

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



RENATO BUSCARIOLLI DE OLIVEIRA

**“SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE, HISTOLOGIA E ECG
DO CORAÇÃO DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS A UM
PROTOCOLO DE *OVERTRAINING* EM ESTEIRA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RENATO BUSCARIOLLI DE OLIVEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Hohl

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

OL42s

Oliveira, Renato Buscariolli de

Sistema de defesa antioxidante, histologia e ECG do coração de ratos Wistar submetidos a um protocolo de *overtraining* em esteira / Renato Buscariolli de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Denise Vaz de Macedo, Rodrigo Hohl.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Overtraining*. 2. Ratos Wistar. 3. Miocárdio. 4. Estresse oxidativo. 5. Teste de esforço. I. Macedo, Denise Vaz de, 1959-. II. Hohl, Rodrigo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Antioxidant defense system, histology and ECG of Wistar heart rats submitted to an overtraining protocol in treadmill.

Palavras-chave em inglês: Overtraining; Wistar rats; Myocardium; Oxidative stress; Exercise test.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Denise Vaz de Macedo, Fernanda Kein Marcondes; Patricia Chakur Brum.

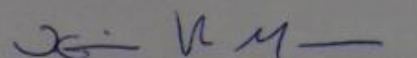
Data da defesa: 28/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

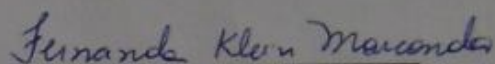
Campinas, 28 de Janeiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

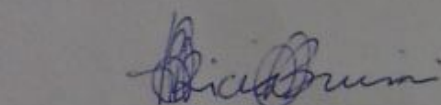
Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes


Assinatura

Profa. Dra. Patricia Chakur Brum


Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

“Aquilo que você acredita você pode alcançar” – Autor desconhecido

Agradecimentos

Dedico este trabalho, que simboliza o término de uma fase importante da minha vida a todos que de alguma forma contribuíram para o seu desenvolvimento.

Começo agradecendo a DEUS, que mais uma vez me deu a oportunidade de poder evoluir neste plano espiritual. Em segundo lugar, agradeço a minha família, meu porto seguro, sem a qual eu não conseguiria atingir nenhum dos meus sonhos. Obrigado pai, obrigado mãe, obrigado Ricardo e obrigado Rogério. Vocês foram e são fundamentais em minha vida. Que nossa união se mantenha sólida e inabalável pelo resto de nossa jornada. Só vocês sabem o que passei (ou melhor, passamos) para chegar até aqui. Obrigado pelo apoio incondicional. Não posso esquecer-me de você vovó Leonor, pelos ensinamentos e lições de vida.

Passada a parte familiar, agradeço as pessoas que marcaram a minha infância e adolescência com tal magnitude que me levaram a escolher o curso de Educação Física como profissão. Se não fossem vocês, eu não estaria aqui. Obrigado Dorival Cieni (grande “Xeine”), meu primeiro professor de futebol. Com muito amor, carinho, sabedoria e dedicação, mostrou que vida é feita de valores e que o futebol é um instrumento fantástico para ensiná-los. Contigo conheci o amargo sabor da derrota e o viciante sabor da vitória. Descanse em paz meu mestre. Agradeço também ao senhor Hugo Teixeira, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de cursar todo o Ensino Fundamental e o Ensino Médio com bolsa em sua instituição (Instituto de Ensino Sant’anna). Agradeço também ao Diogo Ponzo (“seu Diogo”) que mostrou a mim que nem sempre o conhecimento é o mais importante na relação professor-aluno (ou mesmo técnico-jogador) e que a sinceridade e a honestidade são valores irrefutáveis a um ser humano que se preze.

Agradeço à Instituição UNICAMP que me acolheu, me alimentou (foram anos de frequência assídua ao “bandeirão”) e me deu a oportunidade de evoluir intelectualmente, permitindo que eu me tornasse um ser humano mais crítico. Contudo, o mais importante agradecimento que faço à UNICAMP é o de ter possibilitado conhecer as pessoas que citarei a seguir.

Assim, agradeço ao Grupo Labex (Laboratório de Bioquímica do Exercício) do qual faço parte. Dentro deste, em primeiro lugar, agradeço à “chefe”: Dra. Denise Vaz de Macedo, por ter me dado a oportunidade de entrar no “mundo da pesquisa” e poder fazer parte deste grupo maravilhoso, no qual todos têm participação ativa e contribuem para a construção do conhecimento. Admiro muito a sua pessoa: são poucos os que conseguem coordenar e liderar um grupo desta envergadura da forma harmônica e eficiente que você o faz. O Labex é o que é hoje graças à sua competência e ao amor para com seus orientandos. Muito obrigado pelas conversas e “puxões de orelha”: a senhora sempre foi muito justa comigo.

Em segundo lugar, agradeço ao meu orientador, Dr. Rodrigo Hohl. Rodrigão, agradeço imensamente a oportunidade de ter te conhecido. Este trabalho é fruto da sua dedicação como orientador e eu tenho muito orgulho daquilo que produzimos em conjunto. Você me orientou não apenas academicamente, mas para a vida. Com você mudei algumas “filosofias de vida”, passei a enxergar tudo de um modo diferente. Tenho plena consciência de que muito do que sou hoje, devo a você. Quantas vezes discutimos acerca de filmes, livros, músicas, fisiologia, treinamento, bioquímica, religião, futebol, mulheres, etc. Como foram proveitosos todos esses dias! Infelizmente você não estará presente na consumação deste projeto de vida, mas tenha plena consciência que darei o meu máximo para defender este trabalho com a dignidade que ele merece. Gostaria imensamente de continuar sendo orientado por ti em meu doutorado. O desafio agora será mantermos a mesma qualidade em uma nova área, com um projeto totalmente diferente. Aceita o desafio?

Ainda no grupo Labex, agradeço o convívio e o aprendizado a todos nos últimos anos. Obrigado Prof. René (um divisor de águas no Labex), Prof. Armindo (ser humano formidável), Lázaro (o “cara” das análises clínicas e amigo de todos do Labex), Lucas (o “cara” do Labex Atletismo), Fernanda (sempre aprendo muito contigo), Mirtes (companheira da bola e das resenhas), Paulo (gosto muito de ti parceiro!), Danilo (o “cara” da bancada), Rubinho (lado a lado nos experimentos), Mário (saudades das nossas conversas sobre a vida), Charles e Bernardo (os “caras” do treinamento), Ana Porto (valeu pela força e auxílio), Kell (amigo novo e ferrenho adversário nas “peladas” da vida), Cadu, Fernando e Júlia (“bixos” do Labex que sempre trazem novas energias),

Ricardo (parceiro da bola e da prática de BB-110), Carol (gosto muito de ti querida e desejo muita saúde para o Gustavinho), Renatinho (outro aficionado em futebol) e Flaviani (parceira de BB-110). Obrigado a todos!

Quero usar este parágrafo para realizar um agradecimento especial aos grandes amigos que de maneira ou outra ocupam um lugar especial no meu coração: Fernando Catanho, Gustavo Barbosa, João Paulo, Lucas Bedotti, Rafael Reis, Thiago Lourenço e William Sander. Parceiros, muito obrigado por tudo que já passamos e que ainda haveremos de passar juntos. Com vocês conheci a essência da amizade verdadeira, aquela em que o companheiro não apenas auxilia e consola nos momentos de dificuldade, mas que sinceramente fica feliz e vibra pelo sucesso e conquistas do outro. Minha vida não teria o mesmo sabor sem a amizade de vocês. Obrigado amigos e que assim permaneçamos pelo resto de nossas vidas, independente do que aconteça conosco.

Por fim, gostaria de mencionar e agradecer pessoas/instituições ilustres (extra-labex) que estiveram presentes nesta jornada acadêmica. Obrigado companheiros do Paulínia Futebol Clube pelo aprendizado e discussões sobre a bola. Forte abraço para o Prof. Dr. Alcides Scaglia (estaremos juntos no Doutorado?), Evaristo, Cristian, Flavinho, Thiago Russo, Reiner e tantos outros...valeu! Forte abraço também para os companheiros de Ponte Preta: Rodrigo Iralah (diferenciado), Gustavo Querido (quase não dorme), Guilherme Muller, Ricardo (baby), Caio, Vinicius, Fernando Salles e tantos outros...valeu! Abraços também ao Muca (você é muito “gente boa” parceiro!), Ferreira (parceiro), Joyce, Olívia, Osvaldo, Mion, Cidão, etc. Acho que terminei a parte de agradecimentos. Acredito que faltam muitos nomes, mas aprendi que o que vale é a intenção. Ah, como não poderia deixar de ser, agradeço também à Fapesp, que fomentou e possibilitou a concretização deste projeto (07/57511-6).

Gostaria de finalizar os agradecimentos com duas músicas que muito me tocam e que me servem de inspiração em cada amanhecer. A primeira “Tá escrito” é interpretada pelo Grupo Revelação e a segunda “Eu só peço a Deus” eternizada nas vozes de Beth Carvalho e Mercedes Sosa. Recomendo que ouça, independente do gosto musical. Se você conseguiu ler até aqui: Parabéns! Esta linha é especialmente

para agradecer a você que teve paciência de ler esta parte geralmente negligenciada nas teses e dissertações e que eu julgo tão importante!

Tá escrito – REVELAÇÃO

Quem cultiva a semente do amor
Segue em frente não se apavora
Se na vida encontrar dissabor
Vai saber esperar sua hora

Às vezes a felicidade demora a chegar
Aí é que a gente não pode deixar de sonhar
Guerreiro não foge da luta não pode correr
Ninguém vai poder atrasar quem nasceu pra vencer

É dia de sol mas o tempo pode fechar
A chuva só vem quando tem que molhar
Na vida é preciso aprender, se colhe o bem que plantar
É Deus quem aponta a estrela que tem que brilhar

Erga essa cabeça, mete o pé e vai na fé
Manda essa tristeza embora
Basta acreditar que um novo dia vai raiar
Sua hora vai chegar

Eu só peço a Deus - Beth Carvalho e Mercedes Sosa

Eu só peço a Deus
Que a dor não me seja indiferente
Que a morte não me encontre um dia
Solitário sem ter feito o que eu queria

Eu só peço a Deus
Que a injustiça não me seja indiferente
Pois não posso dar a outra face
Se já fui machucada brutalmente

Eu só peço a Deus
Que a guerra não me seja indiferente
É um monstro grande e pisa forte
Toda fome e inocência dessa gente

Eu só peço a Deus
Que a mentira não me seja indiferente
Se um só traidor tem mais poder que um povo
Que este povo não esqueça facilmente

Eu só peço a Deus
Que o futuro não me seja indiferente
Sem ter que fugir desenganando
Pra viver uma cultura diferente

BUSCARIOLLI, Renato. **Sistema de defesa antioxidante, histologia e ECG do coração de ratos *Wistar* submetidos a um protocolo de *overtraining* em esteira**. 2011. Tese de Mestrado – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RESUMO

O recurso do treinamento intensificado é comum no esporte de alto rendimento, uma vez que pode levar ao aumento no desempenho previamente atingido em um curto espaço de tempo. Esse treino pode ser manipulado através de aumentos substanciais nas cargas, duração, frequência, intensidade e, principalmente, pela redução do período regenerativo. Por outro lado, já está bem documentado que essa intervenção pode resultar em perda do nível de desempenho anteriormente atingido. Embora existam diferentes nomenclaturas para descrever essa perda do desempenho em indivíduos previamente bem adaptados, utilizamos aqui a posição adotada em 2006 pelo Colégio Europeu de Ciências do Esporte, que denominou o período de treinamento intensificado de *overtraining* (OT) e os possíveis estados, de manutenção ou eventual melhora no desempenho de *Overreaching* Funcional (FOR), e de queda no desempenho de *Overreaching* Não Funcional (NFOR). Devido às limitações de se estudar o OT em seres humanos, desenvolvemos um protocolo em esteira para modelo animal (ratos *Wistar*) que gera os estados FOR e NFOR após um período de adaptação ao treinamento (TR). O objetivo do presente trabalho foi verificar qual a relação entre o estado do miocárdio e o nível de desempenho dos animais frente ao protocolo de OT. Para tanto, determinamos indiretamente a presença ou não de estresse oxidativo (EO) bem como alterações teciduais e eletrofisiológicas que pudessem mostrar prejuízo da função cardíaca. Assim, além do acompanhamento longitudinal do eletrocardiograma (ECG), ao término do protocolo foi feita análise histológica (Hematoxilina-Eosina/*Sirius Red*); quantificação de células apoptóticas (TUNEL - marcador de apoptose), dosagem de TBARS (marcador de peroxidação lipídica), e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR). Nossos resultados mostraram que não houve alterações nos parâmetros eletrocardiográficos ao longo do protocolo, nem nas análises histológicas e na dosagem de TBARS realizadas em cada um dos grupos de animais. A GR apresentou aumento significativo nos animais que treinaram (TR, FOR e NFOR) frente ao grupo controle (CO) enquanto a SOD, CAT e apoptose aumentaram de forma significativa somente no grupo NFOR. A manutenção dos níveis de TBARS e a ausência de alterações morfológicas ou eletrofisiológicas que poderiam comprometer a atividade contrátil do coração sugerem que o miocárdio adaptou-se positivamente ao treinamento mesmo no grupo NFOR. Todavia, o aumento da apoptose e das enzimas SOD e CAT no NFOR, sugerem uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) neste grupo, que estaria mais susceptível a instalação de um quadro de estresse oxidativo. Portanto, apesar da queda de desempenho do grupo NFOR estar associada a outros fatores que não apenas o comprometimento do miocárdio, nossos dados apontam que a atividade física regular com alto volume deve ser conduzida com cautela e com avaliação periódica da função cardíaca.

Palavras-Chaves: *overtraining*, ratos *Wistar*, miocárdio, estresse oxidativo, teste de esforço

BUSCARIOLLI, Renato. **Antioxidant defense system, histology and ECG of *Wistar* heart rats submitted to an overtraining protocol in treadmill.** 2011. Tese de Mestrado – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ABSTRACT

The use of intensified training is common in high level sport, since it can lead to increases in the performance previously achieved. This training can be manipulated through substantial increases in loads, duration, frequency, intensity, and mainly by reducing the regeneration period. On the other hand, is well documented that this intervention may result in loss of the performance level previously attained. Although there are different classifications to describe this loss of performance in athletes previously well-adapted, we used here the position adopted in 2006 by the European College of Sport Science, which called the period of intensified training of overtraining (OT) and the possible states of maintenance or improvement in the performance of Functional Overreaching (FOR), and decrease in performance of Nonfunctional Overreaching (NFOR). Due to the limitations of studying the phenomenon of the OT in human beings, we developed an animal treadmill model (*Wistar* rats) that takes to the states FOR and NFOR after a period of adaptation to the training (TR). The objective of the present work was to verify the relation between the state of the myocardium and the performance level of the animals submitted to the OT protocol. So, we indirectly determined the presence or not of oxidative stress (EO) in the myocardium, as well as tissue and electrophysiological alterations that could harm the cardiac function. Therefore, we made the longitudinal accompaniment of electrocardiogram (ECG) and in the end of the protocol we made the histological analysis (HE/Sirius Red); the quantification of apoptotic cells (TUNEL), dosage of TBARS (marking of lipid per oxidation) and we measured the activity of the following antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione redutase (GR). Our results had shown that there are no alterations in the electrocardiographic parameters (ECG), in the histological analyses and in the dosage of TBARS. The GR presented a significant increase in the animals that had trained (TR, FOR and NFOR) compared to Control Group (CO) while SOD, CAT and apoptosis had significant increase only in the NFOR. The maintenance of the TBARS levels and the absence of morphologic or electrophysiological alterations that could compromise the contractile activity of the heart, indicate that the myocardium was positively adapted to the training even in NFOR. However, the increase in enzymes SOD and CAT, and the increase of apoptosis in the NFOR, indicates that the production of reactive oxygen species (EROS) seems to be greater in this group, being imminent the installation of EO. Therefore, despite the drop in NFOR performance be associated with other factors than just the involvement of the myocardium, our data show that regular physical activity with high volume should be conducted with caution and with regular assessment of cardiac function.

Keywords: overtraining, *Wistar* rats, myocardium, oxidative stress, exercise test

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organograma da divisão e sacrifício dos grupos experimentais.....	23
Figura 2 -	Histograma das inclinações dos grupos NFOR e FOR.....	24
Figura 3 -	Linearidade do método enzimático da catalase.....	30
Figura 4 -	Linearidade do método enzimático da glutathione redutase.....	32
Figura 5 -	Relação entre xantina oxidase, SOD e $O_2^{\bullet-}$	32
Figura 6 -	Padronização SOD.....	33
Figura 7 -	Linearidade da curva padrão com TMP para ensaio de TBARS.....	35
Figura 8 -	Linearidade do método enzimático para dosagem de TBARS.....	35
Figura 9 -	Padronização TUNEL.....	37
Figura 10 -	Representação esquemática de um <i>boxplot</i>	39
Figura 11 -	Desempenho dos grupos CO, TR, FOR e NFOR.....	40
Figura 12 -	Histologia básica (HE, 40x) dos grupos experimentais.....	43
Figura 13 -	Histologia básica (<i>Sirius Red</i> , 40x) dos grupos experimentais.....	44
Figura 14 -	<i>Boxplot</i> da CAT, SOD, GR e TBARS no VE dos grupos.....	47
Figura 15 -	Índice apoptótico nos diferentes grupos experimentais.....	48
Figura 16 -	ECGs do rato utilizado no estudo de caso.....	71
Figura 17 -	Desempenho do animal com extrassístole.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela I -	Protocolo de indução ao overtraining.....	20
Tabela II -	Protocolo do teste de desempenho.....	22
Tabela III -	Ensaio enzimático realizado para padronização da CAT.....	29
Tabela IV -	Padronização CAT. CV Médio das triplicatas.....	29
Tabela V -	Ensaio enzimático realizado para padronização da GR.....	31
Tabela VI -	Padronização GR. CV Médio das triplicatas.....	31
Tabela VIIA -	Análise intra-grupo do ECG. Grupo Controle.....	42
Tabela VIIB -	Análise intra-grupo do ECG. Grupo FOR.....	42
Tabela VIIC -	Análise intra-grupo do ECG. Grupo NFOR.....	42
Tabela VIII -	Área de colágeno (%) no ventrículo esquerdo (VE).....	44
Tabela IX -	Peso Corporal, Peso do Coração e Razão.....	45
Tabela X -	Área de secção transversal do cardiomiócito do VE.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF – Fator de indução à apoptose
ARC – Repressor de apoptose com sítio de ligação para caspases
CAT – Catalase
CO – Grupo Controle
CTE – Cadeia transportadora de elétrons
 Cu^{2+} - Íon Cobre
Cu -Zn-SOD – Superóxido Dismutase Citosólica
CV – Coeficiente de variação
ECG – Eletrocardiograma
ECO - Ecocardiograma
EO – Estresse oxidativo
Eo – Potencial redox
ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FC - Frequência cardíaca
 Fe^{2+} - Íon Ferro
FOR – *Overreaching* Funcional
GPX – Glutathione Peroxidase
GR – Glutathione Redutase
GSH – Glutathione Reduzida
GSSG – Glutathione Oxidada
GV – Gastrocnêmio vermelho
 H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio
HE – Hematoxilina e Eosina
HOCl – Ácido Hipocloroso
HSP – *Heat Shock Proteins*
HVE - Hipertrofia do ventrículo esquerdo
IC – Intervalo de Confiança
 K_m – Constante de Michaelis-Menten
MAPKs - *Mitogen-activated protein kinases*
Mn-SOD – Superóxido Dismutase Mitocondrial
mtDNA – DNA mitocondrial
NF-kB – Fator nuclear kB
NFOR – *Overreaching* Não Funcional
NO - Óxido nítrico
 NO_2^- - Dióxido de nitrogênio
NOS – Óxido Nítrico Sintase
 O_2 – Oxigênio
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ - Ânion superóxido
 $\bullet\text{OH}$ – Radical Hidroxila
 ONOO^- - Ânion peroxinitrito
ONOOH – Ácido peroxinitroso

OT – *Overtraining*
OTS - Síndrome do *Overtraining*
RL – Radicais Livres
SOD – Superóxido Dismutase
T1 – Teste de desempenho 1
T2 - Teste de desempenho 2
T3 – Teste de desempenho 3
T4 – Teste de desempenho 4
T5 – Teste de desempenho 5
T6 – Teste de desempenho 6
T2x – Treinamento com 2 sessões de exercícios diários
T3x – Treinamento com 3 sessões de exercícios diários
T4x – Treinamento com 4 sessões de exercícios diários
TA1 – Treinamento adaptativo 1
TA 2 – Treinamento adaptativo 2
TBA - Ácido 1 – tiobarbitúrico
TBARS – Marcador de peroxidação lipídica
TMP - Tetrametoxipropano
TNF – Fator de necrose tumoral
TR – Treinado
VD – Ventrículo direito
VE - Ventrículo esquerdo
Vmax – Velocidade máxima
VO₂max - Consumo máximo de oxigênio
XOD – Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Produção de radicais livres e exercício.....	3
1.2. Sistema de defesa antioxidante.....	6
1.3. Alterações no estado redox do miocárdio induzidas pelo exercício crônico.....	8
1.4. Adaptações no miocárdio induzidas pelo exercício: aspectos gerais e.....	11
1.5. Teoria da supercompensação x <i>overtraining</i>	14
1.6. Modelo Animal de OT.....	16
1.7. Hipótese do trabalho.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais.....	20
3.2. Protocolo de indução ao <i>overtraining</i>	20
3.3. Teste de desempenho.....	21
3.4. Quantificação do desempenho.....	22
3.5. Grupos de animais.....	22
3.6. Seleção dos grupos de animais.....	23
3.7. Eletrocardiograma.....	25
3.8. Histologia.....	26
3.8.1. Anestesia.....	26
3.8.2. Preparação da amostra.....	26
3.8.3. Hematoxilina e Eosina (HE).....	26
3.8.4. Picrossírius (<i>Sirius Red</i>).....	27
3.8.5. Morfometria.....	27
3.9. Análises Bioquímicas.....	27
3.9.1. Preparação da amostra.....	27
3.9.2. Análise de confiança das técnicas.....	28
3.9.3. Catalase.....	28
3.9.4. Glutathione Redutase.....	30

3.9.5. Superóxido Dismutase.....	32
3.9.6. Produto de Ataque Oxidativo – TBARS.....	34
3.10. Índice Apoptótico – TUNEL.....	36
3.11. Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Desempenho.....	40
4.2. Eletrocardiograma.....	41
4.3. Histologia.....	43
4.3.1. Hematoxilina e Eosina (HE).....	43
4.3.2. Picrossírius (<i>Sirius Red</i>).....	44
4.3.3. Morfometria.....	45
4.4. Análises bioquímicas.....	46
4.5. Índice Apoptótico – TUNEL.....	48
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59
8. ANEXOS.....	71
8.1. Estudo de caso.....	71
8.2. Declaração de ética no uso de animais.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção de radicais livres e exercício

As células de organismos aeróbios obtêm a energia necessária para sua atividade biológica a partir da oxidação de substratos energéticos, tais como carboidratos, lipídeos e proteínas, usando o oxigênio (O_2) comoceptor final de elétrons. A molécula de O_2 em seu estado diatômico é uma espécie com alto poder oxidante ($E_o = 0,82\text{mV}$), o que é fundamental para o processo de obtenção de energia através da fosforilação oxidativa mitocondrial.

