomposição do H_2O_2 .
 8. **Produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs):** Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Os procedimentos foram realizados de acordo com Okawa et al. (11).
 9. **Lactato sanguíneo:** As concentrações de lactato no sangue total foram determinadas em analisador eletroquímico (YSI modelo 1500 SPORT).
 10. **Estatística:** Os resultados foram analisados por meio de teste-t de Student não pareado e análise de variância, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

As concentrações médias de lactato sanguíneo dos ratos frente às cargas crescentes de trabalho durante o teste de lactato mínimo acham-se na Figura 1. Como pode ser observado, a curva ajustada aos dados de lactato sanguíneo derivados do teste com cargas progressivas mostra, conforme esperado, forma de U. O LMS foi indicado pela carga na qual a curva atingiu o nadir. O LAN médio, expresso

como a carga no qual o LMS foi calculado em todos os ratos foi $4,97 \pm 0,22$ % do peso corporal enquanto que a concentração sanguínea média de lactato nessa carga foi $7,28 \pm 0,19$ mmol/L.

Figura 1 – Determinação do lactato mínimo sanguíneo (LMS) médio dos ratos (n=10) durante teste de cargas progressivas. Cada ponto indica a concentração sanguínea de lactato (mmol/L) nas ordenadas, após um “tiro” de 5 min. de exercício com os animais suportando cada carga indicada na abscissa. O LMS e a carga de trabalho correspondente foram calculados ajustando-se a curva, usando função “spline”. O nadir da curva em forma de “U” obtida indica a carga de trabalho estimada correspondente ao LMS.

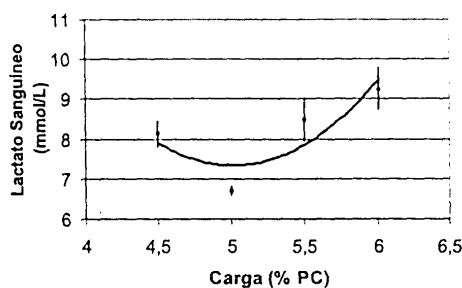
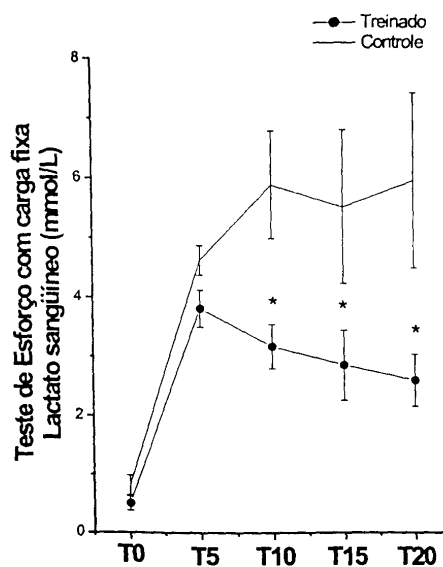


Figura 2 – Lactato sanguíneo (mmol/L) durante o segundo teste de esforço com carga fixa realizado para checar estabilização do lactato sanguíneo durante exercício de natação realizado na carga equivalente ao limiar anaeróbico (5% do peso corporal). Resultado expresso como média \pm desvio padrão de 10 ratos por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA), em relação ao grupo controle.



No primeiro teste de esforço com carga fixa realizado para verificação da estabilização do lactato sanguíneo em 10 animais durante exercício de natação por 20 minutos na carga equivalente ao LAN, o lactato estabilizou-se após 5 minutos à concentração de $5,6 \pm 1,2$ mmol/L. No segundo teste (Figura 2), o lactato sanguíneo estabilizou-se, após 5 minutos de exercício à concentração de $4,5 \pm 0,21$ mmol/L nos ratos controles e de $2,5 \pm 1,2$ mmol/L nos ratos treinados.

A Figura 3 resume os resultados referentes às atividades das enzimas GR e CAT no sangue dos animais. Houve redução significativa na atividade de ambas as enzimas no sangue dos ratos treinados em comparação aos controles. A Figura 4 mostra que houve aumento significativo das concentrações de TBARs no sangue dos ratos treinados em relação aos controles. Constatou-se, ainda, redução significativa da atividade da enzima CK no sangue dos ratos treinados (Figura 5).

Figura 3 – Atividade das enzimas Glutaciona redutase e Catalase no sangue dos animais. Resultados expresso como média \pm desvio padrão de 10 ratos por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, *Teste-t*), em relação ao grupo controle.

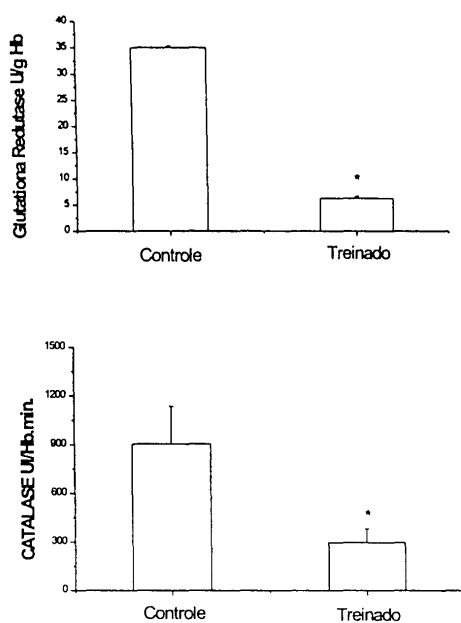
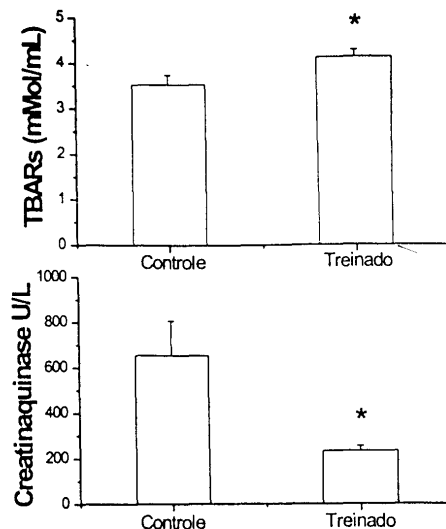


Figura 4 – TBARs e atividade da enzima Creatinaquinase no plasma dos animais. Resultados expresso como média \pm desvio padrão de 10 ratos por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, *Teste-t*), em relação ao grupo controle.



Discussão

A análise dos resultados referentes ao teste de lactato mínimo, efetuado no início do período experimental, demonstrou que nos ratos, durante exercício de natação com intensidades crescentes realizados após acidose láctica induzida por exercício máximo, as alterações de lactato sanguíneo mostram um padrão semelhante àquele descrito para seres humanos (23). Isso possibilitou cálculo da intensidade de exercício na qual o lactato sanguíneo atinge os valores mais baixos. Esta intensidade, que indica o LAN (6), foi estimada na carga de $4,97 \pm 0,22$ % do peso corporal, para o lote de ratos aqui avaliados. Esses resultados confirmam os dados anteriores de nosso grupo, obtidos com o mesmo teste aplicado a ratos sedentários (25). Por outro lado, Pillis et al. (14) verificaram que em ratos, sedentários durante corrida em esteira com intensidades crescentes, o LAN foi encontrado quando a concentração sanguínea de lactato era de aproximadamente 4,0 mmol/L. Mais recentemente, Priviero et al. (16) verificaram que a máxima fase estável de lactato durante corrida em esteira com velocidades constantes foi alcançada quando a concentração de lactato atingiu 4,0 mmol/L, ou seja, o mesmo valor obtido por Pillis et al. (14). Já resultados anteriores obtidos por nosso grupo com testes de natação com cargas constantes mostraram máxima fase estável de lactato na concentração sanguínea de 5,5 mMol/L (6).

Com os protocolos de testes empregados no presente estudo no início do experimento foi possível não só determinar o LAN como checar a ocorrência de estabilização do lactato

sangüíneo durante exercício realizado na intensidade correspondente ao mesmo. Nossos resultados apontaram estabilização do lactato sangüíneo na concentração de 5,6 mmol/L quando os animais se exercitaram no LAN, confirmando os resultados anteriores de nosso grupo (6). Tal valor, contudo, foi significativamente inferior (teste t, $p < 0,05$) àquele estimado na carga de trabalho equivalente ao LAN durante o teste de lactato mínimo.

Para avaliar a eficácia do protocolo de treinamento na melhora do condicionamento aeróbio dos animais, analisamos, ao final do experimento, a concentração de lactato sangüíneo dos animais treinados e controles durante teste de esforço, constando de sessão única de natação por 20 minutos suportando a sobrecarga fixa equivalente ao LAN determinado no início do experimento. Os valores observados nos treinados foram inferiores aos dos controles. Isso indica que o protocolo foi eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais (6). Esses resultados mostram, ainda, que os animais realizaram exercício de intensidade baixa ou moderada, uma vez que houve estabilização do lactato sangüíneo durante a realização do teste.

Embora os animais do presente estudo tenham sido mantidos com dieta balanceada e exercícios físicos moderados, houve diferença significativa em relação aos biomarcadores do ataque oxidativo, do sistema de defesa antioxidante e de lesões musculares entre ratos controles e treinados.

Peroxidação de resíduos ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios da membrana celular pode resultar em perda significativa da integridade da membrana, que é um dos efeitos mais marcantes do dano oxidativo (22), levando à geração de alcanos e aldeídos potencialmente deletérios. Infelizmente, se 4 hidroxinonenal (4-HNE) é excluído, a detecção de lesão na membrana não é diretamente mensurável. Por isso, o teste inespecífico de produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) é bastante empregado como indicador de ataque oxidativo (21). No presente estudo, TBARs apareceram significativamente elevados no sangue dos animais treinados em comparação aos controles, indicando maior ataque oxidativo nos primeiros que nos últimos.

Aumento na peroxidação lipídica tem sido relatado após o exercício (2; 9) embora nem sempre seja constatado (18; 24). O aumento na peroxidação lipídica parece ser tecido específico. Avula e Fernandes (4) constataram redução da peroxidação lipídica nos rins e nas glândulas salivares e aumento da mesma no fígado de camundongos treinados por corrida em esteira analisados em repouso, em comparação dos sedentários. Nenhuma diferença foi constatada no músculo esquelético e cardíaco entre os dois grupos. Radak et al. (17) também não verificaram qualquer diferença nos níveis de peroxidação lipídica no músculo esquelético de ratos treinados por natação e sedentários, analisados em repouso. Os níveis de pentano e etano apareceram 2 a 3 vezes mais elevados do que os valores de repouso em homogeneizados de fígado e músculo esquelético de ratos após corrida até a exaustão (5). Alessio e Goldfarb (2) constataram pequeno aumento na peroxidação tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos após exercício submáximo decorrida em esteira.

O aumento do ataque oxidativo produzido pelo exercício seria menos deletério se fosse compensado por aumento

nos mecanismos celulares de defesa antioxidante. Espécies reativas de oxigênio são removidas por uma série de enzimas, iniciando-se pela superóxido dismutase (SOD), seguida pela catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GP). A glutatona redutase (GR) é outra enzima importante no ciclo glutatona redox (26). No presente estudo observamos redução significativa na atividade das enzimas CAT e GR nos enterócitos dos ratos treinados quando comparados dos sedentários. Essa redução, provavelmente, concorreu para que os animais treinados sofressem maior ataque oxidativo que os controles, conforme inferida pelos valores sangüíneos de TBARs.

A questão do treinamento físico aumentar ou não a atividade das enzimas do sistema antioxidante permanece controversa. Enquanto alguns autores demonstraram aumento da atividade enzimática antioxidante (CAT, SOD e GP) em músculo esquelético induzida pelo treinamento físico (13; 20) outros não constataram nenhuma alteração na atividade das mesmas enzimas (2). A resposta das enzimas antioxidantes musculares parece ser dependente do ergômetro utilizado: natação (12), corrida em esteira (20) ou ocorrida em roda de atividade espontânea (18); do protocolo de exercício contínuo (2) ou intermitente (3; 20) assim como do tipo de fibra muscular (3; 15) e da espécie estudada: rato (2; 12; 20), camundongo (4) ou outros mamíferos (18).

Resultados preliminares de outra série de experimentos realizada em nosso laboratório (dados não publicados) indicam que o prolongamento do período de treinamento por natação na intensidade do LAN de 4 para 8 semanas possa reduzir os indicadores de ataque oxidativo bem como elevar a atividade das enzimas antioxidantes.

Existem também, estudos mostrando atividade ligeiramente reduzida de enzimas antioxidantes (CAT) em músculo de ratos treinados por natação e sacrificados em repouso e atividade significativamente mais elevada em ratos treinados do que em sedentários imediatamente após exercício agudo (2). Isso sugere que em certas circunstâncias, o exercício agudo possa modular a expressão das adaptações induzidas pelo treinamento em relação à atividade das enzimas antioxidantes. Infelizmente, no presente estudo não foi realizado exercício agudo.

A enzima creatinaquinase (CK) tem importância no diagnóstico de doenças do músculo esquelético, como distrofia muscular e do músculo cardíaco, na suspeita de infarto do miocárdio. Ela apresenta, em condições normais, atividade elevada no músculo cardíaco, no músculo esquelético e, em menor escala nos pulmões, rins, fígado e enterócitos. Sua função é transferir, de maneira reversível, a união rica em energia, da fosfocreatina ao difosfato de adenosina (ADP), formando creatina e trifosfato de adenosina. No caso de lesões teciduais, a enzima é liberada no líquido extracelular, aumentando sua atividade no soro. Uma condição fisiológica que eleva a atividade da CK no soro é o exercício físico (10). Um dado bastante interessante obtido no presente estudo foi à redução da atividade CK no sangue dos ratos treinados em comparação com os controles, sugerindo redução das lesões musculares nos primeiros.

Conclusão

O conjunto dos nossos resultados sugere que o treinamento por exercício de natação na intensidade equivalente ao LAN durante 4 semanas foi eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais e reduzir as lesões musculares. Por outro lado, o referido protocolo de treinamento não desencadeou adaptações favoráveis nas atividades das enzimas antioxidantes, nas condições do presente estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o excelente apoio técnico de Clarice Y. Sibuya, José Roberto da Silva, Eduardo Custodio e Daniel Bosso.

Referências Bibliográficas

- Aebi H. Catalase. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-126.
- Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *Journal Applied Physiology*. 1980; 64:1333-1336.
- Atalay MI, Seene T, Amñen O, Sen CK. Skeletal muscle and heart antioxidant differences in response to sprint training. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1996; 158:129-134.
- Avula RCP, Fernandes G. Modulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in salivary gland and other tissue in mice by moderate treadmill exercise. *Aging*. 1999; 11(4):246-252.
- Gee DL, Tappel AL. The effect of exhaustive exercise on expired pentane as a measure of in vivo lipid peroxidation in rat. *Life Science*. 1981; 28:2445-2449.
- Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry Physiology*. 2001; 130A:21-27.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd Oxford: Clarendon Press. 1989.
- Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1993; 25: 210-212.
- Miyazaki H, Oh-Ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshiaki HAS, Haga SA, *et al*. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European Journal Physiology*. 2001; 84(1-2):1-6.
- Moura RA, Wada CS, Purenju A, Almeida TV. *Enzimologia Clínica*. In: Moura RA *et al*. Técnicas de laboratório, Livraria Ateneu, 3^o ed, São Paulo, 1987, p. 103-122.
- Okawa H, Nobuko O, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analalytical Biochemistry* 95: 351-358, 1979.
- Pereira B, Rosa LFBC, Safi DA, Medeiros HG, Curi R, Bechara EJJH. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiology and Behavior*. 1994; 56(5):1095-1099.
- Pereira B, Costa Rosa LFBC, Bechara EJJH, Curi R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. *Ciencia e Cultura*. 1996; 48:43-46.
- Pillis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Uscilka H, Nazar K, Wortyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comparative Biochemistry Physiology*. 1993; 106A:285-289.
- Powers SKI, Criswell D, Lawer J, Ji LL, Martin D, Herb RA, *et al*. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Regulatory Integrate and Comparative Physiology*. 1994; 266: R375-R380.
- Privero FB, Zanescio A, Teixeira CE, Nogueira TCA, Antunes E, Nucci G, *et al*. Maximal lactate steady state determination in sedentary rats submitted to treadmill running. *Anais do XXIV Simpósio Internacional de Ciências do Esporte*. p.85. São Paulo, AP, 2001.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, *et al*. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 27(1/2): 69-74.
- Selman C, McLaren JS, Collins Ali Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DNA oxidative damage: Effects of short-term voluntary where running. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. 2002; 401:255-261.
- Smith FR, Goodaman DS, Zaklama MS, Gabr MK, Maraghy SE, Patwardhan VN. Serum vitamin A, retinol-binding protein, and prealbumin concentration in protein-calorie malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1973; 26: 973-981.
- Smolka M, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira Da Silva L, *et al*. HSP-72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000; 279:E1539-45.
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal catalyzed oxidation of protein. *Journal Biological Chemistry*. 1991; 266: 2005-2008.
- Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings*. 1973; 32:1870-1874.
- Tegtbur U, Busse MW, Brawman KR. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1993; 25:620-624.
- Viinikka L, Vuori J, Ylikorkala O. Lipid peroxides prostocycdein and thromboxane AZ in miners during acute exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1984; 16:275-277.
- Voltarelli FA; Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002; 35 (11): 1389-1394.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 1994; 74: 139-161.

ESTUDO 3

PRADA, F.J.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Oxidative stress during rehabilitation from protein malnutrition associated or not exercise in rats. **Nutrition Research** (enviado para publicação no periódico Nutrition Research).

Nutrition Research Submission

Página 1 de

De "Nutrition Research" <ntr@purdue.edu >
Assunto Nutrition Research Submission
Data Qui, Janeiro 6, 2005 17:11
Para tmail.com,mellomar@rc.unesp.br,balasinska@alpha.sggw.waw.pl,bhlee@krikt.re.kr

Dear Authors ,

Thank you for your interest in Nutrition Research. Your manuscripts have been received by the editorial office. I will assign reference numbers and contact you by early next week regarding your manuscript.

If you already received confirmation for your manuscript, please disregard this e-mail. We have had some e-mails returned and I wanted to make certain everyone was informed upon receipt of their manuscripts.

Sincerely,
Angela

*Angela Ranalli
Managing Editor
Nutrition Research
ntr@purdue.edu
765-496-7849*

[Baixar como um arquivo](#)

OXIDATIVE STRESS DURING REHABILITATION FROM PROTEIN MALNUTRITION ASSOCIATED OR NOT TO EXERCISE IN RATS.