Pelo fato de possuir dois elétrons desemparelhados localizados em orbitais distintos, o O_2 é classificado como uma espécie radicalar, mais especificamente um birradical de estado triplete (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Estes elétrons possuem spins paralelos e compartilham o mesmo número quântico. Conseqüentemente, apesar do seu alto potencial oxidante possui reatividade moderada, uma vez que de acordo com o princípio de exclusão de *Pauli*, o O_2 apenas receberá um par de elétrons de outra molécula caso estes possuam spins que necessariamente sejam antiparalelos aos já existentes na molécula de O_2 . Como isto raramente acontece o O_2 reage lentamente na ausência de um fator catalítico, e tende a receber elétrons de forma individual durante sua redução, gerando moléculas intermediárias instáveis e altamente reativas, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROS) (LEEUEWENBURGH & HEINECK, 2001).

EROS é um termo geral que inclui não apenas as espécies radicalares derivadas do O_2 como também as espécies não radicalares (i.e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) ou O_2 singlete). Por outro lado, denominam-se radicais livres (RL) as moléculas ou fragmentos de moléculas que não necessariamente derivam do oxigênio e que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Ou seja, todas as espécies com elétrons desemparelhados derivadas do O_2 são RL, mas nem todas as EROS são RL (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; FINAUD et al., 2006).

Radicais livres e EROS reagem rapidamente com a molécula estável mais próxima, capturando o elétron necessário para ganhar estabilidade estrutural química.

Assim, podem lesar componentes celulares vitais tais como ácidos nucleicos, membranas celulares e mitocôndrias, podendo levar à morte celular (BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007).

Postula-se que no miocárdio em uma situação de repouso, cerca de 1 a 5% do O_2 consumido pelas mitocôndrias são convertidos em EROS, tais como, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) (ASCENSÃO et al., 2007; LEEUWENBURGH & HEINECK, 2001; CHANCE et al., 1979).

Durante o exercício ocorre uma maior produção de EROS pelos músculos esqueléticos, em virtude do aumento na taxa metabólica (ASCENSÃO et al., 2007; RADACK et al., 2001; RADACK et al., 1999; ALESSIO & GOLDFARB, 1988; DAVIES et al., 1982). Todavia, há poucas evidências diretas de que este aumento seja decorrente da produção mitocondrial (LEEUWENBURGH & HEINECK, 2001). Neste sentido, outras fontes de RL e EROS foram sugeridas no exercício: via da xantina oxidase (XOD), NADPH Oxidase, via da Óxido Nítrico Sintase (NOS) e auto-oxidação de catecolaminas, catalisada por íons metálicos (REID, 2001).

A espécie reativa primária gerada nas células musculares e cardíacas tanto no repouso quanto no exercício é o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formado a partir do ganho de um único elétron pela molécula de O_2 (POWERS et al., 2009; JACKSON et al., 2007). A produção de $O_2^{\bullet-}$ pode ocorrer em diversos locais no interior das células, incluindo as mitocôndrias, retículo sarcoplasmático, túbulos transversos, sarcolema e citosol.

Nas mitocôndrias os principais sítios de produção de $O_2^{\bullet-}$, são os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (BARJA, 1999). No retículo sarcoplasmático, túbulos transversos e sarcolema o principal responsável por esta produção parece ser o sistema das NADPH oxidases, enquanto no citosol a xantina oxidase parece apresentar maior relevância, especialmente no músculo de ratos (POWERS et al., 2009; GOMEZ-CABRERA et al., 2008). Uma vez formado o $O_2^{\bullet-}$ é prontamente dismutado a H_2O_2 em um processo que pode ocorrer de forma espontânea ou através da ação de um grupo de enzimas denominado superóxido dismutase (SOD) (POWERS et al., 2009).

O H_2O_2 é uma espécie não radicalar e dessa forma um agente oxidante fraco, mas com uma meia-vida relativamente longa. Isso permite sua difusão entre as células e interação com diversas moléculas (POWERS et al., 2009). Em uma dessas interações, o H_2O_2 pode reagir com metais reduzidos (Fe^{2+} , Cu^{2+}) gerando o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), espécie radicalar mais reativa que conhecemos, uma vez que não há mecanismo de defesa específico para ela. O $\bullet\text{OH}$ tem sido postulado como o maior responsável por danos gerados em proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA devido a sua alta instabilidade. Todavia, há poucas evidências diretas de que este radical seja produzido em meios biológicos, principalmente devido a sua meia vida muito curta (LEEUEWENBURGH & HEINECK, 2001).

Além de gerar H_2O_2 , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ quando reage com o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) produz outra espécie altamente reativa: o peroxinitrito (ONOO^-), classificado como uma espécie reativa do nitrogênio (ERN). O peroxinitrito pode ser protonado produzindo o ácido peroxinitroso (ONOOH), altamente instável, que irá se decompor em $\bullet\text{OH}$ e dióxido de nitrogênio (NO_2^-).

O $\bullet\text{NO}$ é sintetizado a partir do aminoácido arginina por diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e apresenta uma importante função como sinalizador intracelular (POWERS et al., 2009). Durante o exercício há um aumento exponencial do $\bullet\text{NO}$, favorecendo sua interação com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, portanto, a formação de ONOO^- . O ONOO^- parece estar ligado à depleção de grupos tiólicos e redução da biodisponibilidade de $\bullet\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$, alterando uma série de cascatas de sinalização (POWERS & JACKSON, 2008; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Apesar do papel deletério das EROS, ERN e RL, evidências mostram que estas moléculas também desempenham um papel fisiológico importante na resposta imune do organismo, na regulação redox da transcrição, na sinalização celular e na regulação da atividade enzimática (VOLLAARD et al., 2005). Ou seja, as EROS, ERN e RL são produtos do metabolismo celular que possuem um duplo papel. Podem tanto ser nocivos quanto benéficos para o organismo. Tudo aparentemente depende da manutenção de um equilíbrio entre formação e remoção.

A proteção do efeito nocivo das EROS é feito por um complexo sistema de defesa, que inclui antioxidantes enzimáticos e de baixo peso molecular, não-enzimático.

1.2. Sistema de defesa antioxidante

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que ajuda a reduzir a gravidade dos danos oxidativos gerados pelos RL, EROS e ERN. Esta função pode ser exercida através de duas formas: pela formação de espécies reativas menos ativas ou pela extinção das reações em cadeia responsáveis pela síntese destes compostos (FINAUD et al., 2006).

O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em enzimático (endógeno) e não-enzimático, obtido principalmente da alimentação. As enzimas antioxidantes incluem a SOD, a catalase (CAT) e o sistema glutathione peroxidase (GPX) / glutathione reductase (GR). Os antioxidantes não-enzimáticos incluem uma série de substâncias que neutralizam os RL e as EROS pela capacidade de doar elétrons a estes, sendo os mais conhecidos: vitamina A (Retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), flavonóides, grupos tiólicos, ácido úrico, bilirrubina, ferritina e micronutrientes (ferro, cobre, zinco, selênio, manganês) (FINAUD et al., 2006).

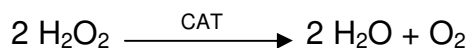
A SOD possui a função de proteção contra os danos gerados pelo $O_2^{\bullet-}$ e é considerada a primeira linha de defesa do sistema de defesa antioxidante enzimático. SOD representa um grupo de enzimas que catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e a seqüente formação de H_2O_2 .



Em todas as células, no repouso, a maior parte do $O_2^{\bullet-}$ produzido pela mitocôndria é dismutado pela SOD mitocondrial (Mn-SOD). O restante difunde-se no citosol, onde sofre a ação da isoforma da SOD dependente de cobre e zinco (Cu-Zn-SOD) (FINAUD et al., 2006). A Cu-Zn-SOD é particularmente estável e parece resistir a variações de pH enquanto a Mn-SOD é mais sensível (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A CAT está presente em todas as células eucarióticas, e em particular nos peroxissomos, estruturas celulares que usam o O_2 para neutralizar substâncias nocivas

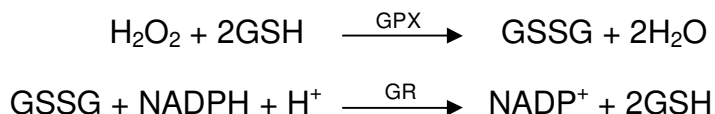
e produzir H_2O_2 . A CAT é uma enzima que possui quatro subunidades em sua estrutura e converte H_2O_2 em água e O_2 (FINAUD et al., 2006).



É importante ressaltar que a CAT tem participação efetiva na detoxicação do H_2O_2 quando há um aumento significativo nas concentrações intracelulares deste composto, uma vez que o k_m da enzima é alto (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A GPX presente no citosol da célula e nas mitocôndrias também tem a capacidade de transformar o H_2O_2 em água. Quando comparada à CAT, a GPX possui uma maior capacidade de remoção de H_2O_2 , atuando também na remoção de peróxidos lipídicos (URSINI & BINDOLI, 1987; CHANCE et al., 1979; COHEN et al., 1963). Há diversas isoformas de GPX nas células animais, sendo que esta é uma das raras enzimas que possuem selênio em sua estrutura (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A dismutação catalisada pela GPX utiliza glutathiona reduzida (GSH), que é transformada em glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG por sua vez é reduzida novamente a GSH através da enzima glutathiona redutase (GR), largamente presente nas células, e que utiliza NADPH como agente redutor, advindo principalmente da via das pentoses (FINAUD et al., 2006; GUL et al., 2006).



A GSH atua como um importante antioxidante intracelular, sendo que a razão GSH/GSSG parece ser o fator determinante para a manutenção do estado redox das células (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Além das enzimas supracitadas, podemos destacar o papel antioxidante das proteínas induzidas pelo calor “*heat shock proteins*” (HSP) assim como das peroxirredoxinas/tiorredoxinas. As HSP têm função de chaperonas, isto é, restauram proteínas não funcionais que foram modificadas, impedem a agregação de proteínas não funcionais e protegem proteínas funcionais de serem alteradas (STARNES & TAYLOR, 2007). Já as redoxinas são enzimas com baixo k_m , presentes em larga escala

nas células e responsáveis pela redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos em geral. Pertencem à família das peroxidases e são homodímeros sem grupo prostético, dependendo de cisteína no sítio-ativo para exercerem sua função catalítica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A eficiência do sistema de defesa antioxidante depende do estado nutricional (vitaminas e micronutrientes) e da atividade enzimática endógena, que pode ser modulada pelo exercício, treinamento, alimentação e idade (FINAUD et al., 2006). Neste sentido, a atividade física regular (especialmente exercícios de *endurance*), tem se mostrado eficaz no aumento da capacidade de defesa antioxidante.

Em relação ao coração, o exercício de *endurance* é tido como uma medida efetiva na proteção contra danos cardíacos, sendo considerada a única ferramenta aplicável de maneira sustentável para obtenção da cardioproteção frente ao aumento na concentração de EROS (KAVAZIS, 2009; ASCENSÃO et al., 2007).

1.3. Alterações no estado redox do miocárdio induzidas pelo exercício crônico

É sabido que a realização regular de exercícios de *endurance* induz um efeito cardioprotetor consistente contra danos gerados por eventos de isquemia-reperfusão (FRENCH et al., 2008). Apesar do efeito cardioprotetor induzido pelo exercício ter sido descrito pela primeira vez em 1978 (McELROY et al., 1978), a busca pelos mecanismos responsáveis continua sendo um tópico de debate. As principais propostas para elucidar este fenômeno estão relacionadas a alterações no estado redox celular e incluem aumento nas proteínas HSP e melhora na capacidade de defesa antioxidante (ASCENSÃO et al., 2007; STARNES & TAYLOR, 2007). Alguns trabalhos sugerem ainda que as adaptações intrínsecas da mitocôndria (mudança na estrutura e densidade dos poros de transição de permeabilidade), aumento de fatores anti-apoptóticos (repressor de apoptose com sítio de recrutamento para caspases (ARC)), diminuição de fatores pró-apoptóticos (citocromo c e fator de indução à apoptose (AIF)) e o aumento na taxa de proliferação celular, também devem ser considerados mecanismos importantes neste contexto (KOLWICZ et al., 2009; KAVAZIS et al., 2008).

O miocárdio é um tecido extremamente oxidativo, e apresenta um elevado consumo de oxigênio basal, especialmente em ratos, que possuem alta frequência

cardíaca (GUL, et al., 2006; MORAN et al., 2004; BEJMA et al., 2000; POWERS et al., 1993). Durante o exercício intenso o consumo de O_2 pode aumentar em mais de quatro vezes, potencializando a produção de EROS (GUL et al., 2003; WILMORE & COSTILL, 1999). As duas principais características do miocárdio que contribuem de forma direta para uma produção de EROS aumentada são (1) a alta densidade mitocondrial e (2) a alta tensão de oxigênio nas mitocôndrias (ASCENSÃO et al., 2007).

O miocárdio é um tecido pós-mitótico. Apresenta uma capacidade limitada de aumento na atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante se comparado a tecidos com maior capacidade proliferativa e oxidativa, como o caso do fígado (JI, 2000). Comparado ao músculo esquelético o coração possui uma maior [GSH] e também maior razão GSH/GSSG (Liu et al., 2000). A atividade absoluta das enzimas antioxidantes e de antioxidantes não enzimáticos é maior no miocárdio, evidenciando uma maior proteção intrínseca deste tecido frente ao músculo esquelético (JI, 2000; Gul et al. (2006)). Segundo Atalay & Sen (1999), o exercício físico regular parece otimizar o sistema de defesa antioxidante cardíaco e promover uma melhora funcional global. Todavia, há na literatura uma grande variabilidade nas respostas destas enzimas frente a protocolos de *endurance* (para revisão, buscar referências em ASCENSÃO et al., 2007).

As principais justificativas elaboradas para a grande diversidade das respostas encontradas baseiam-se nas diferenças metodológicas entre os trabalhos, sendo as mais importantes: características dos protocolos de *endurance* utilizados, procedimentos bioquímicos, fração tecidual analisada, tempo decorrido entre a última sessão de treino e o sacrifício dos animais e os tipos de biomarcadores considerados (ASCENSÃO et al., 2007). A idéia de que os benefícios gerados pelo exercício regular no miocárdio são decorrentes do aumento no sistema de defesa antioxidante *per se* ainda está em debate. Aparentemente, independente das diferenças metodológicas citadas, nem sempre as adaptações ao treino de *endurance* no sistema de defesa antioxidante são efetivas (ASCENSÃO et al., 2007).

O estado redox é uma variável fisiológica dependente do balanço entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade de tamponamento antioxidante. O exercício de *endurance* sistematizado parece gerar duas respostas para manter o

equilíbrio: por um lado, aumenta a formação de EROS e provavelmente como consequência, aumenta a atividade de enzimas antioxidantes contribuindo para um estado de equilíbrio entre pró-oxidante/antioxidante (TIIDUS, 1998; SEN, 1995). Neste sentido, Reid et al. (1993) propuseram um modelo relacionando o estado redox da célula muscular com a produção de força, sugerindo a existência de um estado redox ótimo para geração de força.

O desequilíbrio entre a produção de EROS e sua eliminação, no sentido de aumento na concentração de EROS, é denominado estresse oxidativo (EO). O estresse oxidativo pode causar lesão tecidual e tem sido relacionado a um grande número de doenças crônico-degenerativas (BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007) bem como prejuízos na função cardíaca (TAYLOR et al., 2003) e muscular (REID et al., 1993). Peake et al., (2007) sugeriram que o aumento na produção de EROS inerente à atividade muscular intensa pode ser responsável pelo aumento dos danos musculares e subsequente propagação da resposta inflamatória, o que pode desencadear o processo de apoptose.

A apoptose depende da ativação de uma classe de proteinases denominadas de caspases. Geralmente é causada por fatores fisiológicos, e nem sempre está associada à instalação de um processo inflamatório. Especula-se que a apoptose induzida pelo exercício é um processo regulatório normal, com a função de remover células danificadas sem uma resposta inflamatória exacerbada. Neste contexto, alguns fatores que podem induzir apoptose são: aumento na secreção de glicocorticóides, aumento nas concentrações intracelulares de cálcio, aumento das EROS, aumento do fator de necrose tumoral (TNF) entre outros. Alguns autores destacam a importância da mitocôndria na regulação desse fenômeno (PHANEUF & LEEUWENBURGH, 2001).

Kavazis et al., (2008) mostraram que o treino de *endurance* gera um fenótipo de mitocôndria que se mostrou mais resistente contra o desencadeamento da apoptose do que de animais não treinados. Alguns trabalhos (JUDGE et al., 2005; VENDITTI et al., 1999) mostraram ainda que o treinamento pode levar a uma menor produção de EROS em virtude de um maior desacoplamento na cadeia de transporte de elétrons (CTE) e menor produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo complexo I da mitocôndria (STARNES et al., 2007).

Devido a sua íntima ligação com o estresse oxidativo, a apoptose pode ser utilizada como um indicativo celular não só do balanço entre fatores pró e anti-apoptóticos, mas também do balanço entre produção de radicais livres e sistema de defesa antioxidante, contribuindo para o estabelecimento do panorama do estado redox celular. Todavia, apesar da apoptose ter sido documentada após o exercício, os mecanismos responsáveis continuam desconhecidos (JIN et al., 2000).

Em suma, o treino de *endurance* parece induzir adaptações intrínsecas que otimizam a produção de ATP pela mitocôndria, aumentando a capacidade funcional do miocárdio (STARNES & TAYLOR, 2007). Simultaneamente, apesar da tendência de aumento na modulação de genes relacionados aos sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (ASCENSÃO et al., 2007), tanto o volume como a intensidade do treino parecem ser fundamentais na modulação desta resposta (POWERS et al., 1993).

1.4. Adaptações no miocárdio induzidas pelo exercício: aspectos gerais e ferramentas de avaliação

O coração sofre alterações morfológicas e funcionais em decorrência do processo de treinamento. Os aspectos clínicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos dessas alterações fisiológicas são conhecidos como “síndrome do coração de atleta” (CHEE et al, 2005). Essa se caracteriza pela hipertrofia biventricular e bradicardia associada à função diastólica e sistólica normal. As adaptações morfológico-estruturais ocorrem de acordo com o tipo de treinamento, e são identificadas em alterações no eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) (BRYAN et al., 1992). Similarmente, é sabido que no miocárdio de ratos o treinamento sistematizado leva a profundas alterações anatômicas, fisiológicas e metabólicas. A similaridade das respostas observadas em ratos e humanos indica que este modelo animal é válido para a transposição das adaptações cardiovasculares em humanos (FENNING et al., 2003).

Algumas das possíveis alterações do miocárdio frente ao exercício de *endurance* crônico incluem: aumento na massa cardíaca, aumento das câmaras ventriculares, aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo, aumento da oxidação de ácidos graxos, aumento na expressão da cadeia pesada de miosina e diminuição na

deposição de colágeno nos cardiomiócitos (SCHULTZ et al., 2007). Tais adaptações estruturais otimizam o processo contrátil, melhorando a capacidade funcional, traduzida em um maior volume sistólico e conseqüentemente maior débito cardíaco. (KAVAZIS, 2009; HAI BO, 2008, SCHULTZ et al., 2007; FENNING et al., 2003).

O débito cardíaco possui íntima relação com o desempenho, uma vez que interfere diretamente no transporte de oxigênio para os tecidos. Neste sentido, Bassett & Howley (2000) afirmaram que o principal fator na diferenciação do consumo máximo de oxigênio ($VO_2\text{max}$) entre indivíduos treinados e não treinados é o débito cardíaco, mais especificamente o volume sistólico, uma vez que tanto a frequência cardíaca como a extração de oxigênio pelos tecidos possuem menor variação entre estes sujeitos.

O ECG é o registro da atividade elétrica do coração e é afetado pela alteração da atividade iônica, determinada pelo status nutricional ou de hidratação, balanço eletrolítico, fluxo sanguíneo (isquemia), hipóxia, pH, mudanças estruturais como hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) e estimulação neurogênica ou autonômica (KING et al., 1995). Em ratos, a primeira descrição de um ECG de repouso foi realizada por Sambhi & White (1960). Em geral é similar, mas não idêntico ao ECG de humanos.

Os registros eletrocardiográficos realizados em ratos variam de acordo com o tipo de técnica de gravação utilizada, a qual está sujeita as variáveis como presença ou ausência de anestesia, tipo de agente anestésico, posição do animal durante o registro e características do amplificador (BESTETTI & OLIVEIRA, 1990; BESTETTI et al., 1987). A idade, peso, gênero e forma de contenção do animal são fatores que também precisam ser considerados para o registro e análise do ECG de roedores. O rato apresenta ECG de difícil interpretação patológica quando analisado isoladamente de forma não seriada, sendo geralmente utilizado como uma ferramenta diagnóstica complementar (BESTETTI & OLIVEIRA, 1990; BESTETTI et al., 1987).

As principais diferenças do ECG de ratos em relação ao homem são: alta frequência cardíaca (média = 400bpm), presença de contrações prematuras supraventriculares, arritmia sinusal, assimetria da onda T e ausência do segmento ST em decorrência da alta frequência cardíaca (FC) (BESTETTI & OLIVEIRA, 1990; BESTETTI et al., 1987). A onda Q pode apresentar-se de forma rudimentar ou ausente sendo que a onda S, por outro lado, é registrada em quase todas as derivações

(SAMBHI & WHITE, 1960). O eixo cardíaco mostra-se na posição vertical, indicando que o ápice do coração está próximo da linha média do esterno e pode ser calculado tendo-se como referências o complexo QRS, segundo orientação espacial do sistema hexaxial. Observou-se em ratos *Wistar* saudáveis valores de 0° a 90° semelhante ao eixo elétrico humano (BONILHA et al., 2005).

O ECO é uma importante ferramenta para identificar a morfologia do “coração de atleta” e diferenciá-la do “coração patológico”, principalmente quando existem dúvidas geradas por anormalidades no ECG (CHEE et al., 2005). Pelliccia et al. (2000) mostraram que na ausência de condições patológicas, o maior responsável pelas alterações no ECG seria o remodelamento morfológico induzido pelo treinamento físico, já que os atletas com as maiores anormalidades no ECG mostraram os maiores aumentos na luz, espessura das paredes e massa do ventrículo esquerdo (VE). Fenning et al., (2003) com a utilização de ECO mostraram que ratos submetidos ao treino de *endurance* de 12 semanas aumentaram o diâmetro diastólico interno do VE, volume sistólico e débito cardíaco sem aumento significativo da espessura da parede.