¹Prada, F.J.A., ¹Macedo, D.V., ²Mello, M.A.R. ¹Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), UNICAMP – Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil; ²Depto. de Educação Física, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil.

ABSTRACT

This study was designed to evaluate biomarkers of oxidative stress in rats submitted or not to exercise during recovery from protein malnutrition. Male Wistar rats fed a low protein (LP = 6%) diet after weaning (30 days) to 90 day-old and then a normal protein (NP = 17%) diet until 120 day-old were separated into two groups: sedentary (S) and exercise trained (E = swimming 1h/day, 5 days/week, with from the 90th to the 120th day of life). Rats fed a normal protein diet and were used as controls. Our results have shown that physical exercise had beneficial effects on body weight gain and that the metabolic responses to exercise training were not impaired by early protein malnutrition. Erythrocytes catalase and glutathione reductase (biomarkers of the antioxidant system) were significantly reduced in all groups in comparison to the sedentary control group, but the plasma concentration of TBARs (biomarkers of the oxidative damage) was also lower in the recovered rats, suggesting that the improvement in body growth and muscle glucose metabolism after nutritional rehabilitation with physical exercise could be related with a decrease in the oxidative stress level by training.

Key words: protein malnutrition, nutritional recovery, exercise, oxidative stress.

INTRODUCTION

Exercise training has many physiological effects consistent with improved health. Several studies have shown that exercise is associated with increased oxidative capacity of skeletal muscle [1] and muscle growth [2], improvement in cardiac function [3], enhanced bone mineralization [4] and increased life span [5]. Physical exercise may also be a beneficial part of rehabilitation from malnutrition. Torun & Viteri reported that physically active rats grew more in length and weight than the inactive counterparts [6]. In the same communication, these authors reported that 24-48 months old children under treatment for severe protein calorie malnutrition were assigned to either an active group (stimulated, but not forced to participate in games and activities that involved walking uphill, climbing a ramp running and climbing stars) or a control group (with ad libitum pattern of physical activity and rest observed in child care and nutrition rehabilitation centers). The active group grew more in length and lean body mass than the control group [6].

On the other hand, increased energy demand during physical exercise induces increase in oxygen supply to active tissues [7]. This results in an increased production of reactive oxygen species (ROS), mainly due to elevated rates of mitochondrial respiratory chain [8, 7]. When ROS production overcomes the capacity of the body antioxidant system, an oxidative stress occurs and many cellular constituents such as lipids, proteins and DNA may suffer oxidation due to ROS attack, compromising cell function. It has also been suggested that kwashiorkor, a severe form of protein malnutrition, may itself be a product of the radical initiated tissue damage in the malnourished child [9, 10]. The present study was designed to evaluate biomarkers of oxidative

stress, nutritional status and muscle metabolism in rats submitted or not to exercise during a month recovery from protein malnutrition.

METHODS AND MATERIALS

Animals and diets

Young (30 days) male Wistar rats were fed isocaloric (3948 kcal/kg) normal (NP= 17%) or low (LP=6%) protein diets ad libitum. Table I shows the composition of both diets. The normal protein diet follows the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendations for rodents [11]. Detailed mineral and vitamin mix composition were described elsewhere [11].

Insert Table 1

Experimental groups

Control

- Normal protein sedentary [NP-S]: rats fed the normal protein diet for 90 days and kept sedentary (n = 15);
- Normal protein exercised [NP-E]: rats fed the normal protein diet for 90 day and submitted to swimming on hour per day, 5 days a week, supporting a load equivalent to 5% of body weight during the last 30 days (n = 10);

Recovered

- Low protein/normal protein sedentary [LP/NP-S]: rats fed the low protein diet for 60 days and the normal protein diet for 30 days , kept sedentary (n = 15);
- Low protein/normal protein exercised [LP/NP-E]: rats fed the low protein diet for 60 days and the normal protein diet for 30 days associated with swimming exercise (n = 10).

Tissue Samples

At the 90th days of experiment, rats from all groups were anesthetized without previous fasting with an intraperitoneal injection of chloral hydrate 10% (wt/vol), 0.3 mL for each 100 g of body weight for tissue and blood extraction. They were used in experiments as soon as anesthesia was assured by loss of pedal and corneal reflexes. Heparinized blood samples were obtained from portal vein, for preparation of a hemolysate and for plasma separation. After blood collection, the animals were sacrificed for other biological material obtainment. At the 60th day of treatment rats of the NP-S and of the LP/NP-S groups were sacrificed for biochemical analysis related to nutritional status evaluation.

Soleus Muscle Glucose Metabolism

For measurements of muscle glucose uptake and oxidation, glycogen synthesis and lactate production, longitudinal soleus muscle strips (25-30 mg) were placed in glass vials containing d [U14 C] glucose, (0.25 μ Ci/ μ mol glucose), [3H]-2-deoxyglucose (0.1 μ Ci/ μ mol glucose) and non

radioactive glucose to a final concentration of 5.5 mmol/L plus insulin (100miU/mL). Glucose uptake and oxidation as well as glycogen synthesis and lactate production were determined as previously described [12].

Enzyme Assays

The hemolysate was diluted 1:20 in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0 before assaying. All enzyme assays were performed in triplicate, according to the following methods. Catalase (CAT) activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm for 30 sec after the addition of 10 mM hydrogen peroxide [13]. One unit of catalase activity is the amount of enzyme present that decomposes 1 μM H_2O_2 /min at 25°C [13]. The erythrocyte CAT activity was expressed as IU/g Hb.min. Glutathione Reductase (GR) activity was measured in a 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM EDTA, 0.1 mM NADPH and 0.75 mM DTNB. GSSG (1mM) was added into the cuvette to start the reaction and the absorbance was followed at 412 nm for 3 min [14]. The erythrocyte GR activity was expressed as IU/g Hb [15].

Plasma Reactive Carbonyl Derivatives

We measured the plasma reactive carbonyl derivatives (RCD) by carbonyl reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) using a spectrophotometric method [16]. Plasma (200 μL) was mixed with 1 mL H_2O and 2 mL of 20% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 1.000 g for 10 min. The pellet was resuspended in 1 mL of 10 mM DNPH and incubated for 60 min at 37°C.

For blank it was used 1 mL of 1M HCl instead DNPH. Subsequently, 1mL of 20% TCA was added and the sample was centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was washed with 1:1 ethanol/ethyl acetate solution and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was mixed with 1 mL of 6 M guanidine (diluted in 20 mM H₂PO₄, pH 2.3). Finally the sample was incubated for 40 min at 37°C. The absorbance was measured at 380 nm. The results were expressed as μmols RCD/mL of plasma The analyses were done in triplicate and the mean was used to statistical analysis.

Plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substances

Plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARs) were measured by fluorimetry, according YAGI [17]. Plasma (20 μL) was mixed with 4.0 mL of N/12 H₂SO₄. Phosphotungstic acid 10% (0.5 mL) was added to this mixture, which was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The pellet was mixed with 2.0 mL of N/12 H₂SO₄ and 0.3 mL of 10% phosphotungstic acid and centrifuged again at 3000 rpm for 10 min. Distilled (4.0 mL) water and 1.0 mL of thiobarbituric acid (TBA) (1:1 0.67 % TBA aqueous solution and glacial acetic acid) suspended the pellet. This mixture was heated at 95°C for 60 min. After cooling, 5.0 mL of *n*-butanol was added, and the mixture, shaken vigorously. After centrifugation at 3,000 rpm for 15 min, the *n*-butanol layer was measured at 553 nm with excitation at 515 nm.

Nutritional Status Evaluation

For nutritional status evaluation, plasma glucose, total protein, albumin and free fatty acids (FFA) levels were measured by colorimetric methods, as described by Nogueira et al. [18]. Liver lipids were extracted with ethanol [12] and measured by a colorimetric method [18].

Statistical Analysis:

The results were expressed as means \pm SD for the number of rats (n) indicated. When working with muscle strips, n refers to the number of strips. The data were analyzed by Student's unpaired t-test or ANOVA, where adequate, and $P < 0.05$ values indicated significant difference.

RESULTS

Effects of the low protein diet on nutritional status

Table II shows the results on plasma markers of nutritional status after 60 days feeding the LP diet compared to NP group. The LP group showed significantly reduced body weight gain, hypoproteinemia, hypoglycemia, hypoalbuminemia, high circulating FFA and liver lipid levels. Despite of the low body weight gain observed in the LP animals, no difference in food intake was seen between LP and NP.

Insert Table 2

Effects of one month of re-feeding associated of not to exercise on nutritional status

Table III shows the data for both groups (LP and NP) after 30 days of recovery feeding a NP diet (LP/NP-S and NP-S). We observed almost no difference in proteinemia, albuminemia, circulating FFA levels and liver lipid content between the groups. Body weight gain was twice when compared the group one month before (LP group, Table II), but significantly lower in the protein restricted (LP/NP-S) than in normal protein (NP-S) group.

Table III also shows that there is a significant increase in body weight gain in LP/NP-E compared to LP/NP-S group. The results are completely different for NP groups, with a significant decrease in body weight gain in NP-E compared to NP-S group despite the food intake was higher in trained (NP-E and LP/NP-E) than in sedentary (NP-S and LP/NP-S) groups of rats. Plasma glucose was elevated in the LP/NP-E group in relation to the control (NP-S and NP-E) and LP/NP-S animals. Plasma albumin was lower in both exercised groups, significantly for the LP/NP-E group. On the other hand, proteinemia, circulating FFA levels and liver lipid content did not change with exercise even in LP/NP-E group when compared to the others.

Insert Table 3

Effects of low protein diet and re-feeding associated or not to exercise on skeletal muscle glucose metabolism.

Skeletal muscle glucose uptake and glycogen synthesis were significantly higher only in trained (NP-E and LP/NP-E) rat isolated muscle than in the corresponding sedentary (NP-S and LP/NP-S) ones. However, the LP/NP-E group exhibits a significant lower glycogen synthesis when compared to NP-E group. No difference in glucose oxidation was observed among the four groups. The LP/NP-E rats showed higher muscle lactate production than LP/NP-S rats (Figure 1)

Insert Figure 1

Effects of low protein diet and re-feeding associated or not to exercise on biomarkers of oxidative damage and antioxidant system

Figure 2 shows the effects of re-feeding on oxidative stress markers. Plasma TBARs concentrations were higher in the NP-E and in LP/NP-E than in the corresponding sedentary groups, but it appeared significantly decreased in the recovered (LP/NP-S) rats compared to the corresponding control rats (NP-S) (Figure 2A). Plasma RCD concentrations were significantly increased only in the exercised control rats (NP-E) compared to the other groups (Figure 2B). These data indicate that the NP-E group was submitted to a higher stress level than the other groups.

Insert Figure 2 A and B

Figure 3 show that erythrocyte CAT and GR activities were significantly reduced in all experimental groups (NP-E, LP/NP-S and LP/NP-E) in comparison to the NP-S group.

Insert Figure 3 A and B

DISCUSSION

The rats fed the LP diet exhibited features typical of protein malnutrition such as low body weight gain, hypoglycemia, hypoalbuminemia, high plasma free fatty acid and high lipid levels [19]. The results presented here have shown that after one month of recovery with a normal protein diet these metabolic alterations were reversed. We also have shown that daily food intake and body weight gain were improved when nutritional recovery was associated to physical exercise. These results corroborate the hypothesis that physical exercise has a beneficial effect on body growth during nutritional recovery [6].

The increase in muscular work induces several biochemical reactions essential to muscle growth. Physical training has the ability to revert the alterations in mitochondrial protein induced by catabolic states in rat vastolateral and gastrocnemius muscle [20]. These aspects may be related to growth hormone (GH) levels. GH has many biological effects on body growth affecting protein, carbohydrate and lipid metabolism and stimulating cartilage and bone growth. It has been already demonstrated that administration of GH restores body weight and length in protein deficient young rats [21]. GH levels can be influenced by physical activity, with tendency to elevation especially in exercises above the lactate threshold [22].

In the present study, physical training improved glucose uptake by skeletal muscle both in control (NP-E) and recovered (LP/NP-E) rats. This is not surprising, since physical exercise is known to improve glucose tolerance and sensitivity to insulin [23, 24]. Glucose transport into skeletal muscle is acutely regulated by both insulin and by contractile activity [25], through the translocation of a glucose transporter isoform, the GLUT-4 [26]. The capacity for glucose transport is associated with the muscle content of GLUT-4 protein [25, 26] and both insulin stimulated glucose transport [25, 27] and GLUT-4 protein [27, 28, 29] are increased in the exercise trained skeletal muscle. Despite the increased glucose uptake of skeletal muscle in LP/NP-E rats and normal uptake in LP/NP-S rats, blood glucose concentration was elevated in both recovered groups, when compared to their control counterparts. This may be indicative of insulin resistance in tissues other than skeletal muscle, induced by the early protein restriction.

Besides increased glucose uptake, other skeletal muscle adaptations to aerobic training, concerning glucose metabolism are present as an increased glycogen synthesis [29, 30] and improved lactate release from muscle to blood through an increased plasma membrane transport system [31]. In the present study we observed both increased muscle glycogen synthesis and increased lactate release to the culture medium in the skeletal muscle isolated from trained rats (NP-E and LP/NP-E). Taken together, these results indicate that protein restriction early in life did not impair muscle glucose metabolism responses to exercise training. Even more, protein restriction seemed to accentuate lactate release from the trained skeletal muscle.

Peroxidation of unsaturated fatty acid residues of phospholipids in cell membranes might result in significant loss in membrane integrity, which is one of the most striking effects of oxidative damage [32], leading to generation of potentially harmful aldehydes and alkanes that reacts with thiobarbituric acid. Therefore, the nonspecific test of thiobarbituric acid reactive

substances (TBARs) is very often applied to assess the degree of oxidative stress [32]. In addition, oxidative modification of amino acids has significant effects on cellular functions as oxidatively modified proteins lose their physiological activity and tend to be very sensitive to proteolytic degradation [33]. Oxidative modifications of amino acids residues include transformation of amino acid residues such as proline, arginine and lysine to reactive carbonyl derivatives (RCD) and links have been established between the degree of RCD accumulation and a variety of physiopathological conditions [34].

Our results have shown that plasma TBARs concentration decreased significantly in the protein restricted recovered groups (LP/NP-S) in relation to the corresponding control group (NP-S). This suggest a low oxidative damage to plasma or tissue lipids in the first group, which could result from a lower ROS production or a higher removal capacity in protein restricted than in control rats. This apparent protection of the recovered animals could be better explained by an efficient plasma antioxidant defense, reflected in this study by a decrease in the plasma albumin concentrations than by an increase in efficiency in the enzymatic antioxidant system, as the enzymes GR and CAT are significantly decreased in this group (LP/NP-S) compared to control group (NP-S).

Exercise trained rats (NP-E and LP/NP-E) showed increase in plasma TBARs concentrations when compared to their sedentary counterparts, indicating that training leads to an increase in the oxidative stress level, apparently higher for control trained rats (NP-E).

Single bouts of exercise may lead to increase in the content of TBARs [37] and RCD [38]. Aerobic exercise training, in turn may reduce TBARs [37] and RCD [39] after single bouts of exercise, but may be ineffective in changing significantly these biomarkers of oxidative damage at rest [40, 39]. These discrepancies between our and previous results [40, 39] concerning the

effects of exercise training on biomarkers of oxidative damage measured of rest could be attributed to differences in the swimming training protocol performed by the rats.

In summary, the results presented here suggest that the improvement in body growth and muscle glucose metabolism after nutritional rehabilitation with physical exercise may be related with a decrease in the oxidative stress level, although the enzymatic antioxidant activity was not affected at least after four weeks of training.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva, Aline Cristina Casonato, Amanda Paula Pedroso, Luciana de Lima and Corn Product Brazil. Research supported by the Brazilian Foundations FAPESP (proc. 00/08110-0, 00/07962-2 and 02/02354-0), FUNDUNESP (proc.00154/03-DFP) and CNPq (proc. 522755/96-8).

REFERENCES

1. Pels ALL, White TP, Block WS. Effects of exercise training on plasma lipid and lipoproteins in rats. *J Appl Physiol* 1985; 58:612-618.
2. Watt PW, Kelly FJ, Goldspink DF, Goldspink O. Exercise induced morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat. *J Appl Physiol* 1982; 53:114-1151.
3. Perez AC, Oliveira ACC, Estevez E, Molina AJ, Prieto JG, Alvarez AI. Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats. *Comp Bioch Physiol Part C* 2003; 134:199-206.
4. Baker KO, Griminger P. Long term effects of activity and calcium and phosphorus intake on bones and kidneys of female rats. *J Nutr* 1983; 113:2111-2121.
5. Goodrick CL. Effects of long term voluntary exercise on male and female Wistar rats. In: Longevity, body weight and metabolic rats. *Gerontology* 1980; 26:22-33.
6. Torun B, Viteri FE. Influence of exercise on linear growth. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48(1): S186-190.
7. Sen CK. Exercise-induced oxidative stress and antioxidant nutrients. In: Nutrition in Sports - The Encyclopaedia of Sports Medicine. 2001. V. 7, cap. 22.
8. Sjödin B, Wesling HE, Apple S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 1990; 10: 236-254.
9. Golden MHN, Ramdath D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc of the Nut Soc.* 1987; 46: 53-68.
10. Manary MJ, Leeuwburgh C, Heinecke JW. Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Ped.* 2000; 137(3):421-424.

11. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.
12. Prada FJA, Macedo DV, Mello, MAR (2003). Evaluation of a protein deficient diet in rats through blood oxidative stress biomarkers. *Res Communi Mol Pathol Pharmacol.* (in press)
13. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; 105: 121-126.
14. Smith I K, T L Vierheller, And C A Thorne. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988; 175: 408-413.
15. Beutler E. Red Cell Metabolism In: A manual of biochemical methods, 2^o ed., Grune & Stratton publishers, London, 1975.
16. Eston Finney, RG, S Finney, S Baker, And V Baltzopoulos. Muscle tenderness and peak torque changes after downhill running following a prior bout of isokinetic eccentric exercise. *J Sports Sci* 1996; 14: 291-299.
17. Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lip* 1996; 45: 337-351.
18. Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DSP & Hirata RDC. Métodos de bioquímica clínica., São Paulo, PANCAST, 1990.
19. Torun B. & Chew F. Protein-energy malnutrition. In Shils, M.; Olson, J.A.; shike, M. (eds) *Modern Nutrition in Health and Disease*, v.2, Philadelphia: Lea & Febiger., 1994. p. 950-976.
20. Midaoui AE, Tancrede G, Nadeau A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism: Clin And Exper* 1996; 45:810-816.
21. Muaku GM, Thissen JP, Gerard G, Katelslegers JM, Maiter A. Post natal catch-up growth induced by growth hormone and insulin-growth factor-1 in rats with intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. *Pediatr Res* 1997; 42:370-377.

22. Felsing NE, Brasel JA, Cooper DM. Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:157-162.
23. Dela F. Diminished arginine stimulated insulin secretion in trained man. *J Appl Physiol* 1990; 69:261-264.
24. Nagasawa J, Sato Y, Ishiko T. Effect of training and detraining on in vivo insulin sensitivity. *Int J Sports Medicine* 1990; 11:107-110.
25. Hendriksen EJ, Stump CS, Trinth TT, Beaty SD. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996; 80:1540-1546.
26. Ezaki O. Regulatory elements in insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241:E1-6.
27. Bonen A, Clune PA, Tan MH. Chronic exercise increases insulin binding in muscles but not liver. *Am J Physiol* 1986; 251:E193-E203.
28. Rodnick KJ, Hendriksen EJ, James DE, Holloszy JD. Exercise training, glucose transporters and glucose transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1992; 262:C9-C14.
29. Houmard JA, Hickey MS, Tyndall GL, Gavigan KE, Dohm L. Seven days of exercise increase GLUT-4 protein content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1995; 79:1936-1938.
30. Bagby GJ, Green HJ, Katsuta S, Gollnick PD. Glycogen depletion in exercising rats infused with glucose, lactate, or pyruvate. *J Appl Physiol* 1978; 45:425-9.
31. Pilegaard H, Juel C, Wibrand F. Lactate transport studied in giant sarcolemmal vesicles from rats: effects of training. *Am J Physiol* 1993; 264:E156-E160.
32. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 1973; 32: 1870-1874, 1973.

33. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J Biol Chem* 1991; 266:2005-2008.
34. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257:1220-1224.
35. Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaidphei K, Attri S, Thakur S, Mehta S. Study of oxidative stress in ionized-induced hepatic injury in young rats with and without protein-energy malnutrition. *J Biochem Toxicol*, 1996; 11(3): 139-46.
36. Rana S, Sodhi CP, Metha S, Vaiphei K, Katyal R, Thakur S, Metha SK. Protein-energy malnutrition and oxidative injury in growing rats. *Hum Exp Tox* 1996; 15: 810-814.
37. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol* 1988; 64: 1333-1336.
38. Radák Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in living of rats. *Pfluger Arch* 1998; 173:439-441.
39. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:69-74.
40. Pereira B, Costa-Rosa LFB, Safi DA, Medeiros MHG, Curi R, Bechara EJJ. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiol. Behav* 1994; 56(5):1095-1099.
41. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 14S-22S.

Table 1: Diet composition (g/kg).

Components	Normal protein (AIN-93)*	Low protein
Casein (84% protein)	202	71.5
Cornstarch	397	480
Dextrinized cornstarch	130.5	159
Sucrose	100	121
Soybean oil	70	70
L-cystine	3	1
choline chloridrate	2.5	2.5
mineral mix (AIN-93)	35	35
vitamin mix (AIN-93)	10	10
Fiber (mycrocellulose)	50	50

*Reeves et al [11]

Table 2 - Body weight gain (g), food intake (g/100g body weight), plasma glucose (mg/dL), plasma protein, plasma albumin (g/dL), plasma FFA (μ Eq/L) and liver lipid levels after 60 days of malnutrition

Groups	NP	LP
Body weight gain	149.6 \pm 4.94	55.4 \pm 3.94 ^a
Food intake	20.5 \pm 3.12	22.9 \pm 4.50
Plasma glucose	122 \pm 5.0	100 \pm 4.2 ^a
Plasma total protein	6.4 \pm 0.9	5.5 \pm 0.10 ^a
Plasma albumin	5.8 \pm 0.11	4.7 \pm 0.13 ^a
Plasma FFA	259.2 \pm 11.7	322.2 \pm 45.4 ^a
Liver lipid	2.6 \pm 0.11	7.2 \pm 0.44 ^a

Results are mean \pm SD from 5 rats in the each group, except for body weight gain and food intake where n = 15.

NP = Normal protein diet, LP = Low protein diet

(^a) significantly from NP ($P < 0.05$, t-test).

Tabela 3 – Body weight gain (g), food intake (g/100g body weight), plasma glucose (mg/dL), plasma protein (g/dL), plasma albumin (g/dL), plasma FFA ($\mu\text{Eq/L}$) and liver lipid (mg/100mg) levels after 30 days of malnutrition and nutritional recovery associated or not exercise for 30 days.

Groups	NP-S	NP-E	LP/NP-S	LP/NP-E
Body weight gain	199.5 \pm 4.04	146,9 \pm 6,77 ^a	106.8 \pm 3.24 ^{ac}	116.9 \pm 4.87 ^{ac}
Food Intake	18.1 \pm 4.5	22.1 \pm 5.0 ^a	21.7 \pm 4.7	25.0 \pm 4.1 ^b
Plasma glucose	111.2 \pm 4.0	128.1 \pm 10.3	138.1 \pm 6.7 ^a	152.5 \pm 1.8 ^{ac}
Plasma protein	6.93 \pm 0.10	7.57 \pm 0.53	6.96 \pm 0.12	6.89 \pm 0.05
Plasma albumin	4.45 \pm 0.10	4.14 \pm 0.13	4.61 \pm 0.14 ^c	4.08 \pm 0.09 ^b
Plasma FFA	283.33 \pm 72.79	284.44 \pm 12.95	266.66 \pm 30.63	244.44 \pm 19.87
Liver lipid levels	4.04 \pm 0.21	3.93 \pm 0.17	4.22 \pm 0.24	3.87 \pm 0.18

Results are mean \pm S.D. from 10 animals per group.

(^a) Significant differences in comparison to the NP-S rats ($P < 0.05$, ANOVA).

(^b) Significant differences in comparison to the LP/NP-S rats ($P < 0.05$, ANOVA).

(^c) Significant differences in comparison to the NP-E rats ($P < 0.05$, ANOVA).

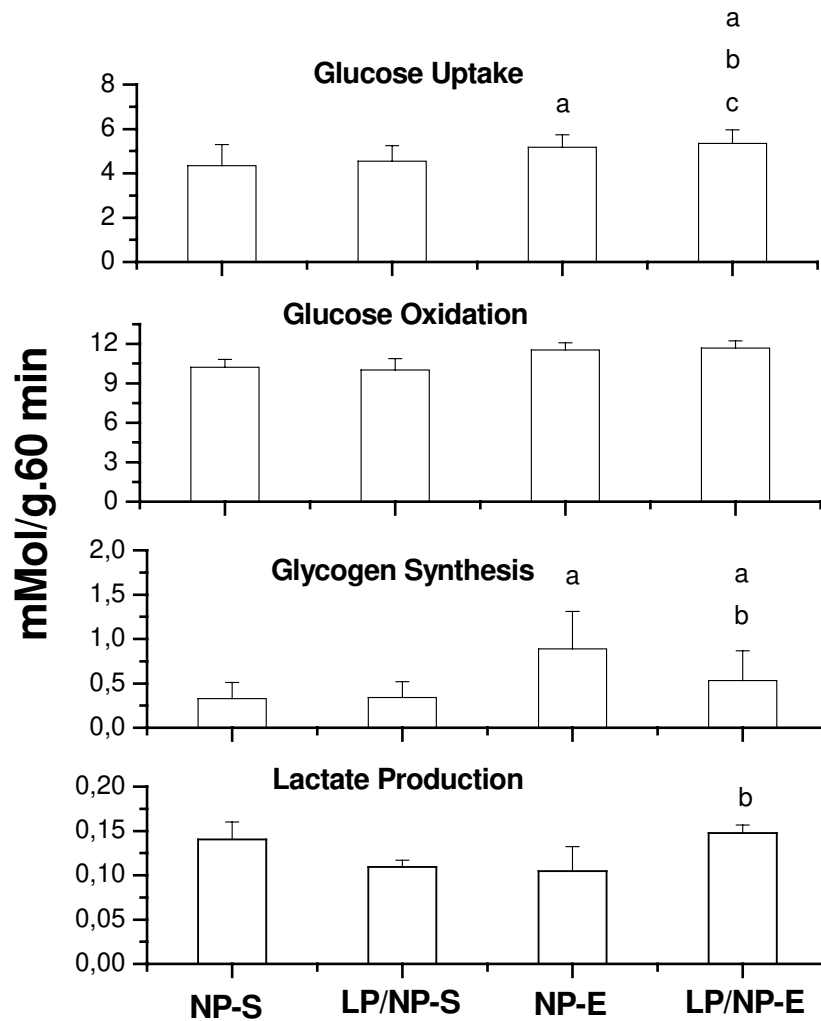


Figure 1 – Skeletal muscle glucose uptake, glucose oxidation, glycogen synthesis and lactate production in soleus muscle after 60 days of protein restriction followed by nutritional recovery associated or not to exercise for 30 days. Results are mean \pm S.D. of the 10 muscles strips per group.

(^a) Significant differences ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison to the NP-S rats.

(^b) Significant differences ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison to the LP/NP-S rats.

(^c) Significant differences ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison to the NP-E rats.

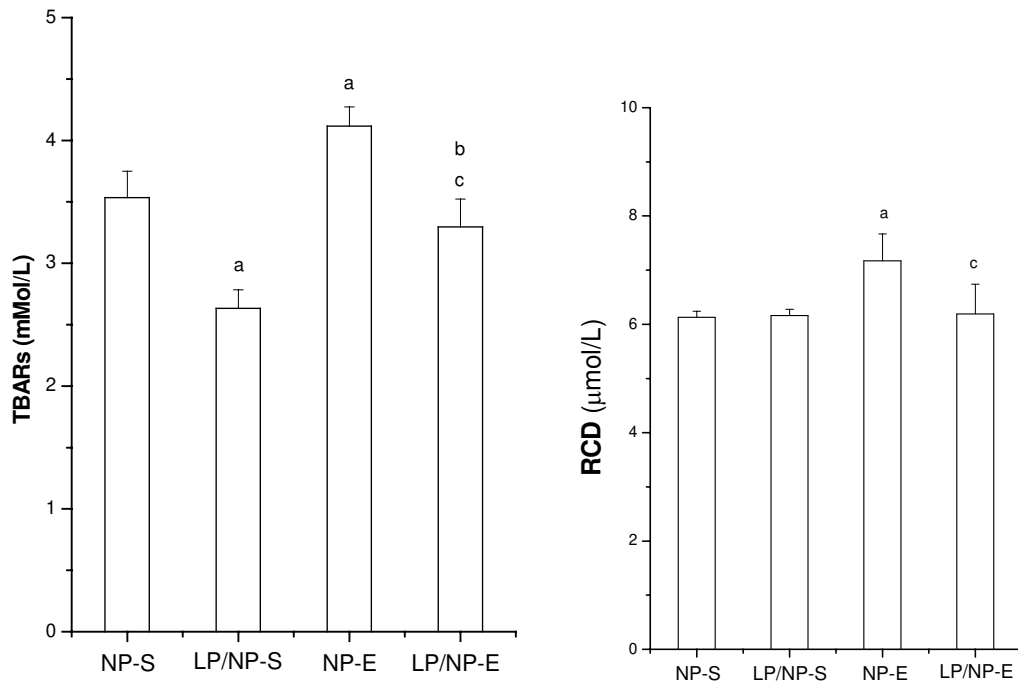


Figure 2 – Plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) and Reactive Carbonyl Derivative (RCD) after 60 days of protein restriction followed by nutritional recovery associated or not to exercise for 30 days. Results are mean \pm S.D. of the 10 animals per group.

^(a) Significant differences ($P < 0,05$, ANOVA) in comparison to the NP-S rats.

^(b) Significant differences ($P < 0,05$, ANOVA) in comparison to the LP/NP-S rats.

^(c) Significant differences ($P < 0,05$, ANOVA) in comparison to the NP-E rats.

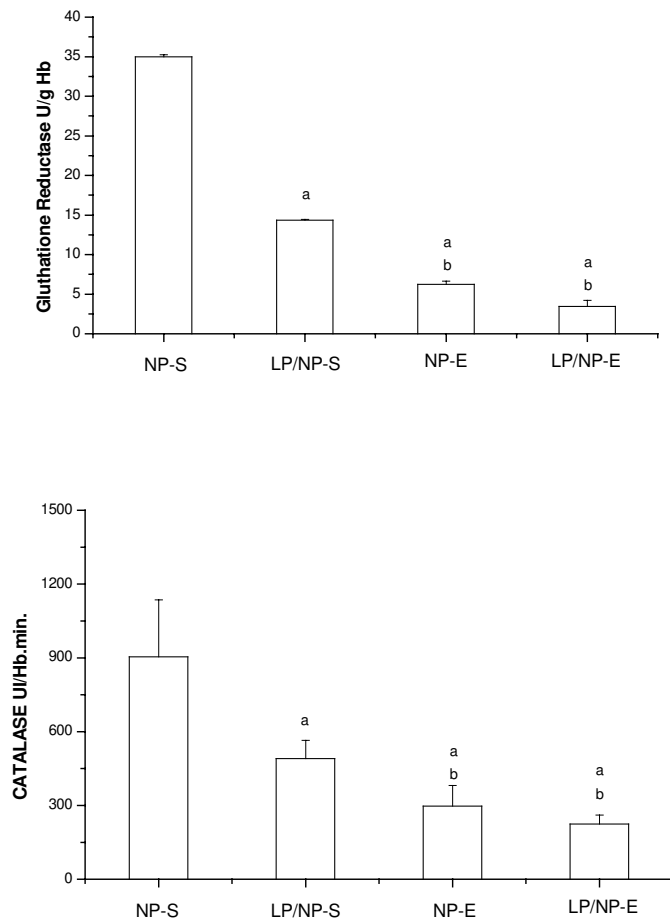


Figure 3 – Blood Glutathione Reductase and Catalase activity after 60 days of protein restriction followed by nutritional recovery associated or not to exercise for 30 days. Results are mean \pm S.D. of the 10 animals per group.

(^a) Significant differences ($P < 0,05$, ANOVA) in comparison to the NP-S rats.

(^b) Significant differences ($P < 0,05$, ANOVA) in comparison to the LP/NP-S rats.

ESTUDO 4

PRADA, F.J.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Exercise mode, swimming vs running, body growth and oxidative stress in young protein restricted rats. (a ser submetido à publicação no periódico Free Radical Biology and Medicine)

EXERCISE MODE, SWIMMING VS RUNNING, BODY GROWTH AND OXIDATIVE STRESS IN YOUNG PROTEIN RESTRICTED RATS.

Francisco J. A. Prada¹, Maria Alice Rostom de Mello², Denise Vaz Macedo¹,

¹Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

²Departamento de Educação Física, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva, and Corn Product Brazil. Research supported by the Brazilian Foundations FAPESP (proc. 00/08110-0, 00/07962-2 and 02/02354-0), FUNDUNESP (proc.00154/03-DFP) and CNPq (proc. 522755/96-8).

EXERCISE MODE, SWIMMING VS RUNNING, BODY GROWTH AND OXIDATIVE STRESS IN YOUNG PROTEIN RESTRICTED RATS.

ABSTRACT

The present study was designed to investigate the influence of two different exercise mode upon body growth, lipid peroxide content (thiobarbituric acid reactive substance [TBARs] amount) and antioxidant enzyme protection (catalase [CAT] and glutathione reductase [GR] activities) in blood of rats recovering from protein malnutrition. Young (28 days) male Wistar rats were fed a low (6%) protein (LP) diet for 60 days followed by a normal (17%) protein (NP) diet for 30 days, associated or not (I) to swimming (S = 60 min./day, 5 days/week, with an overload fo 5% of body weight) or treadmill running (R = 60 min./day, 5 days/week, at 25 m/min.) exercise. Rats always fed the NP diet were used as controls. Protein restricted exercise trained (HP/NP-S and HP/NP-R) rats showed higher body weight gain than their sedentary counterparts (HP/NP-I). Control rats both swim (NP-S) and run (NP-R) trained showed increased in the amount of TBARs in plasma compared to the sedentary group (NP-I). No difference was observed in plasma TBARs among the protein restricted (HP/NP) groups. This difference in lipid peroxidation between control and protein restricted rats can not be explained by differences observed in the antioxidant enzyme difense evaluated, since both control and protein restricted rats showed a decrease in blood CAT in response to swimming and running training. Furthermore, protein restricted and control swim trained rats reduced also blood GR. These results suggest that physical training, independently of exercise mode, accelerated body growth of protein restricted rats, probably without increasing the presence of reactive oxygen species.

Key Words: Protein malnutrition, exercise, oxidative stress, recovery.

INTRODUCTION

Malnutrition is one of the devastating nutritional problems affecting children in most underdeveloped countries (1). Clinically, protein-energy malnutrition (PEM) can be divided into the major forms: 1) Marasmus, which is characterized by severe deficit of body mass; 2) Kwashiorkor, an edematous form of protein malnutrition; 3) and Marasmic-Kwashiorkor (2). PEM has substantial effects on the vulnerability of individuals to oxidative stress (3; 4; 5) as well as to other toxicological insults (6). It has been suggested that kwashiorkor may be a product of free radical initiated tissue damage in the malnourished child (7; 8; 9).

Physical training, in turn, has many physiological effects consistent with improved health. Rodent studies have demonstrated that exercise training is associated with increased oxidative capacity of skeletal muscle (10) and muscle growth (11), improvement in cardiac function (12), enhanced bone mineralization (13) and increase in life span (14). Physical exercise may also be a beneficial part of rehabilitation from PEM. TORUN and VITERI (15) reported that 24 – 48 months old children, under treatment for severe PEM, were assigned to either an active group, stimulated to participate in games and activities that involved walking uphill, climbing a ramp or climbing stairs; or a control group with ad libitum pattern of physical activity and rest observed in child care and nutrition rehabilitation centers. The active group grew more in length and lean body mass than the control group. On the other hand the high energy demand during physical exercise induces increase in oxygen supply to active tissues. This results in an increased production rates of mitochondrial respiration (16).