A histologia básica também desempenha um papel importante na detecção de alterações morfológicas, uma vez que pode ser utilizada para detecção de hipertrofia cardíaca e esteatose, além de indicar a presença de fibras colágenas e infiltrados celulares, marcadores de processo inflamatório localizado.

Em relação aos marcadores sanguíneos para detecção de alterações morfológicas do miocárdio, atualmente as Troponinas C e I são os analitos de escolha, uma vez que apresentam uma série de vantagens (i.e maior tempo de elevação e maior meia vida) frente a outros biomarcadores (i.e lactato desidrogenase, creatina quinase-MB e mioglobina) (BABUIN & JAFFE, 2005). As Troponinas possuem alta especificidade para lesões do miocárdio, mesmo em situações de danos significativos no músculo esquelético (RAJAPPA & SHARMA, 2005). Neste sentido, Neumayr et al (2001) demonstraram, utilizando a Troponina I, que atividades chamadas de *ultraendurance* causavam lesões subclínicas no miocárdio mesmo em atletas experientes.

Tulloh et al., (2006) associaram elevação da Troponina T e função ventricular esquerda anormal em triatletas, alertando sobre a necessidade de determinar a possível permanência destas seqüelas. Com o intuito de verificar se as adaptações morfológicas decorrentes do exercício de *endurance* poderiam atenuar o remodelamento intrínseco do miocárdio de ratos hipertensos, Schultz et al., (2007) concluíram que tanto o volume como a intensidade do treino são fundamentais na determinação de uma resposta fisiológica ou patológica do coração hipertenso. Neste trabalho (SCHULTZ et al., 2007), verificou-se que os animais que executaram um volume muito elevado de treino apresentaram maior deposição de colágeno no cardiomiócito com seqüente perda de função cardíaca, detectada por parâmetros mensurados no ECO. Neste caso, o treinamento prejudicou o débito cardíaco e os autores destacaram a necessidade de se controlar a carga do treino.

1.5. Teoria da supercompensação x *overtraining*

No processo de treinamento, para se aumentar o desempenho das capacidades físicas é necessário a modulação de variáveis como intensidade, duração e frequência do esforço durante as sessões de treino (BOMPA, 2001). Ou seja, a aplicação de sobrecargas de esforço físico é imprescindível para a resposta adaptativa do organismo à alteração provocada na homeostasia das células, órgãos e estruturas envolvidas com o movimento. É importante ressaltar que a resposta adaptativa acontece durante o período de descanso ou período regenerativo pós-esforço.

A resposta ao estresse objetiva uma adaptação positiva nesses sistemas e envolve processo inflamatório, aumentos nas concentrações de reservas energéticas, aumentos nas atividades de enzimas-chave do metabolismo e síntese de novas proteínas. A resposta máxima é denominada na literatura de supercompensação. Na supercompensação ocorre um melhor suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia em atividades físicas já habituais na estrutura do treinamento (BRUIN et al., 1994; FRY et al., 1994).

O treinamento intensificado, também chamado de período de “choque” é comum no esporte de alto rendimento, uma vez que o aumento no desempenho previamente atingido pode ser extremamente significativo em um curto intervalo de tempo (1 a 3 semanas). Esse treino pode ser manipulado através de aumentos substanciais na magnitude das cargas, na duração, freqüência, intensidade e, principalmente, pela redução do período regenerativo. Por outro lado, já está bem documentado que essa intervenção também pode resultar em perda do nível de desempenho anteriormente atingido (COUTTS et al., 2007; HALSON & JEUKENDRUP, 2004).

Ao longo dos anos foram utilizadas diferentes nomenclaturas para descrever essa perda do desempenho em indivíduos previamente bem adaptados. Entre elas encontramos: *overtraining*, *overtraining syndrome*, *overreaching*, *nonfunctional overreaching (NFOR)*, *staleness*, *chronic fatigue* (PLATEN, 2002; URHAUSEN & KINDERMANN, 2002). Independente do nome utilizado, esse estado causa prejuízo financeiro e emocional para todos, empregadores/patrocinadores, treinadores, atletas recreacionistas e profissionais e torcida.

Para tratar desse assunto, nosso grupo de pesquisa utiliza a posição adotada em 2006 pelo Colégio Europeu de Ciências do Esporte, que denominou o período de treinamento intensificado de *overtraining* (OT), e os possíveis estados de manutenção ou eventual melhora no desempenho subsequente ao OT de estado FOR (*Funcional Overreaching*) e o estado de queda do desempenho previamente atingida de NFOR (*Nonfunctional Overreaching*) (MEEUSEN et al., 2006). O estado NFOR pode ainda evoluir para a síndrome do *overtraining* (OTS), caracterizada por alterações metabólicas, fisiológicas e psicológicas mais acentuadas que no estado NFOR, com queda de desempenho por um período mais prolongado (PETIBOIS ET AL., 2003; ARMSTRONG & VANHEEST, 2002).

A distinção entre NFOR e OTS é complexa, uma vez que ambos podem estar associados a um ou mais dos seguintes sintomas: estado catabólico acentuado; alterações fisiológicas, imunológicas e bioquímicas; aumento na incidência de lesões e alterações do humor (MEEUSEN et al., 2006; HALSON & JEUKENDRUP, 2004; ARMSTRONG & VANHEEST, 2002). O principal problema para a prática desportiva é que a transição entre a resposta adaptativa positiva (supercompensação) e o estado

NFOR é dependente do ajuste do tempo destinado ao período regenerativo, freqüentemente feito de forma imprecisa e não individualizada.

Embora existam muitas teorias na atualidade, os mecanismos que levam ao OT permanecem desconhecidos (ARMSTRONG & VANHEEST, 2002; LEHMANN et al., 1993). As pesquisas passam pelas áreas de fisiologia, bioquímica, nutrição e psicologia, com ênfase no sistema nervoso autônomo e controle hormonal (MEEUSEN et al., 2004; KEIZER, 1998; FRY et al., 1994; FELLMAN et al., 1992; VAN BORSELEN et al., 1992; BARRON et al., 1985), sistema imune (MACKINNON, 1998; NIEMAN, 1998; FITZGERALD, 1991), processo inflamatório (SMITH, 2000), depleção de glicogênio (SNYDER, 1998; COSTILL et al., 1988) estresse oxidativo (MARGONIS et al., 2007; TIIDUS, 1998), além de outros fatores estressantes que não o exercício como desencadeadores de alterações no comportamento (FROEHLICH, 1995; URHAUSEN et al., 1995; MCNAIR et al., 1992). No entanto, a única concordância entre os autores para o diagnóstico do OT ainda é a queda no desempenho (SMITH, 2000).

A maioria dos trabalhos apresenta poucos resultados provenientes de estudos controlados, devido principalmente à contradição de se aplicar um treinamento que vise uma diminuição da capacidade fisiológica funcional (ARMSTRONG & VANHEEST, 2002), e a falta de atletas voluntários que estejam dispostos a correr o risco de perder uma temporada de treinos/competições (NOAKES, 2001; LEHMANN et al., 1993). Dessa forma, muitos dos sujeitos sintomáticos aparecem casualmente entre equipes de atletas, sendo diagnosticados como *overtreinados* numa situação retroativa, contribuindo para informações imprecisas (HALSON & JEUKENDRUP, 2004).

1.6. Modelo animal de OT

As limitações de se estudar o fenômeno do OT em seres humanos, justificou o desenvolvimento de um modelo animal que induzisse ao processo de OT. Após três anos de tentativas durante a IC utilizando a natação e corrida como modelo de exercício, padronizamos um modelo reprodutível de treinamento em esteira que induz aos estados FOR e NFOR em ratos *Wistar* (HOHL et al., 2009).

O protocolo consiste de 11 semanas de treinamento, com o aumento no número de sessões diárias (2x, 3x e 4x), paralelo a uma diminuição no tempo de recuperação

entre as sessões (4h, 3h e 2h, respectivamente) nas três últimas semanas do protocolo. Ou seja, após um período de 8 semanas com uma sessão de exercícios diários intercalado por 24h de descanso, provocamos um desequilíbrio crescente entre frequência de exercícios diários e tempo para recuperação entre eles. Avaliamos ao longo das 11 semanas de treino a resposta individual dos animais em um teste de desempenho até a exaustão. Isso foi importante porque somente o aumento da carga de exercícios pelo aumento da frequência diária poderia não ser justificativa suficiente para atestar o modelo como instrumento de investigação das conseqüências do OT no desempenho. Para validar o modelo associamos os dados de desempenho à análise de alguns biomarcadores propostos na literatura (HOHL et al., 2009).

Nosso modelo de OT permite uma análise não pareada entre grupos de animais extraídos do processo contínuo do treinamento em função da resposta nos testes de desempenho. Podemos, dessa forma, reconstruir o *continuum* do treinamento através de pelo menos quatro grupos bem identificados: Controle (CO), representando o estado sem treinamento; Treinados (TR), representando um estado intermediário de adaptação positiva ao treinamento, com aumento de desempenho (após a 9ª semana de treino); e os grupos FOR ou NFOR como os estados finais (após a 11ª semana de treino).

A possibilidade aberta com a utilização do modelo animal, de associação dos estados FOR e NFOR com diversos parâmetros bioquímicos em sangue e tecidos comparáveis através da mesma metodologia, está permitindo a continuidade das investigações das hipóteses sobre as causas desses estados baseadas nas teorias vigentes e nas nossas próprias observações.

1.7. Hipótese do trabalho

O exercício pode ser muito prejudicial para alguns indivíduos, principalmente quando realizado de maneira excessiva e intensa, tendo sido associado a lesões crônicas na musculatura e articulações, broncoconstrição, alterações comportamentais, e em casos mais raros a anafilaxia e morte súbita (COOPER et al., 2007). No presente trabalho procuramos investigar a hipótese de que a queda prolongada de desempenho identificada nos ratos NFOR seria decorrente de alterações morfológicas e eletrofisiológicas do miocárdio relacionadas ao aumento nos níveis de estresse

oxidativo que, por sua vez, poderia prejudicar o débito cardíaco e o transporte de oxigênio necessário para a manutenção do desempenho no exercício de *endurance*, o que aumentaria o risco de lesões severas no tecido cardíaco.

2. OBJETIVOS

O objetivo da dissertação de mestrado foi verificar a presença ou não de estresse oxidativo no miocárdio, bem como alterações morfológicas e eletrofisiológicas que pudessem prejudicar a função cardíaca e consequentemente o desempenho.

2.1. Objetivos Específicos

Para alcançar os objetivos propostos traçamos o seguinte delineamento investigativo:

- Ao longo do protocolo, acompanhamos a evolução longitudinal do desempenho e de parâmetros cardíacos eletrofisiológicos (ECG);
- Ao término do protocolo, averiguamos a atividade das enzimas antioxidantes, a concentração de derivados da peroxidação lipídica, apoptose e alterações morfológicas do miocárdio nos diferentes grupos experimentais (Controle, Treinado, FOR e NFOR).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Setenta ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, com vinte e um dias de idade foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB). Os animais foram acomodados em biotério climatizado a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), com controle de ciclo invertido de luz claro/escuro de 12h e alimentação *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram previamente submetidos e aprovados (638-1) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-Unicamp – (CEEAA – IB – UNICAMP).

Todos os ratos foram adaptados à esteira rolante durante duas semanas antes do início do protocolo de treinamento (60 dias de idade). A fase de adaptação consistiu em colocá-los na esteira 5 dias/semana durante 10 minutos com velocidade em 12 m/min. Essas semanas iniciais tiveram a finalidade de separar os animais que corriam ($n=64$) daqueles que se recusavam a correr ($n=6$). Apenas os animais que corriam prosseguiram no estudo.

3.2. Protocolo de indução ao *overtraining*

O protocolo de treinamento (HOHL et al., 2009) teve duração de 11 semanas com exercício contínuo realizado em esteira. Os detalhes do protocolo de treinamento estão apresentados na Tabela I.

Tabela I. Protocolo de indução ao *overtraining*.

Semanas Experimentais	Fases do Treino	Número dos Testes	Velocidade do Treino (m/min)	Duração do Treino (min)	Número de Sessões diárias	Recuperação entre as sessões (h)
	Adaptação	T1	--	--	--	24
1 ^a	TA1	semana sem testes	15	20	1	24
2 ^a	TA1	semana sem testes	20	30	1	24
3 ^a	TA1	semana sem testes	22,5	45	1	24
4 ^a	TA1	T2	25	60	1	24
5 ^a a 7 ^a	TA2	semana sem testes	25	60	1	24
8 ^a	TA2	T3	25	60	1	24
9 ^a	T2x	T4	25	60	2	4
10 ^a	T3x	T5	25	60	3	3
11 ^a	T4x	T6	25	60	4	2

Podemos observar que o protocolo obedece cinco fases distintas ao longo das onze semanas:

- *Primeiras quatro semanas de treinamento adaptativo 1 (TA1)*: aumento na carga de esforço;
- *5ª a 8ª semana de treinamento adaptativo 2 (TA2)*: exercícios diários com a mesma carga de esforço alcançada ao final da 4ª semana;
- *Semana 2x/dia (9ª semana) (T2x)*: uma semana de exercícios com a mesma carga das semanas anteriores, realizada duas vezes ao dia, com intervalo de quatro horas de descanso entre elas;
- *Semana 3x/dia (10ª semana) (T3x)*: uma semana de exercícios com a mesma carga das semanas anteriores, realizada três vezes ao dia, com intervalo de três horas de descanso entre elas;
- *Semana 4x/dia (11ª semana) (T4x)*: uma semana de exercícios com a mesma carga das semanas anteriores, realizada quatro vezes ao dia, com intervalo de duas horas de descanso entre elas.

3.3. Teste de desempenho

Conforme a Tabela I, foram realizados seis testes de desempenho (T1-T6) ao longo do protocolo: antes do início do treino na fase de adaptação (T1), após a 4ª semana (T2), após a 8ª semana (T3), após a 9ª semana (T4), após a 10ª semana (T5) e após a 11ª semana (T6).

Aplicamos o teste de desempenho proposto por Barbato et al. (1998), com algumas modificações, conforme mostrado na Tabela II. O teste era iniciado com velocidade de 12 m/min e incremento de 1 m/min a cada 2 minutos sem inclinação. Quando a velocidade de 20 m/min era atingida, o incremento na velocidade passava para 2 m/min a cada 3 minutos. O teste era finalizado quando o rato demonstrava exaustão. A exaustão era definida a partir do momento em que os animais tocavam a grade eletrificada da esteira cinco vezes em um intervalo de 1 minuto (Liu et al., 2000),

ou permaneciam na mesma por um período maior que 10s. A pesagem dos animais foi realizada previamente ao teste de desempenho através da utilização de balança de precisão (Gehaka; modelo BG 1000). Os testes de desempenho foram realizados 60h após a última sessão de treino.

Tabela II: Protocolo do teste de desempenho.

Tempo (min)	Início	2	4	6	8	10	12	14	16	18	21	24
Velocidade (m/min)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	26

3.4. Quantificação do desempenho

Para avaliar longitudinalmente o efeito do treinamento nos ratos é aconselhável que o teste quantifique o desempenho considerando a variação de massa de cada animal. Nesse sentido, calculamos a variável de desempenho (D) relacionada ao trabalho mecânico (W) que é proporcional à massa (m) x distância total do teste (d). A distância total percorrida ao longo dos estágios $i = 1, 2, 3, 4...$ é $d = \sum d_i = \sum V_i T_i$, portanto:

$$D = \sum D_i = \sum m \cdot V_i T_i = \sum m d_i = m d$$

onde: D representa o desempenho do rato, D_i o desempenho em cada estágio i , m massa do animal, V_i é a velocidade em cada estágio i , T_i é o tempo decorrido em cada estágio i , d_i é a distância percorrida em cada estágio e d é a distância total percorrida pelo rato ao longo do teste. Neste estudo, o desempenho será mostrado em Kg.m.

3.5. Grupos de animais

Somente os ratos que realizaram o T1 ($n=64$) com valores de desempenho D entre 70 e 230 Kg.m foram selecionados para o estudo ($n=33$) (Figura 1). Deste total, nove ($n=9$) foram selecionados aleatoriamente como Grupo Controle (CO) (Figura 1). Os animais do Grupo CO realizaram os testes de desempenho (Tabela I) até a 10ª semana quando foram sacrificados 48h após o T5. Nas semanas em que não havia

testes, o grupo CO foi submetido a 10 min. de corrida com velocidade de 12m/min, duas vezes na semana para aclimação à esteira e à manipulação. Esta conduta é necessária para diminuir o estresse e aumentar a confiabilidade dos testes de desempenho realizados por este grupo, sendo que o volume de estímulo utilizado não é suficiente para gerar adaptações fisiológicas crônicas que possam gerar o aumento de desempenho. Os demais 24 ratos foram submetidos ao protocolo de treinamento sendo divididos em três subgrupos: Treinados (TR), *Nonfunctional Overreaching* (NFOR) e *Functional Overreaching* (FOR), conforme critério descrito a seguir.

A Figura 1 mostra de forma esquemática a seleção dos diferentes grupos de animais e os momentos de sacrifício.

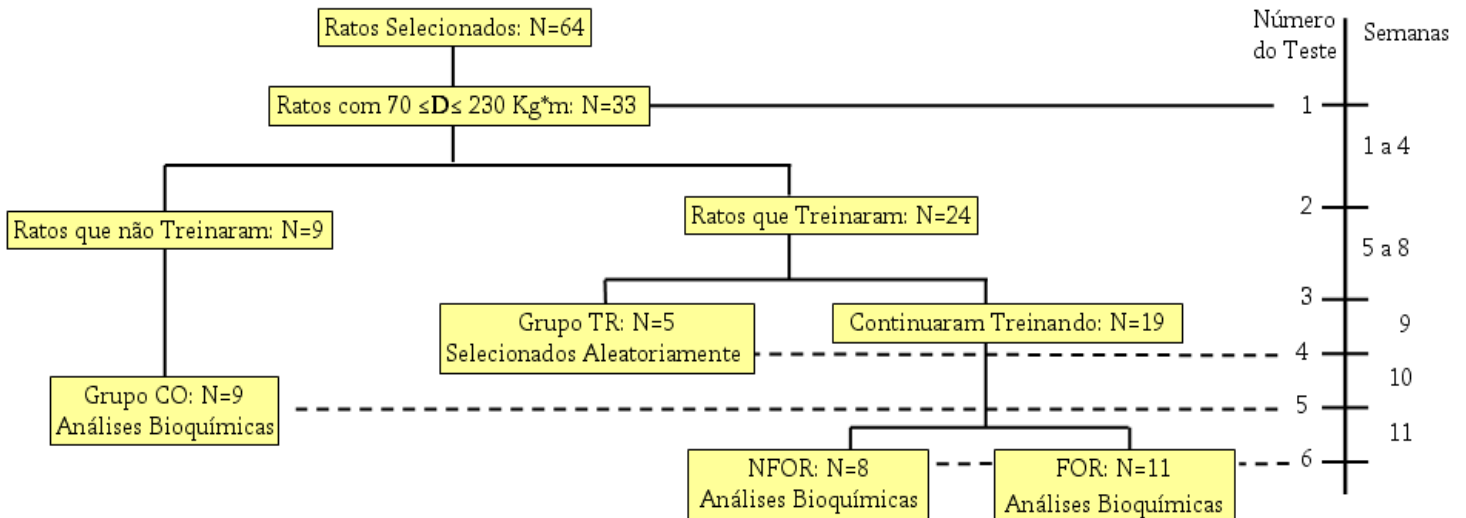


FIGURA 1: Organograma da divisão e sacrifício dos grupos experimentais. As linhas pontilhadas representam os momentos em que determinado grupo de ratos foi sacrificado para as análises bioquímicas.

3.6. Seleção dos grupos de animais

Os animais que compuseram o grupo TR (n=5) foram selecionados aleatoriamente após a fase T2x (9ª semana de treinamento) e foram sacrificados 48h após o término do T4. Destacamos que do T1 até o T4, todos os ratos que treinaram apresentaram aumento de desempenho, conforme será apresentado adiante.

Os grupos NFOR e FOR foram selecionados após o T6 através de uma reta ajustada por quadrados mínimos considerando os valores de desempenho (D) aferidos nos testes T4, T5 e T6, sendo sacrificados 48h após o T6. O ajuste representa a tendência de aumento ou queda de desempenho em relação ao T4. O coeficiente angular (α) utilizado como referência para separação entre os grupos foi baseado no Grupo CO, que não treinou e apresentou um valor de $\alpha = -3,26 \pm 11,79$ kg.m. O valor determinado para a separação foi obtido a partir da média do coeficiente angular menos 1 Desvio Padrão (DP) resultando em $\alpha_{\text{crítico}} = -15,05$ kg.m (HOHL et al, 2009). Este valor foi considerado o ruído embutido no teste de desempenho calculado através da variação apresentada pelo grupo CO. Assim, os animais que apresentaram um coeficiente angular menor que $-15,05$ kg.m ($\alpha < -15,05$ kg.m) foram selecionados como NFOR (n=8) e aqueles que apresentaram um coeficiente angular igual ou maior que ($\alpha \geq -15,05$ kg.m) foram selecionados como FOR (n=11), conforme apresentado na Figura 2.

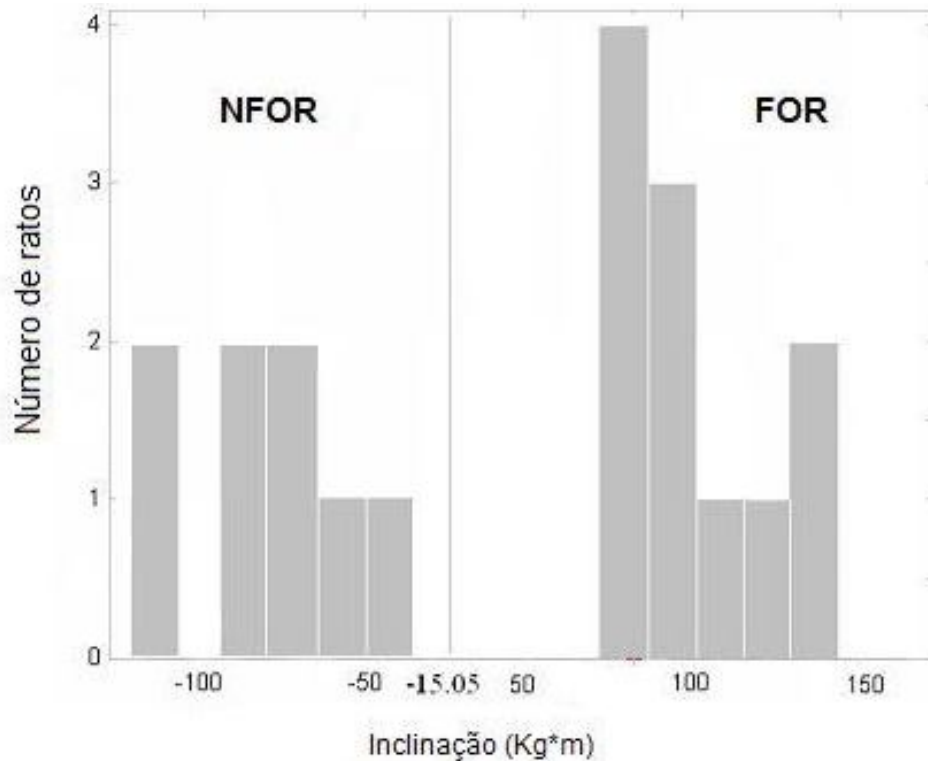


FIGURA 2: Histograma das inclinações dos grupos NFOR (n=8) e FOR (n=11).