There are few animal experimental data on the effects of physical exercise during rehabilitation from PEM on ROS production and body antioxidant capacity. The present study was designed to evaluate the effects of two different modes of exercise (swimming and running) upon body growth and lipid peroxide content as well as on antioxidant enzymes activity in blood of rats recovering from protein malnutrition.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diets

Young (28 days) male Wistar rats (n = 60) were assigned at random to two groups and fed isocaloric (3948 kcal/kg) normal (NP = 17%) or low (LP = 6%) protein diets ad libitum. Table 1 shows the composition of both diets. The NP diet follows the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendations for rodents (17). Detailed mineral and vitamin mix composition is described in REEVES et al (17). All experimental procedures with the animals were approved by the Committee for Animals use in Research of Biological Institute at UNICAMP.

Groups

The rats were subdivided into 6 groups, according to diet and physical exercise mode, as follows:

Control Animals

Normal protein sedentary [NP-I]: Fed the normal protein diet for 90 days and kept “inactive” (n = 14);

Normal protein swimming [NP-S]: Fed the normal protein diet for 90 days and submitted to swimming 60 min per day, 5 days a week, supporting a load equivalent to 5 % of body weight in a pool filled with water at 31 ± 1 °C during the last 30 days (n = 8). This exercise protocol was selected because in previous studies we demonstrated that it corresponds to moderate, aerobic exercise training to rats (18);

Normal protein treadmill running [NP-R]: Fed the normal protein diet for 90 days and submitted to treadmill running, 60 min per day, 5 days a week, at 25 m/min, grade - 3° during the last 30 days (n = 8). This exercise protocol also represents moderate aerobic exercise training for rats (19).

Low protein/normal protein sedentary (LP/NP-I): Fed the low protein diet for 60 days and the normal protein diet for 30 days, kept “inactive” (n = 14).

Low protein/normal protein swimming [LP/NP-S]:Fed the low protein diet for 60 days and the normal protein diet for 30 days (n = 8) associated with swimming exercise.

Low protein/normal protein treadmill running [LP/NP-R]:Fed the low protein diet for 60 days and the normal protein diet for 30 days (n = 8), associated with treadmill running exercise.

Adaptation to the Ergometer

In the three weeks that the proceeded exercise training, the rats were adaptive to the ergometer. The rats assigned to the treadmill running exercise, followed the protocol outlined in table 1 to proceed. For the rats assigned to the swimming exercise, the adaptation consisted of keeping the animal in shallow water at 31 ± 1 °C, for 60 min, 5 days a week, supporting an overload of 5 % of body weight. The purpose of adaptation was reducing stress effects.

Table 1 – Adaptation protocol of the animals to the wake rolling:

Continous		
Weeks	Velocity (m/min)	Time (min)
1°	15	20
2°	20	30
3°	22,5	45
4° (start training)	25	60

Fitness Test

During last week of the experiments, rats from the NP-I (n = 4), NP-S (n = 8), HP/NP-I (n = 4) and HP/NP-S (n = 8) groups were submitted to a 20 min swimming session, supporting an overload of 5% of body weight. Rats from the NP-I (n = 4), NP-R (n = 8), NP/NP-I (n = 4) and HP/NP-R (n = 8) were submitted to a 20 min treadmill running session at 25 m/min, -3° grade. In both tests, blood samples were collected

each 5 min from a cut in the tail HP for lactate determination in an electrochemical analyzer (YSL 2300 STAT, Yellow Spring Inc., USA).

Blood Samples

Forty eight hours after the last exercise training session, all animals were anesthetized, without previous fasting, with an intraperitoneal injection of chloral hydrate 10 % (wt/vol), 0.3 ml for each 100 g of body weight for blood and tissue extraction. They were used in experiments as soon as anesthesia was assured by loss of pedal and corneal reflexes. Heparinized blood samples were obtained from portal vein at the end of the experimental period. The whole blood was centrifuged for 15 min. at 3000 rpm and 250 μ L plasma were withdrawn and stored at -80°C until analyses for thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), biomarkers of oxidative attack. Erythrocytes were washed three times in 0.9 % NaCl. Washed erythrocytes were lysed 1:1 with distilled water and stored at -80°C until analyzed for catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities, as biomarkers of the antioxidant system. Non-heparinized blood samples were also obtained for serum protein, albumin and free fatty acid (FFA) determinations (20). Liver samples were taken for glycogen (21) and lipid (20) evaluations. Serum glucose, total protein albumin, and FFA as well as liver total lipids and glycogen contents, were also measured in 6 rats of each sedentary group (NP-I and LP-I) sacrificed after 60 days of diet treatment.

Enzyme Assays

The hemolysate diluted 1:20 in phosphate buffer (pH 7,0) before assaying. All enzyme assays were performed in triplicate, according to the following methods. Catalase (CAT) activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm for 30 sec after the addition of 10 mM hydrogen peroxide (22). One unit of catalase activity is the amount of enzyme present that decomposes 1 μM H_2O_2 /min at 25°C (22). The erythrocyte CAT activity was

expressed as IU/g Hb/min. Glutathione Reductase (GR). Activity was measured in a 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM EDTA, 0.1 mM NADPH and 0.75 mM DTNB. 1mM GSSG was added into the cuvette to start the reaction and the absorbance was followed at 412 nm for 3 min (26). The erythrocyte GR activity was expressed as IU/g Hb (27).

Plasma Thiobarbituric Acid reactive Substances (TBARs) determination

The TBARs level in plasma was measured by fluorimetry, according YAGI (25). Plasma (20 μ L) was mixed with 4.0 mL of N/12 H₂SO₄. Phosphotungstic acid 10 % (0.5 mL) was added and mixed to this solution, which was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The pellet was mixed with 2.0 mL of N/12 H₂SO₄ and 0.3 mL of 10% phosphotungstic acid and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Distilled water (4.0 mL) and 1.0 mL of thiobarbituric acid (TBA) (1:1 0.67 % TBA aqueous solution and glacial acetic acid) suspended the pellet. This mixture was heated at 95°C for 60 min. After cooling, 5.0 mL of *n*-butanol, was added and the mixture was shaken vigorously. After centrifugation at 3000 rpm for 15 min, the *n*-butanol layer was measured at 553 nm with excitation at 515 nm.

Statistical Analysis

The data are presented as means \pm SD for all treatment groups. Statistical tests employed were student t test and analysis of variance, where appropriate. Significance level was set at 5 % in all cases.

RESULTS

Effects of the Low Protein Diet on Nutritional Status

After 60 days, the LP rats, showed reduced body weight gain, low serum total protein, and albumin, high serum FFA and liver lipid levels. Despite of the low body weight gain observed in the LP animal, no difference in food intake was observed between LP and NP rats (Table 3).

Effect of Exercise Training on Blood Lactate during the Fitness Test

Blood lactate concentrations during the swimming test are summarized on Figure 1A whereas blood lactate concentrations during the treadmill running test are shown on Figure 1B. Blood lactate during the exercise tests were always lower in trained rats in comparison with the sedentary ones, independently of diet or exercise mode.

Effect of Refeeding Associated or not to Exercise on Nutritional Status

After 30 days refeeding with the NP diet, no difference in serum total protein, albumin and serum FFA levels and liver lipid content was observed between the rats initially fed the LP diet (LP/NP-I, LP/NP-S and LP/NP-R) and those always fed the NP diet (NP-I, NP-S and LP/NP-R). Body weight gain was always lower in “recovered” rats (HP/NP-I, HP/NP-S and HP/NP-R) than in controls (NP-I, NP-S and NP-R). Also, body weight gain appeared elevated in exercised “recovered” rats (HP/NP-S and HP/NP-R) in relation to the sedentary ones (HP/NP-I) (Table 4).

Effects of Refeeding Associated or not to Exercise Training on Lipid Peroxidation

Plasma TBARs levels appeared significantly decreased in the “recovered” animals (HP/NP-I, HP/NP-S and HP/NP-R) compared to the corresponding controls

(NP-I, NP-S and NP-R). On the other hand, plasma TBARs were higher in control trained (NP-S and NP-R) in relation to the control sedentary (NP-I) rats.

Effect of Refeeding Associated or not to Exercise Training on Blood Antioxidant Protection.

Blood CAT activity was reduced in all experimental groups (NP-S, NP-R, HP/NP-I, HP/NP-S and HP/NP-R) when compared to the sedentary controls (NP-I). Blood CAT activity also appeared reduced in “recovered” trained rats (HP/NP-S and HP/NP-R) in relation to the sedentary (HP/NP-I) ones. Blood GR activity was reduced in both control (NP-S) and “recovered” (HP/NP-S) rats submitted to swimming exercise-training in relation to the sedentary counter parts (NP-I and HP/NP-I).

DISCUSSION

Reduced body weight gain, low serum total protein and albumin, elevated serum FFA concentration and high liver lipid content, as observed in our experimental rats fed 60 days the low protein diet, are features commonly found in protein malnourished children (2) and experimental animals (26, 27).

When animals are fed diets with a very low protein content, they may restrict their food intake and because progressively wasted (28). After 60 days or diet treatment, food intake was similar in the two groups or rats studied. Compared to the to the normal protein diet; the protein deficient diet allows the assert in that rats on this diet suffered from protein malnutrition and not from energy malnutrition.

In recovery, the biochemical alterations observed in serum and liver of the formerly protein restricted rats were reversed. Also, body weight gain was significantly improved when nutritional recovery proceeded associated to physical exercise, indepently of exercise mode. Both lipid peroxidation (TBARs amount) and antioxidant protection (CAT and GR activities) appeared decreased in blood of protein restricted animals recovered in presence or in absence of physical exercise

Since it is often assumed that, during a constant load exercised, the aerobic/anaerobic transition is demarcated by the higher intensity at which blood lactate does not increase beyond an initial transient (29), we checked for blood lactate stabilization during acute exercise sessions, to assure that the rats were in fact submitted to aerobic exercise protocols. At the end of the last week of experiments, we measured blood lactate during a 20 min swimming (supporting a load of 5 % of body weight) or running (at 25 m/min) exercise session (fitness test). During the exercise sessions, all rats showed an initial increase in blood lactate concentrations. After this, they were able to keep a stable blood lactate concentration during both the swimming and the running exercise sessions. These data confirm the aerobic nature of both exercise protocols. The results also show that both training protocols led to a reduction in blood lactate accumulation during acute exercise. This indicates the efficiency of the swimming and the running training protocols, since it is known that aerobic training reduces blood lactate during exercise both in man (30) and rats (18).

It has previously been reported that physical training stimulates body growth in both eutrophic (31; 32) and protein deficient (33; 34; 27) animals. Exercise had a minimal effect on bone growth in run-trained rats but stimulated significantly bone development in swim-trained in young rats (32). The increase in physical activity induces several biochemical factors essential to body growth. These responses may be related to growth hormone (GH) stimulation (35).

GH has many biological effects on body growth, affecting protein, carbohydrate and lipid metabolism and stimulating muscle, cartilage and bone growth. The effects on bone and cartilage growth as well as on protein metabolism depend on an interaction between GH and insulin like growth factors – IGF-I and IGF-II. Protein-restricted animals are insulin deficient (27) and insulin deficient rats may present low GH levels (36, 37). MUAKU et al. (38) had already reported that administration of exogenous GH or IGF-I restore body weight and length of young protein deficient rats. Both GH (39) and IGF-I (40) can be influenced by exercise, with tendencies to elevation. Other adaptations elicited by exercise training also modulate body growth, since in previous studies, our group demonstrated that insulin deficient rats submitted to physical training (swimming)

recovered tibia epiphysial growth (41) and total protein as well as protein/DNA ration in the gastrocnemius muscle (42) even in absence of increased GH levels.

After the observation that both swimming and running exercise training had beneficial effects on body growth and that the metabolic responses to exercise training were not impaired by early protein restriction, we evaluated the influence of swimming and running exercise training during nutritional rehabilitation on lipid peroxidation and enzyme antioxidant protection in blood. The TBARs assay was used to evaluate the extent of lipid peroxidation associated to swimming and running training. Our results show that both swimming and running exercise training increased in a similar way the amount of TBARs in blood of control rats (NP-S and NP-R) in relation to the sedentary counter parts (NP-I), indicating a high oxidative damage to plasma or tissue lipids in the exercise trained groups. These data suggest a high ROS presence in exercise trained than in sedentary control (NP) independently of exercise mode.

Single bouts of exercise may lead to increases in lipid peroxide content (43) in different rat tissues. Aerobic training, in turn, may reduce tissue lipid peroxide content after single bouts of exercise (43) but may be the ineffective in changing then significantly at rest (44, 43). The discrepancies between our results and those previously reported in the literature may be consequence of differences in the exercise training protocols. In PEREIRA et al. (44) study, the training protocol consisted in swimming 60 min per day, 5 days a week, at 30°C, as well as in ours. However, the training period lasted 8 week, while, in our study it lasted 4 weeks. In ALESSIO & GOLDFARB'S (43) study, the training protocol consisted of running in a treadmill 60 min per day, 5 days a week, for 18 weeks. The speed and the grade were increased each week and by week 10, the animals were running at a speed of 35 m/min up a 15% grade. In the present study, the running training protocol lasted 4 weeks (7 weeks, if the 3 week adaptation period is included). At the end of the experiment, the rats were running at a speed of 25 m/min. A 4 week period of swimming or running training, despite of improving body growth and aerobic condition, may be a too short period to elicit the expected beneficial effects on lipid peroxide content.

The recovered animals (HP/NP) in turn, did not show any increase in the amount of TBARs in blood in response either for swimming not to running training. This suggests a lower ROS presence in protein restricted than in control trained animals.

Exacerbated cellular generation triggered by any physiological or pathological condition is known to be counteracted by an intricate network of chemical and enzymatic antioxidant differences. When ROS production overcomes the capacities of the body antioxidant system, oxidative stress occurs. ROS are removed by a series of enzymes, igniting by superoxide desmutase (SOD), followed by catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GP). Glutathione reductase (GR) is another important enzyme of the redox cycle (45). The set of enzyme activities described in the present study was designed to assess in whether the apparent “protection” of the “recovered” (HP/NP) rats against oxidative stress could be attributed to an increase in the antioxidant enzyme defenses. The results indicate that this is not the case, since both control (NP-S and NP-R) and recovered (HP/NP-S and HP/NP-R), trained rats showed a decreased in blood CAT activity in relation to the equivalent sedentary group. Furthermore, recovered rats submitted to swimming (HP/NP-S) reduced also blood GR activity. Although interesting, these data must be seen with care, since only few biomarkers where analyzed to assess the balance of oxidative damage/antioxidant defenses. Probably, the analysis of greater set of oxy-radical production biomarkers and antioxidant agents in required for a better picture of the oxidative stress status of protein deficient exercise trained rats.

In conclusion, exercise training, independently of mode, improved body weight gain and the aerobic condition of young rats during recovery from protein malnutrition. On the other hand, exercise training increased lipid peroxidation and decrease the antioxidant enzyme defense of control rats. Protein restricted animals, seemed less affected by lipid peroxidation associated to swimming and running exercise training.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio, José Roberto R. da Silva, and Corn Product Brazil. Research supported by the Brazilian Foundations FAPESP (proc. 00/08110-0, 00/07962-2 and 02/02354-0), FUNDUNESP (proc.00154/03-DFP) and CNPq (proc. 522755/96-8).

REFERENCES

- 1 - Uvin, P. The state of world hunger. *Nutr. Reviews*. 1994, 52(5): 151-161.
- 2 - Torun, B. & Chew, F. Protein-energy malnutrition. In Shils, M.; Olson, J.A.; shike, M. (eds) *Modern Nutrition in Health and Disease*, v.2, Philadelphia: Lea & Febiger., 1994. p. 950-976.
- 3 - Denecke, S.M., Lynch, B.A., Fanburg, B.L. Effect of low protein diets or feed restriction on rat lung glutathione and oxygen toxicity. *J. Nutr.*1985, 115: 726-732.
- 4 - Pélissier, M.A., Darmon, N., Desjeux, J.F., Albrecht. R. Effects of protein deficiency on lipid peroxidation in the small intestine and liver of rats. *Chem. Toxic.* 1993, 31(1): 59-62.
- 5 - Becker, K.; Leichsenring, M.; Gana, L.; Bremer, H.J.; Schirmer, R.H. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: Results of a study in Nigeria. *Free Rad. Biol. Med.* 1994, 18:257-263.
- 6 - Campbell, T.C., Hayes, J.R. The effect of quantity and quality of dietary protein on drug metabolism. *Fed. Proc.* 1976, 35(13): 2470-2474.
- 7 - Golden, M.H.N.; Ramdath, D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc of the Nut Soc.* 1987; 46: 53-68.
- 8 - Manary, M.J.; Leeuwenburgh, C.; Heinecke, J.W. Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Ped.* 2000; 137(3):421-424.
- 9 - Flechner, A.; Böhme, C.C.; Gromer, S.; Funk, M. Schirmer, R.H.; Becker, K. Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatric Research.* 2001, 49(2):237-243.
- 10 - Pels, A.L.L.; White, T.P.; Block, W.S. Effects of exercise training on plasma lipid and lipoproteins in rats. *J Appl Physiol* 1985; 58:612-618.
- 11 - Watt, P.W., Kelly, F.J., Goldspink, D.F., Goldspink, O. Exercise induced morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat. *J Appl Physiol* 1982; 53:114-1151.
- 12 – Penpargkul, S. & Scheuer, J. The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J. Clin. Invest.* 1970, 49:1859-1868.

- 13 - Baker, K.O.; Griminger, P. Long term effects of activity and calcium and phosphorus intake on bones and kidneys of female rats. *J Nutr* 1983; 113:2111-2121.
- 14 - Goodrick, C.L. Effects of long term voluntary exercise on male and female Wistar rats. In: Goodrick, C.L. editor. Longevity, body weight and metabolic rats. *Gerontology* 1980; 26:22-33.
- 15 - Torun, B., Viteri, F.E. Influence of exercise on linear growth. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48(1): S186-190.
- 16 - Sen, C.K. Exercise-induced oxidative stress and antioxidant nutrients. In: Maughan R J, editor. *Nutrition in Sports - The Encyclopaedia of Sports Medicine*. 2001. V. 7, cap. 22.
- 17 - Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, 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 AIN-76A. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.
- 18 - Gobatto, C.A.; Mello, M.A.R.; Sibuya, C.Y.; Azevedo, J.R.M.; Santos, L.A.; Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol.* 2001;130A:21-27.
- 19 - Pillis, W.; Zarzeczny, R.; Langfort, J.; Kaciuba-Uscilko, H.; Nazar, K.; Wortyna, J. Anaerobic threshold in rats. *Com. P. biochm. Physiol.* 1993, 106^A:285-289.
- 20 - Nogueira, D.M.; Strufaldi, B.; Hirata, M.H.; Abdalla, D.S.P. & Hirata, R.D.C. *Métodos de bioquímica clínica.*, São Paulo, PANCAST, 1990.
- 21 - Dubois, B., Gilles, K. A. , Hamilton, J.K., Rebers, P.A. Colorimetric method for determination of sugar and relate substances. ***Anal. Chem.***, 28: 350-356, 1956.
- 22 - Aebi, H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- 23 - Smith, I.K.; Vierheller, T.L.; Thorne, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988; 175: 408-413.
- 24 - Beutler, E. Red Cell Metabolism In: *A manual of biochemical methods*, 2° ed., Grune & Stratton publishers, London, 1975.
- 25 - Yagi, K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lip* 1996; 45: 337-351.

- 26 - Weikove, C.; Weikove, E.; Timme, A.; Pinstone, B.L. Pancretic islets of malnourished rats. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1977, 101:266-269.
- 27 - Galdino, R.S.; Almeida, C.C.S.; Luciano, E.; Mello, M.A.R. Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise-training. *Nutr.Res.* 2000, 20(4): 527-35.
- 28 - Mccance, D.R.; Pettit, D.J.; Hanson R.L.; Jacobson, L.T.H.; Knowler, W.C.; Bennett, H. Low birth weight and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetologia.* 1993, 36(supl. 1):A4 (abs).
- 29 - Mader, A.; Heck, H. A theory of metabolism origin of the anaerobic threshold. *International Journal of Sports Medicine* 1986; 7:45-65.
- 30 - Donovan, C.M.; Pagnassoti, M.J. Enhanced efficiency of lactate removal after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 1990; 68:1053-1058.
- 31 - Borer, K.T. Characteristics of growth-inducing exercise. *Physiol. & Behav.* 1980, 24:713-20.
- 32 - Synder, A. The effects of exercise mode, swimming vs running upon bone growth in rapidly growing female rat. *Mechanisms of Aging and Development.* 1992;66(1):59-69.
- 33 - Sakamoto, K.; Grunewald, K.K. Beneficial effects on growth of rats during intermittent fasting. *J. Nutr.* 1987;117:390-395.
- 34 - Orton, R.; Hume, I.D.; Leng, R.A. Effects of levels of dietary protein and exercise on growth rates of horses. *Equine. Ver. J.* 1985;17:381-385.
- 35 - Borer, K.T. & Kelch, R. Increased serum growth hormone and somatic growth in exercising adult hamsters. *Am. J. Physiol.* 1978;234(6):E611-E616.
- 36 - Tannembaum, G.S. Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology.* 1981;76-82.
- 37 - Olchovsky, D. Pituitary insulin growth factor-z content and gene expression in the streptozotocin-diabetes rat: evidence for tissue specific regulation. *Endocrinology.* 1991;128:923-92.
- 38 - Muaku, G.M.; Thissen, J.P.; Gerard, G.; Katelslegers, J.M.; Maiter, A. Post natal catch-up growth induced by growth hormone and insulin-growth factor-1 in rats with

intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. *Pediatr Res* 1997; 42:370-377.

39 - Felsing, N.E.; Brasel, J.A.; Cooper, D.M. Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:157-162.

40 - Nguyen, U.N.; Mougín, F.; Simon-Regaud, M.L.; Rouillon, J.D.; Marguet, P.; Regnard, J. Influence of exercise duration on serum insulin growth factor and binding protein in athletes. *Eur. J. Physiol.* 1998;78:533-537.

41 - Souza, M.Z.; Luciano, E. Metabolismo e crescimento de ratos diabéticos submetidos ao treinamento físico. *Arq. Brás. Endocrinol. Metab.* 1996;40(1):73.

42 - Luciano, E.; Guerino, M.R.; Mello, M.A.R.; Luciano, E.A. Physical training and ultrasound treatment: effects on the protein metabolism of experimental diabetic rats. *XXVI Fims World Congress of Sports Medicine.* 1998;26:21.

43 - Alessio, H.M.; Goldfarb, A.H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol* 1988; 64: 1333-1336.

44 - Pereira, B.; Costa-Rosa, L.F.B.; Safi, D.A.; Medeiros, M.H.G.; Curi, R.; Bechara, E.J.H. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiol. Behav* 1994; 56(5):1095-1099.

45 - Halliwell, B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 14S-22S.

Table 1: Diet composition (g/kg).

Components	Normal protein (AIN-93)*	Low protein
Casein (84% protein)	202	71.5
Cornstarch	397	480
Dextrinized cornstarch	130.5	159
Sucrose	100	121
Soybean oil	70	70
L-cystine	3	1
choline chloridrate	2.5	2.5
mineral mix (AIN-93)	35	35
vitamin mix (AIN-93)	10	10
Fiber (mycrocellulose)	50	50

*Reeves et al. (17)

Table 2 – Body weight gain (g), food intake (g/100g body weight per day), serum glucose (mMol. L), serum total protein (g/L), serum albumin (g/L), serum (μ Eq/L), liver glycogen (mg/100mg) and liver total lipids (mg/100mg) concentrations after 60 days or diet treatment.

Groups	NP	LP
Body weight gain	150.0 \pm 5.0	56.0 \pm 4.00 *
Food intake	12.9 \pm 1.40	16.8 \pm 4.5
Serum glucose	4.6 \pm 1.2	5.7 \pm 1.2
Serum total protein	58.0 \pm 5.0	49.0 \pm 4.0 *
Serum albumin	25.0 \pm 5.0	20.0 \pm 5.0 *
Serum FFA	391 \pm 93	771 \pm 61 *
Liver total lipids	2.6 \pm 0.11	7.2 \pm 0.44

Results expressed as mean \pm S.D. of 6 rats in each group. (*) Significantly different (P <0,05, t-test). NP = normal (17%) protein diet, HP = low (6%) protein diet.

Table 3 – Body weight gain (g), food intake (g/100g body weight per day), serum glucose (mMol. L), serum total protein (g/L), serum albumin (g/L), serum (μ Eq/L), liver glycogen (mg/100mg) and liver total lipids (mg/100mg) concentrations after 90 days of diet treatment associated or not to physical exercise during the last 30 days.

Groups	NP-SED	NP-S	NP-R	HP/NP-I	HP/NP-S	HP/NP-R
Body weight gain	119.5 \pm 4.04	206.3 \pm 4.14	206.3 \pm 4.05	106.8 \pm 3.24 ^a	116.9 \pm 4.87 ^{ab}	146.9 \pm 6.77 ^{abc}
Food intake	6.1 \pm 0.2	7.0 \pm 0.6	6.1 \pm 0.5	7.6 \pm 0.4	8.3 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1
Serum glucose	6.10 \pm 0.22	7.04 \pm 0.57	6.29 \pm 0.86	7.59 \pm 2.47	8.38 \pm 0.10	8.1 \pm 0.34 ^u
Serum total protein	69.3 \pm 1.00	75.7 \pm 0.53	67.2 \pm 1.7	69.6 \pm 1.2	68.9 \pm 0.5	67.9 \pm 1.2
Serum albumin	44.5 \pm 1.0	41.4 \pm 1.3	49.2 \pm 0.31.	46.1 \pm 1.4	40.8 \pm 0.9 ^b	45.7 \pm 0.15
Serum FFA	283 \pm 72.7	284 \pm 12.95	355 \pm 22.0	266 \pm 30.63	244 \pm 19.87	376 \pm 48
Liver lipids	3.9 \pm 0.32	3.4 \pm 0.10	3.28 \pm 0.4	3.7 \pm 0.14	3.3 \pm 0.09	3.52 \pm 0.3

Results expressed as mean \pm S.D. of 8 rats in each group. NP = normal protein diet 90 days, HP/NP = low protein diet 60 days and normal protein diet 30 days. I = sedentary, S = swimming for 30 days, R = treadmill running for 30 days. Significantly differences (ANOVA, P < 0,05) from: a) NP-I, b) NP-S, c) NP-R, d) HP/NP-I, e) HP/NP-S.

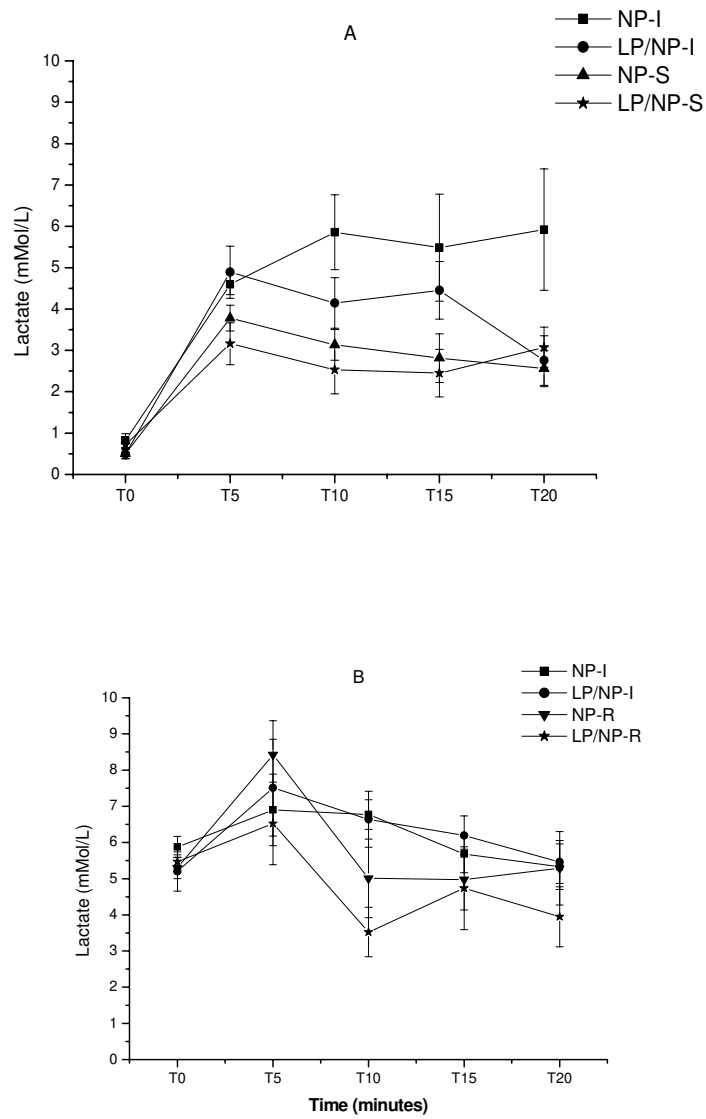


Figure 1 - Blood lactate during the fitness test. A = swimming test and B = treadmill running test. NP-I = normal protein sedentary. Results are expressed as mean \pm SD of 4 to 8 rats in each group. LP/NP-I = low/normal protein sedentary, NP-S = normal protein swimming trained, LP/NP-S = low/normal protein swimming trained, NP-R = normal protein treadmill trained, LP/NP-R = low/normal treadmill running trained.

Table 3 – Plasma TBARs (mMol/L) concentrations and blood catalase (CAT in U/gHb.min) and glutathione reductase (GR in U/gHb) activities after 90 days of diet treatment associated or not to physical exercise during the last 30 days.

Groups	NP-I	NP-S	NP-R	HP/NP-I	HP/NP-S	HP/NP-R
TBARs	3.85 ± 0.22	4.42 ± 0.29 ^a	4.11 ± 0.15 ^a	3.43 ± 0.14 ^a	3.50 ± 0.29 ^{ab}	3.29 ± 0.22 ^{ac}
CAT	864.3 ± 323.7	396.3 ± 50.0 ^a	296.4 ± 90 ^a	551.1 ± 101.6 ^a	352.2 ± 96.1 ^{ad}	223.6 ± 83.1 ^{ad}
GR	79.4 ± 11.4	14.8 ± 0.4 ^a	84.5 ± 11.8 ^b	64.5 ± 9.3 ^a	32.4 ± 3.4 ^{ad}	46.8 ± 12.8 ^{ac}

Results expressed as mean ± S.D. of 8 rats in each group. NP = normal protein diet 90 days, HP/NP = low protein diet 60 days and normal protein diet 30 days. I = sedentary, S = swimming for 30 days, R = treadmill running for 30 days. Significantly differences (ANOVA, P < 0,05) in relation to: a) NP-I, b) NP-S, c) NP-R, d) HP/NP-I, e) HP/NP-S.

Supported by FAPESP (proc. 02/02354-0 and proc. 00/08110-0)

VI – DISCUSSÃO GERAL

No primeiro estudo, foram avaliadas as atividades das enzimas glutathione redutase (GR) e catalase (CAT) nos eritrócitos como biomarcadores do sistema antioxidante e as concentrações plasmáticas de grupamentos sulfidríla (SH), substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e proteínas carboniladas reativas (RCD) como biomarcadores de danos oxidativos em animais eutróficos e desnutridos (restrição protéica alimentar).

Os resultados do ganho de peso corporal, às concentrações sanguíneas de AGL, proteínas totais, albumina e glicose e de lipídeos hepáticos, indicam que a alimentação com a dieta de 6% de proteína foi eficiente em causar uma desnutrição parecida com aquela do tipo Kwashiorkor, nesses animais, exceto pelo aparecimento de edema (TORUN & CHEW, 1994; OKITOLONGA et al., 1987; GOBATTO & MELLO, 1991; MELLO, 1994; LATORRACA et al., 1998). A ausência de edema nesses animais não surpreende, uma vez que outros pesquisadores anteriormente já relataram dificuldades em produzir edema em animais com deficiência protéica experimental (RAMALINGASWANI & DEO, 1968; CARPINELLI, 1978; MELLO & CURY, 1989). A redução no ganho de peso, provavelmente tem haver com uma má absorção de proteínas que, por sua vez, poderiam estar levando o organismo à má absorção do aproveitamento alimentar nos animais. Essa teoria foi elucidada por MARCONDES, (1976), por alterações funcionais e morfológicas, que ocorrem no pâncreas exócrino e epitélio entérico, os quais comprometem a absorção de nutrientes. O baixo peso corporal em ratos submetidos à desnutrição protéica é um fenômeno amplamente relatado na literatura (ESCRIVA et al., 1991; GOBATTO & MELLO, 1991; MELLO, 1994; LATORRACA, 1998). Todas essas diferenças observadas entre os ratos mantidos com a dieta hipoprotéica e aqueles mantidos com a dieta normoprotéica, provavelmente foram desencadeadas pela desigualdade no teor protéico da dieta, uma vez que as duas dietas tinham o mesmo conteúdo energético e não houve diferenças significativas na ingestão alimentar entre os dois grupos.

Os valores superiores de lipídeos, observado nos ratos hipoprotéicos em relação aos normoprotéicos, são alterações já descritas no quadro da desnutrição protéica. É provável que isso seja causado por deficiência de conteúdo e/ou de atividade da enzima glicose-6-fosfatase, presente no fígado, o que impede a liberação hepática de glicose (HEARD et al., 1977). Nossa interpretação é que parte da glicose retida no fígado seria estocada na forma de glicogênio e o restante, transformada em gordura.

Foram encontradas níveis mais baixos de glicose em um modelo de deficiência protéica no qual previamente foi detectada secreção pancreática de insulina reduzida (CARNEIRO et al., 1995; PRADA et al., 2001). Assim, verificou-se que a glicose em presença de baixa insulina pode estar alterada nesses animais, como já relatado anteriormente em modelos de desnutrição (ESCRIVA et al., 1991; OKITOLONGA et al., 1987; RAO, 1995; GOBATTO, 1997). A hipótese para explicar essa inconsistência metabólica na desnutrição seria simplesmente menor absorção intestinal de carboidratos na desnutrição. Outra possibilidade seria maior captação de glicose pelos tecidos periféricos em função de maior sensibilidade à insulina, principalmente nos tecidos musculares e hepático.

Com testes de tolerância à glicose oral, animais submetidos à restrição protéica apresentaram valores máximos de glicose semelhantes aos verificados em ratos controles, sugerindo normalidade no processo abortivo da glicose naqueles animais (MELLO & CURY, 1989), não podendo explicar a primeira hipótese que poderia ocorrer nesse modelo de desnutrição. Embora a hipótese se sustente, alguns autores acreditam que a mesma não pode ser totalmente descartada, pois em dietas hipoprotéicas, substituem-se proteínas por carboidratos a fim de torná-las isocalóricas, tornando-as hiperglicídicas. Essa alteração na dieta parece causar déficit na absorção de carboidratos (MARCONDES, 1976; GOBATTO, 1997).

Com relação à possibilidade de aumento da utilização de carboidratos pelo fígado, é bastante provável que tenha ocorrido maior extração hepática de glicose. Um indício dessas ocorrências são os elevados teores de glicogênio hepático dos ratos hipoprotéicos do presente estudo.

A presença de maior sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos de indivíduos desnutridos, uma vez que já foi relatado que (GOBATTO, 1997) as etapas iniciais da

sinalização da insulina encontram-se exacerbadas em músculo e fígado isolados de ratos deficientes em proteína (REIS et al., 1997). Os dados anteriores de OKITOLONDA et al., (1987), observaram maior efeito da insulina intravenosa em tecidos de ratos alimentados com dieta hipoprotéica. RAO (1995) considerou improvável a ocorrência de maior sensibilidade a insulina em animais desnutridos, já que são resistentes aos efeitos hipoglicêmicos da insulina exógena. O referido autor não verificou alteração na extração hepática de insulina ou na produção de glicose pelo fígado em decorrência da desnutrição calórica. Para ele, a reduzida concentração sanguínea de glicose nessa patologia parece estar mais relacionada à menor secreção de glucagon, embora estudos também tenham mostrados elevação desse hormônio durante a desnutrição. Entretanto, DOLLET et al., (1985) não constataram alterações na concentração de glucagon na desnutrição protéica.