3.7. Eletrocardiograma

O registro do ECG foi realizado em vinte e cinco animais (n=25) que participaram deste trabalho, sendo nove (n=9) do Grupo CO, oito (n=8) do Grupo FOR e oito (n=8) do Grupo NFOR. Nos animais que treinaram o ECG foi realizado no dia seguinte aos testes de desempenho, sendo oito ratos no período da manhã e oito à tarde. O Grupo CO realizava o ECG 72h após o respectivo teste de desempenho, sempre no período da tarde. Assim, os animais que treinaram realizaram seis ECGs enquanto o Grupo CO realizou quatro ECGs. Vale ressaltar que apesar do Grupo CO ter realizado cinco testes de desempenho (Figura 1), o mesmo foi submetido a apenas quatro ECGs, uma vez que o sacrifício ocorreu 48h após o T5 e o ECG deste grupo estava sendo realizado 72h após os respectivos testes. Sendo o objetivo acompanhar o ECG de forma pareada longitudinal dos grupos FOR e NFOR, fizemos o acompanhamento do grupo CO até o T4 respeitando o tempo de sacrifício de 72h em T5 a fim de reduzir o número de animais do estudo sem comprometer a análise longitudinal. Com o intuito de minimizar possíveis efeitos do ritmo circadiano todos os registros foram conduzidos no mesmo horário e os animais avaliados na mesma seqüência adotada na 1ª aferição.

O ECG foi obtido sob efeito de anestesia intramuscular (Zoletil®, 25mg/kg peso corporal) na posição supina e com respiração espontânea. Utilizou-se quatro eletrodos inseridos subcutaneamente nas patas dos animais e conectados aos canais do software (*Heart Ware System*®) sendo registradas seis derivações padrão (I, II, III, aVR, aVL e aVF) com velocidade de 50mm/s e filtros de 100Hz. Foram analisados os seguintes parâmetros: duração do complexo QRS, intervalo PR (definido como o intervalo entre início da onda P e pico da onda R); intervalo RR (definido como o intervalo entre os picos de duas ondas R adjacentes) e intervalo QT (definido como o intervalo entre o início da onda Q e o pico da onda T).

O início e o término de cada um desses parâmetros foram delimitados visualmente na tela de registro do ECG e o tempo de duração correspondente mensurado a partir do posicionamento manual de dois cursores. O valor dos parâmetros em cada registro do ECG corresponde à média aritmética obtida de três (QRS; PR) ou dez (RR; QT) ciclos cardíacos distintos. Um registro de ECG permite a visualização de dez ciclos cardíacos. Todas as aferições foram realizadas pelo mesmo

observador. A análise da confiabilidade do eletrocardiógrafo utilizado, assim como a determinação do coeficiente de variação médio (CV Médio) de cada um dos parâmetros analisados nas condições descritas está disponível em Buscariolli et al., (2008). De acordo com este trabalho (BUSCARIOLLI et al., 2008), o QRS, PR, RR e QT apresentaram um CV Médio inferior a 9%, indicando que a metodologia utilizada possui boa confiabilidade.

3.8. Histologia

3.8.1. ANESTESIA

Sacrificamos os animais utilizando o anestésico Zoletil® (50mg/kg peso) em conjunto com o relaxante muscular xilazina (10un/kg peso) ministrado através de injeção intramuscular (quadríceps direito).

3.8.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

O coração foi removido em diástole (solução KCl 1,15%) e limpo (solução salina 0,9% - 4°C) para retirada do excesso de sangue. Logo após, o mesmo foi pesado e um corte coronal incluindo ambos os ventrículos foi realizado com a utilização de uma lâmina (gillete®) com o intuito de aperfeiçoar a qualidade da secção. A seguir o material foi fixado em paraformaldeído 4% durante 24hs. Findo esse passo, o tecido seguiu preparação histológica rotineira para inclusão em parafina. Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos embebidos foram seccionados em navalha de aço no micrótomo (cortes de 5 μ m) e imediatamente aderido às lâminas de vidro.

3.8.3. HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Esta é a técnica mais comumente utilizada em histologia animal e na rotina da patologia. O corante básico, a hematoxilina, cora as estruturas acídicas em azul (núcleo, ribossomos e retículo endoplasmático rugoso) enquanto a eosina, um corante ácido, cora as estruturas básicas em rosa - avermelhado. Como a maioria das proteínas citoplasmáticas é básica, em uma coloração com HE o citoplasma usualmente se cora em rosa - avermelhado e os núcleos em azul. Esta técnica pode ser usada para detecção de hipertrofia cardíaca e esteatose, além de indicar a presença de infiltrados celulares, marcadores de processo inflamatório localizado. Para visualização das

lâminas e armazenamento das imagens, utilizamos um microscópio óptico da marca Olympus.

3.8.4. PICROSSÍRIUS (*SIRIUS RED*)

Com o intuito de verificar a presença de colágeno no miocárdio, utilizamos a solução de picrossírius (*Sirius Red* 3BA em solução saturada de ácido pícrico) sem a realização de polarização. Para tanto contra coramos com Hematoxilina sendo que nesta técnica o colágeno é identificado pelo forte tom vinho.

3.8.5. MORFOMETRIA

Além da análise qualitativa das lâminas de HE e *Sirius Red*, realizamos também duas análises quantitativas através da técnica de morfometria, utilizando o *software* “Image Pro-Plus 6.0”. Assim, nas lâminas de HE quantificamos em três animais por grupo a área das células do VE. Para tal, aferimos 30 células por animal, utilizando preferencialmente para medição aquelas dispostas transversalmente e com núcleo centralizado. Nas lâminas de *Sirius Red*, quantificamos também em três animais por grupo a área correspondente às fibras colágenas no VE. Para isso, utilizamos 30 campos por animal no intuito de obtermos um resultado representativo. A área das células foi determinada em μm^2 enquanto a área do colágeno foi dada em porcentagem referente à área total dos campos.

3.9. Análises Bioquímicas

3.9.1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

Após a retirada da porção utilizada para análise histológica, cortes do VE foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o período de análises. Os cortes (90mg) foram posteriormente homogeneizados sobre banho de gelo com um homogeneizador (Politron PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland) na razão 1:20 (wt/vol) em Tampão fosfato 50mM e pH 7.0 para as análises da CAT, GR e SOD. Para análise de TBARS foi utilizado solução de KCl (1,15%) na razão 1:3 (wt/vol) no preparo do homogenato.

3.9.2. ANÁLISE DE CONFIANÇA DAS TÉCNICAS

Com o intuito de obtermos uma maior confiabilidade nas padronizações das técnicas bioquímicas, analisamos tanto a linearidade quanto a repetibilidade das triplicatas realizadas em diferentes volumes de amostra e diferentes tempos de leitura, para definirmos a melhor condição experimental para cada método de análise. Uma boa confiabilidade implica em maior precisão das medidas e melhor acompanhamento das mudanças ocorridas (HOPKINS, 2000). Assim, apresentaremos os resultados da linearidade e do CV obtidos em cada uma das técnicas enzimáticas empregadas.

Uma alta correlação entre volumes crescentes de uma mesma amostra e o consumo ou produção dos elementos químicos oriundos da reação enzimática, demonstra que as concentrações de substratos na cubeta de reação estão adequadas, garantindo a velocidade máxima de reação da enzima em concentrações crescentes da mesma. Escolhendo um volume intermediário, assegura-se que tanto aumentos, quanto diminuições na concentração da enzima em decorrência do tratamento (i.e. treinamento físico) possam ser determinadas com sensibilidade.

A análise do CV auxilia na determinação do tempo de leitura mínimo que supere o ruído analítico (i.e. imperfeições no próprio aparelho de leitura, pequenas variações de pipetagem entre outros) garantindo melhor acurácia na quantificação das reações em duplicata ou triplicata. Para o cálculo do CV mostrados a seguir, utilizamos a planilha disponibilizada por Hopkins WG (URL: <http://sportsci.org/resource/stats>. Último acesso em 27-10-2010).

3.9.3. CATALASE

A CAT foi quantificada através de método enzimático descrito por Aebi (1984). No ensaio a atividade da enzima é avaliada a partir da decomposição do peróxido de hidrogênio a água. A reação inicia-se pela adição de H_2O_2 à amostra, devendo a absorbância inicial no espectrofotômetro ser de aproximadamente $A=0,500$. Dessa forma, a decomposição do peróxido de hidrogênio pode ser determinada diretamente pela diminuição da absorbância, em um comprimento de onda de 240nm:



O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da seguinte equação: $A = (tg\alpha \cdot V) / (\epsilon \cdot v) \times FD$, onde A é a atividade enzimática da CAT; $tg\alpha$ é $= \Delta A$ (variação da absorbância da amostra) / Δt (variação no tempo); V é o volume total de solução na cubeta; $\epsilon = 3,94 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar do H_2O_2); v é o volume da amostra e FD o fator de diluição da massa de músculo cardíaco no tampão de homogenato. O tempo de leitura, assim como o volume de amostra utilizado, foi determinado de acordo com os dados obtidos na padronização do método, especificados a seguir.

Tabela III. Ensaio enzimático realizado para padronização da CAT.

Volume Amostra (ul)	60	80	100	120	140	160	180
Volume (ul) - Tampão Fosfato 50mM	1940	1920	1900	1880	1860	1840	1820
Volume (ul) - H_2O_2 (30%)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

A confiabilidade dos diferentes intervalos de tempos testados nos volumes de amostra acima referidos foi avaliada pelo coeficiente de variação médio (CV Médio) e intervalos de confiança - IC (95%) das respectivas triplicatas, conforme Tabela IV:

Tabela IV. Padronização da CAT. CV Médio e IC (95%) das triplicatas realizadas com diferentes volumes de amostra em diversos intervalos de tempo.

Tempo de Leitura (seg)	Coeficiente de Variação (IC) %
30	19 (13,1 a 34,4)
60	9,3 (6,5 a 16,4)
90	4,0 (2,8 a 6,8)
120	3,2 (2,3 a 5,5)

A respeito da linearidade, plotamos os gráficos da taxa de decomposição do peróxido pelos volumes de amostra adicionados em todos os tempos realizados. A seguir, fizemos um ajuste linear e quantificamos a correlação (r) e a confiabilidade (p) dos dados. Abaixo, a curva obtida com 120s de leitura, a melhor dentre todos os tempos de leitura utilizados:

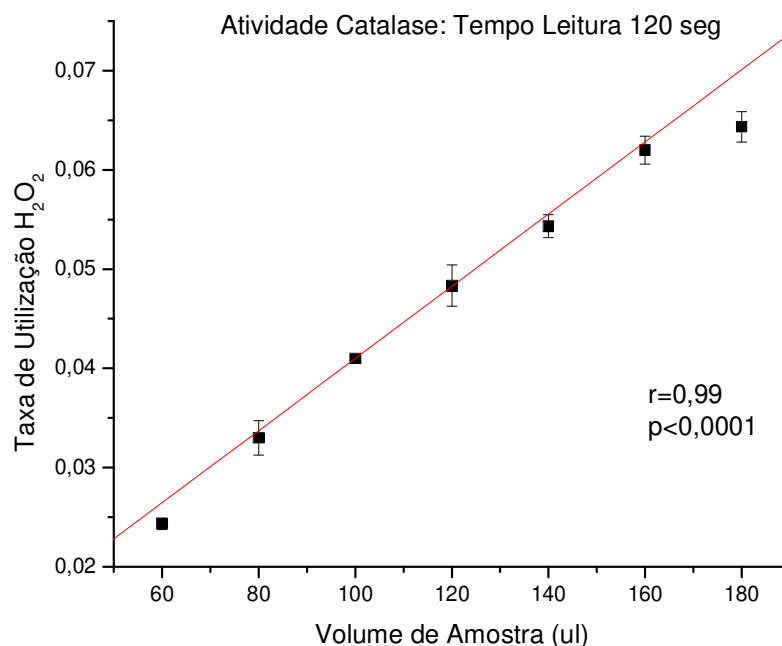
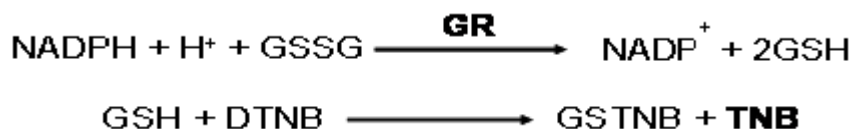


FIGURA 3. Linearidade do método enzimático da catalase em 120s de leitura.

Assim, baseado no que foi exposto, optamos por um tempo de leitura de 120s e volumes de amostra de 100uL para realização deste ensaio.

3.9.4. GLUTATIONA REDUTASE

A GR foi quantificada através do método enzimático descrito por Smith et al.,(1988). A GR é uma enzima que depende de NADPH para catalisar a redução da glutathiona oxidada (GSSG). O procedimento padrão adotado para quantificação da GR foi seguir espectrofotometricamente a formação de TNB a 412nm a partir do ácido 5,5'-ditiobinitrobenzóico (DTNB) conforme esquema abaixo.



O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da seguinte equação: $A = (tg\alpha \cdot V) / (\epsilon \cdot v) \times FD$ onde A é a atividade enzimática da GR; tg α é = ΔA (variação da absorbância da amostra)/ Δt (variação no tempo); V é o volume total de solução na cubeta; $\epsilon = 13,6 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar do TNB); v é o volume da amostra e FD o fator de diluição da massa de músculo cardíaco no tampão de preparação do homogenato. O tempo de leitura utilizado foi de cinco minutos e o volume de amostra de 50uL, conforme dados da padronização a seguir.

Tabela V. Ensaio enzimático realizado para padronização da GR.

Volume (ml) – Tampão Fosfato 0,2M	1	1	1	1	1	1	1
Volume (ml) – DTNB 3mM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume (ul) - H₂O	270	260	250	240	230	220	210
Volume (ml) – NADPH 2mM	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Volume Amostra (ul)	30	40	50	60	70	80	90
Volume (ml) – GSSG 20mM	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

A confiabilidade dos diferentes intervalos de tempos testados nos volumes de amostra acima referidos foi avaliada pelo CV Médio e IC (95%) das respectivas triplicatas, conforme quadro abaixo:

Tabela VI. Padronização GR. CV Médio e IC (95%) das triplicatas realizadas com diferentes volumes de amostra em diversos intervalos de tempo.

Tempo de Leitura (min)	Coeficiente de Variação (IC) %
1	23,3 (16,5 a 41,1)
2	24,6 (17,7 a 42,0)
3	14,2 (10,3 a 23,6)
4	15,7 (11,3 a 26,1)
5	5,4 (3,7 a 9,6)

A respeito da linearidade, plotamos os gráficos da taxa de formação do TNB pelos volumes de amostra adicionados em todos os tempos realizados. A seguir, fizemos um ajuste linear e quantificamos a correlação (r) e a confiabilidade (p) dos dados. Abaixo, a melhor curva obtida dentre os intervalos de tempo utilizados:

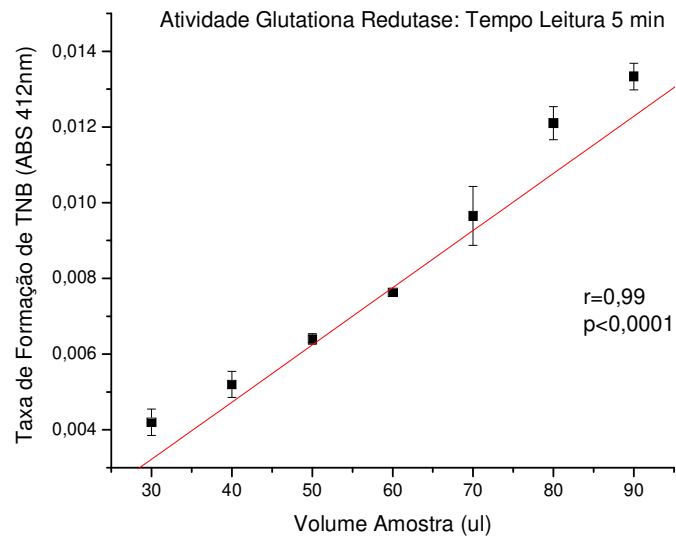


FIGURA 4. Linearidade do método enzimático da glutatona redutase com 5min. de leitura.

É interessante observar que tanto os ensaios da GR quanto da CAT foram realizados com o mesmo homogenato. No entanto, os volumes de amostra para cada ensaio foi diferente, devido à particularidade da concentração da GR e CAT no mesmo homogenato em relação às concentrações de substratos adicionados à cubeta.

3.9.5. SUPERÓXIDO DISMUTASE

Utilizamos o kit de análise da *R & D Systems*® cujo princípio do método pode ser visualizado na figura a seguir.

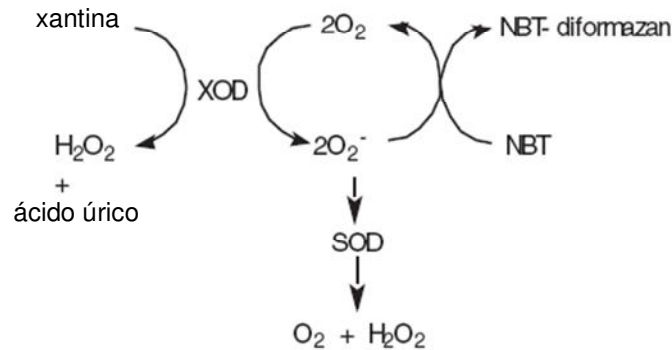


FIGURA 5. Relação entre xantina oxidase (XOD), SOD e o radical ânion superóxido.

Assim, os $O_2^{\bullet-}$ originários da conversão da xantina à ácido úrico e H_2O_2 pela xantina oxidase (XOD), convertem NBT a NBT-diformazan o qual absorve luz a 550nm. A SOD reduz a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e desta forma inibe a taxa de formação de NBT-diformazan, sendo este o parâmetro de avaliação da atividade da SOD na amostra. O

método é livre da interferência de outras atividades catalíticas e é ideal para análise da SOD em mamíferos.

O cálculo da atividade da SOD foi realizado da seguinte forma: $(\Delta \text{ abs controle neg.} - \Delta \text{ abs da mostra contendo SOD}) * 100 / \Delta \text{ abs controle neg.}$, sendo a leitura realizada por 5 min. Isso significa que o resultado é encontrado como uma porcentagem de inibição de formação do NBT-diformazan sendo o controle negativo referenciado como 100%, ou seja, formação máxima de NBT-diformazan (sem a presença de SOD).

A atividade em U enzimática foi calculada através da utilização de uma solução padrão de SOD disponibilizada pelo kit com a relação de 1uL de solução equivalendo a 1U de SOD, sendo que 1uL da solução padrão SOD inibe a formação de NBT-diformazan em ~50%. O que deveria ser padronizado era a quantidade de amostra de homogenato do coração a ser adicionada no meio com as soluções especificadas pelo fabricante do kit. Ou seja, padronizar um volume de homogenato que fosse sensível às possíveis variações da atividade da SOD.

Primeiramente, testamos a reprodutibilidade do controle negativo (sem a presença de SOD) pelo CV. Foram feitas quatro análises sendo o Δ absorbância média ($\pm$ DP) igual a $0,00769 \pm 0,0001$ e o CV igual a 1,3%. Na Figura 6, apresentamos a análise de correlação entre volume de homogenato e absorbância em valores de média ($\pm$ DP) da triplicata.

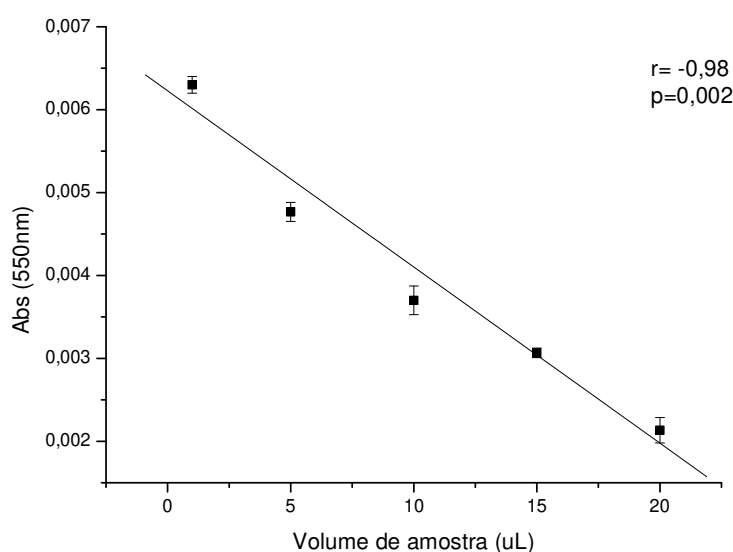


FIGURA 6. Padronização SOD. Relação entre volume de amostra e absorbância.

A Figura 6 mostra que quanto maior a quantidade de amostra, maior é a atividade da SOD, conseqüentemente menor será a formação de NBT-diformazan o que reflete uma relação volume de amostra x absorbância inversamente proporcional. Pela Figura 6, optamos em utilizar 10uL de amostra por apresentar um valor intermediário entre a menor (1uL) e maior (20uL) atividade da SOD medidas.

3.9.6. PRODUTO DE ATAQUE OXIDATIVO - TBARS

O TBARS foi quantificado conforme os métodos descritos por Uchiyama & Midori, (1978) e Ohkawa et al., (1978). No ensaio os produtos resultantes do ataque oxidativo às estruturas celulares (peróxidos lipídicos), reagem com o ácido 1-tiobarbitúrico (TBA), formando bases de Schiff. A interação entre os peróxidos lipídicos e o TBA forma um complexo colorido, mensurado em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532nm menos a leitura na linha de base em 520nm ($Abs_{532nm} - Abs_{520nm}$). Para isso as amostras foram homogeneizadas em KCL (1,15%) na razão 1:3 (wt/vol), sendo adicionados posteriormente a uma solução contendo ácido fosfórico (0,1%), KCl (1,15%), ácido tiobarbitúrico (0,6%) e butanol.

O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva-padrão de tetrametoxipropano (TMP). Cada 10 uL de solução TMP contém 1nmol de TMP. A Figura 7 apresenta a curva-padrão obtida com TMP e a Figura 8 a curva para verificação da linearidade com diferentes volumes de amostra. A confiabilidade do método foi obtida a partir do CV Médio (4,6 %) e IC (3,3 a 8,0) das triplicatas realizadas com TMP. Padronizamos um volume final de 60uL para realização deste ensaio.