Em nosso experimento, a captação de glicose pelo músculo não esteve alterada pela desnutrição. Em incubações com concentração de insulina próxima ao Km para o tecido muscular (100 μ U/ml), os animais tratados com dieta a 6% de proteína apresentaram provavelmente sensibilidade à insulina semelhante a dos animais normoprotéicos (tabela 8). CRACE et al., (1995); CARNEIRO et al., (1995) e REIS et al., (1997), constataram uma sensibilidade aumentada de insulina em animais tratados com dieta deficiente em proteína. CRACE et al., (1995) relatou ainda uma maior captação de glicose em músculos sóleo desnutridos, em relação aos alimentados com dieta normoprotéica, mesmo com ausência total de insulina. Ainda em relação ao metabolismo intramuscular da glicose, CRACE (1990) verificaram aumento da síntese de glicogênio em ratos com restrição protéica, contrariando os resultados do presente estudo, onde verificamos oxidação de glicose e síntese de glicogênio semelhantes entre as fatias de músculos provenientes dos dois grupos estudados. Por outro lado, NOLTE et al. (1994), também não constataram diferença na síntese de glicogênio entre animais controles e desnutridos em fatias musculares incubadas na ausência e na presença de ácidos graxos livres, embora tenham verificado redução na oxidação de glicose na fatias provenientes dos animais desnutridos incubadas na presença de insulina por 120 minutos.

HENRIKSEN et al. (1996) propuseram que taxas elevadas ou reduzidas de glicogênio pelo músculo possam estar, relacionadas ao maior ou menor transporte de glicose, respectivamente. No presente estudo, os resultados parecem corroborar essa hipótese, uma vez que animais normoprotéicos e hipoprotéicos apresentaram valores semelhantes tanto de captação de glicose como de síntese de glicogênio muscular. Não houve diferenças significativas, no que se refere à produção de lactato pelo músculo isolado, entre os dois grupos estudados. Ao contrário, GOBATTO (1997) ao incubar fatias de músculo sóleo isolados, encontrou maior produção de lactato pelos músculos dos ratos desnutridos. Todas essas informações sobre o metabolismo glicídico intramuscular na restrição protéica precisam ser analisadas com cautela, pois existem muitos dados conflitantes entre os diferentes estudos. A situação se torna ainda mais complexa face aos resultados de REIS et al., (1997), que mostraram aumento das etapas iniciais da sinalização da insulina em músculo esqueléticos provenientes de ratos com deficiência protéica.

Os grupamentos sulfidríla (SH) das moléculas biológicas, principalmente de proteínas e da glutatona reduzida são importantes alvos dos radicais. Sua diminuição pode indicar maior ataque radicalar (FAURE & LAFOND, 1995). Nos animais desnutridos observou-se não somente redução da concentração plasmática dos grupamentos sulfidríla como também daquela de albuminas. A albumina é um importante antioxidante e é a principal garantia da bilirrubina, um protetor do transporte de ácidos graxos insaturados no sangue. Em adição, a albumina parece fazer um auto sacrifício na varredura de espécies reativas de oxigênio (EROS). Em seus estudos, FLECHNER et al. (2001), mostraram que a quantidade de albumina relacionava-se com a proteção contra radicais e que no caso da recuperação nutricional, a reabilitação do paciente é mais rápida quando suplementado com a albumina e glutatona. Como os grupamentos sulfidrílas são importantes indicadores do status antioxidante do organismo, os ratos do presente estudo parecem sofrer maior ataque radicalar que os controles.

Para confirmar essa hipótese, foram avaliadas, neste estudo as concentrações plasmáticas de TBARs e RCD, indicadores respectivamente, de danos oxidativos aos lipídeos e às proteínas circulantes ou teciduais.

A peroxidação de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios das membranas plasmáticas pode resultar em significativa perda da integridade da membrana. Este é um dos efeitos mais marcantes dos danos oxidativos (TAPPEL, 1973), levando à geração de aldeídos e alcanos potencialmente nocivos, que reagem com o ácido tiobarbitúrico. Portanto, o teste não específico de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) é freqüentemente empregada para avaliar o grau de dano oxidativo (TAPPEL, 1973). Além disso, modificações oxidativas de aminoácidos tem efeitos significativos na função celular, uma vez que proteínas oxidadas perdem sua atividade biológica e tendem a ser muito mais sensíveis à proteólise (STADTMAN & OILVER, 1991). Modificações oxidativas de resíduos de aminoácidos incluem a transformação de aminoácidos com lisina, arginina e prolina em proteínas carboniladas reativas (RCD). Foram estabelecidas correlações entre o grau de acúmulo de RCD e uma variedade de patologias (STADTMAN, 1992). Dessa forma RCD tem sido usados na avaliação de danos oxidativos.

Observa-se, no presente estudo, que as concentrações plasmáticas de TBARs foram significativamente mais elevadas nos ratos desnutridos que nos controles, confirmando a hipótese de maior dano oxidativo aos lipídeos nos primeiros animais. Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos quanto às concentrações plasmáticas de RCD.

O principal sistema de defesa contra danos oxidativos ao organismo é composto por um grupo de enzimas. As mais importantes enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do anion superóxido a H_2O_2 , a qual é desativada sendo transformada em H_2O pela catalase (CAT) e pela glutathiona peroxidase (GSH-Px). A GSH-Px precisa de GSH como doador de hidrogênio, onde a GSH é oxidada. A regeneração da GSH é catalisada pela glutathiona redutase (GR)(HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; BANERJE et al., 2003). A atividade dessas enzimas é estimulada na presença de EROS. Neste estudo, constatou-se aumento da atividade das enzimas GR e CAT nos eritrócitos nos animais desnutridos, reforçando a hipótese de maior produção de EROS nesses animais em relação aos controles.

Nesse contexto, pode-se considerar que os animais desnutridos desenvolveram adaptação ao estresse oxidativo gerado pela dieta, aumentando as defesas

antioxidantes. Essa hipótese é sustentada pelos relatos de ALBRECHT & PELISSIER, (1995).

TANDOM et al. (1998), administrando lítio na dieta de ratos com desnutrição protéica, verificaram aumento na atividade das enzimas GR, CAT, SOD em relação aos níveis normais, obtendo com isso, diminuição dos níveis de peroxidação lipídica. Já em outros estudos, SODHI et al. (1996), observaram diminuição tanto da atividade da enzima CAT quanto da concentração de glutathione reduzida em desnutridos, embora não tenham evidenciado aumento na peroxidação lipídica.

Em resumo, os resultados do primeiro estudo demonstraram que o modelo animal de desnutrição avaliado parece adequado ao estudo do balanço entre danos oxidativos e respostas antioxidantes e que os marcadores sangüíneos usados foram eficazes em refletir o estresse oxidativo imposto aos animais pela dieta hipoprotéica aqui estudada.

No segundo estudo, foram avaliados os seguintes marcadores sangüíneos em ratos eutróficos submetidos a 4 semanas de treinamento físico de natação: concentração de lactato durante o exercício (marcador do condicionamento aeróbio), concentração de TBARs (marcador de ataque oxidativo) e atividade das enzimas CAT e GR (marcadores do sistema de defesa antioxidante).

Para avaliar a eficácia do protocolo de treinamento sobre o condicionamento aeróbio dos animais, foi determinada a concentração de lactato sangüíneo durante teste de esforço, constando de sessão única de exercício. Os valores observados nos ratos treinados foi menor do que aqueles observados nos ratos sedentários

Durante o exercício de baixa ou moderada intensidade, em seres humanos, o lactato sangüíneo não aumenta mais após 3 a 5 minutos de atividade, voltando aos valores de repouso quando o exercício se prolonga por mais de uma hora. Nessa situação, a taxa de produção de lactato acha-se em equilíbrio ou mesmo inferior à de remoção (1991). Quando realizados exercícios de alta intensidade, a concentração sangüínea de lactato, eleva-se após 3-4 minutos de atividade (WASSERMAN et al., 1986) indicando que a taxa de produção superar a de remoção. Fenômeno semelhante foi discutido para ratos exercitados (GOBATTO et al., 2001).

Os animais treinados mostraram menores concentrações sangüíneas de lactato que os sedentários durante uma sessão de exercício agudo. Isso indica que o protocolo de treinamento empregado (natação 1h/dia, 5 dias/semana, suportando sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal, o que corresponde ao limiar anaeróbio (LAN) para esses animais), foi eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais. Esses resultados indicam, ainda, que os animais realizaram exercício de intensidade baixa ou moderada, uma vez que houve estabilização das concentrações sangüíneas de lactato durante o exercício (GOBATTO et al., 2001).

Embora os animais tenham sido mantidos com dieta balanceada e exercícios físicos moderados, houve diferença significativa em relação aos biomarcadores do ataque oxidativo e do sistema de defesa antioxidantes entre ratos controles sedentários e treinados. TBARs apareceram significativamente elevadas no sangue dos animais treinados em comparação com os sedentários, indicando maior ataque oxidativo nos primeiros que nos últimos animais.

Aumento na peroxidação lipídica tem sido relatado após o exercício (ALESSIO & GOLDFARB, 1998; MIYAZAKI et al., 2001; TURGUT et al., 2003; QUINDRY et al., 2003), embora nem sempre seja constatado (SELMAN et al., 2002; VIINIKKA et al., 1984).

AVULA & FERNANDES (1991) constataram redução da peroxidação lipídica nos rins e nas glândulas salivares e aumento da mesma no fígado de camundongos treinados em esteira e analisados em repouso, em comparação aos sedentários. Nenhuma diferença foi constatada nos músculos esquelético e cardíaco entre os dois grupos. RADAK et al (1999) também não verificaram qualquer diferença nos níveis de peroxidação lipídica no músculo esquelético de ratos treinados por natação e analisados em repouso. ALESSIO & GOLDFARB (1988) constataram pequeno aumento na peroxidação lipídica tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos após exercício submáximo na esteira.

O aumento do ataque oxidativo pelo exercício pode ser compensado por aumento nos mecanismos de defesa antioxidante (GROUSSARD et al., 2003; WOZINIAK, 2003). Em relação às enzimas do sistema antioxidante, esta é uma questão que permanece controversa.

Enquanto alguns autores demonstraram aumento da atividade enzimática antioxidante (CAT, SOD, GR) no músculo esquelético, induzida pelo treinamento físico (PEREIRA et al., 1996; SMOLKA et al., 2000; PANSARASA et al., 2003), outros não constataram nenhuma alteração na atividade das mesmas enzimas (ALESSIO & GOLDFARB, 1998). A resposta das enzimas antioxidantes musculares parece ser dependente do ergômetro utilizado: natação (PEREIRA et al., 1994), corrida em esteira rolante (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; SMOLKA et al., 2000), do protocolo de exercício ser contínuo (ALESSIO & GOLDFARB, 1988) ou intermitente (ATALAY et al., 1996; SMOLKA et al., 2000), assim como do tipo de fibra muscular (ATALAY et al., 1996. POWERS et al., 1994) e da espécie estudada: rato (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; PEREIRA et al., 1994; SMOLKA et al., 2000), camundongo (AVULA & FERNANDES, 1999) ou outros mamíferos (SELMAN et al., 2002).

Existem, também, estudos mostrando atividades ligeiramente reduzidas de enzimas antioxidantes (CAT) em músculo de ratos treinados por natação e sacrificados em repouso e atividade significativamente mais elevada em ratos treinados do que em sedentários sacrificados imediatamente após exercício agudo (ALESSIO & GOLDFARB, 1988). Em estudo efetuado com seres humanos submetidos a treinamento de endurance, constatou-se que os níveis de SOD extracelular são alterados de maneira distinta a partir da administração de CUZn-SOD e Mn-SOD que estão diminuídos pelo treinamento mas aumentados pelo exercício agudo, sugerindo que o treinamento de endurance aumenta as reservas teciduais de SOD extracelular (OOKAVARA et al., 2003). Isso sugere que, em certas circunstâncias, o exercício agudo possa modular a expressão das adaptações induzidas pelo treinamento em relação a atividade das enzimas antioxidantes.

Em resumo, o conjunto dos resultados do segundo estudo sugerem que o treinamento físico moderado por natação durante 4 semanas foi eficaz em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais. Por outro lado, não desencadeou adaptações favoráveis na atividade das enzimas antioxidantes analisadas.

No terceiro estudo foram avaliados biomarcadores do estado nutricional e do estresse oxidativo em ratos submetidos ou não ao exercício de natação por 4 semanas durante recuperação da desnutrição protéica. A atividade de CAT e GR nos eritrócitos

foi usada como marcador do sistema de defesa antioxidante e as concentrações plasmáticas de TBARs e de RCD, como marcador dos danos oxidativos.

Houve ganho de peso em todos os animais ao longo do experimento. Os resultados referentes aos animais recuperados de desnutrição mostraram que o protocolo de realimentação acelerou esse processo em relação ao estado desnutrido do início do experimento sem, contudo restaurar aos valores observados nos controles. Mais ainda, os animais treinados mostraram maior ingestão alimentar e ganho de peso do que os sedentários. As concentrações sanguíneas de AGL e de proteínas voltaram ao normal nos animais inicialmente desnutridos e posteriormente recuperados. A glicose sanguínea mostrou-se significativamente aumentada nos grupos recuperados. Segundo alguns autores, quando o organismo é submetido à desnutrição precocemente, haveria “programação metabólica desordenada” durante o desenvolvimento, o que conduziu à hipótese de que eventos muito precoces levariam a perturbações da homeostase glicêmicas na idade adulta (OZANNE & HALES, 1999). Os dados referentes à glicemia no presente estudo parecem corroborar esta hipótese. Contudo é importante destacar que tal hipótese tem sofrido críticas (HOLNESS & SUDGEN, 1996).

O exercício físico é conhecido por melhorar a tolerância à glicose por aumento da sensibilidade periférica à insulina (DELA et al., 1994), especialmente no músculo esquelético.

O transporte de glicose para o músculo esquelético é regulado tanto pela insulina quanto pela atividade contrátil (HENDRICKSEN et al., 1996), através da translocação de uma isoforma de transportadores de glicose no músculo, o GLUT 4 (EZAKI, 1997). A capacidade de transportar glicose depende do conteúdo muscular de GLUT 4 (HENDRICKSEN et al., 1996; EZAKI, 1997) e tanto os transportadores de glicose estimuladas pela insulina (HENDRICKSEN et al., 1996) quanto à proteína GLUT 4 (RODNICK et al., 1992; HOUMARD et al., 1995; EZAKI, 1997) estão aumentados no músculo esquelético treinado pelo exercício físico. Dessa forma, esperar-se-ia aumento da captação de glicose nos ratos treinados em relação aos sedentários, o que aconteceu no presente estudo.

Os ratos treinados mostraram taxa de síntese de glicogênio muscular maiores que os sedentários. Maior síntese de glicogênio em músculos treinados tem sido reportado e é uma regulação muito vista em grupos treinados, por envolver processos regulatórios: (HENDRICKSEN et al., 1989; HENDRICKSEN & RITTER, 1993) verifica-se aumento rápido da síntese de glicogênio sintetase ou redução da fosforilase. HENDRICKSEN et al. (1996) encontraram relação direta entre aumento da glicogênese e maior transporte de glicose por mecanismos insulino-dependentes, que parecem envolver a presença de CA^{2+} liberados nos processos contráteis do músculo. REN et al. (1993) observaram que o aumento intramuscular dos transportadores GLUT 1 e GLUT 4, implicou em maior transporte de glicose. Então a maior taxa no aumento de síntese do glicogênio pode estar relacionado ao maior transporte de glicose (HENDRICKSEN et al., 1996).

Com relação à produção de lactato muscular, constatou-se aumento nos animais recuperados e treinados em relação ao sedentário equivalente. JACOBS (1986), em humanos, sugeriu que indivíduos treinados apresentaram aumento na capacidade de transporte do lactato da fibra muscular para a circulação sangüínea, dependendo da intensidade. OYONO-ENGUELLE et al. (1990), também observaram a mesma relação quando associaram o aumento da concentração de lactato sangüíneo ao maior transporte muscular desse substrato durante o exercício físico agudo envolvendo indivíduos bem condicionados.

ROTH (1991), verificou aumento da atividade de transporte do lactato para fora do tecido muscular em ratos submetidos a diferentes treinamentos de velocidade e resistência muscular. PILEGAARD et al. (1993) verificaram em estudos com vesículas de sarcolemas gigantes, maior atividade de transporte do lactato do músculo para a corrente sangüínea, com correlação positiva com a intensidade do treinamento, submetendo animais a programas de treinamento de sete semanas, com aumento progressivo da intensidade do treinamento. BONEN & McCULLAGH (1994) submeteram camundongos ao exercício agudo em esteira rolante durante 60 minutos, sendo que após isso retiraram músculos para procedimentos de incubação. Nesse trabalho os autores verificaram aumento do transporte de lactato pelos sóleos anteriormente exercitados, mas relataram que os mecanismos responsáveis por isso

ainda são desconhecidos. Assim, como PILEGAARD et al. (1993), sugeriram que o trabalho físico regular induz a síntese de mais proteínas carreadoras, e que o treinamento físico pode aumentar a atividade do carreador de lactato.

McCULLAGH et al. (1996) sugeriram a existência de duas proteínas transportadoras de lactato, MCT₁ e MCT₂ (monocarboxylate transporters), as quais foram previamente encontradas em ovários de hamsters chineses e fígados de hamsters sírios, em sarcolemas sob estimulação elétrica muscular crônica que aumentou o transporte de lactato no músculo tibial anterior de ratos. Entretanto, essas isoformas apresentam cinéticas de transporte diferentes no músculo, o que levou os autores a sugerirem a existência de uma isoforma específica nesse tecido. GARCIA et al. (1994) verificaram a presença do MCT₁ no coração e no músculo vermelho, mas não no músculo branco. Outros autores, DUBOUCHAUD et al. (1996) e PILEGAARD et al. (1995) viram diminuição da captação de lactato em músculo desestimulado por elevação das patas traseiras de ratos e o mesmo resultado em músculo desnervado.

No presente estudo, no entanto, não foram constatadas diferenças na liberação de lactato pelo músculo esquelético entre os grupos controle treinado e sedentário.

Torna-se importante destacar que, a despeito do aumento da captação de glicose e da síntese de glicogênio pelo músculo esquelético dos ratos recuperados treinados e da captação normal de glicose pelo músculo dos recuperados sedentários, a concentração sangüínea de glicose desses ratos foi maior que a dos controles correspondentes. Isso pode ser indicativo de resistência à insulina em outros tecidos que não o músculo estudado esquelético, induzida pela desnutrição precoce.

Os resultados deste estudo mostraram concentração plasmática de TBARs menor no grupo de animais recuperados de desnutrição sedentário do que no grupo controle sedentário. Isso sugere menor dano oxidativo a lipídeos plasmáticos ou teciduais no primeiro grupo, o que pode ser resultado tanto de menor produção de EROS quanto de maior capacidade de remoção nos animais recuperados do que nos controles. Esta aparente proteção dos animais recuperados pode ser explicada por uma defesa plasmática antioxidante eficiente, refletida neste estudo mais pelo decréscimo nas concentrações plasmáticas de albumina do que pelo aumento da eficiência do sistema enzimático antioxidante, uma vez que as atividades das enzimas CAT e GR

mostraram-se reduzidas no grupo recuperado em comparação ao controle, em contraste com o aumento da atividade destas enzimas observadas nos animais.

Os ratos treinados (controles e recuperados de desnutrição) mostraram aumento nas concentrações plasmáticas de TBARs e RCD quando comparados aos sedentários equivalentes, sendo os maiores valores observados nos controles treinados, situação semelhante à constatada no segundo estudo.

Sessão única de exercício pode elevar o conteúdo de TBARs (ALESSIO & GOLDFARB, 1988) e RCD (RADAK et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003), após sessão única de exercício, mas parece não ter efeitos sobre esses biomarcadores analisados na condição de repouso (RADAK et al., 1999; PEREIRA et al., 1994). As discrepâncias entre os resultados do presente estudo e os relatados na literatura (RADAK et al., 1999; PEREIRA et al., 1994), com respeito aos biomarcadores de estresse oxidativo podem ser decorrência da diferença nos protocolos de natação, especialmente quanto à duração.

Outra informação importante obtida neste estudo foi que a ingestão alimentar e o ganho de peso dos animais durante a recuperação nutricional foram melhorados quando a recuperação ocorreu associada ao treinamento físico. Este fato corrobora a hipótese de que o treinamento físico exerce efeitos benéficos sobre o crescimento corporal durante a recuperação nutricional (TORUN & VITERI, 1994).

Foi relatado anteriormente que o exercício físico estimula o crescimento corporal tanto em animais eutróficos (BOER, 1980; SYNDER et al., 1992) quanto deficientes em proteínas (SAKAMOTO & GRUNEWALD, 1987; GALDINO et al., 2000). O exercício mostrou pequeno efeito sobre o crescimento ósseo de animais jovens treinados por corrida mas estimulou significativamente desenvolvimento ósseo em animais jovens treinados por natação (SYNDER et al., 1992). O aumento da atividade física induz várias respostas bioquímicas essenciais para o crescimento corporal. Essas respostas podem achar-se relacionadas à estimulação do hormônio de crescimento (GH)(BOER & KELCH, 1978). O GH exerce vários efeitos fisiológicos sobre o crescimento corporal, afetando o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos e estimulando o crescimento ósseo, cartilaginoso e muscular. Os efeitos sobre o crescimento

cartilaginosa e óssea dependem da interação entre GH e os fatores de crescimento semelhantes à insulina IGF-1 e IGF-2.

Animais submetidos à restrição proteica são deficientes em insulina (GALDINO et al., 2000). Ratos deficientes em insulina podem apresentar baixos níveis de GH (OLCHOVSKY, 1991). MUAKU et al. (1997) relatou que a administração de GH ou IGF-1 exógena restaurou peso e comprimento corporais de ratos jovens deficientes em proteína. Tanto GH (FELSING et al., 1992) quanto IGF-1 (NGUYN et al., 1998) podem ser influenciados pelo exercício, com tendência à elevação. Outras adaptações elicitadas pelo treinamento físico também modulam o crescimento somático, uma vez que em estudos prévios, demonstrou-se que ratos deficientes em insulina submetidos ao treinamento por natação recuperaram o crescimento da epífise da tíbia (SOUZA & LUCIANO, 1996) e o teor total de proteína bem como a razão proteína/DNA do músculo gastrocnêmico (LUCIANO et al., 1998) mesmo na ausência de elevação do GH.

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que a melhora do crescimento corporal durante a recuperação nutricional associada ao exercício físico pode estar relacionada, ao menos em parte, ao decréscimo no nível de estresse oxidativo, embora as enzimas do sistema de defesa antioxidante não tenham sido afetadas após 4 semanas de treinamento.

O quarto estudo foi delineado para comparar a influência de dois diferentes tipos de exercício (natação e corrida em esteira rolante) sobre o crescimento corporal, peroxidação lipídica (quantidade de TBARs) e proteção enzimática antioxidante (atividade das enzimas CAT e GR) no sangue de ratos durante a fase de recuperação de desnutrição proteica.

Houve ganho de peso em todos os animais nos experimentos envolvendo a recuperação nutricional associada ou não ao treinamento por natação e por corrida em esteira. Contudo, os valores observados para os animais recuperados foram sempre inferiores aos dos controles, da mesma forma que aconteceu no estudo anterior. As concentrações sanguíneas de glicose, AGL e albumina voltaram aos valores normais nos animais inicialmente desnutridos e posteriormente recuperados, repetindo os achados do experimento com natação para a recuperação de variáveis bioquímicas.

A proteína total sangüínea ficou significativamente reduzida para os grupos treinados por corrida (controles e recuperados). Segundo alguns autores, para a manutenção da homeostase nas fases iniciais do treinamento físico, seria necessário um aumento no aporte protéico da dieta (LEMON et al., 1996). Esse aspecto merece investigação, especialmente nos grupos inicialmente desnutridos.

Mais uma vez, o crescimento corporal dos animais durante a realimentação foi significativamente melhorado quando a recuperação nutricional aconteceu associada ao treinamento físico, independentemente do tipo de exercício. Tanto a peroxidação lipídica (quantidade de TBARs) quanto a proteção antioxidante (atividade de CAT e GR) mostraram-se reduzidas no sangue dos animais deficientes em proteína, recuperado em presença ou ausência do exercício físico.

Com relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, os resultados mostraram que tanto o treinamento por natação quanto por corrida aumentaram de maneira semelhante a quantidade de TBARs no sangue dos animais controles em relação aos sedentários correspondentes. Os resultados referentes dos animais submetidos à natação confirmam aqueles do terceiro estudo relatados anteriormente. Isso mais uma vez indica alto nível de danos oxidativos aos lipídeos teciduais ou plasmáticos nos animais controles treinados, o que sugere maior incidência de EROS nos ratos treinados do que nos sedentários, independentemente do tipo de treinamento a que foram submetidos. Os ratos recuperados, por outro lado, não mostraram aumento na quantidade de TBARs circulantes que em resposta à natação quer em resposta à corrida em esteira. Isso sugere menor presença de EROS nos animais sujeitos à restrição protéica do que nos controles treinados.

Essa aparente proteção dos animais submetidos à restrição protéica poderia ser atribuída a aumento na atividade de enzimas antioxidantes. Contudo, os presentes resultados indicam que, mais uma vez, não foi o caso. Tanto os ratos treinados (natação e corrida) do grupo controle quanto os do grupo submetido à restrição protéica mostraram decréscimo na atividade da CAT eritrocitário. Além disso, os ratos submetidos a restrição protéica e treinados por natação reduziram também a atividade GR eritrocitário. Embora interessantes, esses resultados precisam ser analisados com

cautela, uma vez que poucos marcadores foram analisados para avaliar o balanço entre danos oxidativos e defesa antioxidantes.

Em resumo, o treinamento físico, independentemente do tipo, acelerou o crescimento corporal de ratos jovens durante a recuperação da desnutrição protéica. Por outro lado, o treinamento aumentou a peroxidação lipídica e reduziu a defesa antioxidante dos animais controles, também independentemente do tipo de exercício. Os animais deficientes em proteína mostraram-se menos afetados pela peroxidação lipídica associada ao treinamento por natação ou corrida em esteira.

Os resultados obtidos nos estudos 3 e 4 sugerem, entre outros aspectos, a necessidade de ampliar o tempo de treinamento durante a recuperação nutricional, afim de se obter melhor resposta ao exercício. Nesse sentido, foram realizados experimentos onde o tempo de treinamento foi ampliado de 4 a 8 semanas. Por questões práticas, os experimentos foram conduzidos em duas séries separadas. Numa, os ratos foram submetidos a 8 semanas de recuperação nutricional associada à natação e noutra, a 8 semanas de corrida em esteira. Foram avaliadas variáveis relativas ao metabolismo muscular (lactato sangüíneo durante o exercício e captação e oxidação de glicose e síntese glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolado) indicadores de danos oxidativos (concentrações plasmáticas de TBARs e RCD) e indicadores do sistema antioxidantes (atividade CAT e GR nos eritrócitos). Os resultados dos experimentos com natação acham-se descritos no apêndice 1 e aqueles com corrida em esteira, no Apêndice 2. Houve discrepâncias muito acentuadas entre dados referentes ao metabolismo muscular, especialmente no caso da concentração de lactato sangüíneo, durante o exercício entre os ratos controles eutróficos que nadaram e aqueles que correram. O mesmo foi observado com os ratos em situação de repouso.

Por essa razão, novas avaliações serão necessárias, e esses dados não serão discutidos no presente momento.

V – CONCLUSÕES GERAIS

Tomados em conjunto os resultados dos 4 estudos realizados indicam que:

- Os biomarcadores sangüíneos de danos oxidativos (concentrações de TBARs e de RCD) e do sistema de defesa antioxidante (atividades das enzimas CAT e GR) empregados mostraram-se sensíveis ao estresse oxidativo imposto pela dieta hipoprotéica aos animais;
- Os ratos adquiriram adaptação ao estresse imposto pela dieta hipoprotéica, aumentando as defesas contra espécies reativas de oxigênio;
- O treinamento físico durante 4 semanas por natação ou corrida em esteira melhorou o condicionamento aeróbio dos ratos eutróficos mas aumentou a peroxidação lipídica e reduziu as defesas antioxidantes;
- O treinamento físico por 4 semanas de natação ou corrida em esteira rolante acelerou o crescimento somático dos ratos durante a recuperação nutricional;
- A melhora do crescimento corporal durante a recuperação nutricional associada ao exercício físico, independente do tipo, pode estar relacionada, ao menos em parte ao decréscimo no nível de estresse oxidativo;
- O decréscimo do nível de estresse oxidativo parece mais associado à redução nas concentrações plasmáticas de albumina do que ao aumento da eficiência do sistema enzimático antioxidante, uma vez que as atividades CAT e GR mostraram-se reduzidas nos animais em fase de recuperação nutricional.

Apêndice 1

Indicadores do metabolismo muscular (captação e oxidação da glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolados, e concentração sangüínea de lactato durante o exercício), de danos oxidativos (concentrações plasmáticas de TBARs e RCD) e do sistema de defesa antioxidante (atividades das enzimas CAT e GR nos eritrócitos) dos ratos submetido a 8 semanas de recuperação nutricional e/ou treinamento físico por natação.

A Tabela 1 mostra os valores do ganho de peso corporal, glicose sérica, albumina sérica, proteínas totais séricas, AGL séricos, glicogênio hepático e lipídeos hepáticos dos animais após período de desnutrição por 60 dias e recuperação nutricional e/ou exercício físico de natação por 60 dias. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para: ganho de peso corporal, glicose sérica, proteínas totais e lipídeos hepáticos. A albumina sérica mostrou-se mais elevada nos grupos treinados que nos sedentários. Os AGL séricos elevaram-se nos controles treinados (NP-TRE) em relação aos sedentários (NP-SED), ocorrendo o inverso entre os grupos recuperados treinados (HP/NP-TRE) e sedentários (HP/NP-SED).

Tabela 1 – Ganho de peso, glicose sérica, proteínas totais séricas, albumina sérica, AGL séricos, glicogênio hepático e lipídeos hepáticos após 60 dias de desnutrição e recuperação nutricional e/ou exercício físico de natação por 60 dias.

Grupos	NP-SED	NP-TRE	HP/NP-SED	HP/NP-TRE
Ganho de Peso	179,41 ± 7,48	183 ± 4,35	156 ± 4,26	176,6 ± 5,46
Glicose Sérica	135,4 ± 10,66	113,4 ± 3,27	124,1 ± 7,29	113,4 ± 3,17
Proteínas Séricas Totais	5,7 ± 0,08	5,4 ± 0,12	5,6 ± 0,03	5,7 ± 0,07
Albumina Sérica	4,56 ± 0,21	5,31 ± 0,19*	4,91 ± 0,10	5,33 ± 0,15* μ
AGL Sérico	261,9 ± 5,95	366 ± 15,11*	298,9 ± 10,04 α	211,3 ± 8,52* $\alpha\mu$
Glicogênio Hepático	3,5 ± 0,18	2,4 ± 0,51	2,9 ± 0,13*	2,9 ± 0,35
Lipídeos Hepáticos	3,9 ± 0,32	3,4 ± 0,11	3,7 ± 0,14	3,3 ± 0,09

Resultados expressos como média \pm erro padrão de 15 animais por grupo.

(*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle sedentário (NP-SED). (μ) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao recuperado sedentário (HP/NP-SED) (α) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle treinado (NP-TRE). As siglas são as mesmas da tabela 2.

A figura 1 mostra o teste de esforço realizados pelos animais após 60 dias de recuperação e/ou exercício de natação. Houve diminuição aparente do lactato no sangue dos ratos Treinados em relação aos respectivos sedentários, a partir dos 10 min de exercício (HP/NP-TRE).

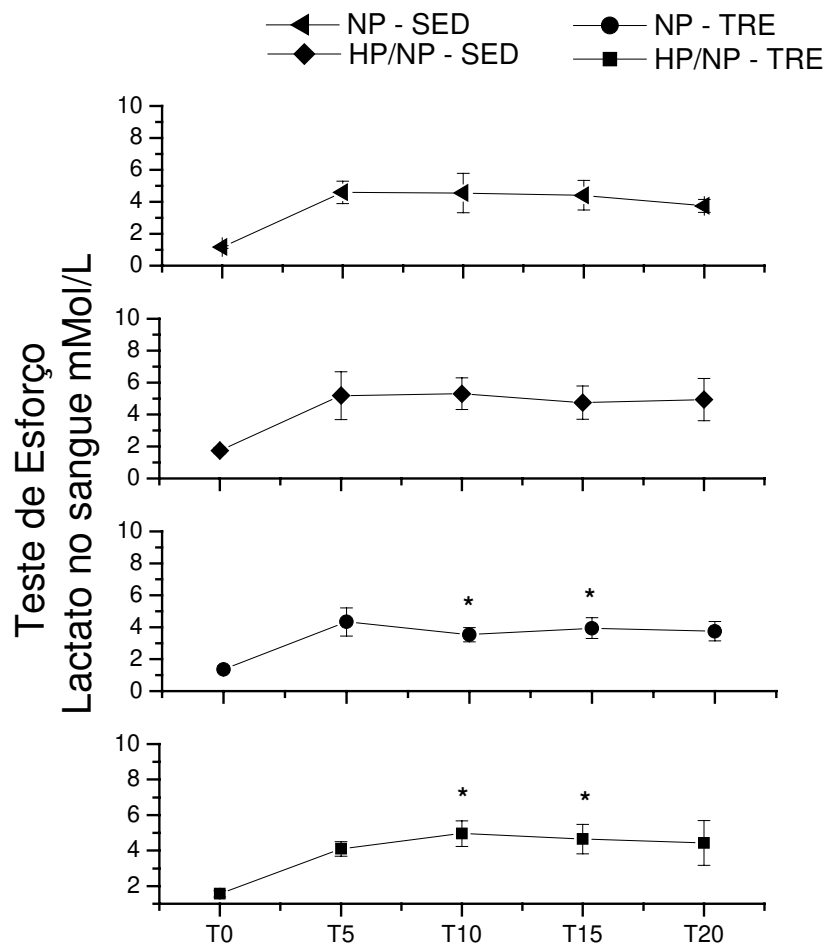


Figura 1 – Lactato sanguíneo no sangue dos ratos durante teste de esforço (natação com sobrecarga de 5% do peso corporal por 20 min.) realizado após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento por natação. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao controle sedentário (NP-SED) correspondente.

A figura 2 resume os resultados das enzimas glutathiona redutase e catalase dos animais após 60 dias de recuperação e/ou exercício de natação. Em relação a glutathiona redutase encontramos aumento nos grupos treinados em comparação aos respectivos sedentários. No caso da catalase, houve redução em todos os grupos em comparação ao controle sedentário (NP-SED).

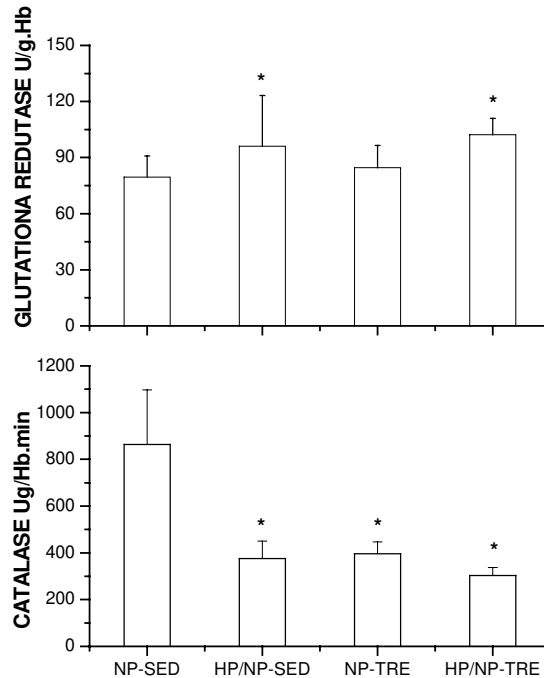


Figura 2 – Glutathiona redutase e a Catalase no sangue dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento físico de natação. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo. As siglas são as mesmas da Tabela 2. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle sedentário (NP-SED).

A Figura 3 mostra que, após 60 dias de recuperação e/ou exercício de natação, os valores de Proteínas Carboniladas não mostraram diferença significativa entre os grupos.

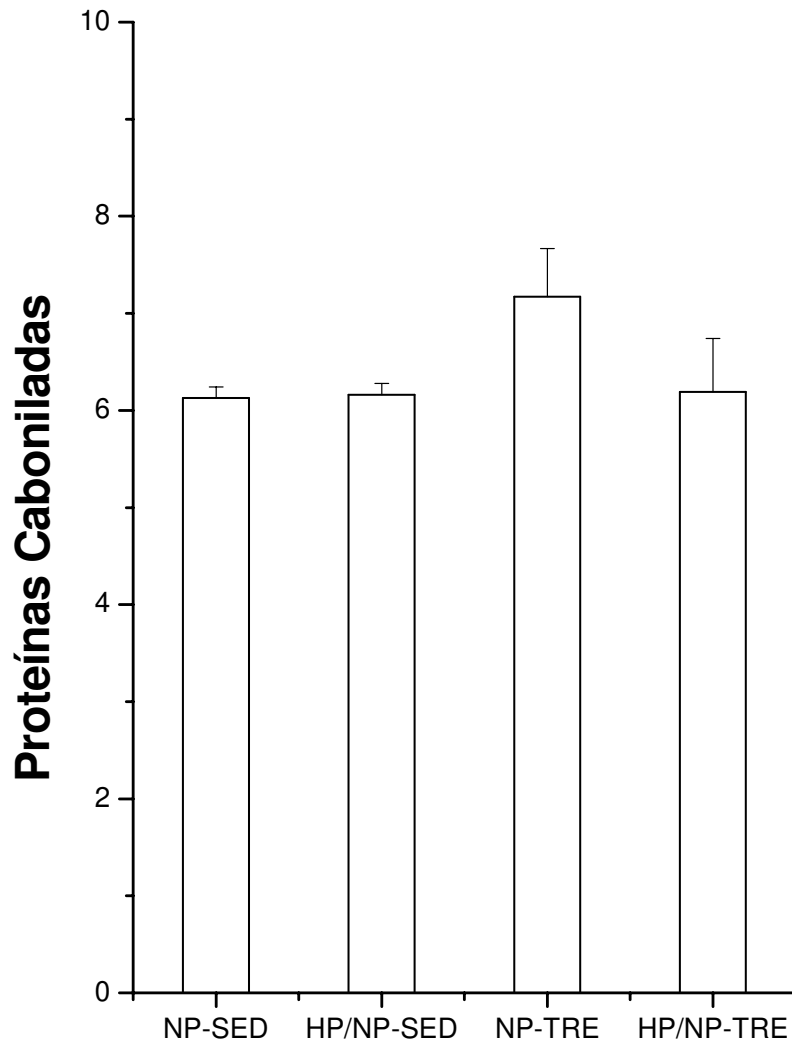


Figura 3 – Proteínas Carboniladas no plasma dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou exercício. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

A Figura 4 mostra que, após 60 dias de recuperação e/ou exercício de natação, os valores de TBARs mostraram-se mais elevadas no grupo controle treinado (NP-TRE) em relação aos demais.

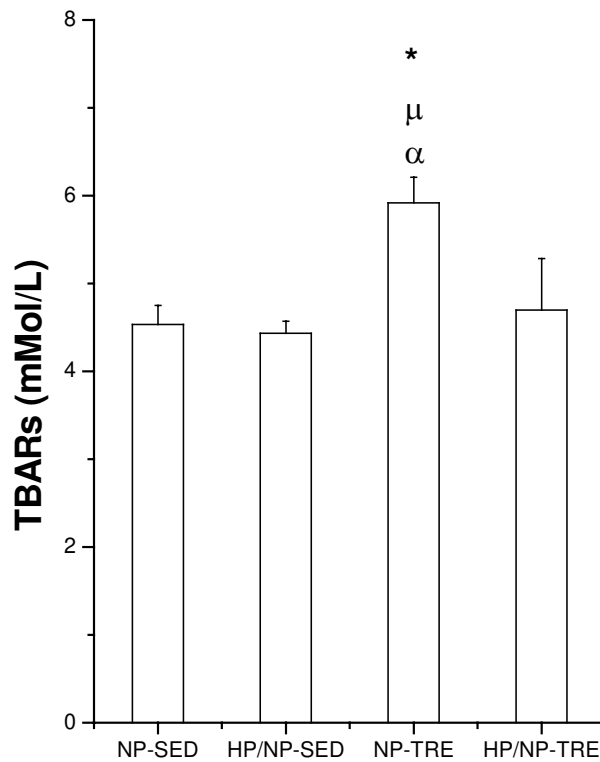


Figura 4 – TBARs no plasma dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou exercício. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle sedentário (NP-SED). (μ) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao recuperado sedentário (HP/NP-SED). (α) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle treinado (NP-TRE).

A figura 5 mostra simultaneamente os valores de oxidação de glicose, captação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolado dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento físico de natação. Não houve diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados.

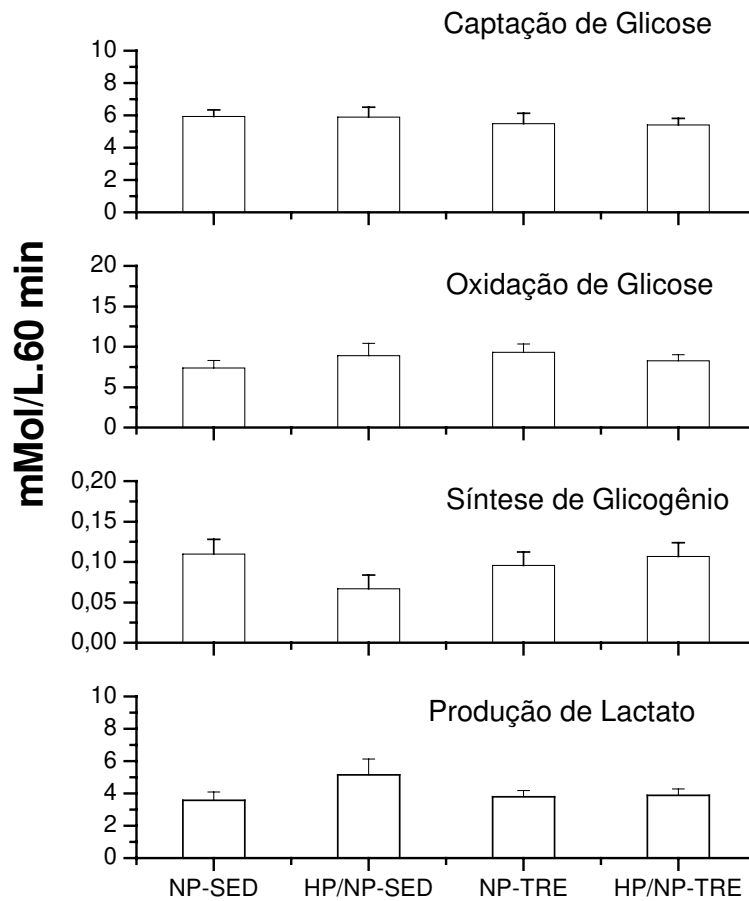


Figura 5 – Captação de glicose, Oxidação de glicose, Síntese de glicogênio e Produção de lactato pelo músculo sóleo isolados dos ratos. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 amostras teciduais.

Apêndice 2

Indicadores do metabolismo muscular (captação e oxidação da glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolados, e concentração sangüínea de lactato durante o exercício), de danos oxidativos (concentrações plasmáticas de TBARs e RCD) e do sistema de defesa antioxidante (atividades das enzimas CAT e GR nos eritrócitos) dos ratos submetido a 8 semanas de recuperação nutricional e/ou treinamento físico por corrida em esteira.

Na tabela 1 acham-se os valores de ganho de peso, glicose sérica, proteínas totais séricas, albumina sérica, AGL séricos, glicogênio hepático e lipídeos hepáticos dos animais após período de 60 dias de desnutrição e recuperação nutricional e/ou exercício físico de corrida em esteira por 60 dias. Ganho de peso, glicose sérica, proteínas totais séricas, albumina sérica, AGL séricos e lipídeos hepáticos apresentaram perfis semelhantes à aqueles observados com 30 dias de recuperação e/ou treinamento físico. A concentração sérica de proteínas totais normalizou-se em relação ao glicogênio hepático os valores de todos os grupos foram muito inferiores aos observados aos 30 dias. Não podemos explicar as causas de tal diferença.

Tabela 1 – Ganho de peso (g), glicose sérica (mMol/L), proteínas totais séricas (mg/L), albumina sérica (g/L), AGL séricos (μ Eq/L), glicogênio hepático (mg/100mg) e lipídeos hepáticos (mg/100mg) após 60 dias de desnutrição e recuperação nutricional e/ou exercício físico de esteira por 60 dias.

Grupos	NP-SED	NP-TRE	HP/NP-SED	HP/NP-TRE
Ganho de Peso	197,1 \pm 1,6	281,1 \pm 5,8	199,3 \pm 1,8 ^{α}	257,5 \pm 1,9 ^{$\ast\mu$}
Glicose Sérica	6,57 \pm 0,67	6,29 \pm 0,86	5,92 \pm 0,64	8,1 \pm 0,34 ^{μ}
Proteínas Séricas Totais	48,8 \pm 0,10	47,8 \pm 0,8	50,2 \pm 0,18	48,5 \pm 0,25
Albumina Sérica	48,3 \pm 0,34	49,2 \pm 0,31	46,7 \pm 0,36	45,7 \pm 0,15
AGL Sérico	579 \pm 60	555 \pm 22	458 \pm 80 ^{$\ast\alpha$}	576 \pm 48 ^{μ}
Glicogênio Hepático	4,8 \pm 0,4	4,2 \pm 0,6	4,8 \pm 0,2	4,1 \pm 0,5
Lipídeos Hepáticos	3,11 \pm 0,2	3,28 \pm 0,4	3,88 \pm 0,3	3,52 \pm 0,3

Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

(\ast) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle sedentário (NP-SED).

(μ) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao recuperado sedentário (HP/NP-SED) (α) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle treinado (NP-TRE). NP = dieta normoprotéica (Controle), HP/NP = dietas hipo e normoprotéicas (Recuperado), SED = sedentário, TRE = treinado por corrida.

A figura 1 mostra o teste de esforço realizado pelos animais após 60 dias de recuperação e/ou treinamento físico. Em todos os grupos, houve aumento da concentração de lactato sangüíneo aos 5 minutos de exercício, após o que houve estabilização da concentração do referido substrato, não foram constatadas diferenças entre os grupos. Apenas, todos os valores observados foram muito superiores aos verificados no teste anterior. Isso pode ser indicativo de alguma forma de estresse, não prevista, sofrida pelos animais durante o teste. Corrobora esta hipótese o fato de que observamos que os animais estavam bastante agressivos no dia do teste. Isso pode ter mascarado o efeito esperado do treinamento, isto é redução do lactato sangüíneo durante o esforço.

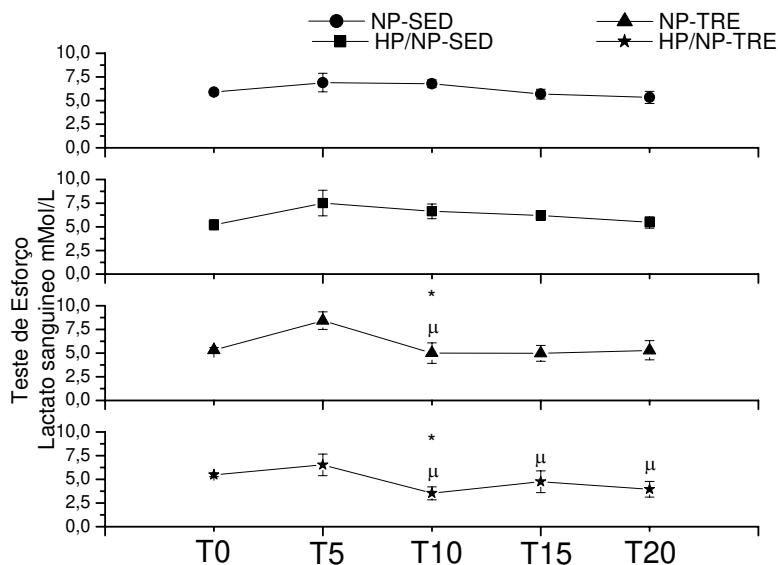


Figura 1 – Lactato sangüíneo dos ratos durante teste de esforço (corrida em esteira, 25 m/min, durante 20 min.) após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento por corrida. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo. (*) diferença significativa ($P < 0,05$, teste-t) em relação ao grupo sedentário correspondente. (μ) diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação aos valores de T5.

A figura 2 resume os resultados das enzimas glutatona redutase e catalase dos animais após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento por corrida em esteira. Em relação à glutatona redutase e à catalase encontramos uma diminuição significativa para os grupos: controle treinado (NP-TRE), recuperado treinado (HP/NP-TRE) e recuperado sedentário (HP/NP-SED) em relação ao grupo controle sedentário (NP-SED). No caso da última enzima o comportamento foi semelhante ao observado aos 30 dias.

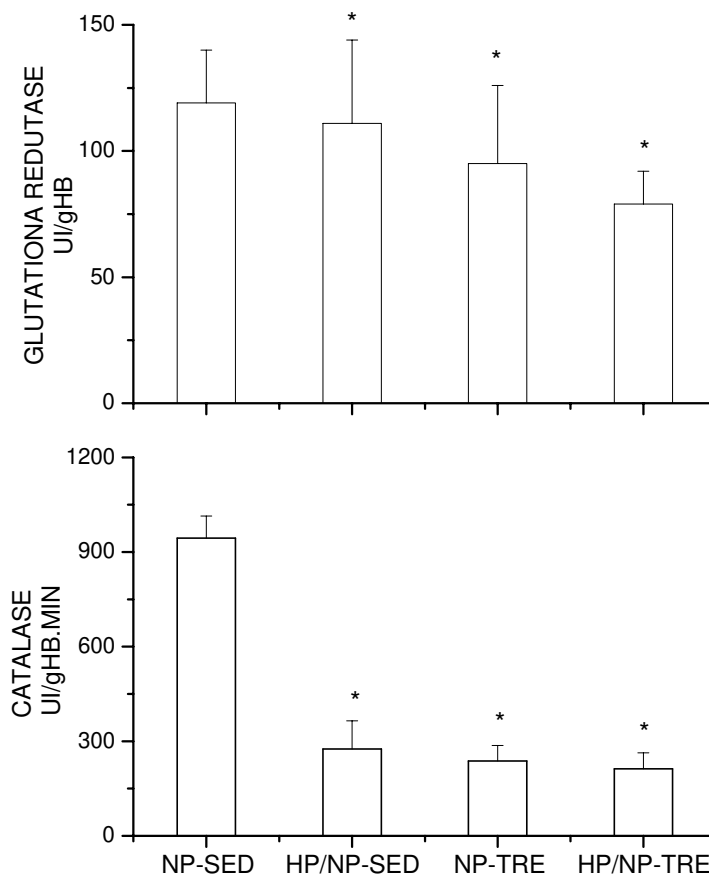


Figura 2 – Glutathione redutase e a Catalase no sangue dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento físico de corrida em esteira. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle sedentário (NP-SED).

A Figura 3 mostra que, após 60 dias de recuperação e/ou exercício de corrida em esteira, não houve aumento significativo em nenhum dos grupos.

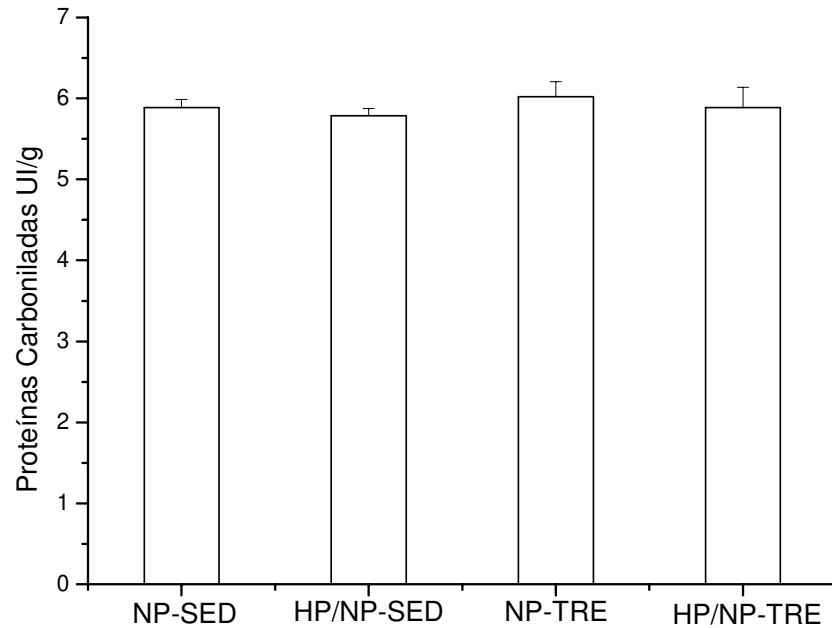


Figura 3 – Proteínas Carboniladas no plasma dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou exercício. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

A figura 4 mostra que os animais controle treinado (NP-TRE), recuperados sedentários (HP/NP-SED) e recuperados treinados (HP/NP-TRE) tiveram aumento nos TBARs em relação ao grupo controle (NP-SED), após 60 dias de recuperação e/ou treinamento por corrida em esteira.

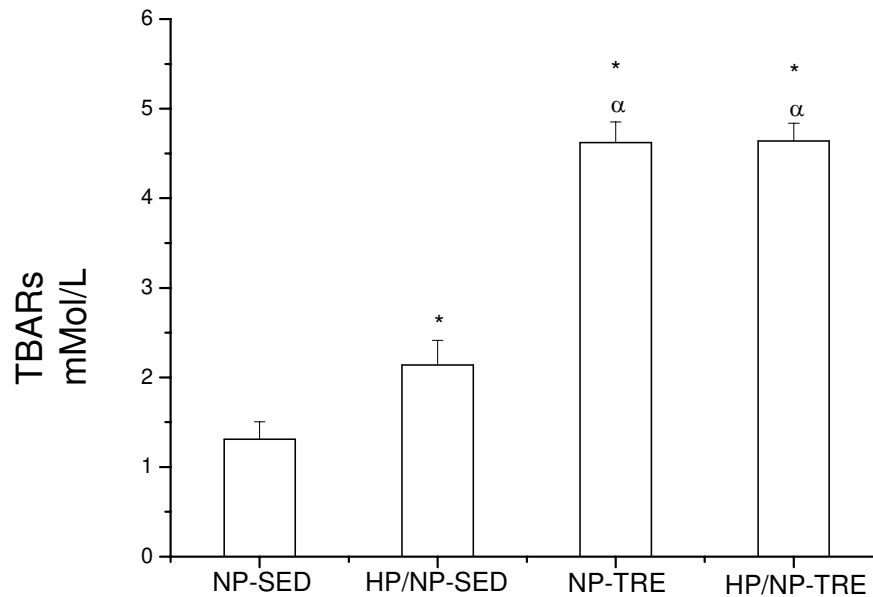


Figura 4 – TBARs no plasma dos ratos após 60 dias de recuperação nutricional e/ou treinamento físico por corrida. Resultados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo. As siglas são as mesmas da Tabela 2. (*) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao controle sedentário (NP-SED). (α) Diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA) em relação ao recuperado sedentário (HP/NP-SED).

Francisco José Andriotti Prada
Doutorando

Maria Alice Rostom de Mello
Orientadora