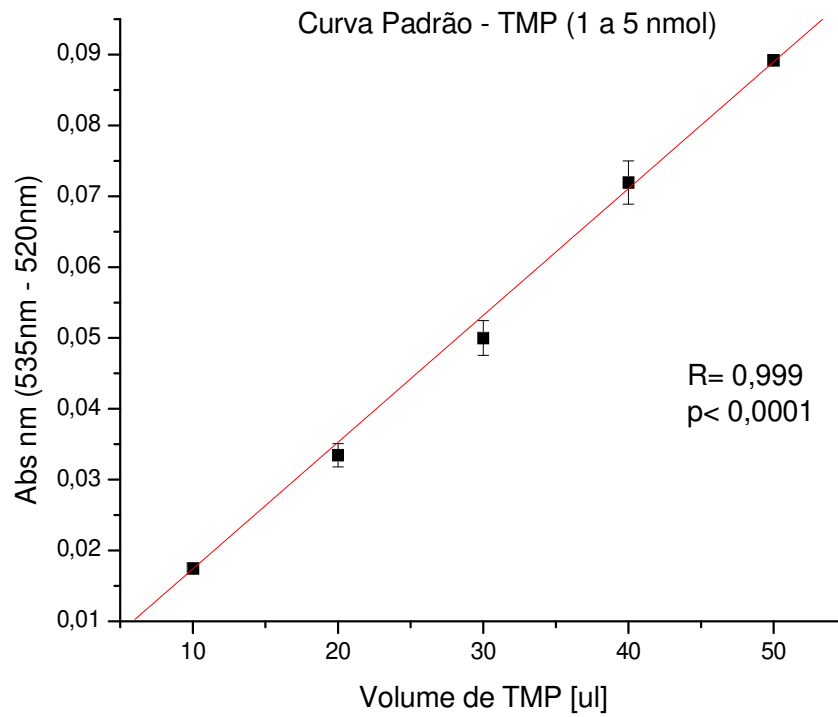


FIGURA 7. Linearidade da curva padrão com TMP para ensaio de TBARS.

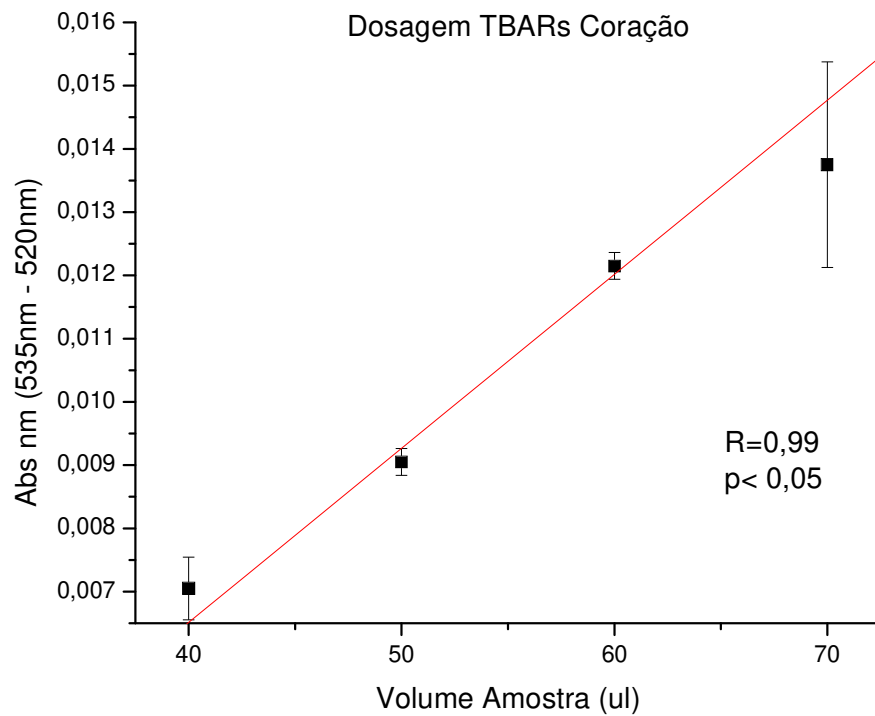


FIGURA 8. Linearidade do método enzimático para dosagem de TBARS.

3.10. Índice Apoptótico – TUNEL

A reação de TUNEL é um método morfológico específico para detecção de apoptose baseado nas características bioquímicas das células apoptóticas, que sofrem clivagem internucleossômica do DNA. Essa reação é caracterizada pela inserção mediada pela enzima Terminal desoxi Transferase (TdT) e de um nucleotídeo (desoxiuridina -UTP) conjugado a biotina ou fluoresceína nos sítios de quebra do DNA da célula apoptótica. A adição de uma cauda polinucleotídica, torna o DNA marcado, permitindo sua visualização em microscopia de luz.

Para cada animal, após o sacrifício e retirada do coração, foi realizado um corte longitudinal da porção anterior do ventrículo esquerdo (VE). A seguir o corte foi imerso em solução de sacarose 30% (4°C) por 30' para crio-preservação. Após isso, o mesmo foi embebido com *tissue-tek* e armazenado em freezer comum. A partir deste material, foram realizados doze crio cortes consecutivos de 5µm de espessura em criostato (Leica, modelo CM 1850, Alemanha) depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma, CA, EUA).

Seguindo as instruções do fabricante (*In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), a reação de TUNEL foi realizada segundo o protocolo a seguir:

- 1- Descongelar lâminas na câmara úmida – 10'
- 2- Fixar tecido com paraformaldeído 4% em PBS, pH 7,4, 20-25°C – 20'
- 3- Lavagem com PBS – 30'
- 4- Incubar em solução de bloqueio (H₂O₂ 3% em Metanol), 20-25°C – 15'
- 5- Lavagem com PBS – 3 x 5'
- 6- Permeabilização (0,1% Triton X-100; 0,1% Citrato de Sódio), freezer – 2'
- 7- Lavagem com PBS – 2 x 5'
- 8- Reação: Incubar em solução TUNEL (enzima TdT + solução de nucleotídeos, 1:9), 37°C – 1 hora
- 9- Lavagem com PBS – 5 x 5'
- 10- Incubar em solução POD, 37°C - 30'
- 11- Lavagem com PBS – 5 x 5'
- 12- Incubar em solução DAB – Tempo variável

- 13- Enxaguar bem com água destilada
- 14- Contra-corar com Hematoxilina – 40”

Após a montagem das lâminas, determinamos o índice apoptótico, obtido através da razão entre os núcleos marcados (apoptóticos, em marrom) e núcleos não marcados (não apoptóticos, em roxo), gerando um valor em porcentagem. Para tal, utilizamos cinco animais por grupo, contabilizando cinco campos por animal, totalizando vinte e cinco campos por grupo. Para visualização das lâminas e armazenamento das imagens, usamos um microscópio óptico da marca Olympus. Segue abaixo os controles positivos e negativos obtidos durante a padronização da técnica.

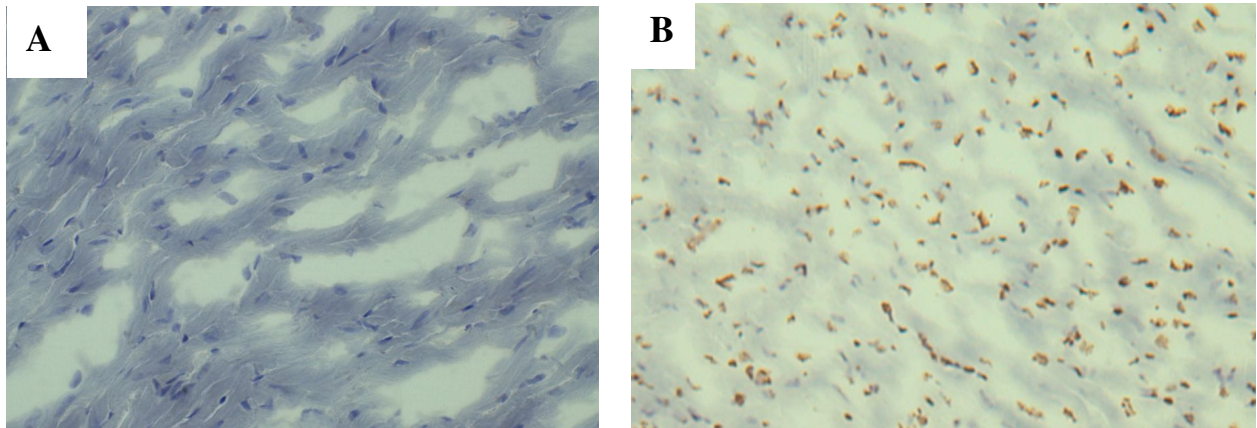


FIGURA 9. Padronização TUNEL. A - Controle Negativo. B – Controle Positivo. Núcleos não-apoptóticos (roxo). Núcleos apoptóticos (marrom).

3.11. Estatística

Para condução das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Instat (San Diego, CA) e o programa Matlab (7.0). Em relação aos parâmetros eletrocardiográficos e de desempenho, utilizamos análises pareadas e não pareadas sendo os resultados apresentados na forma de Média $\pm$ DP. Para dois grupos pareados foi utilizado o Teste T. Para amostras não pareadas ou pareadas em mais de dois grupos utilizamos o Teste ANOVA. Para as análises histológicas e de TUNEL, utilizamos apenas análises não pareadas (ANOVA) sendo que os resultados estão

expressos na forma de Média $\pm$ DP. Nas comparações acima descritas, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As análises bioquímicas (SOD, CAT, GR e TBARS) estão apresentadas na forma de *boxplot*. Esta representação dos dados evidencia as medianas e os intervalos de confiança (95%) da média de cada grupo. Caso os intervalos de confiança não estejam sobrepostos, a diferença entre os grupos é considerada significativa (SIM & REID, 1999; MACGILL et al, 1978). Sim & Reid (1999) apontaram algumas limitações da análise estatística convencional (Anova, etc) no que diz respeito à rejeição ou não rejeição de diferenças entre grupos, principalmente pelo fato de não permitirem uma análise mais detalhada da dispersão dos resultados.

A maior limitação é que os testes estatísticos informam o nível de incerteza (5%) sobre a significância da diferença entre as médias dos grupos, mas não fornece informação sobre a magnitude desta diferença. Isto é, as diferenças entre as médias de dois grupos, mesmo sendo duas amostras de controle, invariavelmente existem, o teste fornecerá apenas a probabilidade desta diferença não ser casual, ou seja, de haver um efeito que causa a diferença.

Como este estudo analisa grupos experimentais que passaram por magnitudes de treinamento diferentes (em relação ao volume), não basta sabermos apenas se as médias são diferentes pelo efeito do treinamento, mas é pertinente sabermos o quanto são diferentes em relação ao grupo CO a medida que os grupos experimentais treinaram por mais ou menos tempo. Este tratamento é particularmente interessante para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, em virtude da ampla variação da resposta frente a diversos protocolos de treinamento (ASCENSÃO, 2007). Em virtude disto, julgamos conveniente apresentarmos tanto a dispersão bruta dos dados, por meio dos quartis superior e inferior que representam cada um, 25% da dispersão total dos resultados (Figura 10), quanto os intervalos de confiança no *boxplot*, que fornecem a informação sobre as diferenças significativas entre os grupos.

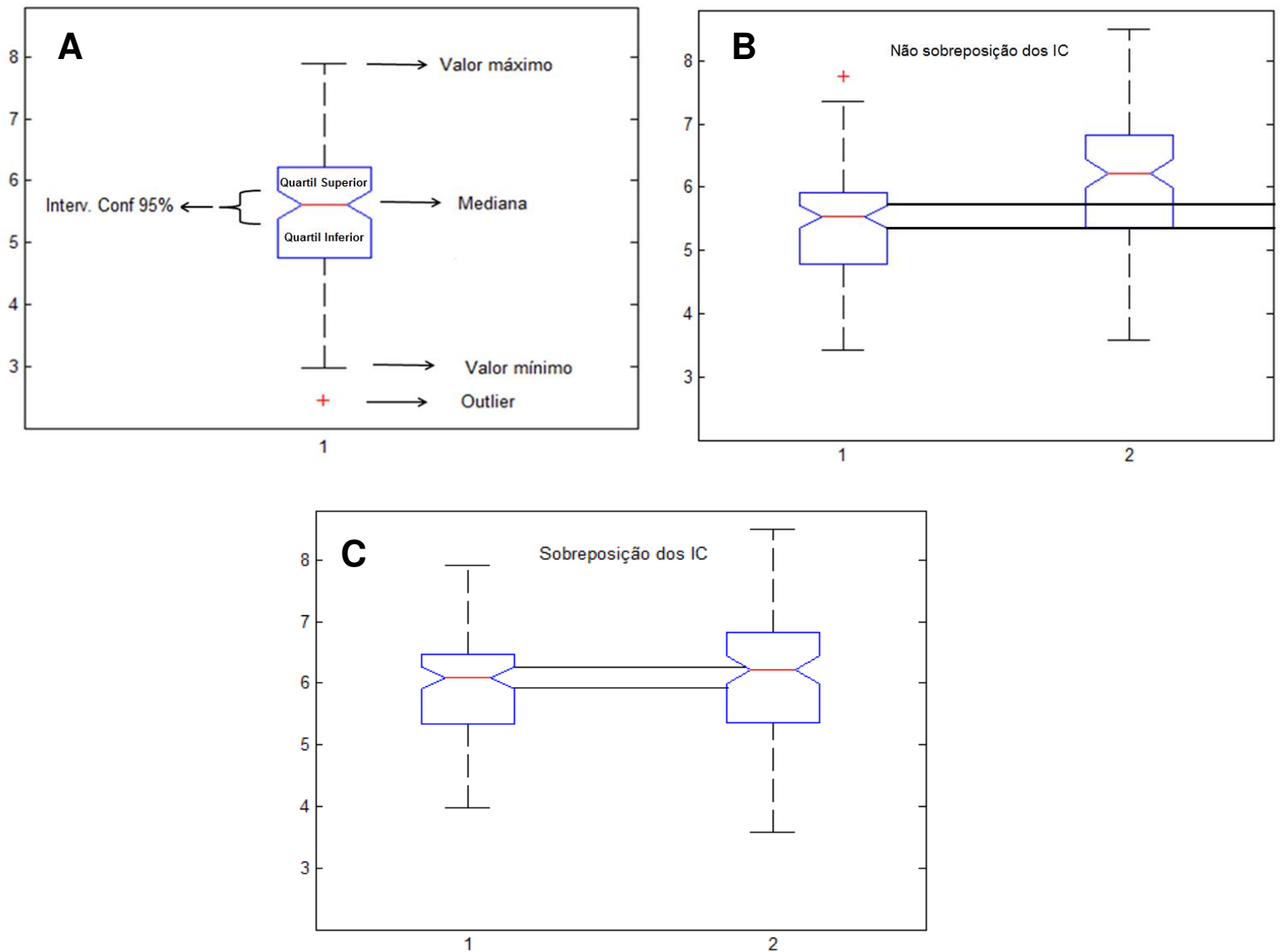


Figura 10: Figuras representativas de gráficos hipotéticos de *Boxplot*. A figura A apresenta todos os parâmetros fornecidos por um gráfico de *boxplot*. A figura B exemplifica uma condição onde não há sobreposição dos intervalos de confiança dos *boxplot* (diferenças significativas entre as amostras dos *boxplots*). Já a figura C exemplifica uma condição onde há a sobreposição dos intervalos de confiança dos *boxplots* (ausência de diferenças significativas entre as amostras dos *boxplots*).

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho

Os dados de desempenho estão apresentados na Figura 11. O desempenho (kgm) de cada grupo nos testes 4 (T4) 5 (T5) e 6 (T6) está representado pelas barras (Média $\pm$ DP) e o volume (V) de treino em minutos executado por cada grupo até o respectivo teste, está indicado sobre as barras (Média $\pm$ DP). As barras em cinza indicam o desempenho do referido grupo no momento em que este foi sacrificado. As análises estatísticas foram realizadas de forma pareada e não pareada.

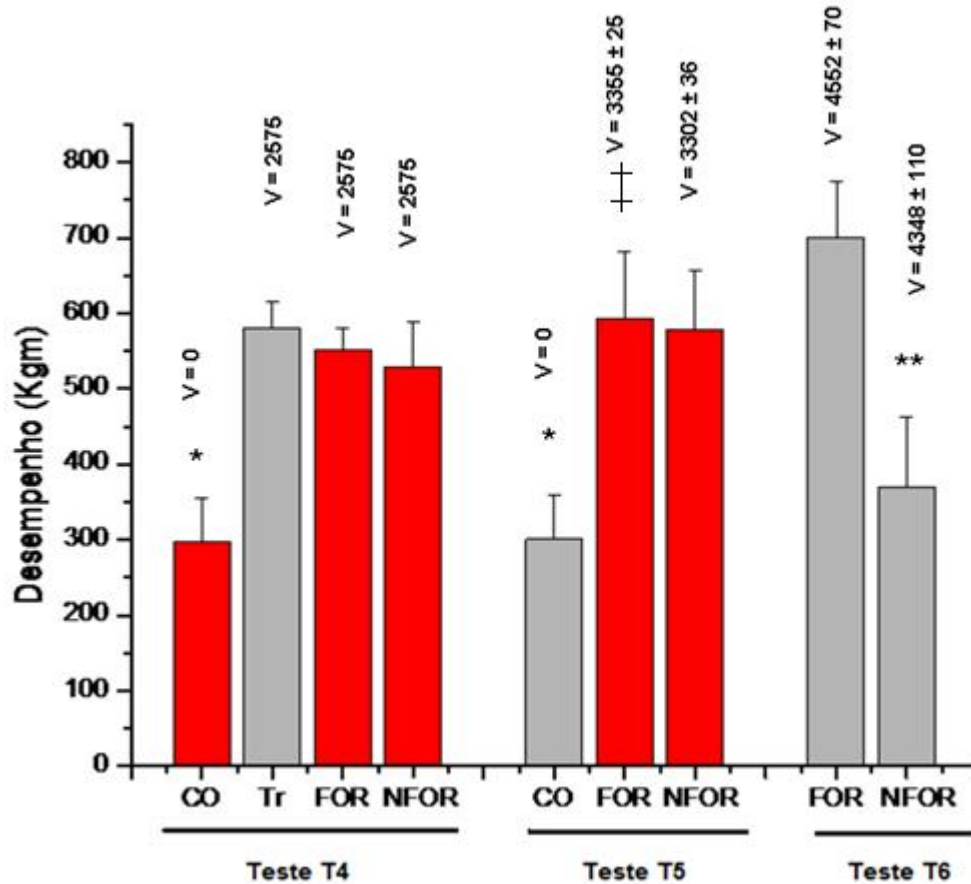


FIGURA 11. Desempenho dos grupos CO (n=9), TR (n=5), FOR (n=11) e NFOR (n=8). As barras em cinza representam o desempenho do referido grupo no momento em que esse foi sacrificado. “V” = volume de treinamento realizado (min) até o momento do referido teste de desempenho. * Diferença Significativa para TR, FOR e NFOR no T4, FOR e NFOR no T5 e FOR no T6. ** Diferença Significativa para FOR no T6, FOR e NFOR no T5 e TR, FOR e NFOR no T4. ‡ Diferença Significativa para FOR no T6.

O volume de treino dos grupos TR, FOR e NFOR no T4 foi de 2575min. indicando que os animais realizaram por completo todas as sessões de treino prescritas até aquele momento. Os três grupos apresentaram aumento significativo do desempenho em relação ao CO no T4, sem diferenças significativas entre os grupos. No teste 5 o comportamento se repetiu para FOR e NFOR, uma vez que o TR já havia sido sacrificado. O grupo de animais NFOR apresentou diminuição significativa de desempenho em T6, quando comparado ao T4 ($369,8 \pm 93,2$ x $528,8 \pm 58,6$ kgm, respectivamente) e ao T5 ($369,8 \pm 93,2$ x $565,5 \pm 74,4$ kg.m). Já o Grupo FOR aumentou significativamente o desempenho em T6 quando comparado ao T4 ($700,8 \pm 73,7$ x $550,8 \pm 29,2$ kgm, respectivamente) e T5 ($700,8 \pm 73,7$ x $593,0 \pm 87,7$ kgm).

A última semana do protocolo foi fundamental para gerar este comportamento e distinguir os grupos FOR e NFOR, já que não houve diferença significativa no desempenho entre estes grupos em T4 ($550,8 \pm 29,2$ x $528,8 \pm 58,6$, respectivamente) e T5 ($592,9 \pm 87,7$ x $565,5 \pm 74,4$, respectivamente). Tanto o volume de treino (4348 ± 140 x 4552 ± 109 min), quanto o desempenho ($369,6 \pm 93,0$ x $700,8 \pm 73,69$ kg.m) do NFOR foram significativamente menores do que o FOR em T6, indicando que além de NFOR apresentar um decréscimo no desempenho, mostrou também dificuldades para realização dos treinamentos nesta fase.

4.2. Eletrocardiograma

Além do desempenho, o ECG foi a única análise realizada longitudinalmente ao longo do protocolo. Assim, os respectivos dados serão analisados de forma pareada, ou seja, através da comparação intra-grupo dos parâmetros obtidos. As Tabelas VIIA, VIIB e VIIC apresentam os parâmetros obtidos dos grupos CO, FOR e NFOR, respectivamente. Os números que identificam os ECGs correspondem ao número do teste de desempenho realizado previamente ao ECG.

Tabela VIIA. Análise intra-grupo do ECG. Grupo Controle. Média±DP.

ECG - GRUPO CONTROLE (CO)				
	ECG 1	ECG 2	ECG 3	ECG 4
PR (ms)	56,86 ± 2,06	56,81 ± 3,67	56,23 ± 2,24	54,76 ± 1,72
QRS (ms)	15,98 ± 0,88	15,71 ± 0,44	15,29 ± 1,29	15,14 ± 0,52
QT (ms)	27,39 ± 4,18	29,69 ± 1,30	31,69 ± 1,67	33,19 ± 2,86*
FC (bpm)	489,26 ± 54,40	504,21 ± 28,47	502,83 ± 20,09	501,85 ± 15,50

* Diferença Significativa para ECG 1 e ECG 2. ANOVA, p<0,05. CO, n=7.

Tabela VIIB. Análise intra-grupo do ECG. Grupo FOR. Média±DP.

ECG - GRUPO FOR						
	ECG 1	ECG 2	ECG 3	ECG 4	ECG 5	ECG 6
PR (ms)	54,10±3,63	56,23±5,88	55,60±3,93	56,45±4,91	54,23±4,30	53,82±3,92
QRS (ms)	16,38±0,98	15,95±0,61	15,98±1,06	16,17±1,09	15,78±1,29	16,48±1,63
QT (ms)	31,83±1,70	33,37±1,23	36,70±2,66*	38,60±2,85*#	38,38±3,95*#	39,95±4,81*#
FC (bpm)	544,71±16,43	501,18±19,60*	511,93±18,76*	513,15±27,74*	502,36±23,21*	505,63±24,60*

*Diferença Significativa para ECG 1. # Diferença Significativa para ECG 2. ANOVA, p<0,05. FOR, n=6.

Tabela VIIC. Análise intra-grupo do ECG. Grupo NFOR. Média±DP.

ECG - GRUPO NFOR						
	ECG 1	ECG 2	ECG 3	ECG 4	ECG 5	ECG 6
PR (ms)	54,73±1,88	55,63±2,14	55,93±4,45	57,00±2,94	54,33±3,47	54,12±3,06
QRS (ms)	15,73±1,47	15,88±0,34	16,22±0,60	16,05±0,70	16,50±1,03	16,40±1,04
QT (ms)	33,47±2,32	36,20±3,98	39,68±3,18*	39,85±3,87*	40,72±3,98*#	41,48±4,18*#
FC (bpm)	532,84±15,66	498,32±18,57	490,29±47,74	495,33±32,66	492,71±24,40	490,21±18,91

*Diferença Significativa para ECG 1. # Diferença Significativa ECG 2. ANOVA, p<0,05. NFOR, n=6.

De acordo com os dados de ECG, podemos observar que longitudinalmente houve um aumento significativo do intervalo QT, inclusive no CO. Este foi o único parâmetro que apresentou alterações sistemáticas ao longo do tempo, sendo que o treinamento parece ter potencializado esse fenômeno nos grupos FOR e NFOR. Vale ressaltar que o anestésico utilizado para aferição do ECG (Zoletil®, 25mg/kg peso corporal) é um anestésico do tipo dissociativo que sabidamente apresenta efeito cardioestimulatório, aumentando a FC dos animais no momento da aferição (WILSON et al., 1993).

4.3. Histologia

4.3.1. HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Em relação à histologia básica, não observamos diferença qualitativa entre os diferentes grupos, conforme apresentado na Figura 12. Não visualizamos alterações na presença de infiltrado celular, uma vez que todos os grupos apresentaram nível semelhante, principalmente na região periférica e em torno de vasos. Além disso, não foi observada esteatose cardíaca e regiões isquêmicas (ou com diminuição da luz de vasos).

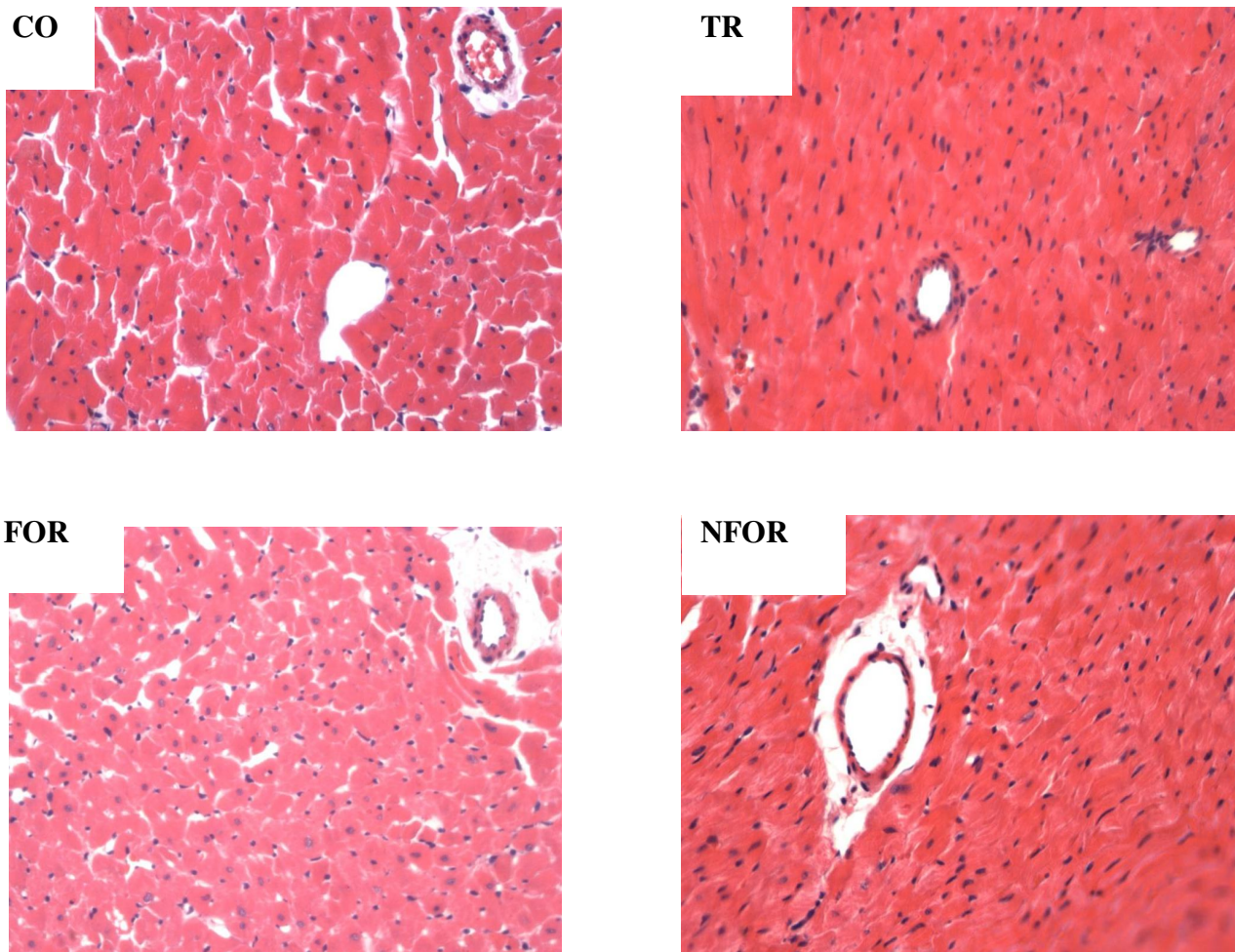


FIGURA 12. Histologia Básica (HE, 40x) de quatro ratos representantes dos grupos experimentais CO, TR, FOR e NFOR. Não houve diferença qualitativa.

4.3.2. PICROSSÍRIUS (*SIRIUS RED*)

Semelhante ao que ocorreu com a técnica de HE, não foi observada diferença qualitativa na presença de colágeno entre os diferentes grupos, conforme Figura 13.

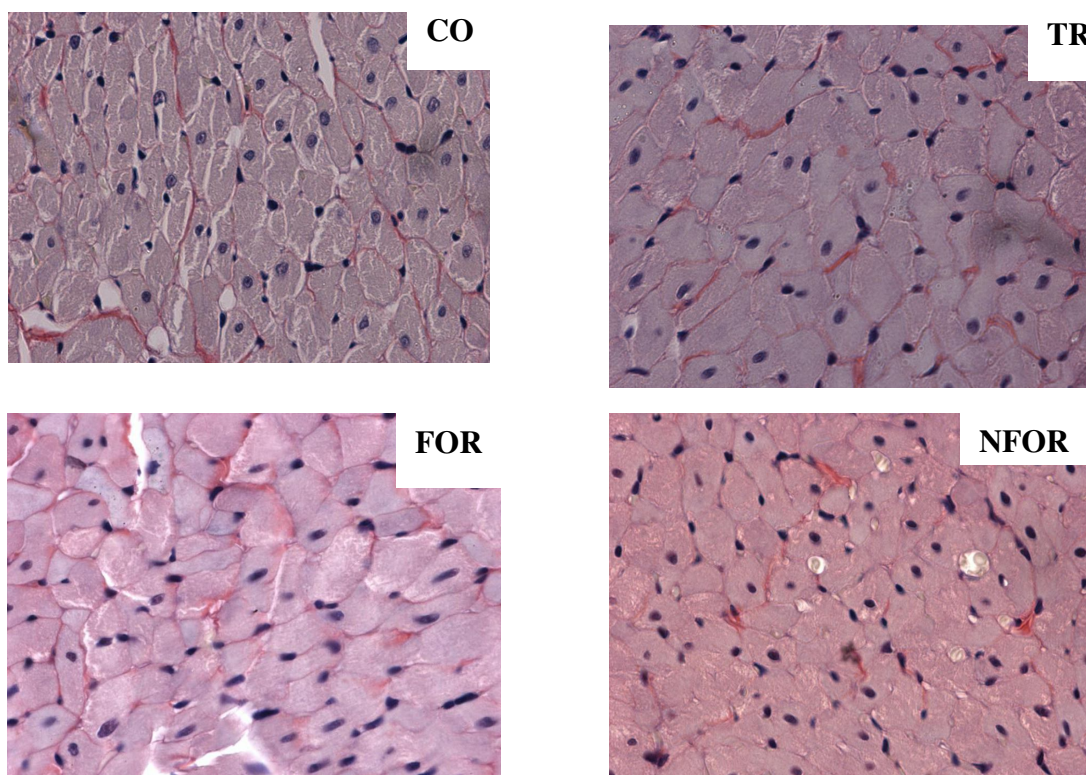


FIGURA 13. Histologia Básica (*Sirius Red*, 40x) de quatro animais representantes dos Grupos experimentais CO, TR, FOR e NFOR. Não houve diferença qualitativa.

No que diz respeito à análise quantitativa do colágeno, apresentamos na Tabela VIII os dados obtidos a partir da morfometria. Os dados correspondem à análise de três animais ($n=3$) em cada grupo, exceto o TR.

Tabela VIII. Área de colágeno (%) no ventrículo esquerdo (VE).

	ÁREA DE COLÁGENO		
	CO	FOR	NFOR
COLÁGENO (% ÁREA TOTAL- VE)	$1,43 \pm 1,16$	$1,56 \pm 1,42$	$1,38 \pm 1,49$

Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p<0,05$). Dados correspondentes a três animais de cada grupo. Foram quantificados 30 campos por animal, totalizando 90 campos por grupo.

Corroborando com as observações prévias feitas na análise qualitativa, vimos que não houve diferença quantitativa na presença de colágeno entre os grupos, reforçando que as alterações morfológicas referentes ao colágeno no miocárdio foram pouco significativas.

4.3.3. MORFOMETRIA

Os dados correspondentes ao peso corporal e à massa do miocárdio dos animais no dia do sacrifício estão contidos na Tabela IX.

Tabela IX. Peso corporal, peso do coração e razão peso coração/peso corporal.

	CO	TR	FOR	NFOR
Peso Corporal (g)	416,20 ± 41,14	406,78 ± 35,05	366,89 ± 24,12*	370,29 ± 33,03*
Peso Coração (mg)	1196,70 ± 140,57	1285,81 ± 51,89	1198,43 ± 105,89	1203,18 ± 111,60
Coração/Peso Corporal (mg/g)	2,88 ± 0,22	3,18 ± 0,26	3,27 ± 0,27*	3,25 ± 0,17*

* Diferença Significativa (ANOVA, $p < 0,05$) para CO. CO, n=9; TR, n=5; FOR, n=11, NFOR, n=8.

Em relação ao peso corporal, podemos observar que não houve diferença significativa entre o grupo CO e TR. Todavia, no decorrer do protocolo quando aumentamos a frequência de treino, ocorreu uma queda significativa nos grupos FOR e NFOR quando comparado ao CO. Em relação ao peso do coração não foi observado diferença significativa entre os grupos a despeito do desempenho. Quando utilizamos a massa corporal dos animais para relativizarmos o peso do coração, observamos que há um aumento significativo desta razão, nos grupos FOR e NFOR em relação ao CO. Todavia, este aumento é reflexo da queda no peso corporal e não é decorrente de um ganho de massa cardíaca.

Com o intuito de verificarmos diferenças morfológicas ao nível celular no que diz respeito a ganhos hipertróficos, apresentamos na Tabela X dados referentes à área celular no VE.

Tabela X. Área de secção transversal do cardiomiócito do ventrículo esquerdo.

	ÁREA CELULAR		
	CO	FOR	NFOR
ÁREA CELULAR VE (um²)	184,30 ± 70,72	220,85 ± 59,39*	204,04 ± 55,64*

* Diferença Significativa para CO (ANOVA, $p < 0,05$). Dados correspondentes a três animais de cada grupo. Foram quantificadas 30 células por animal, totalizando 90 células por grupo.

Notamos que houve um aumento significativo na área de secção transversa celular nos grupos FOR e NFOR quando comparados ao CO, sendo esta uma adaptação inerente ao tipo de treinamento (*endurance*) aplicado no protocolo (SCHULTZ et al., 2007). Desta forma, apesar de não observamos ganhos de massa cardíaca nos grupos que treinaram, ao nível celular detectamos adaptações morfológicas induzidas pelo protocolo de OT, mas não evidenciamos diferenças entre os grupos FOR e NFOR.

4.4. Análises bioquímicas

Os resultados referentes às análises de SOD, GR, CAT e TBARS realizadas no VE estão contidos na Figura 14 na forma de *boxplot*.

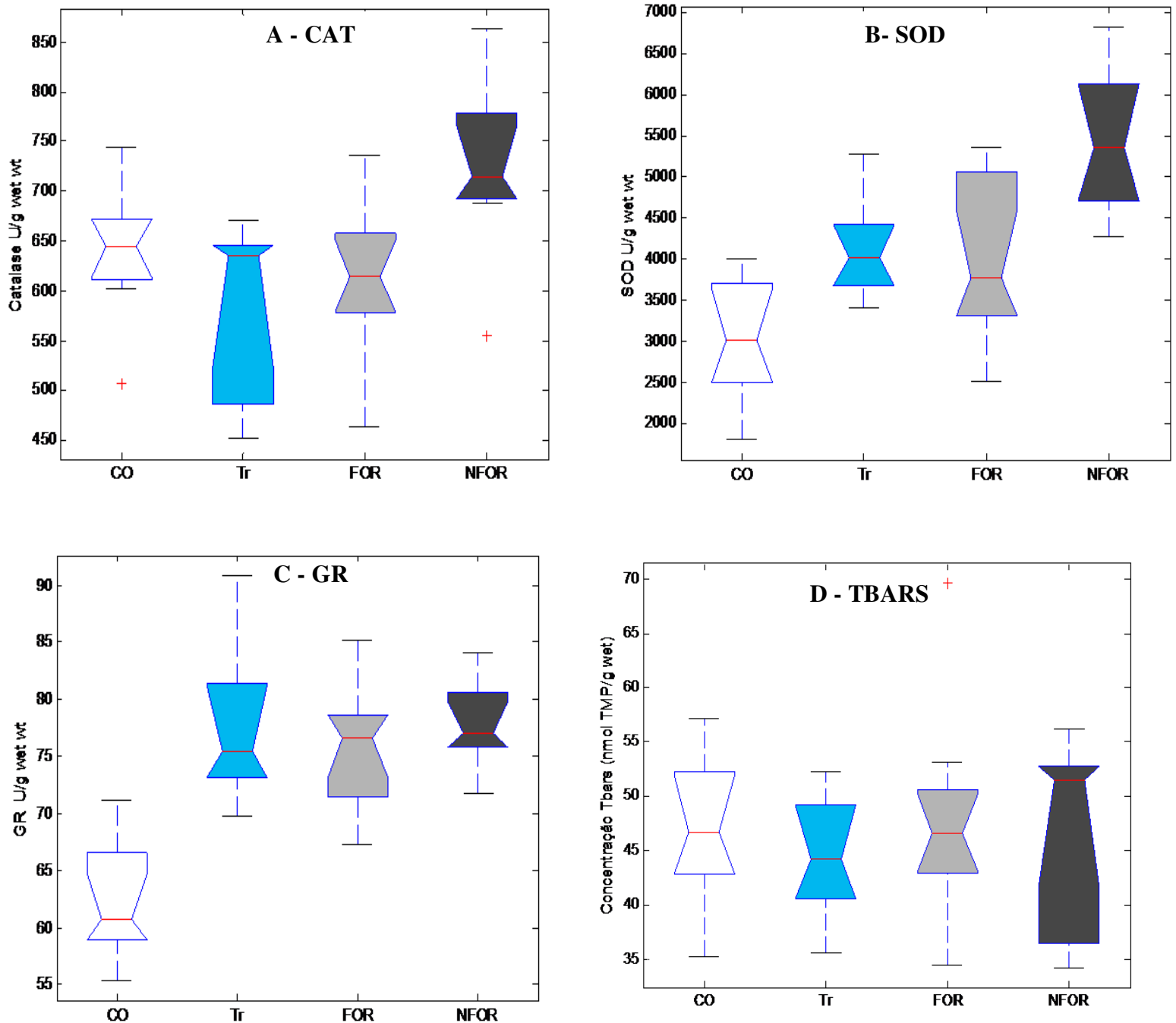


FIGURA 14. *Boxplot* da atividade da CAT (A), SOD (B), GR (C) e TBARS (D) no VE dos grupos CO (n=9), TR (n=5), FOR (n=11) e NFOR (n=8). CAT: Diferença significativa NFOR x demais grupos. SOD: Diferença significativa NFOR x demais grupos e TR x CO. GR: Diferença significativa CO x demais grupos. TBARS: Não houve diferença significativa. A não sobreposição dos intervalos de confiança foi utilizada como parâmetro estatístico.

Observamos um aumento significativo na atividade das enzimas SOD e CAT no grupo NFOR, quando comparadas aos demais grupos. Já a GR, apresentou um

comportamento distinto, visto que não houve diferença entre os animais que treinaram, mas houve aumento destes em relação ao CO. Sobre os dados de TBARS, podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos.

4.5. Índice Apoptótico – TUNEL

A Figura 15 apresenta a Média $\pm$ DP referente ao índice de apoptose nos diferentes grupos experimentais. Acima da média de cada grupo, está indicada a razão entre o total de campos que apresentaram algum núcleo apoptótico e o total de campos quantificados. Esta razão é um indicativo da proporção deste fenômeno nos diferentes grupos. Ao lado, encontra-se uma prancha com fotos representativas de cada grupo sendo que as setas indicam núcleos em apoptose.

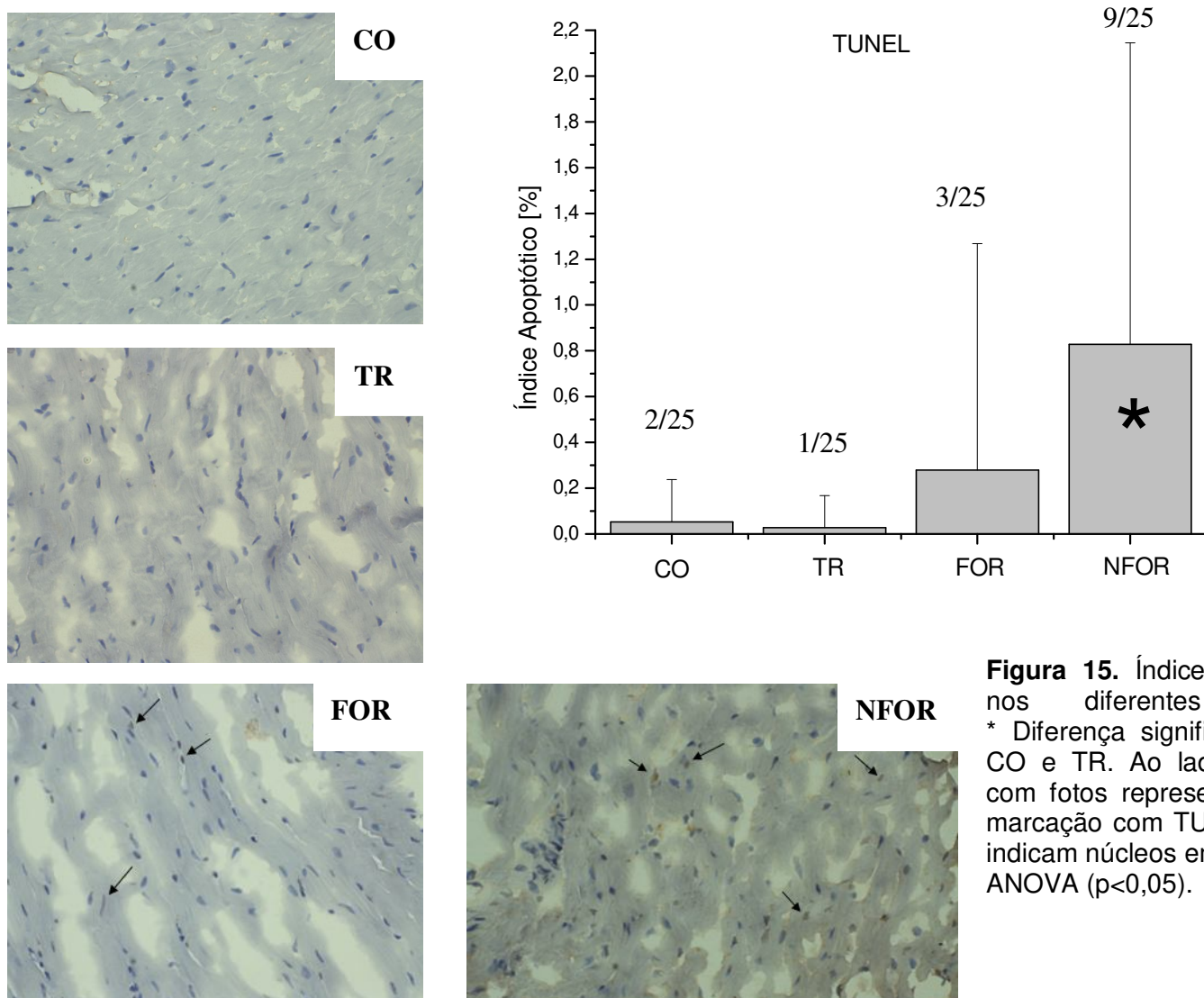


Figura 15. Índice Apoptótico nos diferentes grupos. * Diferença significativa para CO e TR. Ao lado, prancha com fotos representativas da marcação com TUNEL. Setas indicam núcleos em apoptose. ANOVA ($p < 0,05$).

De acordo com os dados, podemos observar que o índice apoptótico é bastante baixo no miocárdio de ratos de maneira que os grupos CO, TR e FOR apresentaram um índice médio inferior a 0,5% ($0,05 \pm 0,18$; $0,03 \pm 0,14$ e $0,28 \pm 0,99$ %, respectivamente). Já o grupo NFOR, apesar de também apresentar baixos índices ($0,82 \pm 1,32$ %), mostrou aumento significativo em relação aos grupos CO e TR. Além do índice apoptótico, o número de campos marcados e o número de animais com marcação reforçam a maior presença deste evento no NFOR. O grupo NFOR apresentou apoptose em quatro animais enquanto o FOR apresentou em dois e o CO e TR em apenas um cada grupo. Vale ressaltar que foram analisados cinco animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

A queda ou estagnação prolongada do desempenho é o único parâmetro obrigatoriamente relacionado com o *overreaching* não funcional (NFOR) enquanto a manutenção ou eventual aumento de desempenho é característica do estado FOR (MEEUSEN et al., 2006). Tanto o estado FOR quanto NFOR são conseqüências ao overtraining (OT), ou seja, de um período de treino intensificado. Neste estudo, o OT foi caracterizado por um período de treinamento de alto volume (semanas 10 e 11, Tabela I) e a análise do desempenho foi o parâmetro utilizado como critério de seleção para a distinção dos grupos experimentais CO, TR, FOR e NFOR.

Estabelecer uma análise pareada dos parâmetros bioquímicos em músculo cardíaco de ratos ao longo do processo de treinamento é tecnicamente muito difícil de realizar. Contudo, consideramos neste caso, que os grupos representam os diferentes estados de dois processos contínuos de treinamento que têm em comum o estado ativo (CO) e o de treinamento moderado (TR) com a posterior distinção em FOR (*continuum* 1) ou NFOR (*continuum* 2) após um período de duas semanas de OT. Portanto, quaisquer alterações similares dos grupos FOR e NFOR comparadas ao CO e TR, provavelmente refletem as respostas comuns do OT (treinamento de alto volume), enquanto quaisquer alterações entre FOR e NFOR, refletem a intolerância (NFOR) ou tolerância (FOR) de alguns ratos ao OT, gerando a queda (NFOR) ou aumento (FOR) de desempenho, relativizando o efeito do OT às características intrínsecas de cada animal.

Os dados de desempenho aqui apresentados indicam que até o teste T5, os grupos FOR e NFOR, selecionados *a posteriori*, mostraram níveis de desempenho similares ao observado pelos animais do grupo TR em T4 (Figura 11). Dessa forma, consideramos que o grupo TR representa os grupos FOR e NFOR até o teste de desempenho T4, quando o treinamento induziu aumento de desempenho em todos os grupos. O aumento em quatro vezes da frequência diária de treinamento foi determinante na diferenciação dos grupos FOR e NFOR, induzindo à queda de desempenho em alguns ratos agrupados como NFOR e aumentando nos ratos FOR.

Isto comprova que apesar do OT ser necessário para o aumento de desempenho no alto rendimento é ao mesmo tempo prejudicial para alguns, sendo considerado um processo crítico que merece um controle individualizado de adequação das cargas de treinamento frente à recuperação. Os resultados de desempenho apresentados nesse estudo reproduzem o mesmo comportamento já observado por Hohl et al., (2009), evidenciando que o protocolo de indução ao processo de OT é reprodutível em ratos *Wistar*.

A queda de rendimento apresentada pelo grupo NFOR em T6 (Figura 11) não pode ser associada ao processo de destreinamento, pois os volumes de treino realizados pelos animais do grupo TR, FOR e NFOR até o T4 e FOR e NFOR no T6 seriam suficientes para ocasionar aumento no desempenho (Figura 11).

A queda de desempenho poderia estar associada à diminuição do débito cardíaco ocasionando um déficit no transporte de oxigênio para os músculos em contração durante o teste, visto que está bem estabelecido que a capacidade cardiorrespiratória é um dos principais limitantes para o aumento do $VO_2\text{max}$ (BASSETT & HOWLEY, 2000). O débito cardíaco poderia diminuir em virtude de possíveis danos teciduais advindos do aumento da geração de EROS durante o exercício. Uma alta produção de EROS poderia superar a capacidade de defesa antioxidante celular que, em última instância, comprometeria a capacidade contrátil do miocárdio. Neste caso, o estresse oxidativo poderia ocasionar aumento da peroxidação lipídica e alterações na atividade das enzimas antioxidantes tendo como últimas conseqüências o aumento na apoptose ou necrose tecidual com o surgimento de infiltrado celular. Os possíveis danos na morfologia cardíaca poderiam ser detectados em alterações ou anomalias no ECG de repouso, o que tornaria a análise do ECG uma possível ferramenta de controle e diagnóstico do estado NFOR em atletas durante o treinamento intensificado (OT).

Na análise da morfometria cardíaca observamos que não houve diferença na massa do coração, independente do nível de treinamento, conforme observado por outros autores (SENTURK et al., 2001; CRISMAN et al., 1985; FULLER & NUTTER, 1981). Todavia, quando relativizamos esta variável pela massa corporal, notamos um aumento significativo desta razão nos grupos FOR e NFOR em relação ao CO (Tabela

IX). Este comportamento foi decorrente da perda de peso corporal do FOR e NFOR ao longo do protocolo, sendo que resultado semelhante foi encontrado por Moran et al., (2004) em um treinamento em esteira muito semelhante ao nosso: doze semanas com intensidade de 25m/min, 45 minutos de duração e frequência de cinco vezes na semana.

Na análise pareada do ECG, o único parâmetro que encontramos alteração sistemática foi o aumento do intervalo QT nos grupos CO, FOR e NFOR (Tabelas VIIA, VIIB, VIIC). As alterações do ECG documentadas em atletas em *overtraining* incluem mudanças nos segmentos ST, nos intervalos PR, QT e arritmias, sendo que vários autores têm reportado tanto alargamento (KUIPERS & KEIZER, 1988; FOSTER et al., 1982; MICHAEL, 1961) como baixa amplitude (STEGEMAN, 1981) da onda T. Eletrocardiograficamente, o intervalo QT reflete a sístole ventricular e compreende o período de tempo que o coração leva para completar a despolarização e a repolarização dos ventrículos sendo medido, no ECG, a partir do início da onda Q até o final da onda T (BRONZATTO et al., 2001).

Este parâmetro (QT) é considerado importante, pois uma série de eventos fisiológicos e patológicos relaciona-se ao seu prolongamento (i.e. vagotonia, aumento da idade, isquemia do miocárdio, arritmias, doenças sistema nervoso central, alterações hidroeletrólíticas, Síndrome Congênita do QT Longo e uso de psicotrópicos) em alguns casos vinculando-se ao fenômeno de morte súbita (KOEHLER et al., 2004). Todavia, a definição de limites superiores para esta variável mostra-se uma tarefa difícil na literatura, já que inúmeros trabalhos mostram superposição de valores normais com valores prolongados do intervalo QT em indivíduos com Síndrome Congênita do QT Longo (KOEHLER, 2004).

O aumento observado no intervalo QT ocorreu nos grupos CO, FOR e NFOR, indicando que esta variação parece estar atrelada tanto ao aumento da idade dos ratos como ao processo de treinamento (DIAS DA SILVA et al., 2002). Neste sentido, o treinamento de alto volume utilizado no presente trabalho, parece ter potencializado esta alteração, evidenciando o risco inerente deste tipo de atividade. Uma das possíveis justificativas para tal fenômeno seria a hipertrofia do miocárdio, que poderia retardar o processo de repolarização dos ventrículos (DIAS DA SILVA et al., 2002). Todavia,

apesar do aumento da área celular do cardiomiócito (Tabela X) corroborar esta teoria, não parece haver uma associação deste parâmetro (QT) com a queda de desempenho, já que houve uma baixa correlação entre estes ($r = -0,24$).

Em relação às alterações histológicas provocadas pelo protocolo de treinamento, não observamos indícios de infiltrado celular, alterações na quantidade de colágeno, esteatose, regiões isquêmicas ou com diminuição na luz de vasos nos grupos FOR e NFOR (Figura 12). Nossos dados estão de acordo com os encontrados por Huang et al., (2009) que mostraram manutenção da estrutura histológica do miocárdio após um protocolo de treinamento semelhante ao utilizado neste estudo. Por outro lado, quando analisamos a área da superfície celular dos cardiomiócitos, detectamos um remodelamento do VE decorrente do aumento na área de secção transversa (hipertrofia cardiomiocítica), conforme já observado por Kolwicz, et al., (2009). De acordo com Fenning et al., (2003), o remodelamento do VE decorrente da hipertrofia do cardiomiócito, sem alterações na quantidade de colágeno, permite uma melhor capacidade contrátil, levando a uma otimização da função cardíaca com concomitante aumento no débito cardíaco. Possivelmente o treinamento até a semana 11 (Tabela I) levou a uma melhora da função cardíaca tanto no FOR como no NFOR, a despeito das diferenças de desempenho.

A estrutura dos cardiomiócitos do NFOR aparenta não ter sido comprometida considerando-se o nível de peroxidação lipídica (Figura 14) e apoptose (Figura 15) apresentados. Apesar dos ratos NFOR mostrarem um aumento significativo de apoptose em relação ao CO e TR, observa-se que a média foi baixa e apresenta um DP alto ($0,82 \pm 1,32 \%$), sendo equivalente aos índices encontrados em ratos saudáveis em alguns trabalhos na literatura (KOLWICZ et al., 2009; METCALF et al., 2009; LEE et al., 2008). No entanto, o aumento significativo do NFOR em relação ao grupo CO e ao TR e a tendência de aumento observada no FOR, sugere uma relação deste fenômeno com o volume de treino executado.

Alguns trabalhos apontaram os riscos cardíacos envolvidos em atividades de *ultraendurance* destacando a perda transiente da função ventricular, aumento nos danos gerados ao tecido cardíaco e o seqüente aparecimento de biomarcadores sanguíneos de lesão do miocárdio (GEORGE et al., 2008; SCOTT & WARBURTON et

al., 2008). Huang et al., (2009) em um trabalho com ratos utilizando-se de um protocolo em esteira semelhante ao deste presente estudo, ressaltou os possíveis riscos envolvidos na associação entre grandes volumes de exercícios de *endurance* e atividades que levem à exaustão. Apesar das aferições terem sido realizadas logo após o término do protocolo e não 48hs após como em nosso modelo, os autores (HUANG et al., 2009) mostraram aumento na deleção do mtDNA⁴⁸³⁴, assim como o aumento de apoptose no VE, ponderando sobre os malefícios deste tipo de atividade. Nosso modelo não generaliza este provável efeito do treinamento de grande volume, mas relativiza a um grupo de ratos mais vulneráveis a este fenômeno caracterizado pelo grupo NFOR.

As EROS, fundamentalmente o H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, são conhecidas indutoras de apoptose (JACKSON et al., 2002) devido a sua ação na abertura de poros que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial e facilitam a liberação de proteínas pró apoptóticas no citosol (CHABI et al., 2008). Nesses casos, tanto o aumento exacerbado na geração de EROS quanto o conseqüente dano às membranas mitocondriais destacam-se como os principais responsáveis pela indução da apoptose (KUJOTH et al, 2005; MATES & JIMENEZ, 2000). Nesse contexto, o grande aumento da enzima SOD e, especialmente, da CAT no grupo NFOR (Figura 14), sugerem que o cardiomiócito deste grupo possui uma capacidade de produção de EROS maior que o grupo FOR submetido às mesmas condições de treinamento.

Muitos trabalhos mensuraram a atividade das enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT, GPX e GR) do miocárdio de ratos em diferentes protocolos de *endurance* em esteira rolante (HUANG, 2009; GUL et al., 2006; MORAN, et al., 2004; LIU et al., 2000; POWERS et al., 1993). No entanto, a literatura aponta resultados diversos, como aumentos, manutenção ou mesmo diminuição da atividade destas enzimas em diferentes magnitudes (para revisão, buscar referências em ASCENSÃO et al., 2007). Contudo, a diferença deste presente estudo consiste no fato que podemos comparar as respostas enzimáticas de dois grupos (FOR e NFOR) com desempenhos distintos e que se submeteram ao mesmo protocolo de treinamento de alto volume (OT). Além disso, podemos recorrer ao grupo TR para reproduzir os efeitos de um treinamento de *endurance* moderado.

A atividade da GR aumentou em todos os grupos, em relação ao CO (Figura 14). No miocárdio, a GR apresenta atividade catalítica maior do que no músculo esquelético e parece ser responsiva não só ao treinamento de *endurance*, mas também ao aumento da idade (BEJMA et al., 2000; SOMANI et al., 1995). A GR possui um importante papel na regulação do estado redox da célula (SOMANI et al., 1995), uma vez que a GSH é o antioxidante não enzimático mais importante do cardiomiócito, sendo fundamental na manutenção do estado redox (MORAN et al., 2004). A [GSH] no miocárdio de ratos parece ser maior do que no músculo, sendo que a diminuição de [GSH] leva a perda na proteção deste tecido contra danos advindos de eventos de isquemia-reperfusão (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; RAMIRES & JI, 2001; LIU et al., 2000). Alguns trabalhos mostraram aumento na concentração de GSH e na razão GSH/GSSG em decorrência do treinamento (RAMIRES & JI, 2001; SOMANI et al., 1995). Portanto, o aumento da atividade da GR nos grupos TR, FOR e NFOR representa uma adaptação importante contra a instalação do estresse oxidativo em cardiomiócitos, independente do aumento de volume de treinamento que gere aumento (FOR) ou queda de desempenho (NFOR).

A atividade da SOD se mostrou aumentada no grupo TR e em 50% dos ratos FOR (acima da mediana) em relação ao CO. O grupo NFOR mostrou um aumento ainda maior, com o intervalo de confiança acima dos demais grupos. O aumento da SOD parece ser uma adaptação esperada, mesmo em elevadas magnitudes, uma vez que a Mn-SOD é altamente induzida e um importante fator na proteção contra a apoptose e necrose (KAVAZIS et al., 2008).

Powers et al. (1993), investigaram o efeito de nove modelos de treinamento de 10 semanas, com diferentes intensidades e tempos de duração (30, 60 e 90 min.), na atividade da SOD nos ventrículos direito (VD) e esquerdo. O estudo (POWERS et al., 1993) mostrou elevação da SOD em todos os protocolos sendo este bastante elevado nos protocolos de maior intensidade e duração. Pelo fato da SOD compor a primeira linha de defesa contra $O_2^{\bullet-}$ o aumento da sua atividade pode diminuir a exposição do miocárdio a este radical, reduzindo indiretamente a formação de $^{\bullet}OH$ evitando assim a instalação do estresse oxidativo (MORAN et al., 2004; POWERS et al., 1993). As atividades da GR e SOD nos grupos TR, FOR e NFOR sugerem que o aumento nas

atividades destas enzimas parece esperado nos cardiomiócitos do VE frente ao estímulo do treinamento de *endurance*.

A atividade da CAT apresentou aumento significativo apenas no grupo NFOR comparado a todos os grupos analisados, permanecendo inalterada nos grupos TR e FOR em relação ao CO (Figura 14). O aumento da CAT parece ser um fato extraordinário do grupo NFOR, inclusive se comparado ao estudo de Powers et al., (1993) que não observaram aumento na atividade da CAT no VE e VD em nenhum dos nove protocolos de 10 semanas de treinamento de *endurance* com diferentes intensidades e volumes. Outros trabalhos que mostraram aumento de outras enzimas do sistema de defesa antioxidante enzimático em protocolos de *endurance*, apresentam valores de CAT inalterados ou com mudança pouco significativa (GUL et al., 2006; RAMIRES & JI, 2001; SOMANI et al., 1995;). O aumento da CAT no grupo NFOR sugere uma produção elevada de H_2O_2 no cardiomiócito do VE uma vez que a CAT possui um alto valor de k_m comparado à glutathione peroxidase e necessita de concentrações maiores de H_2O_2 para atingir sua V_{max} (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

As EROS desempenham importante função na ativação de fatores de transcrição das enzimas antioxidantes SOD e CAT (FRANCO et al., 1999). Nesse contexto, a família das MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) aparece como sendo uma das principais ligações entre os níveis celulares de EROS e adaptação de enzimas antioxidantes (CUSCHIERI & MAIER, 2005). A cascata de ativação clássica das MAPKs consiste no aumento da ativação dos fatores de transcrição nucleares, em virtude da ativação destas por EROS (JACKSON et al., 2002). Tal aumento levaria, por conseguinte, a um estímulo na expressão de genes que codificam as enzimas antioxidantes (CUSCHIERI & MAIER, 2005; CHEN et al., 2001).

A principal ligação conhecida entre a produção de EROS e a síntese de proteínas antioxidantes envolve a regulação dos ativadores transcricionais NF- κ B. A ativação destes sinalizadores por EROS participa tanto na regulação da transcrição quanto no aumento da abundância das enzimas antioxidantes SOD e CAT em resposta ao aumento da produção de EROS (JI, 2007; JACKSON et al., 2002; ZHOU et al., 2001). Devido à maior meia-vida e ao livre acesso do H_2O_2 pelas membranas celulares,

o H_2O_2 exerce importante papel sinalizador, podendo desencadear, inclusive, a apoptose (POWERS et al., 2009; KAVAZIS et al., 2008).

Uma maior concentração de EROS no cardiomiócito do VE parece ser o diferencial no aumento da atividade das enzimas SOD e CAT e também do aumento da apoptose no grupo NFOR em relação aos demais grupos. Embora este aumento ainda não possa ser caracterizado como um estado de estresse oxidativo devido a manutenção dos níveis de TBARS e ao aumento discreto da apoptose (em relação ao FOR), o aumento da produção de EROS dos ratos NFOR pode gerar a longo prazo um estado pró - oxidante no cardiomiócito. Esse efeito não é advindo do *overtraining* somente, uma vez que os animais dos grupos FOR e NFOR foram submetidos ao mesmo volume de treino. Possivelmente, uma provável causa desta diferença reside em características estruturais das mitocôndrias dos cardiomiócitos (composição das proteínas da CTE, composição e densidade dos poros de transição de permeabilidade,, alterações da bi-camada lipídica) que levariam a uma maior produção de EROS nos ratos NFOR (KOLWICZ et al., 2009; KAVAZIS et al., 2008; BEJMA et al., 2000). O modelo animal de *overtraining* proposto neste estudo pode ser utilizado para elucidar estas questões no futuro.

6. CONCLUSÕES

A manutenção dos níveis de TBARS e a ausência de alterações morfológicas ou eletrofisiológicas que poderiam comprometer a atividade contrátil do coração indicam que o miocárdio adaptou-se positivamente ao treinamento em todos os grupos treinados. Todavia, tanto o aumento nas enzimas do sistema de defesa antioxidante SOD e CAT como o aumento de apoptose no NFOR indicam que a produção de EROS parece estar mais exacerbada neste grupo, sendo provável a instalação de um quadro de estresse oxidativo aumentando o risco do aparecimento de lesões no tecido cardíaco destes animais. Pelo fato de não termos realizado medidas diretas da função cardíaca (ECO) demonstrando que a queda de desempenho do grupo NFOR não esteja diretamente associada a um comprometimento do miocárdio, não podemos descartar este mecanismo. Assim, apesar da queda de desempenho do grupo NFOR parecer estar associada a outros fatores que não apenas o comprometimento do miocárdio, nossos dados apontam que a atividade física regular com alto volume deve ser conduzida com cautela e com avaliação periódica da função cardíaca. Resultados recentes de nosso grupo de pesquisa sugerem que a queda de desempenho do grupo NFOR parece estar relacionada com um aumento nos níveis de estresse oxidativo e queda da capacidade oxidativa mitocondrial do músculo esquelético (Rodrigo Ferraresso, 2010; Dissertação de Mestrado).

7. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods Enzymol** 105:121-126, 1984.

ALESSIO HM, GOLDFARB AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **J Appl Physiol** 64: 1333-1336, 1988.

ARMSTRONG LE, VANHEEST JL. The unknown mechanism of the overtraining syndrome. **Sports Med** 32(3): 185-209, 2002.

ASCENSÃO A, FERREIRA R, MAGALHÃES J. Exercise-induced cardioprotection – biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. **Int J Cardiol** 117: 16-30, 2007.

ATALAY M, SEN CK. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Ann. N.Y. Acad Sci* 874, 169–177, 1999.

BABUIN L, JAFFE AS. Troponin: The biomarker of choice for the detection of cardiac injury. **Can Med Ass J** 173(10): 1191-202, 2005.

BARBATO JC, KOCH LG, DARVISH A, CICILA GT, METTING PJ, BRITTON SI. Spectrum of aerobic endurance running performance in eleven strains of rats. **J Appl Physiol** 85 (2): 530 – 536, 1998.

BARJA G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. **J Bioenerg Biomembr** 31: 347–366, 1999.

BARRON JL, NOAKES TD, LEVY W. Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. **J Clin Endocrinol Metab** 60: 803-806, 1985.

BASSETT DR, HOWLEY ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. **Med Sci Sports Exerc** 32 (1): 70-84, 2000.

BEJMA J, RAMIRES P, JI LL. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: Differential effects in the myocardium and liver **Acta Physiol Scand** 169: 343-351, 2000.

BESTETTI RB, OLIVEIRA JSM. The surface electrocardiogram: a simple and reliable method for detecting overt and latente heart disease in rats. **Braz J Med Biol Res** 23: 1213-1222, 1990.

BESTETTI RB, RAMOS CP, SILVA JF, SALES-NETO VN, OLIVEIRA JSM. Ability of the electrocardiogram to detect myocardial lesions in isoproterenol-induced rat cardiomyopathy. **Card Res** 21: 916-921, 1987.

BOMPA TO. **Periodização: teoria e metodologia do treinamento**. São Paulo, Phorte Editora, 2001.

BONILHA AMM, SARAIVA RM, KANASHIRO RM, PORTES LA, ANTONIO EL, TUCCI PJF. A routine electrocardiogram should not be used to determine the size of myocardial infarction in the rat. **Braz J Med Biol Res** 38: 615-619, 2005.

BRONZATTO, H.A.; SILVA, R.P.; STEIN R. Morte súbita relacionada ao exercício. **Rev Bras Med Esporte** 7(5):163-169, 2001.

BRUIN G, KUIPERS H, KEIZER HA, VANDER VUSSE GJ. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **J Appl Physiol** 76 (5): 1908-1913, 1994.

BRYAN G, WARD A, RIPPE JM. Athletic heart syndrome. **Clin Sports Med** 11(2): 259-72, 1992.

BUONOCORE G, GROENENDAAL F. Anti-oxidant strategies. **Semin Fetal Neonat Med**. xx: 1-9, 2007.

BUSCARIOLLI R, MACEDO DV, SANTOS GB, AREAS MA, HOHL R. Reliability of the electrocardiogram in normal rats. **Int J Exerc Sci** 1: 63-63, 2008.

CHABI B, LJUBICIC V, MENZIES KJ, HUANG JH, SALEEM A, HOOD DA. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. **Aging Cell** 7(1): 2-12, 2008.

CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev** 59: 527-605, 1979.

CHEE CE, ANASTASSIADES CP, ANTONOPOULOS AG, PETSAS AA, ANASTASSIADES LC. Cardiac hypertrophy and how it may break an athlete's heart – the Cypriot case. **Eur J Echo** 6: 301-307, 2005.

CHEN Z, GIBSON TB, ROBINSON F, SILVESTRO L, PEARSON G, XU B, WRIGHT A, VANDERBILT C, COBB MH. MAP kinases. **Chem Rev** 101: 2449–2476, 2001.

COHEN G, HOCHSTEIN P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Bioch** 2: 1420-1428, 1963.

COOPER DM, RADOM-AIZIK S, SCHWINDT C, ZALDIVAR F JR. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. **J Appl Physiol**. 103(2):700-9, 2007.

COSTILL DL, FLYNN MG, KIRWAN JP, HOUMARD JA, MITCHELL JB, THOMAS R, PARK SH. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. **Med Sci Sports Exerc** 20(3): 249-254, 1988.

COUTTS AJ, WALLACE LK, SLATTERY KM. Monitoring changes in performance, physiology, biochemistry, and psychology during overreaching and recovery in triathletes. **Int J Sports Med**. 28(2):125-34, 2007.

CRISMAN RP, RITTMAN B, TOMANEK RJ. Exercise-induced myocardial capillary growth in the spontaneously hypertensive rat. **Microvasc Res** 30: 185–194, 1985.

CUSCHIERI J, MAIER RV. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Crit Care Med** 33: S417–S419, 2005.

DAVIES KJ, QUINTANILHA AT, BROOKS GA, PACKER L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun** 107:1198–1205; 1982.

DIAS DA SILVA VJ, FERREIRA NETO E, SALGADO HC, FAZAN JUNIOR R. Chronic converting enzyme inhibition normalizes QT interval in aging rats. **Braz J Med Biol Res** 35 (9): 1025-1031, 2002.

FELLMAN N, BEDU M, BONDET G. Inter-relationships between pituitary and catecholamines during a 6-day Nordic ski race. **Eur J Appl Physiol** 64: 258-265, 1992.

FENNING A, HARRISON G, DWYER D, ROSE'MEYER R, BROWN L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. **Molec Cel Biochem** 251: 51–59, 2003.

FERRARESSO R. Estudo da relação entre ataque oxidativo, sistema de defesa antioxidante e atividade mitocondrial em ratos submetidos a um protocolo de indução ao overtraining em esteira. **Tese de Mestrado**. Instituto de Biologia, Unicamp 2010.

FINAUD J, LAC G, FILAIRE E. Oxidative stress. Relationship with exercise and training. **Sports Med** 36 (4): 327-358, 2006.

FITZGERALD L. Overtraining increased the susceptibility to infection. **Int J Sports Med** 12(1):5-8, 1991.

FOSTER C, POLLOCK M, FARREL P, MAKSDUD M, ANHOLM J. Training responses of speed skaters during a competitive season. **Res Quart Exerc Sports** 53: 243-6, 1982.

FRANCO AA, ODOM RS, RANDO TA. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. **Free Radic Biol Med** 27(9-10): 1122-32, 1999.

FRENCH JP, HAMILTON KL, QUINDRY JC, LEE Y, UPCHURCH PA, POWERS SK. Exercise-Induced cardioprotection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. **Faseb J** 22 (000-000), 2008.

FROEHLICH J. Overtraining syndrome. Inc Heil J, editor. Psychology of sport injury. **Champaign (IL): Human Kinetics** 59-70, 1995.

FRY RW, MORTON AR, KEAST D. Periodization of training stress - a review. **Can J Sports Sci** 17(3): 234-240, 1994.

FULLER EO, NUTTER DO. Endurance training in the rat: Performance of isolated and intact heart. **J Appl Physiol** 51: 941-947, 1981.

GEORGE K, SHAVE R, WARBURTON D, SCHARHAG J, WHYTE G. Exercise and the heart: Can you have too much of a good thing? **Med Sci Sports Exerc** 40 (8): 1390-1392, 2008.

GOMEZ-CABRERA MC, DOMENECH E, VIÑA J. Moderate exercise is na antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free Rad Biol Med** 44: 126-131, 2008.

GUL MA, DEMIRCAN B, TAYSI SE, OZTASAN NF, GUMUSTEKIN KA, SIKTAR EC, POLAT FMD, AKAR SA, AKCAY FB, DANE S. Effects of endurance training and acute

exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. **Comp Bioch Physiol A**143: 239–245, 2006.

GUL M, ATALAY M, HÄNNINEN O. Endurance training and glutathione dependent antioxidant defense mechanism in heart of the diabetic rats. **J Sports Sci Med.** 2:52–61, 2003.

HAI BO, JIANG N, MA G, QU J, ZHANG G, CAO D, WEN L, LIU S, JI LL, ZHANG Y. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: Role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. **Free Rad Biol Med** 44: 1373–1381, 2008.

HALLIWELL B & GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford Press**, Oxford, 2007.

HALSON SL, JEUKENDRUP AE. Does Overtraining Exist? **Sports Med** 34 (14): 967–981, 2004.

HOHL R, FERRARESSO RLP, BUSCARIOLLI R, LUCCO R, BRENZIKOFER R, MACEDO DV. Development and characterization of an overtraining animal model. **Med Sci Sports Exerc** 41 (5): 1155–1163, 2009.

HOPKINS WG. Measures of reliability in sports medicine and science. **Sports Med** 30 (1): 1–15, 2000.

HOPKINS WG. A new view of statistics. Sportscience [online]. Disponível em: URL: <http://sportsci.org/resource/stats>

HUANG CC, LIN TJ, CHEN CC, LIN W. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. **Eur J Appl Physiol** 107:697–706, 2009.

JACKSON, M.J; PAPA, S; BOLANOS, J; BRUCKDORFER, R; CARLSEN, H; ELLIOTT, R.M; FLIER, J; GRIFHTHS, H.R; HEALES, S; HOLST, B; LORUSSO, M; LUND, E; OIVIND MOSKAUG, J; MOSER, U; DI PAOLA, M; POLIDORI, M.C; SIGNORILE, A; STAHL, W; VINA-RIBES, J; ASTLEY, S.B. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. **Mol Aspects Med** 23: 209–285, 2002.

JACKSON MJ, PYE D, PALOMERO J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. **J Appl Physiol** 102: 1664–1670, 2007.

JI LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. **Exp Gerontol** 42: 582–593, 2007.

JI LL. Oxidative stress in the heart. C.K. Sen, L. Packer & O. Hanninen (eds) **Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise** Elsevier, Amsterdam, 2000.

JIN H, YANG R, LI W, LU HSIENWIE, RYAN MA, OGASAWARA AK, PEBORGH JV, PAONI NF. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 279: H2994-H3002, 2000.

JUDGE S, JANG YM, SMITH A et al. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. **Am J Physiol Reg Int Comp Physiol** 289: R1564-R1572, 2005.

KAVAZIS AN, MCCLUNG JM, HOOD DA, POWERS SK. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 294:928-935, 2008.

KAVAZIS AN. Exercise preconditioning of the myocardium. **Sports Med** 39 (11): 923-935, 2009.

KEIZER HA. Neuroendocrine aspects of overtraining In: Overtraining in sports. **Champaign, IL, Human Kinetics** 145-167, 1998.

KING A, LO YSA, CHIN MK, LI JX, SO RCH. Electrocardiographic abnormalities and cardiovascular physiology in athletic overtraining. **Hong Kong Med J** 1: 155-160, 1995.

KOEHLER NR, ZOUVI JP, ACEVEDO LA, SUKIENIK BJ, RABIN M. An analysis of the electrocardiogram QT interval. **Braz J Med Biol Res** 37: 27-29, 2004.

KOLWICZ SC, MACDONNELL SM, RENNA BF, REGER PO, SEQQAT R, RAFIQ K, KENDRICK ZV, HOUSER SR, SABRI A, LIBONATI JR. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 297: H1361-H1368, 2009.

KUIPERS H, KEIZER, HA. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. **Sports Med** 6: 79-92, 1988.

KUJOTH GC, HIONA A, PUGH TD, SOMEYA S, PANZER K, WOHLGEMUTH SE, HOFER T, SEO AY, SULLIVAN R, JOBLING WA, MORROW JD, VAN REMMEN H, SEDIVY JM, YAMASOBA T, TANOKURA M, WEINDRUCH R, LEEUWENBURGH C, PROLLA TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. **Science** 309 (5733): 481-4, 2005.

LABRUNIE GM, GOUVEIA MA. Disritmias cardíacas, cardioversão e desfibrilação. **Rev Bras Anesthesiol** 45: 1: 47 – 56, 1995.

LEE SD, KUO WW, BAU DT, KO FY, WU FL, KUO CH, TSAI FJ, WANG PS, LU MC, HUANG CY. The coexistence of nocturnal sustained hypoxia and obesity additively increases cardiac apoptosis. **J Appl Physiol** 104: 1144–1153, 2008.

LEHMANN M, BAUMGARTL P, WIESENACK C, et al. Training-Overtraining: influence of a defined increase in training volumes vs training intensity on performance, catecholamines and some metabolic parameters in experienced middle-and long-distance runners. **Eur J Appl Physiol** 64(2): 169-77, 1993.

LEEUEWENBURGH C, HEINECKE JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. **Curr Med Chem** 8 (7): 829-838, 2001

LIU J, YEO HC, OVERVIK-DOUKI E, HAGEN T, DONIGER SJ, CHU DW, BROOKS GA, AMES BN. Chronically and acutely exercised rats : biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol** 89: 21-28, 2000.

MACKINNON LT. Effects of overreaching and overtraining on immune function. In: Overtraining in sports. **Champaign, IL, Human Kinetics**, 219-241, 1998.

MARGONIS K, FATOUROS IG, JAMURTAS AZ, NIKOLAIDIS MG, DOUROUDOS I, CHATZINIKOLAOU A, MITRAKOU A, MASTORAKOS G, PAPASSOTIRIOU I, TAXILDARIS K, KOURETAS D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. **Free Radic Biol Med** Sep 15;43(6):901-10, 2007.

MATÉS JM, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol** 32(2): 157-70, 2000.

MCGILL R, TUKEY JW, LARSEN WA. Variations of box plots. **The American Statistician**. 32 (1): 12-16, 1978.

McELROY CL, GISSEN SA, FISHBEIN MC. Exercise-Induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. **Circulation** 57: 958-962, 1978.

MCNAIR D, LORR MM, DROPPLEMAN LF. Profile of mood states manual. **San Diego (CA)**, 1992.

MEEUSEN R, DUCLOS M, GLEESON M, RIETJENS G, STEINACKER J, URHAUSEN A. Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome. **Eur J Sports Sci** 6(l):1-14, 2006.

MEEUSEN R, PIACENTINI MF, BUSSCHAERT B, BUYSE L, DE SHUTTER G, STRAY-GANDERSEN J. Homonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over)training status. **Eur J Appl Physiol** 91: 140-146, 2004.

METCALF CS, POELZING S, LITTLE JG, BEALER SL. Status Epilepticus Induces Cardiac Myofilament Damage and Increased Susceptibility to Arrhythmias in Rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** *In Press*, 2009.

MICHAEL ED. Overtraining in athletes. **J Sports Med Phys Fitness** 1: 97-8, 1961.

MORAN M, DELGADO J, GONZALEZ B, MANSO R, MEGIAS A. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. **Acta Physiol Scand** 180: 157–166, 2004.

NEUMAYR G, GAENZER H, PFISTER R, STURM W, SCHWARZACHER SP, EIBL G, MITTERBAUER G, HOERTNAGL H. Plasma levels of cardiac troponin I after prolonged strenuous endurance exercise. **Am J Cardiol** 87(3):369-71, A10, 2001.

NIEMAN DC. Effects of athletic endurance training on infection rates and immunity. In: Overtraining in sports. **Champaign, IL, Human Kinetics**, 193-217, 1998.

NOAKES TD. Lore of running. **South Africa: Human Kinetics**, 2001.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for Lipid Peroxidases in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Anal Biochem** 95: 351-358, 1978.

PEAKE JM, SUZUKI K, COOMBEE JS. The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and relationship to oxidative stress after exercise. **J Nutr Biochem**. 18(6):357-71, 2007.

PELLICCIA A, MARON BJ, CULASSO F, DI PAOLO FM, SPATARO A, BIFFI A. Clinical significance of abnormal electrocardiographic patterns in trained athletes. **Circulation** 102: 278-84, 2000.

PETIBOIS C, CAZORLA G, POORTMANS JR, DELERIS G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. **Sports Med** 33: 83-94, 2003.

PHANEUF S, LEEUWENBURGH C. Apoptosis and Exercise. **Med Sci Sports Exerc** 33 (3): 393-396, 2001.

PLATEN P. Overtraining and the endocrine system. **Eur J Sport Sci** 2 (parte 1): 1-7, 2002.

POWERS SK, CRISWELL D, LAWLER J, MARTIN D, LIEU FK, JI LL, HERB RA. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. **Am J Physiol** 265: H2094–H2098, 1993.

POWERS SK, DUARTE J, KAVAZIS AN, TALBERT EE. Reactive oxygen species are signaling molecules for skeletal muscle adaptation. **Exp Physiol** 95 (1): 1-9, 2009.

POWERS SK, JACKSON MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev** 88: 1243-1276, 2008.

RADACK Z, KANEKO T, TAHARA S, NAKAMOTO H, OHNO H, SASVARI 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** 27: 69-74, 1999.

RADACK Z, TAYLOR AW, OHNO H, GOTO S. Adaptation to exercise induced oxidative stress: From muscle to brain. **Exerc Immunol Rev** 7: 90-107, 2001.

RAJAPPA M, SHARMA A. Biomarkers of cardiac injury: an update. **Angiology** 56 (6): 677-91, 2005.

RAMIRES PR, JI LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia–reperfusion in vivo. **Am J Physiol: Heart Circ Physiol** 281: H679–H688, 2001.

REID, MB. Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle. Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J Appl Physiol** 90: 724-731, 2001.

REID MB, KHAWLI FA, AND MOODY MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. **J Appl Physiol** 75: 1081–1087, 1993.

SAMBHI MP, WHITE FN. The electrocardiogram of the normal and hypertensive rat. **Circ Res** 8: 129-34, 1960.

SCHULTZ RL, SWALLOW JG, WATERS RP, KUZMAN JA, REDETZKE RA, SAID S, MORREALE DE ESCOBAR G, GERDES AM. Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. **Hypertension** 50:410-416, 2007.

SCOTT JM, WARBURTON DER. Mechanisms underpinning exercise-induced changes in left ventricular function. **Med Sci Sports Exerc** 40(8): 1400-1407, 2008.

SEN CK. Oxidants and antioxidants in exercise. **J Appl Physiol** 79: 675–686, 1995.

SENTURK UK, GUNDUZ F, KURU O, AKTEKIN MR, KIPMEN D, YALCIN O, BOR-KUCUKATAY M, YESILKAYA A, BASKURT OK. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **J Appl Physiol** 91: 1999–2004, 2001.

SMITH IK, VIERHELLER TL, THORNE CA. Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates using 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid). **Anal Bioch** 175: 408-413, 1988.

SMITH LL. Cytokine hypothesis of overtraining : a physiological adaptation to stress ? **Med Sci Sports Ex** 32 (2) : 317-331, 2000.

SIM J, REID N. Statistical Inference by Confidence Intervals: Issues of interpretation and utilization. **Phys Ther** 79(2): 186-195, 1999.

SNYDER AC. Overtraining and glycogen hypothesis. **Med Sci Sports Exerc** 30:1146-1150, 1998.

SOMANI SM, FRANK S, RYBAK LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. **Pharmacol Biochem Behav** 51: 627–634, 1995.

STARNES JW, BARNES BK, OLSEN ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca^{2+} induced dysfunction. **J Appl Physiol** 102: 1793-1798, 2007.

STARNES JW, TAYLOR RP. Exercise-Induced Cardioprotection: Endogenous Mechanisms. **Med Sci Sports Exerc** 39 (9): 1537-1543, 2007.

STEGEMAN JR. Exercise Physiology: physiologic basis of work and sports. **Chicago : Yearbook Medical Publishers Inc**, 1981.

STONE MH, KEITH RE, KEARNEY JT, FLECK SJ, WILSON GD, TRIPLETT NT. Overtraining: a review of the signs, symptoms and possible causes. **J Appl Sport Sci Res** 5: 35-50, 1991.

TAYLOR RP, CICCOLO JT, STARNES JW. Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide. **Cardiov Res** 58: 575–581, 2003.

TIIDUS PM. Radical species in inflammation and overtraining. **Can J Physiol Pharmacol** 76:533-538, 1998.

TULLOH L, ROBINSON D, PATEL A, WARE A, PRENDERGAST C, SULLIVAN D, PRESSLEY L. Raised troponin T and echocardiographic abnormalities after prolonged strenuous exercise--the Australian Ironman Triathlon. **Br J Sports Med** 40(7):605-609, 2006.

UCHIYAMA M, MIDORI M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. **Anal Bioch** 86: 271-278, 1978.

URHAUSEN A, KINDERMANN W. Diagnosis of overtraining: what tools do we have? **Sports Med**. 32(2):95-102, 2002.

URHAUSEN A, GABRIEL H, KINDERMANN W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. **Sports Med** 20:251-276, 1995.

URSINI F, BINDOLI A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem Physic Lip** 44: 255-276, 1987.

VAN BORSELEN F, VOS NH, FRY AC. The role of anaerobic exercise in overtraining. **J Strength Cond Res** 14: 74-79, 1992.

VENDITTI P, MASULLO P, DI MEO S. Effect of training on H₂O₂ release by mitochondria from rat skeletal muscle. **Arch Biochem Biophys** 372: 315-320, 1999.

VOLLAARD NBJ, SHEARMAN JP, COOPER CE. Exercise-induced oxidative stress. Myths, Realities and Physiological Relevance. **Sports Med** 35 (12): 1045-1062, 2005.

WILMORE JH, COSTILL DL. Physiology of Sport and Exercise. **Human Kinetix, Second ed. Campaign IL**, 1999.

WILSON RP, ZAGON IS, LARACH DR, MAX LANG C. Cardiovascular and respiratory effects of tiletamine-zolazepam. **Pharmacol Biochem Behav** 44: 1-8, 1993.

ZHOU LZ, JOHNSON AP, RANDO TA. NF-kB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. **Free Radic Biol Med** 31: 1405–1416, 2001.

8. ANEXOS

8.1. Estudo de caso

Mostraremos a seguir, um estudo de caso obtido com um dos animais que participaram do protocolo. As imagens foram obtidas no momento da realização dos ECGs deste animal. Este rato completou todo o protocolo, e de acordo com o critério de seleção integrou o grupo NFOR.

ECG 1



ECG 2



ECG 3



ECG 4



ECG 5



ECG 6



FIGURA 16. ECGs de um rato pertencente ao NFOR obtido ao longo do protocolo de treino.

Este animal nos chamou a atenção, pois apresentou uma grande alteração na conformação gráfica do ECG 2 quando comparado ao ECG 1, que havia se mostrado dentro dos padrões de normalidade (Figura 16). Desde então, o padrão observado tornou a se repetir ao longo do protocolo (Figura 16), mas não impediu que o animal cumprisse o treinamento.

De acordo com a literatura, o fenômeno observado pode ser classificado como uma taquidisritmia gerada pelo fenômeno de hiperexcitabilidade (LABRUNIE & GOUVEIA, 1995). As disritmias por hiperexcitabilidade se formam a partir de focos ectópicos de excitação, podendo ser supraventriculares, juncionais e ventriculares. As extrassístoles são batimentos que ocorrem fora do ritmo cardíaco de base e constituem as taquidisritmias mais freqüentes podendo ser uni ou multifocais. Em humanos, até cinco extrassístoles isoladas por minuto não chegam a interferir no débito cardíaco, porém, se são mais freqüentes merecem atenção especial (LABRUNIE & GOUVEIA, 1995). As extrassístoles podem se apresentar organizadamente, com um batimento prematuro alternado com um batimento normal, formando o bigeminismo ou duas extrassístoles seguidas de um batimento normal (assim como o contrário, uma extrassístole e dois batimentos normais), formando o que se chama de trigeminismo. Se houver uma seqüência de extrassístoles teremos uma salva, que se for prolongada será chamada de taquicardia paroxística. O ECG geralmente permite a classificação do tipo de taquidisritmia e de acordo com a Figura 16 temos um caso de bigeminismo/trigeminismo.

Clinicamente, em humanos este fenômeno não precisa obrigatoriamente ser tratado, desde que não haja repercussão sobre o débito cardíaco e permaneça estável. Se for suspeitada uma queda do débito cardíaco, ou caso a taquidisritmia possa evoluir para taquicardia paroxística, então deve ser tratada. Seu tratamento consiste em retardar a repolarização miocárdica pelo uso de drogas antidisrítmicas como a lidocaína. Em nosso caso, como este rato aumentou seu desempenho do T1 para o T4 (Figura 17), quando já apresentava o fenômeno de extrassístole, acreditamos que a queda no desempenho ocorrida no T6 seja decorrente de outros fatores que não o bigeminismo/trigeminismo.

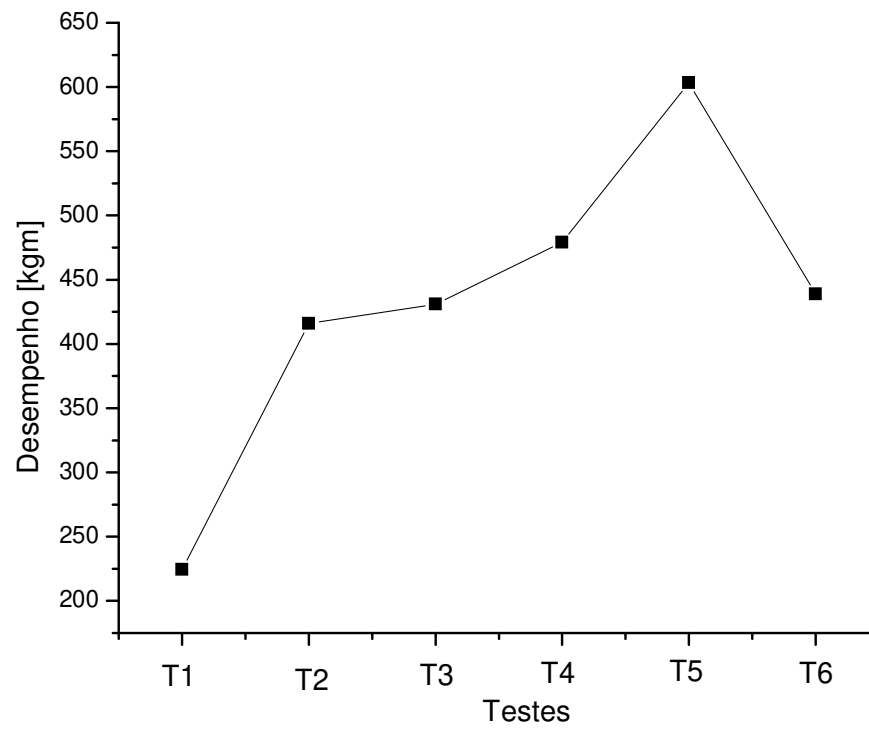


FIGURA 17. Desempenho do rato com extrassístole.

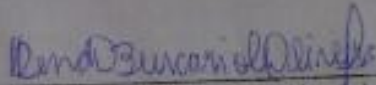
8.2. Declaração de Ética no uso de animais

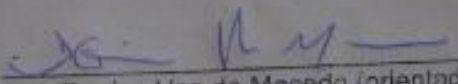
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "Sistema de defesa antioxidante, histologia e ECG do coração de ratos Wistar submetidos a um protocolo de *overtraining* em esteira"

(☐) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(☒) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança:
Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB - UNICAMP, sob Protocolo(s) nº 638-1.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Renato Buscariolli de Oliveira (aluno)


Dra. Denise Vaz de Macedo (orientador)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente
☒ Defendido () Indefendido

Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDI