

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia



CLÁUDIO CESAR ZOPPI

**Efeitos do treinamento e do "overtraining" no metabolismo oxidativo, enzimas antioxidantes e HSP72 em diferentes fibras musculares**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Cláudio Cesar Zoppi  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao  
Instituto de Biologia  
para obtenção do título  
de doutor em Biologia  
Funcional e Molecular,  
área de concentração  
Bioquímica.

Orientadora – Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Departamento de Bioquímica – I.B.

UNICAMP

Campinas, 2004

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE BC  
CHAMADA UNICAMP  
Z76e  
EX  
DMBO BC/ 58355  
ROC 16-117-04  
D X  
REÇO R\$ 11,00  
ATA 27/06/04  
CPD

CM00198343-1

13 ID 317689

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

**Z76e**

**Zoppi, Cláudio Cesar**

Efeitos do treinamento e de "overtraining" no metabolismo oxidativo, enzimas antioxidantes e HSP72 em diferentes fibras musculares / Cláudio César Zoppi.-- Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo

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

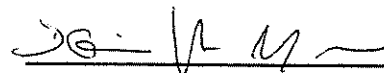
1. Bioquímica--Biologia. 2. Glutathione. 3. Stress. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

Campinas, 04 de Fevereiro de 2004

**BANCA EXAMINADORA:**

**Titulares:**

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo  
(IB/UNICAMP-orientadora)



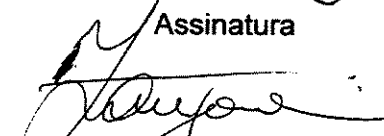
Assinatura

Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres  
(IQ/USP)



Assinatura

Prof. Dr. Francesco Langone  
(IB/UNICAMP)



Assinatura

Profa. Dra. Roseli Golfetti  
(FEF/UNICAMP)



Assinatura

Prof. Dr. Armindo Antonio Alves  
(UNIARARAS)



Assinatura

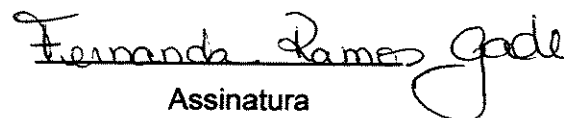
**Suplentes:**

Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva  
(IB/UNICAMP)



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha  
(IB/UNICAMP)



Assinatura

## **Agradecimentos:**

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, além de orientadora, por demonstrar ser uma grande amiga.

Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva, pelas discussões e pelo aprendizado.

Aos professores que participaram da banca examinadora, pela contribuição. Em especial ao amigo Armindo Antônio Alves, que muito me honra com sua participação na banca.

Aos amigos do laboratório, pelas discussões e momentos agradáveis.

Ao Leandro, pelas incontáveis horas treinando os animais.

Ao Fernando Catanho pela ajuda na construção dos gráficos de Boxplot.

A todos os colegas do departamento.

Aos profs. Hélio Moura e Luis Fernando Goulart, pela viabilização dos estudos com atletas.

Andréia e Marina pelo apoio com a burocracia.

À minha família, sem a qual este momento não seria possível.

À FAPESP (processo 98/15922-9) pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

### **Lista de abreviaturas:**

2,4DNP: 2,4 dinitrofenilhidrazina

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Adenosina trifosfato

CAPS: Ácido (3-[ciclohexilamino]-1- propano sulfônico)

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DTNB: Ácido 5,5- ditiobis (2-nitrobenzóico)

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

MOPS: Ácido (3-[N-morfolino]) propano sulfônico

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

PAGE: Gel de poliacrilamida para eletroforese

PMSF: Fenil metil sulfonil fluorido

PSA: Persulfato de amônio

SDS: Duodecil sulfato de sódio

TEMED: N',N',N',N' - Tetrametil- etilenodiamina

TNB: Ácido tionitrobenzóico

TRIS: (Tris-[Hidroximetil] aminometano)

VO<sub>2máx.</sub>: Consumo máximo de oxigênio

## Índice:

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo.....                                                               | 6  |
| Summary.....                                                              | 7  |
| Introdução.....                                                           | 8  |
| Exercício físico e<br>estresse.....                                       | 9  |
| Treinamento físico e resposta adaptativa .....                            | 9  |
| Síndrome de overtraining.....                                             | 11 |
| Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no exercício físico..... | 14 |
| Sistemas de defesa antioxidante.....                                      | 16 |
| Antioxidantes não enzimáticos.....                                        | 18 |
| Estresse oxidativo e exercício.....                                       | 19 |
| O papel da HSP72 na regulação intracelular.....                           | 19 |
| Adaptações induzidas pelo treinamento.....                                | 23 |
| Objetivos.....                                                            | 27 |
| Materiais e métodos.....                                                  | 30 |
| Resultados e Discussão Parte I.....                                       | 41 |
| Resultados e Discussão Parte II.....                                      | 64 |
| Considerações finais e conclusões.....                                    | 72 |
| Apêndice I.....                                                           | 74 |
| Apêndice II.....                                                          | 77 |
| Referências.....                                                          | 79 |

**Resumo:**

O treinamento físico induz uma série de adaptações no organismo que leva à melhora na performance esportiva. No entanto, os atletas podem ser submetidos a cargas extremamente altas de treinamento e quando a recuperação não é suficiente este atleta pode ser acometido pelo overtraining. Alguns autores, sugerem que a causa da sua instalação seja o excesso de formação de radicais livres. Nosso objetivo neste trabalho foi analisar os efeitos de um protocolo de overreaching em biomarcadores de ataque oxidativo, enzimas antioxidantes e capacidade oxidativa. Para tanto submetemos 25 animais a um protocolo de treinamento de onze semanas nas quais as oito primeiras constituíam um protocolo de treinamento e as últimas três constituíram o protocolo de overreaching. Foram medidos como marcadores de ataque oxidativo, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e de proteínas carboniladas (PC) dosamos ainda atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR) e catalase (CAT) e ainda como marcador de capacidade oxidativa, dosamos a atividade da enzima citrato sintase (CS) e ainda medimos a concentração da proteína de estresse HSP72 para avaliarmos os níveis de estresse imposto às fibras nos músculos sóleo (SO), extensor digital longo (EDL) e semi tendinoso (ST). Embora o treinamento induziu aumento no ataque oxidativo, as enzimas antioxidantes e a capacidade oxidativa avaliados aqui pela atividade das enzimas GR, CAT e CS também aumentaram em todos os músculos, o protocolo de overreaching induziu um panorama de estresse oxidativo observado pela queda da atividade das enzimas antioxidantes e aumento dos marcadores de ataque oxidativo devido ao alto nível de estresse imposto por este protocolo, avaliado pelos níveis de HSP72, que também induziu queda na atividade da CS. Nossos dados permitem concluir que o estresse oxidativo é um fator que leva à instalação do overreaching e que o monitoramento destes marcadores pode ser uma ferramenta útil na prática para se evitar a instalação deste processo.

**Summary:**

Physical training is known to induce several adaptations. These adaptations are desired to increase athletic performance. Frequently athletes are submitted to hard training in order to push performance to its upper limits, although when loads are excessive and the regeneration is not enough the athlete is said to be overtraining. Overtraining syndrome is the result from an imbalance between training loads and regeneration processes, and induces autonomic changes that impair performance. Overreaching is known as the initial phase of overtraining and is known as a metabolic imbalance leading to a decrease in ATP synthesis and inducing short term fatigue. Free radicals are well known high reactive molecules that can oxidize intracellular structures and so impair cell function and are increased during strenuous exercise. So the aim of this work is to study the behavior of oxidative stress markers in subjects submitted to an overreaching protocol. In this study we used 30 animals divided in training group (n=25) and a control group (n=5). The exercise protocol consisted in a 8 weeks endurance training and a 3 weeks overreaching protocol. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) and carbonylated proteins (PC) were measured as oxidative attack markers, glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and citrate synthase (CS) activities were measured as muscle antioxidant and oxidative markers and also stress protein HSP72 were measured to ensure stress levels in soleus (SO), extensor digital longus (EDL) and semitendinous (ST) muscles. Although endurance training induced increase in TBARs an PC levels, antioxidant and oxidative enzymes were also increased and at the end of training protocol the stress markers TBARs, PC and HSP72 levels were back to baseline values. On the other hand, overreaching protocol induced oxidative stress situation leading to decreases in antioxidant and oxidative enzymes and giving rise to TBARs and PC levels. HSP72 was also highly expressed suggesting a high stress imposed by the overreaching protocol. In conclusion, our data suggest that overreaching can be induced by oxidative stress and the measure of these markers could be a useful tool in sports field as markers of overreaching installation.

## INTRODUÇÃO

---

## ***I. EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE***

Os principais sistemas do nosso corpo trabalham conjuntamente para fornecer uma das nossas respostas de defesa mais poderosas e sofisticadas: a resposta ao estresse. Ela nos permite reagir a uma emergência e lidar com essa alteração, através do funcionamento do cérebro, glândulas, hormônios, sistema imune, coração, musculatura esquelética, sangue e pulmões. Essa resposta integrada fornece combustível, oxigênio, energia, força muscular, resistência à dor, acuidade mental, além de uma proteção temporária contra infecções. Ou seja, causar doença ou algum tipo de dano não é função da resposta ao estresse, que representa um mecanismo evolutivo conservado, pelo qual as células se defendem contra mudanças abruptas e adversas do meio ambiente, se adaptando a elas (Welch, 1992).

O princípio do treinamento físico é justamente esse, buscar, por meio de estratégias metodológicas fundamentadas no conhecimento científico ou algumas vezes de forma empírica, a aplicação de estímulos que desequilibrem a homeostasia dos sistemas biológicos do organismo, permitindo uma resposta adaptativa positiva, com melhora na *performance*.

No entanto, é sabido que o mesmo grau de estresse, induzido pelo mesmo agente estressor, pode produzir respostas diferentes em indivíduos distintos (efeito específico). Ou seja, dependendo de características endógenas, tais como predisposição genética, sexo ou idade, ou exógenas, tais como grau de treinabilidade, hábitos alimentares, utilização de medicamentos e estilo de vida, um grau de estresse normalmente tolerado por um indivíduo poderia vir a ser patogênico a outro, ocasionando distúrbios na resposta biológica, o que poderia afetar seletivamente um ou outro sistema predisposto no organismo.

Assim, da mesma forma que para outros estímulos estressores, podemos observar que a resposta dos indivíduos frente a aplicação de um mesmo esquema de treinamento pode levar a situações totalmente diferentes, que passam desde a adaptação positiva até um quadro de perda no rendimento físico.

### ***Treinamento Físico e Resposta Adaptativa***

Desde o clássico experimento conduzido por Hill e colaboradores (1924), que mostraram aumento no consumo total de oxigênio, rompendo a homeostase não só do tecido muscular, mas também sistemicamente, com o envolvimento de outros tecidos tais como o cardíaco, os vasos sanguíneos, bem como o próprio sangue, vários estudos

enfocaram o potencial estressor do exercício físico, e suas diversas formas de alteração na homeostasia intracelular (Coyle, 2000).

O estresse induzido pelo exercício físico é responsável pelo distúrbio agudo de células e órgãos ao qual segue-se uma fase de antichoque, quando os mecanismos de defesa são ativados. Nessa fase há uma intensificação nos processos de produção de energia, com uma considerável excitação dos sistemas adrenérgico e hipofisário-adrenal. A consequência dessa ativação é um aumento na concentração de catecolaminas e glicocorticóides na corrente sanguínea, amplificando a mobilização de reservas energéticas e estruturais do organismo.

As catecolaminas mobilizam as reservas de glicogênio hepático e muscular, induzindo hiperglicemia, bem como ativam a lipólise e conseqüentemente a concentração de ácidos graxos livres plasmáticos. Outro resultado da ação das catecolaminas encontra-se na intensificação do fluxo de oxigênio e oxidação de substratos nos tecidos (Vöet et al., 1999). Os glicocorticóides, além de amplificar o efeito das catecolaminas ativam a gliconeogênese e as reações de transaminação e, conseqüentemente, a conversão de aminoácidos em glicose (Meerson, 1984).

No período regenerativo ao exercício ocorrem os processos adaptativos, quando se restabelece um nível de homeostasia celular e sistêmica acima do encontrado antes do estímulo dado, conhecido na literatura como supercompensação. Num esquema de treino correto, este seria o momento adequado para a aplicação de uma nova carga de exercícios. Por outro lado, se nenhum outro estímulo for aplicado, a tendência é ocorrer involução das adaptações induzidas (destreinamento).

Fica claro, portanto, que a adaptação positiva é resultado de uma alternância corretamente programada entre indução de estresse (atividade física) e período reservado aos processos regenerativos (descanso). São esses fatores que permitem a supercompensação. Quando essa relação é respeitada, o organismo adapta-se positivamente ao exercício (Åstrand, 1992). Se um mesmo estímulo for imposto novamente, os mecanismos homeostáticos não serão rompidos na mesma extensão e conseqüentemente não serão observadas novas adaptações (Fry et al., 1992).

É importante ressaltar que além da otimização dos intervalos recuperação/repouso entre sucessivas sessões de treino, a regulação da carga de exercícios (intensidade e volume) em cada atividade programada também é extremamente importante para que uma determinada metodologia de treinamento atinja seu objetivo final, de aumentar o rendimento físico (*performance*). Isso conduz a um dos grandes problemas do momento

atual, saber exatamente quando a recuperação e também a supercompensação estão completas. Quando a recuperação entre uma sessão e outra é incompleta, observa-se fadiga prematura. Tal situação, de forma crônica, pode levar à instalação da síndrome de *overtraining* (OTS), que tem como consequência final a diminuição do rendimento, até o desencadeamento de distúrbios mais graves ou lesões de difícil recuperação ou muitas vezes até irrecuperáveis (Urhausen e Kindermann, 2002).

Na realidade, a instalação do OTS não ocorre de forma aguda, como por exemplo uma lesão muscular, entorse articular ou fratura óssea. A OTS, ao contrário, se instala em resposta a um desequilíbrio crônico entre estímulo e recuperação durante o processo de treinamento.

## **II. SÍNDROME DO OVERTRAINING**

A principal consequência da instalação da OTS é o efeito inverso do desejado com o treinamento. Ou seja, queda da *performance* esportiva. Apesar de acometer atletas de modalidades coletivas e desportos que envolvem basicamente capacidades de força e velocidade (Kraemer e Nindl, 1998), a incidência da OTS parece ser maior em atletas de *endurance*, sendo que mais de 60% deste tipo de atleta já vivenciou, em algum momento de sua carreira uma situação de *overtraining* (Morgan et al, 1987). Aparentemente, a instalação da OTS em atletas de *endurance* e de força e velocidade possuem diferentes causas (Israel, 1958). Postula-se que atletas de *endurance* sejam mais susceptíveis à OTS pelo fato de serem submetidos a altos volumes e intensidades de treinamento (O'Toole, 1998).

Na prática desportiva, a característica crônica da instalação do *overtraining* torna sua profilaxia mais difícil. Atletas que sentem uma queda inicial no seu rendimento tendem a aumentar suas cargas de treinamento, sem uma reflexão da causa desta queda, que pode ser justamente pelo excesso de treino. Atletas de várias modalidades em depoimento a órgãos de imprensa justificaram que sua *performance* estava sendo melhor numa determinada temporada, justamente em virtude de treinarem ou competirem menos que em temporadas anteriores, mas isso quase nunca é levado em consideração (Lehman et al, 1998a). Em nosso laboratório reportamos um caso similar, quando um fundista de nível internacional venceu uma importante prova internacional saindo do período de transição, enquanto outro atleta da mesma equipe e de mesmo nível que se preparou com treinamento intenso para a mesma não obteve êxito (dados não publicados).

Atualmente a literatura já diferencia as diferentes fases da instalação da OTS, embora ainda não existam parâmetros fidedignos para sua detecção (Hooper et. ali, 1995).

### ***Overreaching vs Overtraining.***

Como o principal desencadeador do *overtraining* é o tempo de recuperação insuficiente, sua fase inicial caracteriza-se por uma fadiga muscular precoce e excessiva, que pode ser rapidamente revertida com o aumento no período de descanso. Essa fase é denominada pela literatura de *overreaching*. Como normalmente o *overreaching* se instala após um período de treino intenso, é também utilizado para induzir a supercompensação (Kuipers, 1998). O principal problema é que a transição do estado de *overreaching* para o *overtraining* é uma tarefa difícil de se estabelecer. Ao contrário do *overreaching*, que pode ser rapidamente revertido, uma vez instalada a OTS o atleta pode levar até meses para se restabelecer de tamanho estresse.

A fadiga muscular excessiva, em qualquer tipo de atividade física se caracteriza, em última instância, pela incapacidade das fibras em ressintetizar ATP, diminuindo a capacidade de rendimento esportivo (Noakes, 2000). Nessa situação ocorre uma diminuição nos estoques de glicogênio e na concentração de ATP (Kuipers, 1988). O aumento nas concentrações de AMP é devido ao aumento na atividade da adenilato quinase, enzima que catalisa a produção de ATP, além de AMP a partir de duas moléculas de ADP. O desequilíbrio entre treino/recuperação não dá tempo para um pronto reestabelecimento, tanto do glicogênio (hepático e muscular) quanto do “pool” de fosfatos ricos em energia (Bruin et ali, 1994). Por estes motivos, relaciona-se o *overreaching* a um estresse metabólico (Kuipers et ali, 1998).

Assume-se que o *overtraining* se instala quando o estresse induzido pelo treinamento, leva a disfunções não só musculares, mas também sistêmicas, principalmente do sistema neuroendócrino (Lehmann et ali, 1993). Neste sentido, Fry e colaboradores (1991) listaram 84 alterações sistêmicas induzidas pela OTS, sendo 40 relativas a alterações fisiológicas e de *performance*, tais como perda de apetite e de rendimento, perda de coordenação, alterações na frequência cardíaca de exercício e repouso. Outras 12 alterações psicológicas do tipo, instabilidade emocional, alteração da personalidade e medo de competições. 14 alterações imunológicas, principalmente no sentido de diminuição desta capacidade e outras 18 alterações bioquímicas, que vão no sentido de um estado catabólico mais ativo, principalmente em relação ao metabolismo protéico.

### ***Diagnose de Overreaching e Overtraining***

Diagnosticar a OTS no seu início é uma tarefa difícil, uma vez que a mesma pode ser interpretada como um treinamento inadequado, que não induziu as adaptações suficientes para elevar a *performance*. Uma maneira interessante seria utilizar marcadores biológicos para detectar sua instalação, e desta forma evitar as consequências mais deletérias.

Grande parte dos estudos nesta área focam principalmente a análise da queda na *performance* e os efeitos da OTS nos diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos que levam à melhora da mesma, tais como alterações na secreção de hormônios que regulam as vias de produção de energia e de regeneração das estruturas celulares, como por exemplo as catecolaminas, glicocorticóides e a testosterona, além de alterações na frequência cardíaca e do lactato sanguíneo de repouso e durante o exercício e na capacidade de produção de energia intracelular (Fry and Kramer, 1997; Bosquet et al, 2001; Hedelin et al, 2000). No entanto, os estudos ainda não são conclusivos (Bruin et al, 1994; Hoopers et al, 1995; Rowbottom et al, 1995).

A complexidade em se estabelecer um determinado marcador, ou ainda que seja, um grupo de marcadores para diagnosticar *overreaching* se dá pelo fato de atletas que apresentam esta síndrome, não necessariamente apresentarem as mesmas respostas fisiológicas. A única alteração apresentada por todos os atletas é realmente a perda da capacidade de rendimento, quando a reversão deste processo é extremamente complicada e muito lenta (Rowbottom et al, 1998).

### ***Causas da Instalação da OTS***

Embora as consequências do overtraining sejam bem conhecidas (Fry et al, 1991), as causas que levam à OTS ainda permanecem pouco conhecidas. Algumas hipóteses foram aventadas, sendo que algumas permanecem viáveis, enquanto outras perderam qualquer sustentação.

Na tabela abaixo, estão listadas as principais hipóteses que procuram explicar a instalação desta síndrome.

Tabela I. Hipóteses que explicam a instalação do “overtraining”.

| HIPÓTESE                                    | AUTOR                  |
|---------------------------------------------|------------------------|
| Desbalanço autonômico                       | Lehmann et ali, 1998   |
| Teoria da Glutamina                         | Newsholme et ali, 1991 |
| Teoria da depleção de glicogênio            | Costill et ali, 1988   |
| Fadiga psicológica                          | Foster e Lehmann, 1997 |
| Teoria da inflamação sistêmica (citoquinas) | Smith, 2000            |

Embora vários esforços tenham sido feitos no sentido de estudar o overtraining, suas causas permanecem pouco compreendidas.

Nenhum estudo, no entanto, se ateve às alterações induzidas pelo overtraining aos mecanismos intracelulares responsáveis pela atenuação do estresse induzido pelo exercício. Tais mecanismos seriam os sistemas de defesa antioxidante que atuam na detoxificação específica de radicais livres, bem como a resposta das proteínas de estresse, responsáveis pela atenuação dos mais variados tipos de alterações induzidas pelo exercício, tais como aumento de temperatura, alterações de pH e depleção dos estoques de glicogênio, dentre outros.

Pelo fato destes mecanismos representarem a primeira frente de defesa celular contra os variados tipos de estresse a que são submetidas, julgamos que o desbalanço destes mecanismos pode ser a primeira e mais precoce alteração.

### **III. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) NO EXERCÍCIO.**

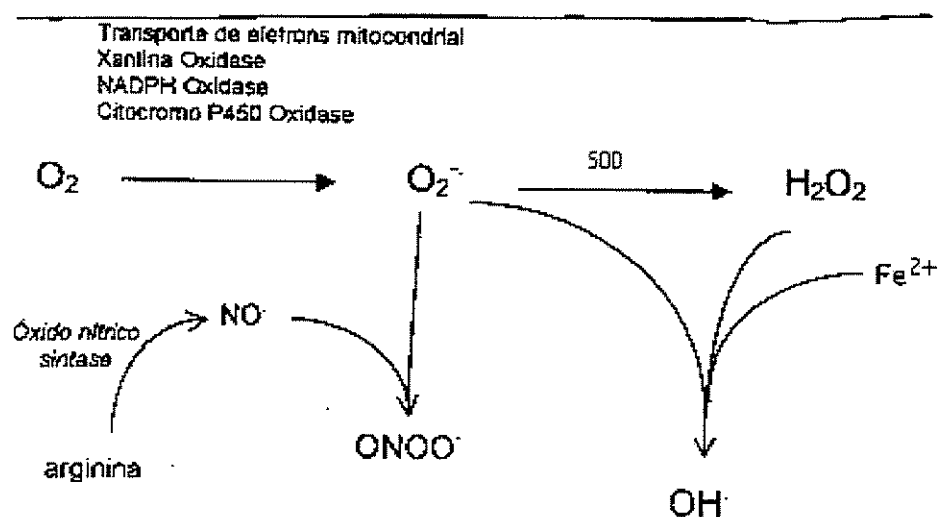
O oxigênio, por ter a particularidade de ser uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais, para ser reduzido necessita receber seus elétrons um a um. Normalmente esta redução é feita na citocromo oxidase ( $aa_3$ ), do complexo IV mitocondrial, que catalisa a transferência monoeletrônica de quatro elétrons, produzindo  $H_2O$  como único produto final da reação. Estima-se que este processo contribua para a utilização de 95 a 98% do oxigênio total consumido pelas células.

Entretanto, uma pequena fração deste oxigênio (2 a 5%) é reduzido univalentemente, produzindo radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), dando início à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Jenkins & Goldfarb, 1993). Estas, incluem um amplo espectro de espécies radiculares como o e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e não radiculares

como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O  $\text{O}_2^-$  pode ser formado durante o exercício físico de várias maneiras

- i) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra reduzida (numa situação de anóxia muscular) e é "reperfundida" pelo oxigênio, durante, por exemplo a pausa após um esforço de alta intensidade;
- ii) por enzimas como xantina oxidase (ativada na mesma situação descrita acima, onde predomina uma baixa concentração de ATP e alta concentração de AMP)
- iii) pelas enzimas NADPH oxidase de leucócitos ativados e citocromo P450 oxidase (Hess e Manson, 1984; Sjödin et al., 1990).

O músculo esquelético também produz óxido nítrico (NO), através da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Reid, 1996). O óxido nítrico pode reagir com  $\text{O}_2^-$ , formando peroxinitrito, um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao  $\text{OH}^\cdot$  (Beckman et al, 1990), conforme esquematizado na Figura 1:



**FIGURA 1:** Vias de formação de EROs (adaptado de Essig & Nosek, 1997).  $\text{O}_2^-$  (Radical ânion superóxido);  $\text{OH}^\cdot$  ( radical hidroxila);  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio);  $\text{NO}^\cdot$  (óxido nítrico);  $\text{ONOO}^-$  (ânion peroxinitrito).

Como os radicais livres são espécies extremamente instáveis, eles podem atacar alvos celulares diversos, com o objetivo de estabilizarem sua estrutura molecular. A consequência disto é a oxidação de fosfolípidos de membranas celulares e subcelulares, DNA e proteínas (Packer, 1997; Rádak et al, 1999; Rádak et al, 2000).

### ***EROs e Oxidação de Proteínas***

Os aminoácidos que compõem as proteínas são susceptíveis a reações com EROs. A oxidação de um ou mais aminoácidos pode romper as estruturas secundária e terciária de proteínas, aumentando sua hidrofobicidade por exposição dos aminoácidos do seu interior. O radical hidroxila é particularmente proteotóxico pois pode reagir com o carbono  $\alpha$  de qualquer aminoácido (Ryter et al, 1990). Além de potencialmente danificar a função biológica de proteínas, a oxidação destas por radicais livres pode também determinar sua degradação à peptídeos e eventualmente a seus respectivos aminoácidos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

### ***EROs e Oxidação de Fosfolípidos***

Os ácidos graxos poliinsaturados, constituintes das membranas biológicas são também um alvo importante para o ataque de EROs. A oxidação destes lípidos é conhecida como peroxidação lipídica; um processo degenerativo que leva a alterações estruturais e funcionais das membranas celulares e intracelulares, prejudicando seu metabolismo, podendo inclusive induzir a morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Outro problema associado à peroxidação de lípidos de membrana é que este fenômeno não se restringe a apenas uma molécula de fosfolípido. Estas moléculas estão dispostas de forma seqüencial, de forma que esta oxidação se propaga por toda a membrana por reações em cascata, degradando os lípidos em outras moléculas de menor tamanho, sendo estas principalmente aldeídos de baixo peso molecular, como por exemplo o malonaldeído (Halliwell & Gutteridge, 1999).

## ***IV. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE***

Durante o processo de evolução os organismos vivos desenvolveram mecanismos de defesa eficientes, a fim de combater a ação deletéria das EROs.

Basicamente, os sistemas de defesa antioxidante são divididos em duas grandes classes que atuam conjuntamente, com o objetivo de detoxificar os efeitos deletérios causados pelas EROs dentro das células: 1) Sistema de defesa enzimático e 2) Sistema de defesa não enzimático.

### ***Enzimas Antioxidantes***

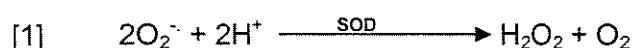
O sistema enzimático é constituído por quatro enzimas principais.

- Superóxido dismutase (SOD)

- Sistema Glutationa Peroxidase (GPX) / Glutationa Redutase (GR)
- Catalase (CAT)

*Superóxido Dismutase:*

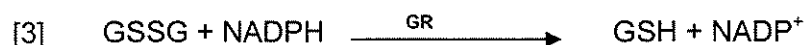
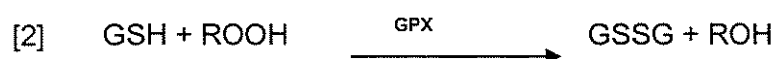
A primeira defesa contra o  $O_2^{\cdot -}$  é a enzima superóxido dismutase (SOD). A ação direta desta enzima é a de sequestrar os radicais  $O_2^{\cdot -}$  formados, originando  $H_2O_2$  (equação 1).



As principais isozimas da SOD são as dependentes de cobre e zinco (Cu-Zn SOD) e outra, dependente de manganês (Mn-SOD). A Cu-Zn SOD atua principalmente no citossol, enquanto a Mn-SOD atua na matriz mitocondrial ((Yu, 1994, Halliwell & Gutteridge, 1999).

*Sistema Glutationa Peroxidase /Redutase e Catalase:*

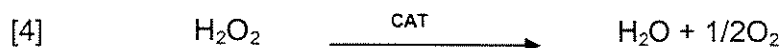
Estas três enzimas, embora se utilizem de diferentes caminhos, apresentam a mesma função, controlar os níveis de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos formados durante os processos de dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  e da peroxidação lipídica, respectivamente, através de sua transformação em  $H_2O$  e  $O_2$  (Yu, 1994). A ação das enzimas CAT e GPX impede que o processo de formação de outros radicais mais potentes, como o radical hidroxila, neutralizando consequentemente as ações deletérias por eles causadas. As enzimas GPX e GR atuam em conjunto e necessitam de glutatona reduzida (GSH) e NADPH (reações 2 e 3 respectivamente) como cofatores, para o perfeito funcionamento deste sistema.



De forma similar à SOD, a GPX e a GR estão distribuídas tanto no citossol (aproximadamente 45%) quanto na mitocôndria (aproximadamente 55%) (Ji et al., 1988).

A atividade da GPX e da CAT diferem de tecido para tecido dentro do corpo humano. (Halliwell & Gutteridge, 1999). Elas agem em diferentes compartimentos da célula. Enquanto a GPX, em conjunto com a GR atua tanto dentro das mitocôndrias como

no citossol, a CAT se encontra presente principalmente em organelas chamadas peroxissomos e controla especificamente os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reação 4).



Embora existam ainda dúvidas com relação à existência de duas enzimas que desempenham a mesma função dentro de uma mesma célula, sabe-se que a afinidade da GPX pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  é cerca de 10 vezes maior que o da CAT (Powers et ali., 1999). Portanto, em baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a GPX é a maior responsável pelo controle dos níveis de peróxido intracelular. A CAT passa a atuar de forma mais ativa à medida que a concentração desta substância aumenta no interior da célula.

Outra característica interessante do sistema de defesa antioxidante é a distribuição intramuscular destas enzimas, sendo que as fibras musculares mais oxidativas, ou tipo I possuem maior quantidade de todas as enzimas antioxidantes, enquanto as fibras mais glicolíticas, ou tipo II possuem menores quantidades das enzimas antioxidantes (Powers et ali., 1999).

### ***Antioxidantes não enzimáticos***

O outro grande grupo de defesa antioxidante, é o não enzimático, também conhecido como antioxidantes de baixo peso molecular. Dentre estas moléculas estão as vitaminas A, E e C e também a GSH, que atua como potente antioxidante.

Estas moléculas antioxidantes atuam na detoxificação das EROs, doando elétrons de suas moléculas para as moléculas dos radicais livres formados, sem no entanto se transformarem em radicais reativos (Halliwell & Gutteridge, 1999). As vitaminas atuam de forma conjunta e em diferentes compartimentos intracelulares. Com características lipossolúveis, as vitaminas A e E se localizam inseridas nas membranas celulares, enquanto a vitamina C por ser hidrossolúvel atua no citossol, e ainda participa na reoxidação das vitaminas lipossolúveis (Packer, 1997; Ji 1999).

A GSH é um tripeptídeo que contém um grupamento tiólico e é encontrada em quase todas as células animais e vegetais (Meister & Anderson, 1983). O principal papel da GSH é como substrato da GPX. No entanto, ela ainda atua de forma similar à vitamina C, isto é, na reoxidação de antioxidantes moleculares como as vitaminas lipossolúveis. A distribuição de GSH entre as fibras musculares é semelhante ao das enzimas antioxidantes, sendo que maiores concentrações desta molécula são encontradas nas fibras do tipo I (Ji, 1995).

### ***Estresse Oxidativo e Exercício***

Estresse oxidativo é a consequência de um desequilíbrio entre produção e eliminação das EROs, podendo se dar tanto pelo aumento na formação destas espécies quanto pela queda na capacidade antioxidante celular (Travacio & Llesuy, 1996). A consequência do aumento nos níveis de estresse oxidativo é a perda das funções celulares que podem, em última instância ocasionar sua morte.

Em 1978, Dillard e colaboradores foram os primeiros a mostrar que o exercício físico induzia aumento da peroxidação lipídica, medida pelo aumento dos níveis exalados de pentano, após os sujeitos pedalarem por 60 minutos, com intensidades relativas variando entre 25 e 75% do  $\text{VO}_2$  máx.. Desde então, um grande número de estudos vem dando suporte à hipótese que o exercício físico aumenta a produção de radicais livres induzindo o estresse oxidativo (Davies et ali., 1982; Alessio, 1993; Jackson, 1998; Ji, 1999).

### ***Papel da HSP72 na regulação intracelular***

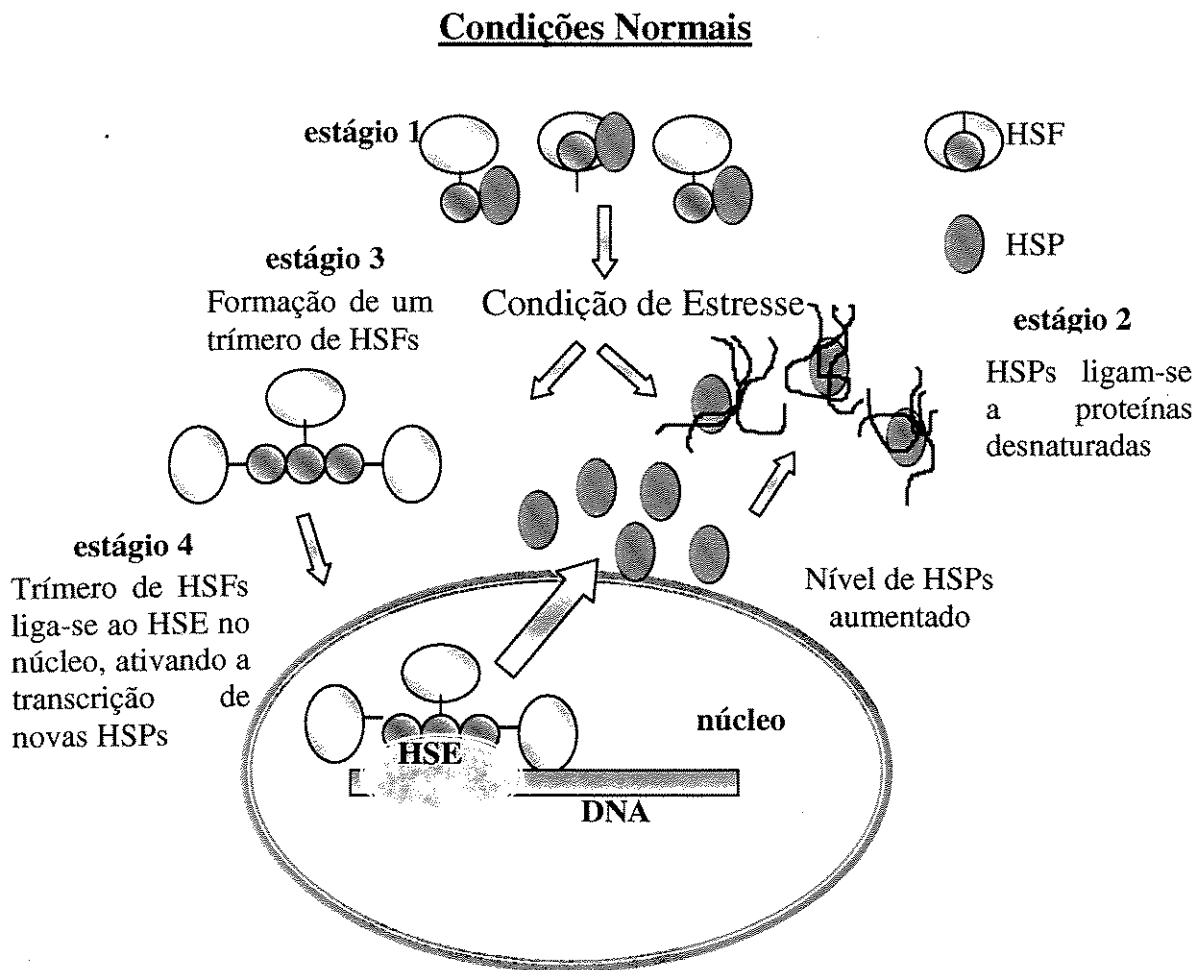
Células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes através de uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas proteínas de estresse (Locke et ali, 1990). Welch (1993) salientou que o termo proteínas de estresse tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular.

O aumento de expressão de proteínas de estresse foi inicialmente evidenciado em *Drosophila* (Ritossa, 1962), por meio de choque térmico (incubação em diferentes temperaturas elevadas), daí serem mais conhecidas como “Heat Shock Proteins” (HSP). As HSP são uma extensa família de proteínas expressas em resposta ao estresse variando seu peso molecular entre 8 e 110 kDa, sendo mais estudadas as proteínas de 70kDa, a HSP72 que é a forma induzida e a HSC73, que se trata da forma constitutiva (Kregel, 2002).

As HSP são de fundamental importância para a sobrevivência das células, não apenas em condições de estresse, onde se vê aumento de síntese de proteínas dirigidas à reparação de danos celulares, mas também em eventos de transporte e enovelamento de proteínas em formação (Neupert, 1990; Gething e Sambrook, 1992; Craig, 1993; Morimoto, 1993; Stuart et ali, 1994). Desta forma, elas são também denominadas de chaperonas moleculares (Hall, 1994).

Hoje já se conhece que a “resposta heat shock” é uma propriedade geral de todas as células de nosso organismo, seja em condições de hipertermia ou de demais estados de alteração homeostática, tais como exposições a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição dos estoques de glicogênio, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos e estresse oxidativo (Schlesinger, 1986; Bienz e Pelham, 1987; Welch, 1992; Yellon e Marber, 1994).

A hipótese mais aceita para a regulação transcricional das HSP propõe o controle pelo “fator heat shock” (HSF), presente no citosol, que tem capacidade de ligação com o “elemento heat shock” (HSE), situado no núcleo, conforme esquematizado na Figura abaixo :



**Figura 2:** Modelo especulativo para explicar a ativação do HSF em condições de estresse.

De acordo com a Figura 2, em condições basais, as HSPs estão ligadas ao HSF (estágio 1). O HSF pode ser definido como um fator de ativação transcricional presente, sobretudo, no citoplasma, em estado monomérico e sem atividade de ligação ao DNA. Em

resposta à hipertermia ou a outra condição de estresse qualquer, há um aumento de proteínas denaturadas no citosol, expondo principalmente os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, o que induz o desacoplamento do complexo HSP-HSF. O desacoplamento ocorre em virtude das HSPs se ligarem às proteínas denaturadas, pois sua função é prevenir agregação em interações deletérias com outras proteínas, situação que poderia desencadear níveis maiores de estresse (estágio 2). Contudo, para que o HSF desencadeie o processo de transcrição das HSPs, ele deve entrar no núcleo e se ligar ao HSE; a entrada do HSF no núcleo só é possível através da transição do estado monomérico (desativado) para o estado oligomérico (ativado) (estágio 3). As HSPs regulam o estado de oligomerização do HSF (e assim sua capacidade de se ligar ao DNA) por meio da ocultação da superfície de trimerização: uma vez havendo a ligação das HSPs constitutivas a proteínas denaturadas no citoplasma a superfície de trimerização é exposta e torna-se possível a formação de trímeros do HSF; em um estágio subsequente, ocorre ainda a entrada destes trímeros no núcleo e imediata ligação aos HSEs do DNA, ativando a transcrição das HSPs (estágio 4). A resposta transcricional de HSPs induzida por um estado de hipertermia é proporcional a duração e severidade do estresse (Storti, 1980; Didomenico et al., 1982; Morimoto, 1993; Feige e Polla, 1994; Kregel, 2002).

Dessa forma, as HSP atuam de forma decisiva no processo adaptativo, auxiliando no enovelamento (folding) de novas proteínas e principalmente no reenovelamento (refolding), alterando assim o “turnover” protéico, com o aumento da meia vida das proteínas já existentes (Kregel, 2002). Esta característica faz com que as HSPs tornem as células submetidas à condições estressantes mais tolerantes ao estresse induzido, e esta adaptação faz com que as células consigam suportar maiores níveis de estresse subsequentes. Trabalhos mostram que as HSPs tornam as células mais tolerantes ao estresse térmico (Kregel, 2002), à isquemia e reperfusão (Powers et al., 2001) e ao estresse oxidativo (Essig e Nosek, 1997; Smolka et al., 2000).

A função das proteínas de estresse em situação de exercício físico ainda são poucos conhecidas. Muitas condições bioquímicas e fisiológicas, juntamente com a elevação de temperatura poderiam estimular a expressão de proteínas de estresse no exercício, dentre elas depleção de glicose, hipóxia, concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  elevada e decréscimo de pH (Locke et al., 1990). Existem evidências também que EROs, numa condição de estresse oxidativo, poderiam também participar como sinalizadores na síntese de HSPs (Welch, 1992). Hernando e Manso (1997) relataram que ratos

sedentários submetidos ao exercício intenso tiveram aumentos significativos de HSP72 no músculo sóleo. Locke e colaboradores (1990) também mostraram que o estresse induzido por um exercício exaustivo em esteira seria um estímulo suficiente para induzir síntese de HSP72 e HSP90 em células do músculo sóleo, do baço e em linfócitos.

Dado o potencial das EROs danificarem proteínas intracelulares durante contrações musculares repetitivas, foi sugerido que a síntese de HSPs poderia complementar a defesa enzimática antioxidante pré-existente do organismo, principalmente quando esta estivesse diminuída (Essig, Nosek, 1997). Resultados prévios de nosso laboratório mostraram aumento na concentração de proteínas carboniladas e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes CAT e GR no músculo sóleo de ratos sedentários, duas horas após um protocolo de exercício exaustivo, indicando que a exaustão estava relacionada com um aumento nos níveis de estresse oxidativo. Nesse mesmo tempo, detectou-se aumento significativo na expressão de HSP72 no músculo sóleo, reforçando a idéia de que a síntese de HSP poderia ser um mecanismo complementar de proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício quando o sistema enzimático antioxidante está com sua atividade diminuída (Smolka et al., 2000). A sinalização para a síntese de HSPs seria, possivelmente, a exposição de aminoácidos hidrofóbicos das próprias enzimas da defesa; os aminoácidos hidrofóbicos atuariam como regiões de ligação às HSPs, sinal para a síntese de mais proteínas de estresse.

Existem evidências experimentais de que apenas músculos compostos por fibras do tipo I apresentam expressão constitutiva de HSP70; músculos de fibras mistas contêm HSPs constitutivas de acordo com a proporção de fibras do tipo I existentes. O nível aumentado de HSP70 constitutivas em fibras do tipo I relaciona-se, possivelmente, ao fato destas fibras estarem continuamente sujeitas a condições mais estressantes do que outros tipos de fibras (Locke et al., 1991; Locke et al., 1994).

Além disso, os processos de adaptação ao estresse imposto pelo exercício contínuo e repetitivo têm suas atividades regulatórias ocorrendo, preponderantemente, no intervalo de recuperação entre as sessões de treinamento (imediatamente após o exercício até 24 horas do término da atividade contrátil), por intermédio de expressão específica de genes que induzem síntese de HSPs (Neufer et al., 1998). Tais resultados revelam que a ação das HSPs é seqüencial após uma atividade contrátil contínua, como um mecanismo de compensação celular aos possíveis danos ocasionados pelo estresse oxidativo, reforçando que o tempo de recuperação de uma sessão de treinamento para outra é de fundamental importância para a ocorrência dos processos anabólicos.

## **VI. ADAPTAÇÕES INDUZIDAS PELO TREINAMENTO FÍSICO**

O estudo das adaptações induzidas pelo treinamento data de muito antes do aparecimento da fisiologia do exercício como área da ciência. Gregos e romanos já sabiam que a massa muscular aumentava em decorrência do treinamento de força (Hamilton e Booth, 2000). Em 1628, William Harvey postulou que quanto maior a massa muscular de um homem, este seria mais forte, teria menor quantidade de gordura e seu coração seria mais forte e seus vasos mais numerosos.

Os estudos pioneiros na área da fisiologia do exercício foram desenvolvidos mais precisamente a partir de 1910 (Rehberg, 1951). Focaram principalmente adaptações sistêmicas ao exercício físico, mais especificamente aquelas relativas ao sistema cardiovascular e respiratório (Krogh, 1919), introduzindo o conceito da limitação do consumo máximo de oxigênio pelo sistema cárdio-respiratório (Hill, 1922). Esses trabalhos renderam a ambos os autores o prêmio Nobel de Medicina. Desde então, uma série de estudos se desenvolveram nesta área.

### ***Adaptações Musculares ao Treinamento***

O estudo das adaptações bioquímicas ao treinamento são relativamente recentes. Os primeiros trabalhos nesta área mensuravam principalmente a quantidade de glicogênio e os tipos de fibra que compunham os músculos. Sabe-se atualmente que o treinamento aliado a uma dieta adequada leva a um aumento nas reservas de glicogênio muscular (Roedde et al., 1986).

É interessante ressaltar que até o início dos anos 60 pouquíssimos estudos sobre o assunto foram executados. Até então, não se imaginava que o músculo poderia adaptar-se metabolicamente ao treinamento. Somente nos últimos 30 anos que se iniciou o estudo das adaptações bioquímicas do músculo ao exercício (Hamilton & Booth, 2000). No caso específico das pesquisas com seres humanos, tal data coincide com o trabalho de Bergström e Hultman (1966), que introduziram a técnica de biópsia, possibilitando o início de tais estudos.

Com relação aos tipos de fibra muscular, é sabido que o tecido muscular não é um tecido homogêneo quanto às suas células. Ao contrário, é formado por diferentes tipos de fibras musculares, cada qual com um fenótipo específico (Maltin et al., 1989; Termin et al., 1989; Staron & Johnson, 1993), que ainda podem variar de indivíduo para indivíduo. Exemplo claro são as diferenças de composição de fibras encontradas em maratonistas e

velocistas (Bernus et ali, 1993). Vários estudos nesta área mostraram que o treinamento pode induzir alterações na composição das fibras musculares, alterando principalmente as isoformas de miosina contidas nas fibras (Andersen & Henriksson, 1977; Baumann et ali, 1987; Jurimae et ali, 1996).

Em outra frente, com o trabalho pioneiro de Holloszy em 1967 se iniciou o estudo das adaptações metabólicas ao treinamento. Desde então, vários trabalhos vem demonstrando que o treinamento é responsável pelo aumento na atividade de enzimas de todas as vias do metabolismo oxidativo. Assim, estudos mostraram aumento na atividade de enzimas que atuam desde a via glicolítica (Baldwin et ali, 1973; Viru, 1994), ciclo de Krebs (Holloszy, 1973; Fitts et ali, 1975; Holloszy & Coyle, 1984), cadeia respiratória (Oscai & Holloszy, 1971; Henrikson & Reitman, 1977; Dudley et ali, 1982; Nemirovskaya et ali, 1992) até a beta oxidação de ácidos graxos (Holloszy & Coyle, 1984; Chilibeck et ali, 1998; Jong-Yeong et ali, 2002). A quantidade e a densidade das mitocôndrias também são aumentados em resposta ao treinamento (Gollnick, 1986; Venditti et ali, 1999).

Outra importante linha de pesquisa sobre as adaptações musculares ao exercício físico é com relação aos substratos energéticos utilizados pelo tecido muscular para ressíntese de ATP durante a atividade física (Hamilton & Booth, 2000). No século 19 acreditava-se que a principal fonte de energia muscular eram as proteínas (Hamilton & Booth, 2000). No entanto, ainda na primeira década do século XX tal hipótese foi derrubada, quando em 1907 Fletcher demonstrou acúmulo de lactato intramuscular. Os primeiros estudos conduzidos por Hill e colaboradores (1924) já apontavam, ainda que de forma rudimentar, os carboidratos e lipídeos como principais substratos energéticos durante o exercício. Desde então, estudos utilizando metodologias mais sensíveis e fidedignas permitiram avanços nesta área. Hoje sabemos que os principais substratos musculares oxidáveis são os carboidratos e lipídeos (Pernow & Saltin, 1971; Brooks, 1998). Atualmente, o enfoque dos trabalhos nesta área é no sentido de se estabelecer os mecanismos que regulam o percentual de utilização de cada um dos substratos (Rodgers, 1998; Brooks & Mercier, 1994), ou seja, a participação de cada substrato energético durante as atividades com diferentes interações entre volume e intensidade.

A literatura demonstra que músculos submetidos a treinamento, principalmente de *endurance* aumentam a capacidade de oxidação de lipídeos (Coggan et ali, 1990; Martin et ali, 1993). A tal fato tem se atribuído o efeito poupador das fontes de carboidratos endógenas (glicogênio muscular e hepático) e a essas adaptações conjuntas se atribui a

melhora da *performance* atlética, principalmente em modalidades esportivas de longa duração (Hickson et al, 1977; Abernethy et al, 1990; Holloszy et al, 1998; Hawley, 2002).

### ***Adaptações dos Sistemas de Defesa Antioxidantes ao Exercício Físico***

De uma forma geral, os tecidos possuem uma capacidade antioxidante adequada para as taxas de consumo de oxigênio específicas. Tecidos que consomem maiores quantidades de oxigênio e portanto produzem mais radicais livres possuem maior atividade de enzimas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 1999). No caso específico do tecido muscular, como já citado em capítulo anterior, a atividade das enzimas antioxidantes também varia nas diferentes fibras que compõem os músculos esqueléticos. Fibras mais oxidativas possuem maior capacidade antioxidante, enquanto as mais glicolíticas possuem menor atividade das enzimas antioxidantes.

Já está bem estabelecido que os sistemas de defesa antioxidantes, principalmente o enzimático, são capazes de se adaptarem em resposta a exposição crônica a agentes oxidantes (Oberly et al, 1987).

O tecido muscular apresenta uma peculiaridade em relação aos demais. Enquanto a maioria dos tecidos pouco alteram seus níveis de metabolismo, o músculo esquelético pode aumentar muitas vezes seu metabolismo em relação aos níveis basais (Astrand & Rodahl, 1986). Isto faz com que suas células fiquem expostas a maiores concentrações de oxidantes, sendo viável supor que o treinamento físico seria responsável pelo aumento na atividade das enzimas antioxidantes. Em recente revisão, Powers e colaboradores (1999) reuniram de forma bastante abrangente os dados apresentados pela literatura a esse respeito. Embora alguns estudos falhem, no sentido de demonstrar tal adaptação, a grande maioria dos trabalhos que se dedicaram a este assunto mostraram aumento na atividade de todas as principais enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, glutathione peroxidase/redutase e catalase tanto em ratos quanto em humanos.

Outros estudos mostraram que não é só o sistema enzimático que sofre adaptação ao treinamento. Evidências apontam no sentido de um aumento na concentração de GSH nas fibras musculares em resposta ao treinamento físico (Marin et al, 1993; Leeuwenburgh et al, 1994; Leeuwenburgh, et al, 1997). De fato, já existem muitas evidências que o treinamento, principalmente de *endurance* é responsável pela indução da atividade das enzimas antioxidantes (Powers et al., 1994, Ji, 2002, Smolka et al., 2000). Nesse sentido, resultados prévios de nosso laboratório mostraram que após 8 semanas de treinamento de *endurance* houve aumento na atividade das enzimas CAT e GR no músculo sóleo de

ratos, com aumento também na atividade da enzima citrato sintase como marcador de capacidade oxidativa (Smolka et al., 2000).

### ***Características da composição e recrutamento de fibras musculares***

O tecido muscular apresenta como característica, uma grande heterogeneidade com relação às células que o constituem. As fibras musculares que compõem o tecido muscular apresentam características morfológicas e funcionais diferenciadas.

Por sua vez os músculos esqueléticos apresentam uma composição variada de diferentes tipos de fibras musculares. Estas fibras são classificadas da seguinte forma quanto sua composição e características fisiológicas:

1. Fibras do tipo I: São fibras de pequenos diâmetro transversal, contração lenta e com características oxidativas. São recrutadas em esforços de longa duração e baixa intensidade.
2. Fibras do tipo IIa: São fibras intermediárias, de médio diâmetro transversal, contração rápida e com característica glicolítica aeróbia. São recrutadas em esforços de longa duração e média intensidade.
3. Fibras do tipo IIb: São fibras de grande diâmetro transversal, contração rápida e com característica glicolítica anaeróbia. São recrutadas em esforços de curta duração e alta intensidade.

Os diferentes padrões de recrutamento destas fibras podem induzir adaptações diferenciadas nas mesmas, portanto se faz necessário analisar todos os tipos com o objetivo de se traçar um panorama adaptativo geral quando se analisa os efeitos de exercícios na musculatura esquelética.

**OBJETIVOS** \_\_\_\_\_

A Introdução da presente tese mostra que um dos grandes desafios no desenvolvimento de metodologias de treinamento que induzam adaptações físicas específicas para determinada modalidade é a incorporação de períodos adequados de repouso na proposta de periodização, reforçando a importância da busca de marcadores moleculares que sejam capazes de refletir esses estados de adaptação ou *overreaching* como uma forma de impedir a instalação da condição de *overtraining*. Com a utilização de marcadores confiáveis, seria possível otimizar as condições de treino, de fundamental importância, principalmente para as equipes de alto nível.

Para o desenvolvimento da técnica proposta, um dos objetivos da presente tese foi elaborar um protocolo de treinamento de *endurance* com diferentes cargas de esforço e tempos de recuperação, com o duplo objetivo: i) adaptar os animais e ii) estabelecer um desbalanço entre treino e recuperação. As análises foram feitas em amostras de músculos (com diferentes capacidades oxidativas), sendo eles; sóleo (SO), extensor digital longo (EDL) e semitendinoso (ST), compostos predominantemente por fibras do tipo I, IIa e IIb, respectivamente (Maltin et alí, 1989).

O outro objetivo da presente tese foi monitorar e avaliar a efetividade da técnica de Limiar de Estresse, utilizando os mesmos biomarcadores sanguíneos estudados nos animais em jogadores de futebol da categoria junior de um time da primeira divisão durante o Campeonato Estadual.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

A metodologia apresentada inicialmente se refere ao estudo executado com animais, parte I desta tese, e logo em seguida são descritos os métodos utilizados no estudo conduzido com atletas (parte II). Apesar dos dois estudos se utilizarem de alguns marcadores em comum optamos por dividir a apresentação da metodologia, uma vez que as amostras nos animais são do tecido muscular e nos atletas são do sangue o que diferencia e alguns aspectos os métodos analíticos e a forma de cálculo da concentração.

### **ANIMAIS E PROTOCOLOS DE TREINAMENTO:**

Para este trabalho foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar, machos, de aproximadamente 2 meses de idade, obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP e mantidos em ciclo invertido de claro-escuro, com ração e água sem nenhum tipo de restrição. Duas semanas antes do período de treinamento os animais foram submetidos a atividades diárias na esteira rolante, correndo a uma velocidade de 10 m/min por 5 minutos. Estas duas semanas iniciais tiveram dupla finalidade, a primeira foi adaptar os animais que participaram do estudo à esteira rolante. O segundo objetivo foi separar os animais que, os quais constituíram os grupos treinado e controle, sedentário (confinados apenas à movimentação dentro das gaiolas)

Desta forma, ao final do período de adaptação os animais foram divididos em dois grupos; o grupo controle sedentário, e o outro grupo que foi submetido ao treinamento de endurance e posteriormente à *tentativa de indução de overreaching* (TIO), onde foi aumentado o número de sessões diárias até os animais perfazerem 4 sessões por dia. Ao todo, os protocolos tiveram a duração total de 11 semanas e foram realizados em esteira rolante com inclinação de  $-3^\circ$ , conforme mostrado na Tabela II.

Utilizamos o treinamento de endurance pelo fato deste tipo de esforço ser apontado como maior responsável pela indução da OTS (Lehmann et al, 1997). Optamos também por aumentar a frequência e consequentemente o volume de treinamento ao invés da intensidade no protocolo de overreaching baseados em dados da literatura que creditam a este fator a instalação da OTS (Lehmann et al, 1998).

Os animais submetidos ao treinamento foram sacrificados ao final da quarta e oitava semana, com o objetivo de avaliarmos as respostas nas duas fases distintas do treinamento, e semanalmente durante a fase de overreaching. Os animais controle foram sacrificados ao final da oitava semana de treinamento no intuito de minimizar as possíveis alterações decorrentes da idade.

Tabela II. Protocolos de treinamento semana 1 a 8, e de TIO semana 9 a 11.

| Semanas                         | Velocidade<br>(m/min) | Tempo<br>(min) | Sessões<br>Diárias |
|---------------------------------|-----------------------|----------------|--------------------|
| 1 <sup>a</sup>                  | 15                    | 20             | 1                  |
| 2 <sup>a</sup>                  | 20                    | 30             | 1                  |
| 3 <sup>a</sup>                  | 22,5                  | 45             | 1                  |
| 4 <sup>a</sup>                  | 25                    | 60             | 1                  |
| 5 <sup>a</sup> a 8 <sup>a</sup> | 25                    | 60             | 1                  |
| 9 <sup>a</sup>                  | 25                    | 60             | 2                  |
| 10 <sup>a</sup>                 | 25                    | 60             | 3                  |
| 11 <sup>a</sup>                 | 25                    | 60             | 4                  |

### ***PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO***

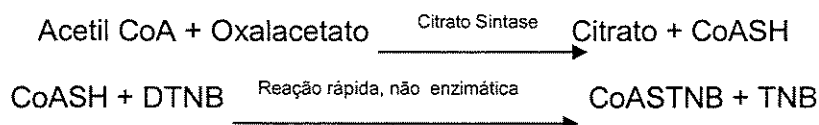
Após o animal ter sido anestesiado com 1 mL de hidrato de cloral (10%), os músculos sóleo (SO), extensor digital longo (EDL) e semitendinoso (ST) foram extraídos e colocados sobre um papel de filtro para a retirada de vestígios de gordura e tecido conjuntivo. Os músculos foram retirados 48 horas após a última sessão de treino. Feito isso, os mesmos foram imersos em nitrogênio líquido, congelados e conservados à -70°C, até os ensaios serem conduzidos. Para sua utilização, este material, após ser descongelado foi cortado em pequenas amostras de 30 mg e imerso em meio contendo sacarose 440 mM, MOPS 50 mM, PMSF 0,01 mM e EDTA 100 mM, pH 7.2. Os músculos colocados em tubos de ensaio foram homogeneizados por 10 segundos em homogeneizador tipo Polytron (PT 2100), na velocidade mais rápida do aparelho. Todo procedimento foi feito entre 0°C e 4°C. A dosagem de proteína foi feita pelo método de Biureto (Gornal et al. 1949), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### ***DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS***

#### ***a) Citrato Sintase***

A citrato sintase (CS) é uma enzima intramitocondrial do ciclo de Krebs, que catalisa a condensação do oxaloacetato (OAA) com acetil CoA. Medimos sua atividade pelo método proposto por Srere (1969). O meio de reação continha 0.1 mL de DTNB

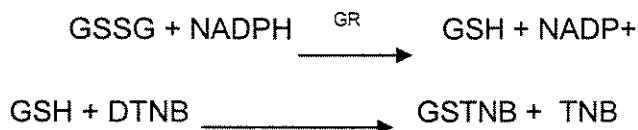
1mM, 0,03 mL de Acetil CoA 10mM e volume do homogenato muscular correspondente a 50 mg/mL. A reação foi iniciada acrescentando-se 0.05 mL de OAA 10 mM, completando com água o volume suficiente para completar 1 mL de volume total na cubeta. A reação de formação de TNB foi seguida por 3 minutos a 412 nm em espectrofotômetro Beckman DU 640, segundo as seguintes reações:



Para o cálculo da velocidade da reação enzimática usamos a fórmula  $A = E \cdot c \cdot l$ ; onde A é a absorbância da amostra,  $E = 13.600 \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$ , c é a concentração de TNB e l é o caminho ótico da cubeta. A leitura das absorbâncias em um determinado intervalo de tempo nos permite determinar a sua diferença e nos fornece a velocidade da reação enzimática catalisada pela enzima citrato sintase.

#### **b) Glutathione Redutase**

Os ensaios foram conduzidos de acordo com Smith e colaboradores (1988). As amostras foram adicionadas a um meio de incubação contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M e EDTA 2 mM em pH 7.0. Foram adicionados ainda ao meio de reação 50  $\mu\text{L}$  de NADPH 2 mM, 250  $\mu\text{L}$  de DTNB 3mM e 50  $\mu\text{L}$  de GSSG 20 mM, para o início da reação. A formação de TNB foi acompanhada por 3 minutos a 412 nm de absorbância em espectrofotômetro Beckman modelo DU 640, segundo as seguintes reações:



Para calcular a atividade desta enzima em homogenato de músculo utilizamos a mesma equação usada para o cálculo da citrato sintase, utilizando o valor de coeficiente de extinção Molar do TNB de  $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **c) Catalase:**

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos segundo Aebi (1984), adicionando-se as amostras de músculo a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 10 mM. A queda nos valores de absorbância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi seguida por 30 segundos a 240 nm, segundo a reação:



Para o cálculo da atividade desta enzima no músculo foi utilizada a mesma equação descrita para a citrato sintase e glutathione redutase, utilizando o valor de coeficiente de extinção Molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $43,6 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Andersen et al, 1997).

### **DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).**

O ataque oxidativo aos lipídios de membrana leva à formação de aldeídos de baixo peso molecular, principalmente malondialdeído (MDA) que reage com o ácido tiobarbitúrico formando bases de schiff, que fluorecem quando excitadas a 515 nm.

As amostras foram preparadas conforme descrito por Yagi (1987). 500  $\mu\text{L}$  de homogenato foram diluídos em 4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,04 M). Adicionou-se 0,5mL de ácido fosfotungstico 10%, aguardou-se 5 minutos e centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,04 M), seguido da adição de 0,3 mL de ácido fosfotungstico 10%. Após centrifugação a 3000 rpm, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o precipitado em 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . A essa mistura foi adicionado 1 mL da solução reagente de ácido tiobarbitúrico, composta de ácido tiobarbitúrico 0,67 % em ácido acético 50%. Incubou-se a mistura final em banho maria a  $90^\circ\text{C}$  por 1 hora. Após, esfriou-se em banho de gelo e efetuou-se a extração dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) com 5 mL de butanol. Finalmente a medida da emissão da fluorescência da fase orgânica é feita a 553 nm. O comprimento de onda de excitação é 515 nm. O espectrofluorímetro utilizado foi o modelo SPF-500C<sup>TM</sup> SLM Aminco (SLM Instruments, Inc.).

Para se calcular a concentração de TBARS, usou-se uma curva padrão de tetraetoxipropano, conforme descrito por Yagi (1987). Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína.

### **DOSAGEM DE PROTEÍNAS CARBONILADAS**

Uma das conseqüências do ataque dos radicais livres às proteínas é o aumento de carbonilas na sua estrutura. Essas carbonilas servem inclusive para marcar as proteínas para serem hidrolisadas por proteases. O aumento de proteínas carboniladas numa amostra indica portanto, ação de radicais livres. As carbonilas das proteínas reagem com o composto 2,4-dinitrophenilhidrazina (2,4 DNP) formando um cromóforo que absorve a 380 nm.

Amostras de 200  $\mu$ L de homogenato foram diluídos para 1 mL de H<sub>2</sub>O. Adicionou-se 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20 % para precipitação das proteínas. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi incubado durante 50 minutos a 37°C com 1 mL de 2,4 DNPH 10 mM dissolvido em HCl 2 M, com agitação em vortex a cada 5 minutos. Paralelamente o tubo com o branco sofreu o mesmo processo sendo a solução de 2,4 DNP substituída por HCl 2 M. Após, foi feita nova precipitação das proteínas com TCA 20%, lavou-se o precipitado três vezes com uma mistura de etanol/acetato de etila (1:1 v/v) e ressuspendeu-se em guanidina 6 M dissolvida em fosfato de potássio 2 mM, pH 2,3 corrigido com ácido trifluoracético. Determinou-se a absorbância a 380 nm. Para o cálculo da concentração usou-se o coeficiente de extinção molar descrito na literatura ( $\epsilon$  = 22.000/M/cm) (Faure & Lafond, 1995). Os valores foram expressos em nmoles/ mg proteína.

### ***DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE HSP72:***

A técnica de "Blotting" permite que proteínas separadas em gel de poliacrilamida possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose. As bandas assim transferidas são passíveis de análise por auto-radiografia, imunodeteção ou serem eluídas para análise de aminoácidos ou sequência da cadeia polipeptídica (LeGendre & Matsudaira, 1988).

#### ***a) Eletroforese em SDS-PAGE***

O homogenato obtido, conforme descrito acima, foi diluído (1:1 vol/vol) em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,18 M, glicerol 30%, SDS 6,9% e DTT 0,2 M em pH 6,8.

As amostras assim preparadas foram aplicadas em SDS-PAGE com a seguinte composição. O gel de empacotamento continha 1,67 mL de acrilamida/bisacrilamida (30:0,8), 1,25 mL Tris-HCl 1M pH 6,8, 0,05 mL SDS 20%, 7 mL H<sub>2</sub>O e para a polimerização utilizou-se TEMED 15  $\mu$ L e 120  $\mu$ L de PSA 10%.

O gel de corrida era composto de 12,5 mL de Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 11,2 mL Tris-HCl 1M pH 8,8, 0,15 mL SDS 20% e 6,2 mL H<sub>2</sub>O. Acrescentou-se ainda 20  $\mu$ L de TEMED e 250  $\mu$ L de PSA 10%, com o intuito de catalisar a polimerização do gel. A corrida de eletroforese foi executada em ~4 horas, permitindo a variação da amperagem e fixando a voltagem em 90 mV por 1 hora. Após este período foi mantida em 200mV, até o final do experimento.

### **b) Western Blotting**

O tampão de transferência foi preparado com 2,2 g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900 mL de água, sendo titulado a pH 11 com NaOH 2M e o volume final completado a 1L com 100 mL de metanol. A membrana de nitrocelulose e o gel de poliacrilamida foram colocados para equilibrar com tampão CAPS por 5 minutos. O gel foi colocado sobre a membrana em suporte plástico e a transferência ocorreu a 400 mA por 60 minutos a 15°C em sistema refrigerado da série TE (Hoefer,CA,USA).

Para a imunodeteção, a membrana foi bloqueada com tampão (pH 7,6) Tris HCL 0,02M, NaCl 0,15M, Tween 0,05% (TBST), contendo 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora em agitação suave e, em seguida, lavada 3 vezes com TBST e incubada “overnight” com anticorpo monoclonal contra HSP72 (SPA-810, StressGen, Canadá), diluição 1:1000 em TBST. Como segundo anticorpo foi utilizado um anticorpo “anti-mouse” conjugado com peroxidase (Bio Rad, CA, USA), diluído 1:2000 no tampão TBST, deixando-se incubar por 2 horas, seguido por 3 lavagens de 10 minutos com TBST.

Para a preparação do tampão revelador, foram utilizados 10 mg de 3,3' – Diaminobenzidina (Sigma – USA), diluídos em 15 mL de água destilada e 5 mL de tampão fosfato 0,2 M. Imediatamente antes de se executar a revelação, juntou-se ao tampão de revelação 20 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

### **c) Análises Densitométricas**

Foram realizadas análises densitométricas para quantificação das HSPs, utilizando-se o Sharp-Scanner para aquisição de imagem e o programa “Image Master 1D Elite” (Amershan Pharmacia, Uppsala, Suécia) para análise e quantificação da HSP72.

## **APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os resultados obtidos no estudo com animais, serão apresentados na forma de *boxplot*. Optamos pelo gráfico de *boxplot* por julgarmos que as informações contidas neste tipo de gráfico demonstram de forma mais clara a resposta do grupo de sujeitos como um todo sem a limitação imposta pela utilização de médias e desvio padrão permitindo uma análise mais ampla do fenômeno observado. Este tipo de representação gráfica, traz as informações da mediana do grupo bem como a variação observada nos espaços interquartis que mostram alterações de 50% acima e abaixo da mediana e o

gráfico pode ainda ser composto pelos *outliers*, que mostram os sujeitos que apresentaram alterações fora do padrão do grupo.

## **METODOLOGIA PARTE II – TRABALHO COM ATLETAS:**

### **SUJEITOS DA PESQUISA:**

Participaram desse estudo 21 atletas de futebol da Associação Atlética Ponte Preta, Categoria Sub-20 com  $18 \pm 1$  anos de idade. Este trabalho contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Faculdade de Odontologia da Unicamp, sendo que todos os sujeitos foram informados dos procedimentos utilizados no estudo e deram seu consentimento por escrito.

### **PERFIL DAS ATIVIDADES EXECUTADAS PELOS ATLETAS DURANTE A FASE COMPETITIVA:**

Durante o período competitivo, os atletas treinavam quatro dias da semana, executando atividades táticas, técnicas e físicas. A intensidade dos treinos não era superior a 60% da máxima e o volume de treino diário não era superior a 120 minutos, configurando, portanto, atividades de média intensidade, visando exclusivamente a manutenção da forma adquirida no período preparatório. Os jogadores tinham apenas uma atividade de alta intensidade semanal que se tratava do jogo da competição. Os atletas que não participavam dos jogos faziam uma sessão de treino semanal com intensidade e duração similares às do jogo.

### **PROTOCOLO DAS COLETAS DO SANGUE E PREPARO DAS AMOSTRAS:**

A coleta do sangue foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), no Instituto de Biologia da UNICAMP, sob responsabilidade de farmacêutica credenciada, seguindo todos os cuidados de higiene e assepsia. Mensalmente, foram coletados 5 mL de sangue, a partir do término do período preparatório e conseqüente início do campeonato (coleta 1) até o momento em que o time foi eliminado da competição nas semi-finais (coleta 5). As amostras foram coletadas sempre 48 horas após o término do jogo semanal ou da sessão de treinamento mais intensa, mimetizando o jogo aos sujeitos que não participaram do mesmo.

O sangue foi coletado diretamente em tubo heparinizado e em seguida, centrifugado por quinze minutos, a 3000 x g para separação do plasma e células sanguíneas. O plasma foi armazenado a -70°C em tubos tipo eppendorf para posterior análise da concentração de grupamentos sulfidríla totais, ácido úrico e atividade da enzima creatina quinase.

As hemácias foram lavadas com solução gelada de Tampão Fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4 e centrifugadas a 700 x g, desprezando-se, em seguida, o sobrenadante. Esse processo foi repetido três vezes. Alíquotas de 500µL foram retiradas e hemolisadas com água deionizada na proporção 1:1 (v/v) (Andersen et al, 1997), com posterior armazenamento a -70°C para as análises da atividade das enzimas catalase e glutatona redutase.

#### **ANÁLISE DA ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE (CK) NO PLASMA:**

As análises foram feitas utilizando-se o kit "MPR3 CK NAC-ativado" (Boehringer Mannheim). Juntou-se à solução tampão (frasco de 2,5 mL) um reativo específico, deixando-os em banho-maria a 37°C por um minuto. Em seguida, adicionou-se 50 µL de plasma à solução reativa, deixando novamente a mistura em banho-maria a 37°C por mais um minuto. De forma imediata, realizou-se quatro leituras das absorbâncias de uma mesma amostra a 334 nm, com um minuto de intervalo entre uma leitura e outra, para que fosse obtido um valor  $\Delta$ . O cálculo da atividade de CK (U/L) na amostra foi feito pela equação  $CK_p = 8252 \times \Delta$  absorbância/minuto.

#### **GRUPAMENTOS SULFIDRILA (GS) TOTAIS EM PLASMA:**

Uma alíquota de 50 µL do plasma foi misturada em 1mL de tampão Tris-EDTA (1mM), sendo feita uma primeira leitura a 412 (leitura  $A_1$ ). Após essa leitura foi adicionado 20 µL de 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 10mM, diluído em metanol. Esperou-se 15 minutos à temperatura ambiente e fez-se nova leitura (leitura  $A_2$ ). O branco (B) continha somente DTNB e tampão Tris-EDTA. Os grupamentos sulfidríla totais foram calculados conforme mostrado abaixo, usando-se o coeficiente de absorção molar =  $13,600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Faure & Lafond, 1995).

$$(A_2 - A_1 - B) \times 1,57 \text{ mM}$$

### **ÁCIDO ÚRICO:**

As análises para determinação da concentração de ácido úrico no plasma foram conduzidas de acordo com Town e colaboradores (1985), através de kit específico Roche.

### **GLUTATIONA REDUTASE (GR):**

Os ensaios foram conduzidos de acordo com Smith et. al. (1988). As amostras (3 $\mu$ L de hemolisado diluído 1:20) foram adicionadas a um meio de incubação contendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M, EDTA 2 mM em pH 7.0, 50 $\mu$ L de NADPH 2 mM e 250 $\mu$ L de DTNB 3 mM. Um volume de 50  $\mu$ L de GSSG 20 mM foi adicionado para iniciar a reação. A formação de 5,5'-Tiobis ácido 2-nitrobenzóico (TNB) foi acompanhada a 412nm. Para calcular a atividade da enzima utilizamos a seguinte equação:  $E = 100 \times A/[Hb]$ , onde E é a atividade da enzima em unidades internacionais UI/grama de hemoglobina; A é o número de unidades de enzima da amostra, sendo calculada pela equação:  $\Delta A/13.600 \times V_h/V_c$ , onde  $\Delta A$  é a diferença da absorbância em 412 nm em 1 minuto; 13.600 é o coeficiente de extinção do TNB a 412 nm;  $V_h$  é o volume do hemolisado na cubeta;  $V_c$  é o volume total da cubeta e  $[Hb]$  é a concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dL (Beutler, 1975).

### **CATALASE (CAT):**

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras a tampão fosfato 50 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM (Aebi, 1984). A queda nos valores de absorbância foi seguida em 240 nm. O cálculo da atividade enzimática foi feita pela seguinte equação:  $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$ , onde a é o volume de hemolisado na cubeta e b é o volume total da cubeta;  $A_1$  é o valor da absorbância em  $t=0$  e  $A_2$  é o valor da absorbância no tempo final, que em nosso caso é de 15 segundos após o início da reação.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

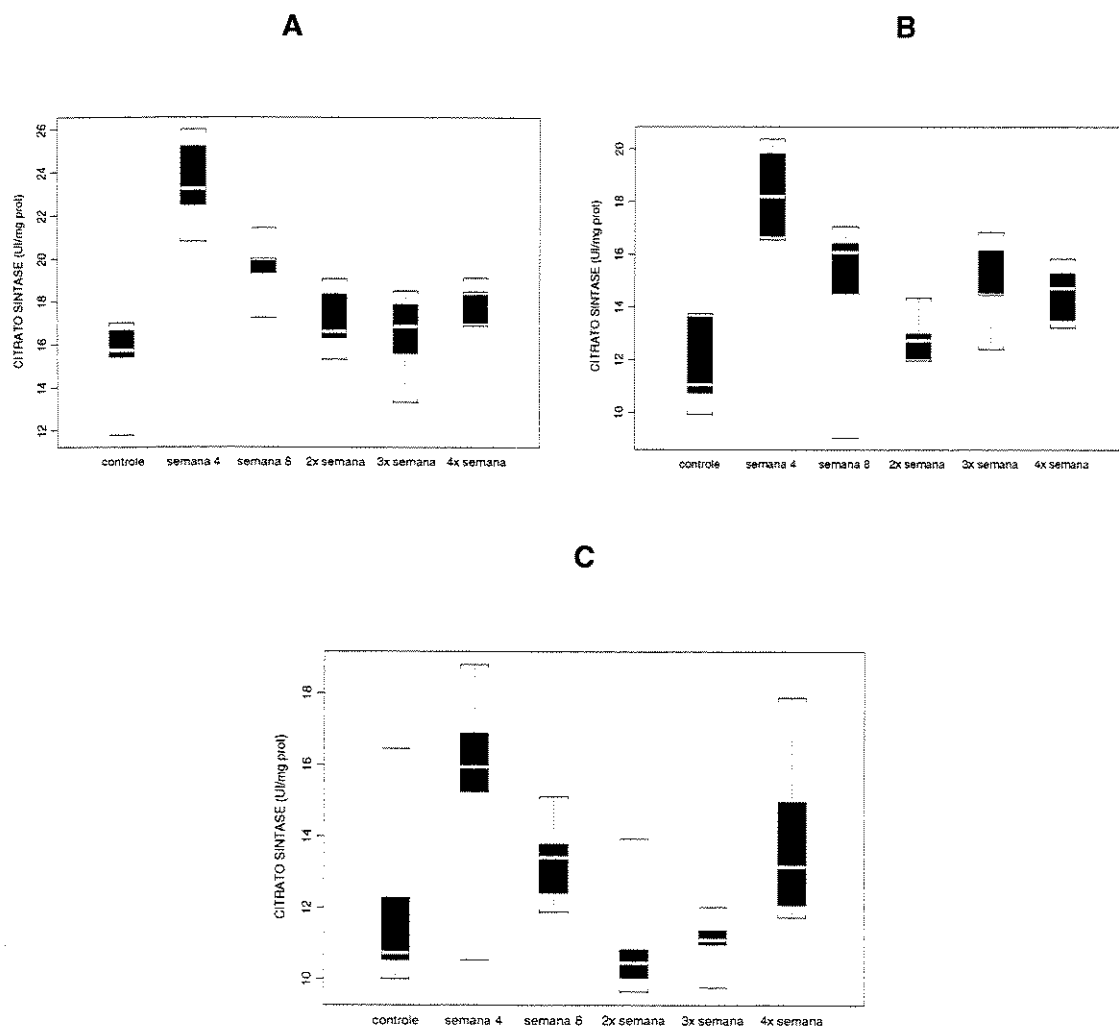
Foi utilizado o software GraphPad Instat<sup>®</sup> (San Diego, CA) para conduzir as análises estatísticas, o teste utilizado foi "one way" ANOVA para amostras pareadas, juntamente com o pós-teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE I (animais submetidos ao treinamento e overtraining).

Os resultados relativos ao período que envolveu o treinamento de oito semanas, com uma sessão diária foram comparados ao grupo controle, de animais sedentários. Os dados obtidos durante o protocolo de tentativa de indução de *overreaching* (TIO) foram comparados tanto com o grupo sedentário quanto com os resultados obtidos após 8 semanas de treinamento.

### 1. EFEITO SOBRE A CAPACIDADE OXIDATIVA

As alterações induzidas na atividade da enzima citrato sintase (CS) ao longo das 11 semanas de exercícios estão apresentadas nas Figuras 4 A (músculo sóleo), B (músculo EDL) e C (músculo semitendinoso).



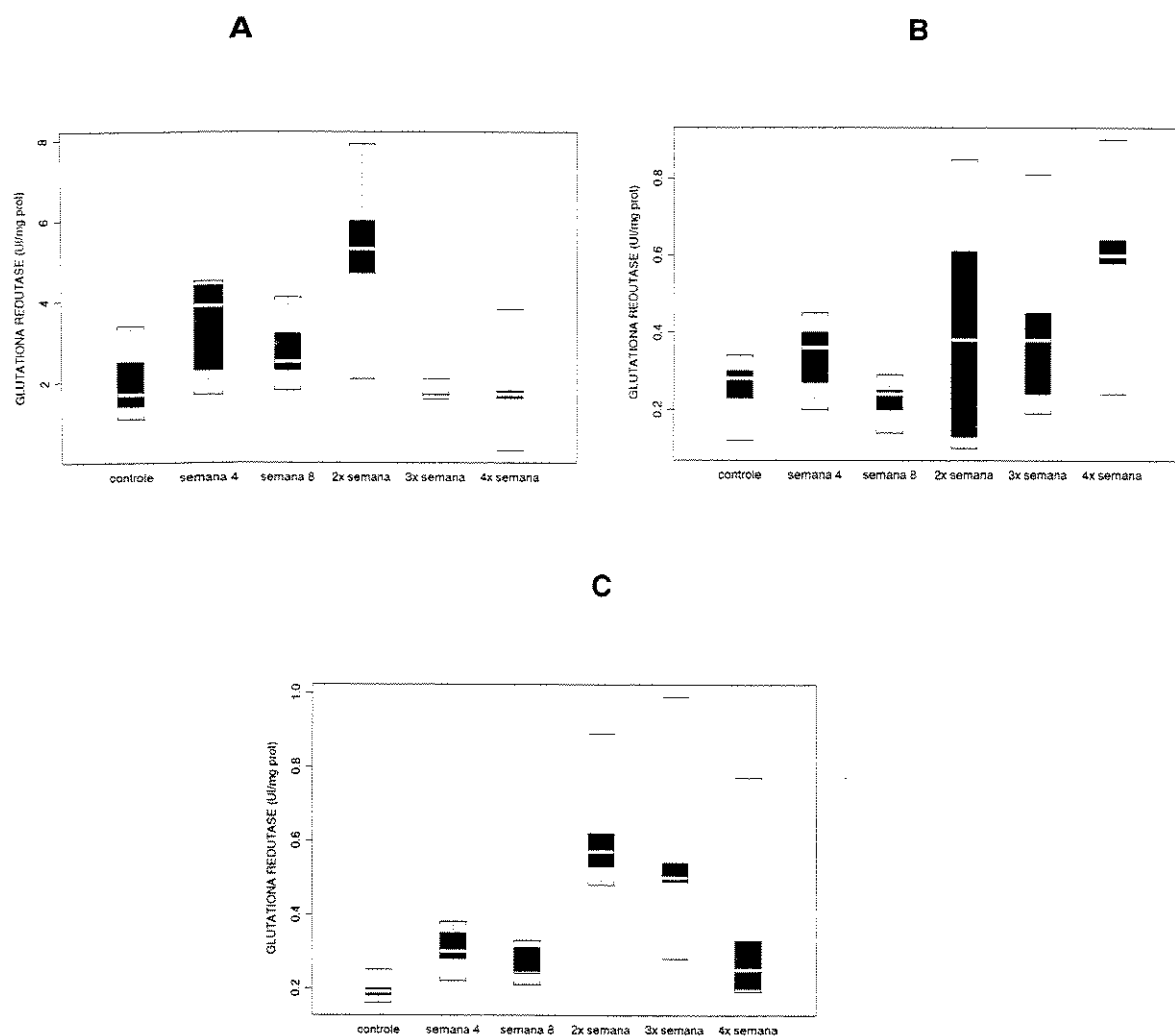
**Figura 4:** Atividade da enzima citrato sintase nos músculos SO, EDL e ST (A, B e C, respectivamente) ao longo de 11 semanas de exercícios. Resultados são medianas e intervalos interquartis (n=5).

Analisando inicialmente a atividade da enzima citrato sintase após oito semanas de treinamento diário, podemos observar um comportamento similar nos três músculos. Observa-se aumento expressivo nos valores da mediana após quatro semanas de treino (quando foi aumentado progressivamente a carga de esforço), comparados com as atividades da CS do grupo sedentário. Ao final da oitava semana, com a estabilização do volume e intensidade do esforço por quatro semanas, a atividade da CS tendeu a uma queda, mas mantendo-se numa faixa de valores acima dos valores do grupo controle. Esses dados sugerem uma adaptação positiva na capacidade oxidativa induzida pelo estímulo diário do treinamento nos três tipos de músculos analisados.

O aumento nas sessões diárias de exercícios, com a conseqüente diminuição no tempo de recuperação (TIO), por sua vez, induziu diminuição na atividade da CS, mais pronunciada nos músculos EDL e semitendinoso, mais glicogenolíticos, com os valores de atividade tendendo a estar próximos dos do grupo controle. De qualquer forma, ao final das 11 semanas todos os três músculos exibiram valores próximos aos encontrados no final da oitava semana, à despeito do aumento no volume de esforço.

## ***2. EFEITO SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE***

As alterações induzidas na atividade da enzima GR ao longo das 11 semanas de exercícios estão apresentadas na Figura 5 (músculo sóleo SO, músculo EDL e músculo semitendinoso, ST, respectivamente).



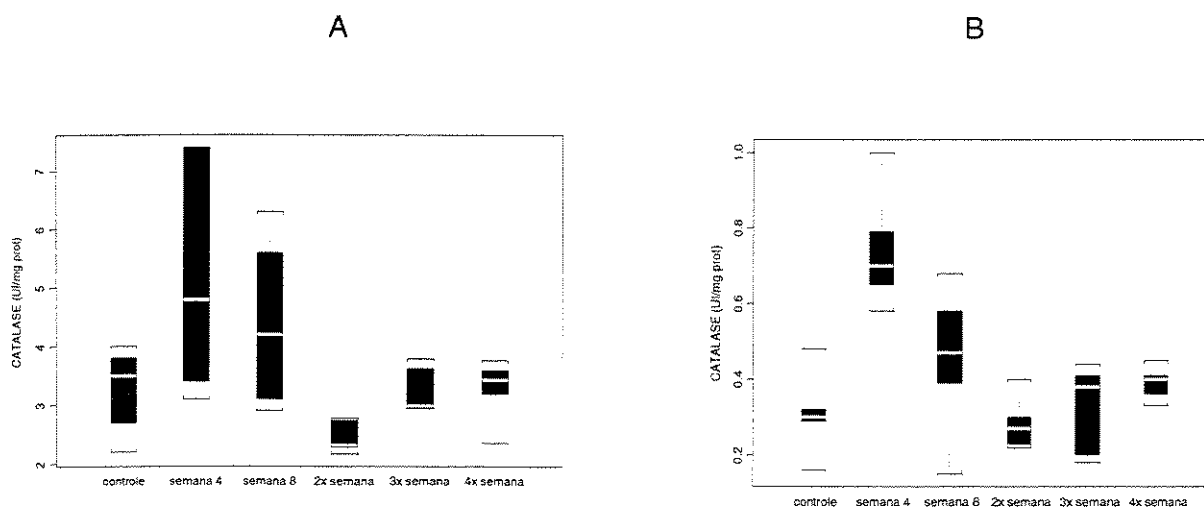
**Figura 5:** Atividade da enzima glutathione redutase (A) nos músculos sóleo (A), EDL (B) e ST (C).. Resultados são medianas e intervalos interquartis (n=5).

Analisando as alterações induzidas na atividade da GR pelo treinamento, podemos observar que ao final da quarta semana a atividade da GR (A) apresentava valores da mediana aumentados nos três músculos estudados, quando comparados ao grupo controle. Ao final da oitava semana a atividade da GR apresentava-se com valores da mediana intermediários entre os do grupo controle e os animais da quarta semana de treinamento, principalmente nos músculos SO e ST.

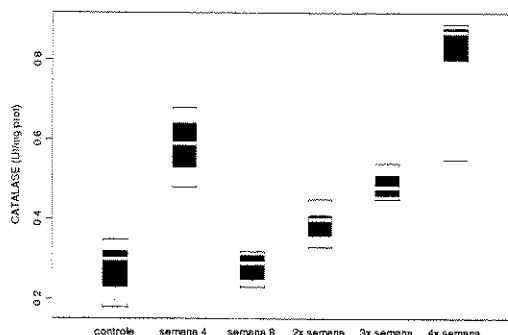
Quando analisamos a resposta da atividade da GR no músculo sóleo nas três semanas de TIO (9<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup>) observamos aumento nos valores da mediana na nona semana, com um grande aumento na variabilidade das respostas. No entanto, nas semanas 10 (3x) e 11 (4x) a atividade da GR chegou a valores bastante diminuídos em relação aos obtidos após a quarta semana de treinamento, atingindo valores próximos aos encontrados nos animais do grupo sedentário, mas com uma grande homogeneidade na resposta.

A atividade da GR no músculo ST apresentou comportamento semelhante ao exibido pelo SO. Ao final da primeira semana de TIO, quando os animais se exercitavam duas vezes ao dia a atividade da GR teve aumento expressivo em relação à oitava semana de treinamento, apresentando queda gradual o final do TIO, na 11<sup>a</sup> semana. Já no músculo EDL, o perfil da atividade da GR foi inverso aos demais músculos. A atividade desta enzima se manteve bastante alta nas semanas 9 e 10, aumentando expressivamente na 11<sup>a</sup> semana.

As alterações induzidas na atividade da enzima CAT ao longo das 11 semanas de exercícios estão apresentadas na Figura 6 (músculo sóleo SO, músculo EDL e músculo semitendinoso, ST, respectivamente).



C



**Figura 6:** Atividade da enzima catalase nos músculos sóleo (A), EDL (B) e ST (C).. Resultados são medianas e intervalos interquartis (n=5).

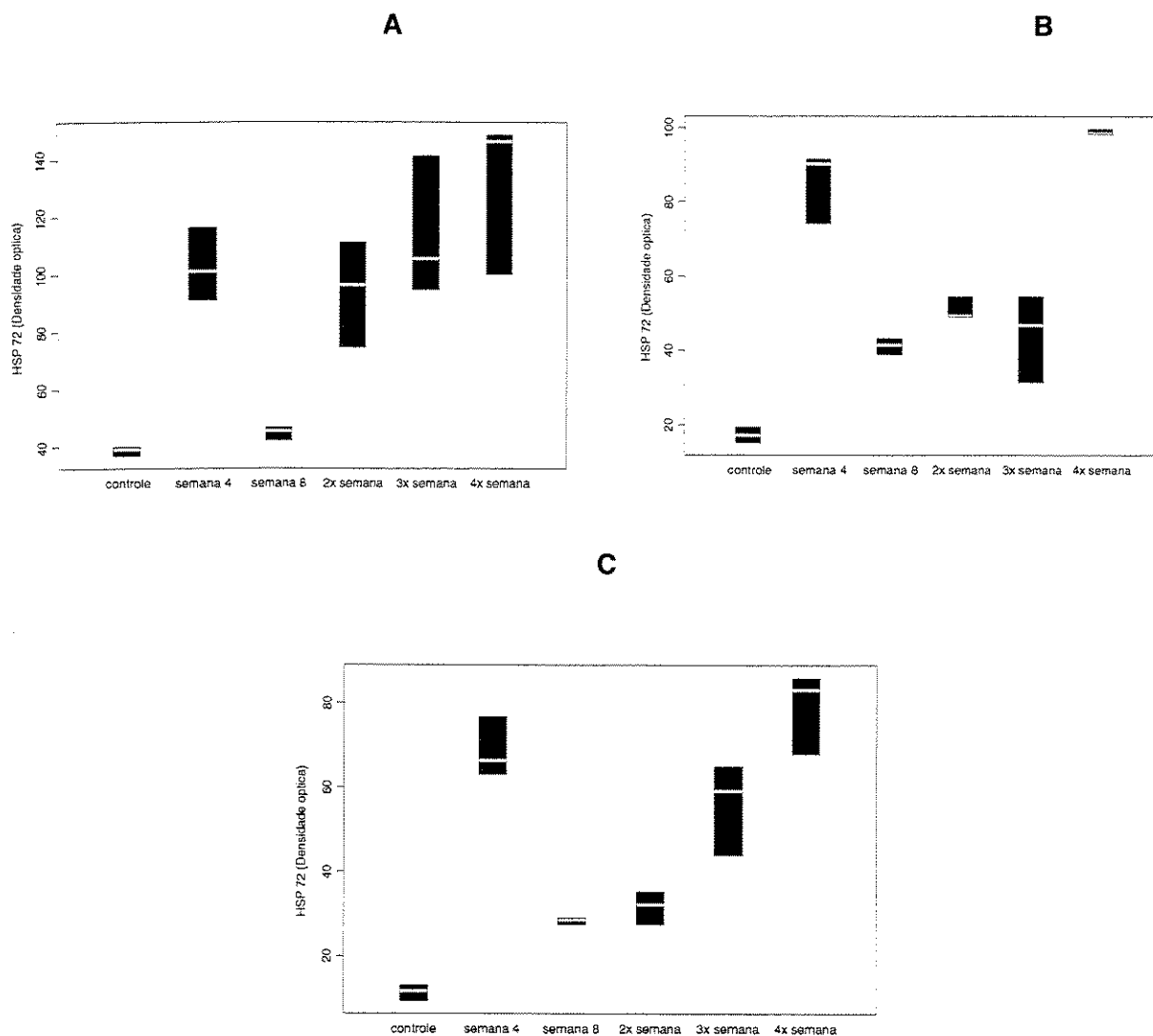
Com relação às alterações induzidas na atividade da CAT pelo treinamento podemos observar um comportamento similar nos três tipos de músculos, com aumento na mediana dos dados ao final da quarta semana, retornando a valores intermediários ao final da oitava semana de treinamento. Exceção feita ao músculo ST, no qual a atividade da CAT retornou a valores similares aos encontrados no grupo controle.

O protocolo de TIO induziu alterações diferenciadas na atividade da CAT nos diferentes músculos. Nos músculos SO e EDL a atividade da CAT se estabilizou em valores próximos aos do grupo controle até o final da semana 11, com uma leve tendência de aumento no músculo EDL, mas com valores de atividade sempre abaixo dos valores exibidos durante o treinamento.

O efeito no músculo ST foi de uma tendência de aumento gradual em relação ao valor obtido no final do treinamento. À partir da segunda semana de TIO, quando os animais se exercitavam três vezes ao dia, a atividade da CAT já era significativamente maior em relação à oitava semana de treinamento. Ao final da TIO os valores médios da atividade da CAT se mostraram acima dos valores obtidos ao final da quarta semana de treinamento.

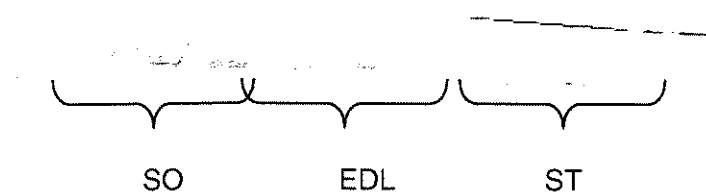
## 2.2. Concentração de HSP72

As alterações induzidas nas concentrações de HSP72 ao longo das 11 semanas de exercícios estão apresentadas na Figuras 7A (músculo sóleo), B (músculo EDL) e C (músculo semitendinoso).



**Figura 7:** Concentração de HSP72 nos músculos SO (A), EDL (B) e ST (C). Resultados são medianas e intervalos interquartis (n=5). \*

#### Membrana demonstrativa do WESTERN-BLOTTING:



**Figura 8:** Western Blotting representativa da análise de HSP72 nos músculos SO, EDL e ST dos animais submetidos a quatro sessões de treino ao dia.

A resposta da HSP72 ao protocolo de treinamento foi semelhante ao observado nos demais marcadores. Ao final da quarta semana de treinamento, a concentração de HSP72 se mostrou aumentada em relação aos valores dos animais controle nos músculos SO, EDL e ST, tendendo a uma queda aos valores basais no SO e após as oito semanas de treinamento, embora nos músculos EDL e ST a concentração de HSP ainda permaneciam maiores quando comparados ao grupo controle.

O protocolo de TIO induziu perfis de alterações específicos para os diferentes músculos, embora todos tenham exibido aumento na concentração de HSP72 ao final das 11 semanas.

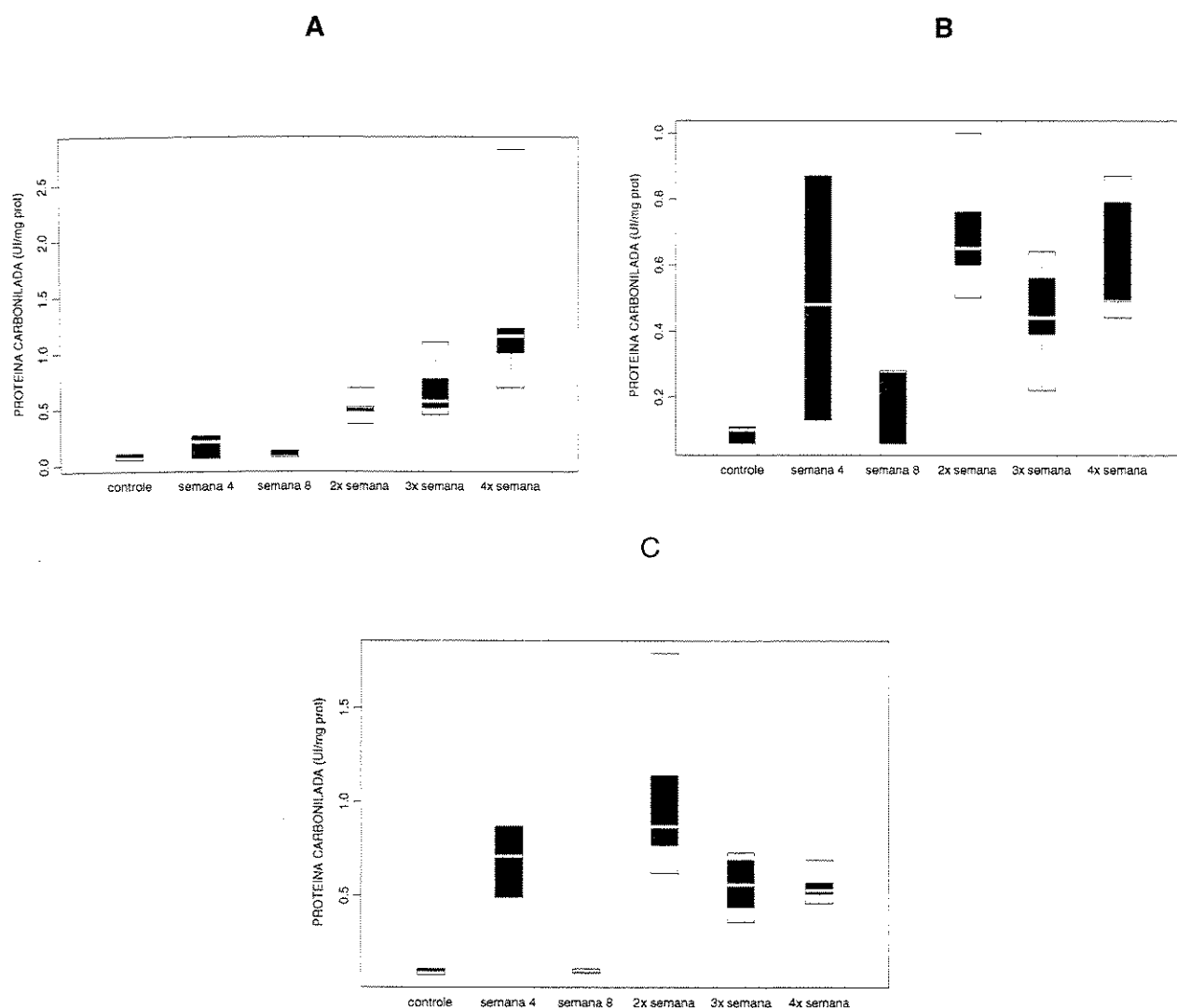
O SO apresentou aumento significativo na concentração da HSP72 já ao final da nona semana, quando comparado aos valores encontrados na oitava semana de treinamento. Ao final da 11ª semana a concentração de HSP72 se encontrava significativamente maior em relação aos valores obtidos ao final da quarta semana de treinamento.

A concentração de HSP no músculo EDL se manteve em níveis semelhantes aos obtidos ao final da oitava semana de treinamento. No entanto, ao final da última semana de TIO a concentração de HSP72 aumentou, chegando próximo aos observados ao final da quarta semana de treinamento, significativamente maiores em relação à oitava semana de treinamento, valores estes que já se encontravam acima do grupo controle.

No ST a concentração de HSP72 mostrou aumento gradual durante as semanas de TIO. Ao final da 10ª semana, quando os animais se exercitavam três vezes ao dia a concentração desta proteína já era superior aos valores da oitava semana de treinamento. Ao final da TIO a concentração de HSP72 no ST atingiu valores superiores aos obtidos ao final da quarta semana de treinamento.

### **3. MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Para avaliarmos os níveis de oxidação celular induzido pelas onze semanas de treinamento, quantificamos as concentrações de proteínas carboniladas (PC), como marcador de oxidação de proteínas nos diferentes músculos. Os resultados estão mostrados na Figura 9.



**Figura 9:** Concentração de proteínas carboniladas (PC) nos músculos SO (A), EDL (B) e ST (C). Resultados são medianas e intervalos interquartis. (n=5).

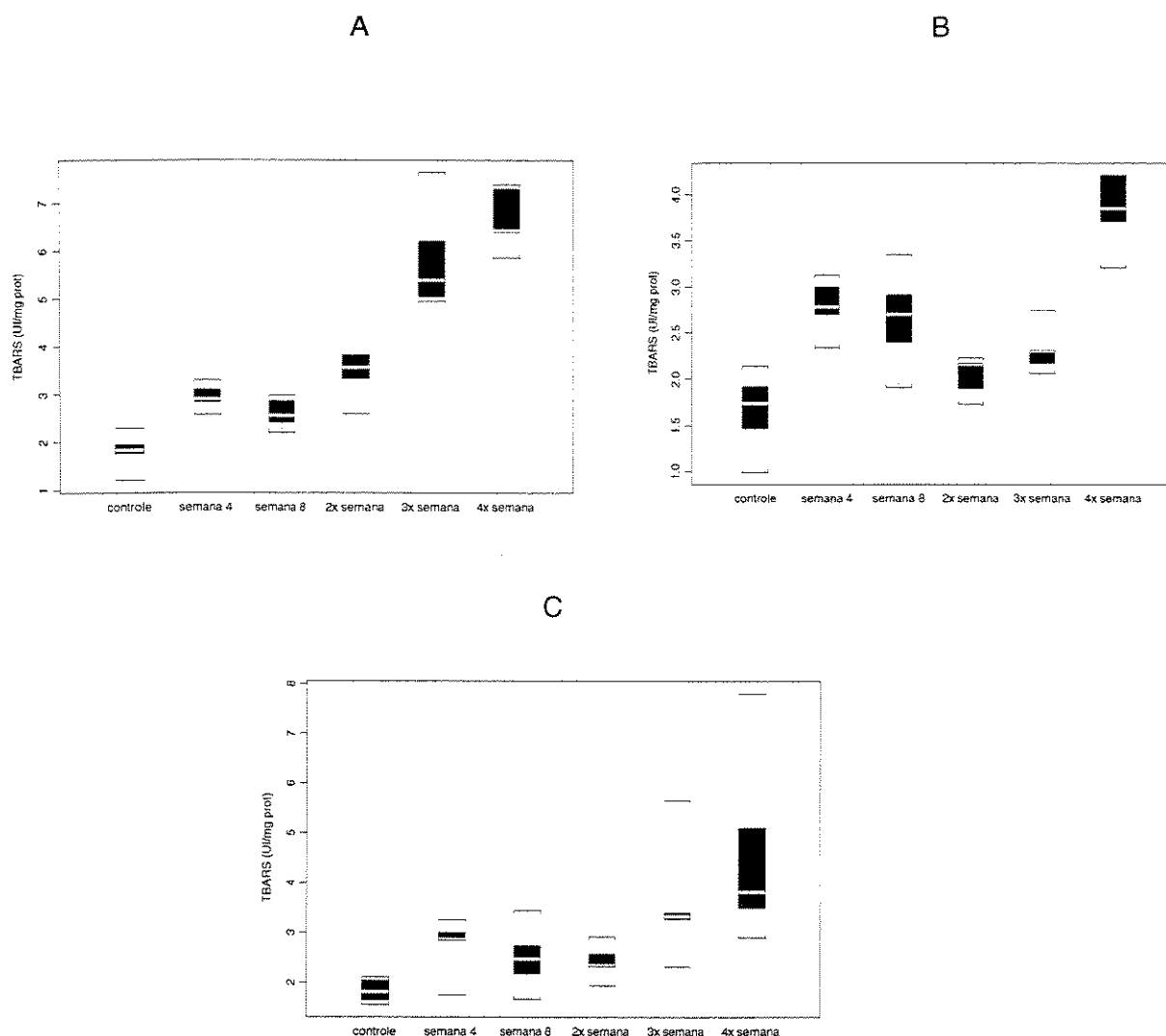
A concentração de PC (A) após o treinamento mostrou praticamente o mesmo perfil nos músculos EDL e ST, com aumento na oxidação de proteínas intracelulares ao final da quarta semana e uma tendência de volta aos valores basais ao final da oitava semana. Nota-se também uma grande homogeneidade nas respostas. Observamos pequeno aumento na concentração de PC no músculo sóleo nessas oito semanas de treinamento.

Com relação ao protocolo de TIO, no músculo SO observou-se uma tendência gradual de aumento na concentração de PC, sendo que ao final da nona semana os níveis de oxidação protéica se apresentavam aumentados em relação à oitava semana de treinamento. Ao término do protocolo de TIO a concentração de PC se encontrava expressivamente maior em relação ao observado na oitava semana de treinamento.

No músculo EDL, apesar de flutuações, observadas principalmente ao final da 9ª semana, as concentrações de PC se mantiveram próximas ou acima dos valores encontrados na quarta semana de treinamento. Porém, esses valores se mantiveram sempre aumentados quando comparados aos valores observados ao final da oitava semana de treinamento.

O ST mostrou aumento abrupto na concentração de PC logo após a primeira semana de TIO, com queda nas semanas seguintes, embora a concentração de PC também tenha estado sempre acima dos valores encontrados após a oitava semana de treinamento.

Para avaliarmos os níveis de oxidação celular induzido pelas onze semanas de treinamento, quantificamos as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) como marcador da oxidação de lipídeos nos diferentes músculos. Os resultados estão mostrados na Figura 10.



**Figura 10:** Concentração de TBARs nos músculos SO (A), EDL (B) e ST (C). Resultados são medianas e intervalos interquartis. (n=5).

O comportamento da concentração de TBARs durante o treinamento foi similar aos demais parâmetros estudados. Isto é, mostrou aumento nos valores da mediana em todos os músculos ao final da quarta semana e uma queda pra valores intermediários ao final da oitava semana, embora especificamente no EDL os valores se mantiveram acima dos do grupo controle.

Com relação ao protocolo de TIO, notamos novamente respostas diferenciadas. O SO mais uma vez apresentou tendência gradual de aumento na concentração de TBARs, sendo que ao final da décima semana os valores já se encontravam bem acima dos exibidos ao final da oitava semana de treinamento. Ao fim do protocolo, quando os

animais já perfaziam quatro sessões diárias de exercício a concentração de TBARs se encontrava superior ao observado após a quarta semana de treinamento.

No EDL a concentração de TBARs só mostrou valor aumentado ao final da última semana de protocolo de TIO. O comportamento da concentração de TBARs no ST foi similar ao do EDL, se mantendo próximo aos níveis encontrados ao final da oitava semana de treinamento, com aumento somente após a 10ª semana.

## **DISCUSSÃO:**

O principal objetivo do treinamento físico é melhorar a qualidade de vida em indivíduos não atletas, assim como aumentar a capacidade de *performance* em indivíduos atletas (Noakes, 2000). No entanto, se não houver uma relação ideal entre estímulo (exercício) e regeneração (descanso) a adaptação positiva ao treinamento pode não acontecer, e os resultados podem ser exatamente o contrário do que se espera, isto é, o rendimento pode diminuir, devido a instalação do processo de *overreaching/overtraining* (Kuipers, 1998).

Há uma grande discussão na literatura se existem ou não marcadores confiáveis desse processo, pois aparentemente várias substâncias se alteram dependentes da intensidade, frequência e duração dos exercícios, embora ainda não existam descritos na literatura marcadores completamente confiáveis, nem de adaptação, nem de *overreaching*, que ajudem a diagnosticar esse limite individual de estresse que impeça a instalação do *overtraining*, objetivo dos pesquisadores do Labex.

Ao nosso ver, um dos problemas para isso é que a literatura é carente de protocolos de exercícios que se preocupem em estabelecer esse quadro de desequilíbrio entre exercício/repouso em animais de laboratório, o que dificulta o estudo da sensibilidade de biomarcadores nessa situação. Dessa forma, neste trabalho partimos da padronização de um protocolo de exercícios físicos que pudesse levar as duas faces da mesma moeda do treinamento físico: adaptação e *overreaching*.

Com exercícios semanais que variavam no número de sessões diárias procuramos monitorar alguns marcadores que já sabíamos que se alteravam em resposta a uma situação de treinamento (Smolka et al., 2000) para analisar se esses marcadores poderiam ser utilizados como marcadores de *overreaching* em atletas. Julgamos que esse conhecimento poderia ser de extrema importância, principalmente para os preparadores físicos/treinadores, uma vez que durante a fase de treinamento ainda é possível a

interferência na metodologia de trabalho aplicada e nos intervalos de descanso, o que poderia reverter a instalação crônica deste processo, evitando fases mais tardias e deletérias do *overtraining*.

Um dos méritos da presente tese foi poder comparar as alterações sequenciais induzidas por um protocolo de treinamento de *endurance* com sessões diárias de exercício (8 semanas) com um protocolo curto de tentativa de indução de *overreaching/overtraining* (TIO) com duração de 3 semanas, quando as sessões diárias de exercícios foram aumentadas de 2 para até 4 vezes ao dia, com a conseqüente diminuição no tempo de recuperação desse esforço (Petibois et al, 2003). Nossa idéia foi responder se o protocolo de exercícios proposto era eficiente para atingir fibras musculares de diferentes capacidades oxidativas, e se o mesmo tipo de estresse induzia as mesmas resposta entre elas. Analisando tipos de fibras musculares diferentes poderíamos ter um panorama mais completo das adaptações induzidas por esse protocolo específico de exercícios.

Nossos resultados mostraram que o padrão de respostas induzidas pelos dois protocolos (treinamento e TIO) foram distintas em seu conjunto e serão discutidas a seguir.

## **1. ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO PROTOCOLO DE TREINAMENTO DE ENDURANCE**

Já está amplamente estabelecido na literatura que o treinamento de *endurance* aumenta a atividade oxidativa muscular, devido ao aumento na concentração e densidade mitocondrial (Gollnick, 1986). Neste sentido, a atividade da enzima citrato sintase tem sido muito utilizada para avaliar esta adaptação (Dudley et al, 1982; Holloszy e Coyle, 1984; Smolka et al, 2000). Nossos dados corroboram com a literatura, uma vez que neste estudo também observamos aumento na atividade da enzima citrato sintase em resposta ao treinamento de *endurance*. Considerando que esse perfil de resposta foi observado nos três tipos de músculos, podemos inferir que o protocolo de exercícios utilizado foi eficiente para estimular todos os tipos de fibras, independente de sua capacidade oxidativa, sugerindo um componente de alta intensidade no treinamento aplicado.

O aumento significativo na atividade das duas enzimas antioxidantes GR e CAT ao final da quarta semana também está em acordo com a literatura, onde vários estudos também encontraram a mesma resposta adaptativa em diferentes tipos de fibras musculares (Ji et al, 1992; Powers et al, 1994; Powers et al, 1999). O retorno da

atividade da três enzimas a valores intermediários entre os obtidos no grupo controle sedentário e ao final da quarta semana de treinamento, quando o protocolo atingiu sua intensidade e volumes máximos, observados ao final da oitava semana de treinamento podem ser explicados pelo princípio da reversibilidade do treinamento (Bompa, 1990) e se devem principalmente a estabilização do estímulo durante as últimas quatro semanas de treinamento. Esses dados sugerem que o estímulo aplicado neste período não foi suficiente para manter as adaptações induzidas na fase anterior do treinamento.

A análise dos níveis de oxidação lipídica e protéica, detectados pelas concentrações de TBARs e PC intramusculares mostram que ao final da quarta semana houve um aumento no estado redox intracelular, provavelmente devido ao aumento constante na produção de radicais livres neste período. Segundo Alessio et alii (1988), a produção das EROs é proporcional ao aumento na intensidade do esforço. Os resultados obtidos ao final da oitava semana corroboram com esta interpretação, uma vez que quando se manteve o estímulo constante os valores de peroxidação lipídica bem como a concentração de proteínas carboniladas retornaram próximos aos níveis basais. Estes dados estão em acordo com os resultados encontrados por Ràdak et alii (1999 e 2000), os quais mostraram que o treinamento físico induz atenuação nos níveis de proteínas carboniladas e TBARs. A explicação para isso poderia ser o aumento na capacidade antioxidante, observada neste trabalho através da atividade das enzimas GR e CAT. A literatura aponta também que o treinamento de *endurance* pode induzir aumentos tanto na atividade da enzima GPX (Powers et alii, 1999), como na concentração de moléculas antioxidantes não enzimáticas, como a glutathiona reduzida (Leeuwenburg et alii, 1994 e 1997).

De fato, estudos demonstraram que atletas bem treinados não apresentam alterações em marcadores de ataque oxidativo após uma partida de futebol, uma maratona ou até mesmo uma prova de triatlon (Margaritis et alii, 1997, Zoppi et alii, 2003), embora Kanter e colaboradores (1988) tenham mostrado aumento da peroxidação lipídica após corridas de 80 e 100 km executadas em intensidades relativas próximas à 75% do  $VO_{2\text{ máx}}$ .

Analisando nossos dados no seu conjunto notamos que, aparentemente, um estado intracelular mais oxidado parece ser importante para a adaptação positiva observada, principalmente nas enzimas do sistema de defesa antioxidante, as quais acredita-se que sejam responsivas a um aumento na concentração de oxidantes intracelulares (Ji et alii, 1990). No caso do exercício físico, os principais agentes seriam as

EROs. Esses dados estão de acordo com a hipótese de Reid (2001), de que haveria um estado redox ótimo para a produção máxima de força, resultado de uma razão adequada entre oxidantes e antioxidantes e o possível desequilíbrio desta razão para qualquer um dos lados seria prejudicial.

Com relação à expressão da proteína de estresse HSP72, já tínhamos observado modulação na sua concentração no músculo sóleo (Smolka et al., 2000). Vários outros trabalhos demonstraram aumento na expressão desta proteína. Demonstrou-se aumento na expressão da HSP72 em resposta ao exercício em fibras musculares esqueléticas do tipo I e II (Hernando e Manso, 1997) e também em outras células e tecidos, tais como cérebro, leucócitos, adrenal, coração, fígado e baço (Salo et al., 1991; Demirel et al., 1999; Campisi et al., 2003).

De forma similar, detectamos aumento na concentração de HSP72 nos três tipos de músculos ao final da quarta semana de treinamento. Estes dados reforçam níveis aumentados de estresse oxidativo como o fator responsável pelas adaptações detectadas nas capacidades oxidativa e antioxidante dos músculos. Similar a estes resultados, Febbraio e Koukoulas (2000) também mostraram aumento na expressão de HSP72 em resposta a um estímulo progressivo em humanos, sugerindo que as respostas da expressão da HSP72 em ratos são similares às encontradas em humanos, pelo menos neste tipo de protocolo.

Por outro lado, o retorno da concentração de HSP72 a valores basais ao final da oitava semana sugerem que as fibras musculares já haviam atingido um nível homeostático adequado ao estímulo imposto durante esta fase do treinamento, que não mais se constituía numa situação estressante às mesmas, fato que se refletiu em todos os demais parâmetros estudados.

Em síntese, embora tais adaptações já foram amplamente estudadas e segundo Noakes (2000), elas ocorram no sentido de otimizar as funções orgânicas de maneira geral, induzindo aumento na *performance* atlética, o mérito desse trabalho foi mostrar esse panorama adaptativo em músculos com capacidades oxidativas diferentes, permitindo uma análise mais aprofundada dos dois momentos do protocolo de treinamento, a quarta e oitava semanas. Nossos dados reforçam nossa própria observação, de que, principalmente os biomarcadores do *status* antioxidante são capazes de refletir diferentes níveis de estresse oxidativo intramuscular em função da modulação intensidade x volume de esforço (Smolka et al., 2000).

## 2. ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO PROTOCOLO DE TIO

As alterações observadas nos parâmetros por nós estudados no protocolo de TIO, de forma diferente do ocorrido no protocolo de treinamento, não demonstraram um padrão de comportamento. Ao contrário, as respostas foram em certos casos bem diferenciadas nos três músculos estudados. Provavelmente nessa situação os músculos sejam expostos a diferentes níveis de estresse oxidativo.

A discussão destes resultados baseados em dados da literatura é extremamente difícil, uma vez que não encontramos nenhum estudo que tenha um enfoque similar ao nosso. De fato, só recentemente começou a se especular sobre a influência dos radicais livres na instalação do *overtraining*. Tiidus (1998) foi o primeiro autor a propor o efeito deletério das EROs como um dos responsáveis pelo *overtraining*. Atualmente outros trabalhos vêm destacando a atuação do estresse oxidativo neste processo (Smith, 2000; Petibois et al, 2003), embora como já mencionado anteriormente, nenhum estudo mais controlado dedicou-se a mensurar as alterações de marcadores de ataque oxidativo e dos sistemas de defesa antioxidantes numa situação real de *overreaching/overtraining* utilizando modelos animais.

Nossos dados, de uma forma geral demonstram que numa situação de desequilíbrio exercício/recuperação as fibras musculares estão submetidas a um aumento nos níveis de estresse oxidativo. Mostramos concentrações de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas aumentadas nos três músculos estudados, em relação ao observado no período de treinamento. No entanto, a diferença entre estes dois momentos (treinamento e TIO) é melhor percebida quando analisamos as alterações na atividade das enzimas estudadas.

Enquanto o treinamento induziu aumento na atividade de todas as enzimas o protocolo de *overreaching* induziu queda na atividade da citrato sintase em todos os músculos estudados em relação à oitava semana de treinamento, chegando a atingir valores similares ao encontrado no grupo controle, evidenciando uma queda na capacidade oxidativa destes músculos relacionada à *performance*. Resultados semelhantes foram obtidos por Ji et al (1988), que mostraram diminuição não só na atividade da citrato sintase, mas também de outras enzimas metabólicas após um exercício agudo exaustivo. O autor também justificou esta queda devido ao estresse oxidativo causado pelo esforço.

A atividade das duas enzimas antioxidantes no SO mostraram queda em resposta ao protocolo de TIO, sugerindo que esse tipo de músculo foi mais estressado que os

outros pelo protocolo de TIO. Estes resultados podem ser explicados com base no padrão de recrutamento dos diferentes tipos de fibras neste tipo de esforço (Roy et al, 1991). Eles estão de acordo com o observado por Lehmann et al (1997), que concluíram que em atletas de modalidades de *endurance* encontrados em situação de *overtraining*, as fibras do tipo I, presentes em grande maioria no músculo SO (Maltin et al, 1989) são as que sofrem maiores agressões.

No músculo SO, especificamente, observamos um grande aumento nos níveis de estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento exacerbado na concentração de produtos do ataque oxidativo a lipídeos e proteínas e pela queda da capacidade antioxidante intracelular, mostrada pela diminuição na atividade das duas enzimas antioxidantes mensuradas.

Embora nossos dados mostrem aumento na atividade das enzimas antioxidantes em momentos específicos nos músculos EDL e ST, elas parecem estar atuando num sistema de compensação. Isto é, quando uma delas apresenta queda a outra mostra aumento em sua atividade. Isso diminui, de uma forma geral a capacidade antioxidante nos músculos estudados quando comparados com os efeitos do treinamento. Encontramos resultados semelhantes nestas mesmas enzimas, mensuradas nos eritrócitos de jogadores de futebol, durante uma temporada (Zoppi et al, 2003). Esta compensação poderia representar uma estratégia intracelular limite para combater o aumento na concentração de EROs.

De fato, estudos “in vitro” mostram que quantidades excessivas de EROs podem levar a uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (Pigeolet et al, 1990). Podemos inferir que o protocolo de TIO induziu grande aumento na produção de EROs, que em concentrações excessivas podem ter oxidado as enzimas antioxidantes. Há a possibilidade do excesso de radicais livres reagirem com grupamentos tiólicos das estruturas terciárias destas enzimas. No caso da catalase, este efeito pode se dar ainda pela oxidação do ferro presente na molécula de heme do sítio catalítico desta enzima (Tauler et al, 1999; Ji, 2002). Foi mostrado em recente estudo (Netto et al, 2002) que enzimas com grandes quantidades de resíduos de cisteína, que possuem em sua molécula grupamentos tiólicos, podem atuar como moléculas antioxidantes, perdendo assim sua capacidade de catálise.

No que diz respeito a HSP72, sua superexpressão em todos os músculos traduz o estresse excessivo induzido pelo nosso protocolo de tentativa de *overreaching/overtraining*.

Como já descrito na Introdução deste trabalho, a expressão da HSP72 se dá em resposta a uma gama de estresses proteotóxicos que podem acometer as células. Alguns autores já classificam o estresse oxidativo como um dos possíveis desencadeadores da expressão desta proteína (Essig e Nosek, 1997). A carbonilação excessiva de proteínas também nos músculos EDL e ST sugerem que esta superexpressão de HSP72 possa ser resultado do excesso de ataque oxidativo induzido pelo TIO também nos músculos mais glicolíticos.

Estes dados podem ser interpretados como uma última estratégia intracelular para combater o alto nível de estresse imposto pelos exercícios, uma vez que a capacidade antioxidante se encontra diminuída, no intuito de manter as fibras musculares integras. Resultados semelhantes foram observados por Lehmann et al (1997), que observaram aumento excessivo na expressão da HSP72 em remadores que se encontravam, segundo os autores, num estado de *overreaching*. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa, obtidos durante a conclusão do meu mestrado, também mostraram aumento na concentração de HSP72 em músculo sóleo de ratos sedentários submetidos a exercício agudo, concomitante com uma diminuição na atividade das enzimas CAT e GR (Smolka et al., 2000). Esses dados reforçam a sugestão da participação das HSP72 como um mecanismo secundário de defesa antioxidante muscular numa situação de exercício físico extenuante em todos os tipos de fibra muscular.

### **3. IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DOS RESULTADOS OBTIDOS**

Baseados na definição de *overreaching*, que postula este estado a uma disfunção metabólica periférica, principalmente relacionado com os mecanismos de ressíntese de fosfatos ricos em energia, causando fadiga prematura (Kuipers, 1998), nos propusemos a estudar quais seriam as possíveis causas que levariam a tal disfunção.

Nossos dados nos permitem sugerir que numa situação de *overreaching* as células musculares se encontram sujeitas a uma condição de alto estresse oxidativo. Embora não tenhamos submetido os animais de nossos grupos experimentais a um teste de *performance*, percebia-se claramente durante as últimas sessões de treino a dificuldade que os mesmos enfrentavam para finalizá-las. A causa desta fadiga prematura, evidenciada pela literatura e visualizada em nossos animais nos parece perfeitamente justificável pelo aumento nos níveis de estresse oxidativo mostrado em nossos resultados. Em concordância com nossa interpretação, vários trabalhos vem demonstrando uma

relação do tipo causa e efeito entre estresse oxidativo e fadiga muscular (Brotto e Nosek, 1996; Essig e Nosek, 1997).

O efeito deletério do excesso de EROs capaz de alterar a *performance* e induzir fadiga prematura, poderia ser através da oxidação de proteínas envolvidas de alguma forma no processo de contração muscular. Estas proteínas poderiam ser enzimas metabólicas, que atuam na ressíntese de ATP. Neste sentido, alguns trabalhos demonstram a inativação de enzimas da cadeia respiratória (Zhang et ali, 1990, Molnar et ali.,2003), além dos nossos resultados, que mostraram diminuição na atividade da enzima do ciclo de Krebs citrato sintase, interferindo na capacidade de ressíntese oxidativa do ATP. Estes dados talvez possam explicar os resultados observados por Lehmann et ali (1993), que mostraram que sujeitos submetidos a um protocolo de *overtraining* tinham sua *performance* diminuída em um protocolo de esforço de longa duração, onde se observou maior produção de lactato quando comparados aos resultados obtidos quando os sujeitos não se encontravam no estado de *overreaching*.

Outro alvo das EROs são as proteínas do retículo sarcoplasmático, responsáveis pelo metabolismo do cálcio. Estudos demonstraram que existe realmente a necessidade de oxidação destas proteínas para que as mesmas possam aumentar sua função (Reid, 2001; Plant et ali, 2001), e que as adaptações ao treinamento fazem com que a concentração de EROs em sujeitos treinados tenha que ser maior para que se observe um mesmo efeito (Plant et ali, 2003). No entanto, uma quantidade excessiva de EROs pode desencadear efeito contrário ao desejado e diminuir os níveis de força desenvolvidos pelas fibras musculares (Reid, 2001; Plant et ali, 2003). O excesso de EROs, numa situação de estresse oxidativo, pode ainda oxidar proteínas contráteis (Haycock et ali, 1996) e até mesmo a enzima ATP-sintase (Zhang et ali, 1990), o que também induziria fadiga precoce.

Portanto, os dados da literatura em conjunto com os apresentados neste trabalho, nos permitem estabelecer um panorama da indução do *overreaching/overtraining* pelo estresse oxidativo. De fato, como proposto por Reid (2001), o rendimento máximo da fibras musculares depende de uma razão adequada entre oxidantes e antioxidantes intracelulares, suficiente para que as proteínas sensíveis ao estado redox sejam oxidadas e possam atuar em sua eficiência máxima e ao mesmo tempo que a célula possa evitar os efeitos deletérios decorrentes de um ataque oxidativo maior, ocasionado pela alta concentração de EROs, o que induziria queda na *performance*.

Corroborando com a hipótese acima proposta, nossos resultados demonstram as ações paradoxais das EROs. Observamos que até a quarta semana de treinamento as EROs produzidas induziram aumento na atividade das enzimas estudadas, enquanto que ao final da oitava semana, com a diminuição na produção das EROs em virtude da manutenção da carga de esforço alcançada na quarta semana notamos queda na atividade enzimática, provavelmente devido à falta do estímulo adaptativo sinalizado pela alteração redox.

Por outro lado, no protocolo de TIO, pudemos notar a ação deletéria ocasionada pelo aumento excessivo na concentração das EROs, principalmente no músculo SO, que de forma contrária ao observado durante o treinamento, levou a queda acentuada na atividade das enzimas, com oxidação exacerbada de constituintes celulares. Tais observações concordam com a proposta de uma razão ótima entre oxidantes e antioxidantes, que deve ser respeitada para que as células possam desempenhar suas funções de forma otimizada.

Ainda neste sentido, pensando na prorrogação crônica desta situação de estresse oxidativo, se nos basearmos na teoria proposta por Smith (2000), que propõe como causa da síndrome do *overtraining* uma inflamação sistêmica devido à produção exacerbada de moléculas de citocinas, podemos inferir que a exposição de longo prazo a quantidades excessivas de radicais livres devido ao excesso de cargas de treinamento, pode ser o desencadeador desta síndrome, uma vez que as citocinas são sintetizadas pelas células, inclusive as musculares, em resposta às lesões teciduais induzidas também pelo estresse oxidativo (Pyne, 1994; Smith, 2000).

Concluindo, a nossa estratégia metodológica de exercícios parece satisfatória para compreender como a musculatura reage a condições distintas de solicitação de esforço contínuo. Os biomarcadores de estresse oxidativo, em conjunto com as análises da concentração de HSP72 mostraram-se sensíveis para detectar alteração de sobrecarga e consequentemente para detectar adaptação positiva ao treinamento ou *overreaching*, quando aumentamos as sessões diárias de corrida, com a consequente diminuição no tempo de recuperação ao exercício (2x/dia, 3x/dia e 4x/dia). Portanto, podemos considerar que a metodologia empregada conseguiu prever o início do que poderia ser uma situação de *overtraining*, onde se prevalece, num primeiro momento, uma condição de alterações com características mais bioquímicas e metabólicas (*overreaching*). A concentração plasmática de uréia e a atividade plasmática das enzimas creatina quinase (CK) e glutamato-oxaloacetato transaminase (TGO), dosadas por outro aluno de nosso

laboratório nos mesmos animais utilizados neste trabalho, e apresentadas em sua tese de doutorado e aqui apresentadas no anexo I, nos ajudam a interpretar e justificar nossos resultados.

A concentração de uréia, catabólito final da oxidação de aminoácidos, não mostrou alteração durante as 11 semanas de esforço, indicando que nosso protocolo de TIO não induziu a instalação de um estado de degradação proteica, característico do *overtraining*, mas que ainda não se mostra presente no seu início (*overreaching*) (Petibois et ali, 2003).

Por outro lado, o aumento progressivo da atividade plasmática da CK e da TGO, enzimas amplamente utilizadas na literatura como marcadores de lesão muscular indica que o aumento dos níveis de estresse oxidativo após o protocolo de TIO fez com que os níveis de lesão muscular aumentassem de forma similar, justificando a idéia que o estresse oxidativo induzido numa situação de *overreaching* favorece o aparecimento de microlesões musculares, além da fadiga característica ocasionada por este estado.

Todos esses resultados reforçam a utilização desses biomarcadores em atletas.

Apresentaremos a seguir, na parte II da presente Tese os resultados de recente trabalho conduzido em nosso laboratório, que monitorou um grupo de jogadores de futebol da categoria junior durante toda uma temporada competitiva através basicamente dos mesmos marcadores mensurados nesta tese, só que sanguíneos. Através da aplicação da técnica Limiar de Estresse não observamos nenhuma alteração nos parâmetros de estresse oxidativo estudados durante toda a temporada, sendo que nenhum dos atletas apresentou nenhum sintoma relacionado ao estado de *overreaching* (Zoppi et ali, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE II (Resultados com atletas)\_\_\_\_\_

Nesta seção, apresentaremos o trabalho que conduzimos em paralelo aos experimentos com os grupos experimentais de modelo animal, estudando atletas, que resultou no aceite para publicação do manuscrito intitulado “**Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva**” na revista Paulista de Educação Física.

Nosso objetivo, neste estudo, foi aplicar a técnica de limiar de estresse através do monitoramento de biomarcadores de ataque oxidativo, lesão muscular e a atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase e catalase em jogadores de futebol durante toda a fase competitiva do campeonato paulista de futebol da categoria sub-20 (Junior).

Cabe ainda ressaltar que durante este trabalho, os atletas que apresentaram alterações drásticas nos biomarcadores, foram submetidos a trabalho individualizado de menor intensidade até retornarem aos valores médios apresentados pelo grupo.

## RESULTADOS:

### *Efeito de cinco meses de campeonato na atividade das enzimas antioxidantes:*

O perfil de atividade das enzimas antioxidantes GR e a CAT do hemolisado mostrou comportamento diferenciado entre elas em função da progressão no campeonato. Podemos observar pela Figura 16 uma queda significativa ( $P < 0.05$ ) na atividade da GR nas duas últimas análises. Nesse mesmo período, a atividade da CAT exibe aumento bastante significativo ( $P < 0.001$ ) em sua atividade (Figura 17).

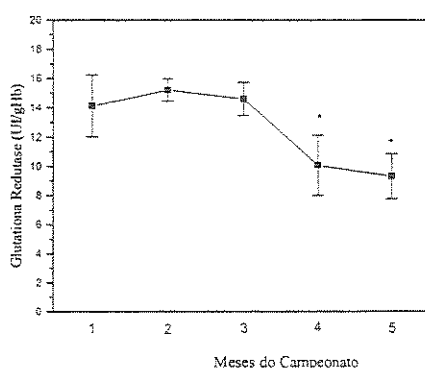


Figura 11: Perfil da atividade da enzima glutathione redutase ao longo de 5 meses de período competitivo. Resultados são média  $\pm$  DP ( $n = 21$ ) \* $P < 0.05$  em relação às análises 1, 2 e 3.

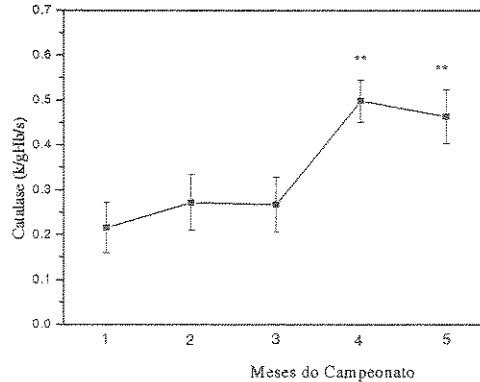


Figura 12: Perfil da atividade da enzima catalase ao longo de 5 meses de período competitivo. Resultados são média  $\pm$  DP ( $n=21$ ) \*\*  $P<0.001$  em relação às análises 1, 2 e 3.

*Efeito de cinco meses de campeonato em marcadores de estresse oxidativo e lesão muscular:*

A maioria das proteínas plasmáticas possui resíduos de cisteína (com grupamentos sulfidríla livres), que podem ser oxidados pela ação de radicais livres, desempenhando, portanto, um papel de proteção no plasma. Dessa forma, a quantificação da concentração plasmática dos grupamentos sulfidríla totais (GS) fornece uma idéia do nível de ataque oxidativo a proteínas plasmáticas. A Figura 18 mostra que não houve nenhuma alteração significativa nesse parâmetro em nenhuma das análises. A concentração plasmática de GS permaneceu em torno de  $500\mu\text{M}$ , com pequena variação ao longo dos 5 meses.

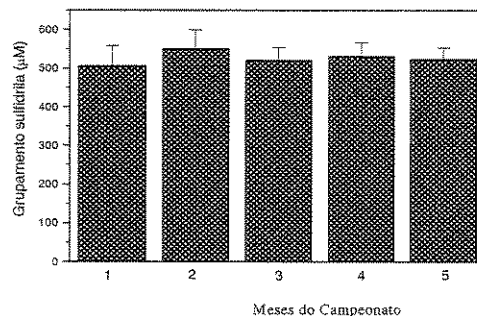


Figura 13: Perfil da concentração plasmática de grupamentos sulfidríla (GS) ao longo de 5 meses de período competitivo. Resultados são média  $\pm$  DP ( $n=21$ ).

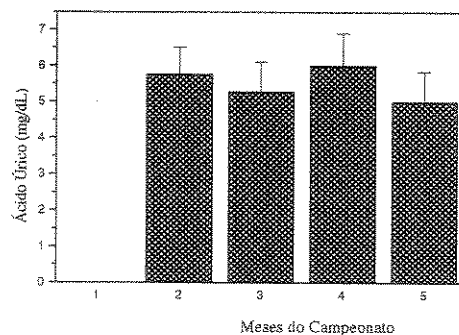


Figura 14: Perfil da concentração plasmática de ácido úrico ao longo de 5 meses de período competitivo. Resultados são média±DP (n= 21).

O ácido úrico, por sua vez, pode desempenhar tanto o papel fisiológico de antioxidante celular quanto sua concentração elevada pode sugerir uma maior atividade da enzima xantina oxidase, indicando um aumento na produção de radical ânion superóxido por essa via (Hellsten, 1994). Podemos observar pela figura 19 que a concentração plasmática de ácido úrico também não sofreu alterações significativas durante a temporada competitiva, variando em média entre 5,0 e 6,0 mg/mL, embora não tenhamos os dados referentes a primeira análise, devido a problemas no processamento das amostras. É importante salientar que os marcadores mostrados nas Figuras 18 e 19 permaneceram, inclusive, dentro dos valores de referência para sujeitos não atletas.

A atividade da enzima CK dosada no plasma, utilizada para quantificar os níveis de alteração muscular também não mostrou variação significativa durante a temporada (Figura 20), embora tenha apresentado grande variabilidade entre os sujeitos. Podemos observar também que os valores médios da concentração plasmática da CK encontrados nos jogadores de futebol sempre estiveram bem acima da média dos valores de referência para sujeitos não atletas.

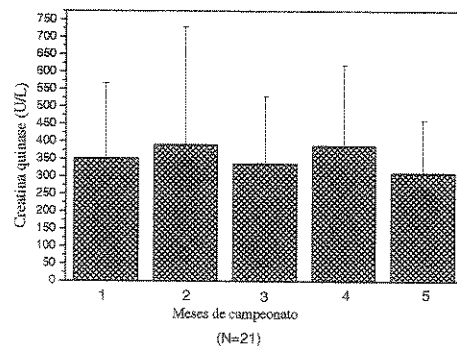


Figura 15: Perfil da atividade plasmática da enzima creatina quinase ao longo de 5 meses de período competitivo. Resultados são média  $\pm$  DP (n= 21).

## DISCUSSÃO:

### *Atividade das enzimas antioxidantes:*

Embora de formas diferenciadas, as enzimas estudadas neste trabalho CAT e GR atuam na detoxificação de EROs, mais especificamente no controle dos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular (Chance et al., 1979). Apesar do  $H_2O_2$  não ser uma espécie radicalar, nem ter alto potencial oxidante, o mesmo pode reagir com metais de transição, principalmente o ferro, ligado ou não a grupamentos heme localizados dentro das células, dando origem ao radical hidroxila (OH), um poderoso oxidante (Yu, 1994). Portanto, a manutenção de baixos níveis dessa substância é de fundamental importância para que nenhuma estrutura subcelular sofra ataque oxidativo intenso e mantenha suas devidas funções. O  $H_2O_2$  é desidratado enzimaticamente a  $H_2O$  e  $O_2$  pela enzima catalase (CAT). A outra enzima responsável pela detoxificação do  $H_2O_2$ , glutathiona peroxidase (GPX), tem menos especificidade para o substrato, reduzindo também hidroperóxidos a álcool. O  $k_m$  para  $H_2O_2$  da CAT e GPX são diferentes. Enquanto a GPX atinge sua  $V_{max}$  em baixas concentrações, a CAT só atinge sua velocidade máxima de catálise em altas concentrações de  $H_2O_2$  (Powers et al., 1999). Na reação catalisada pela GPX a glutathiona reduzida (GSH) funciona como doador de elétrons. A glutathiona oxidada (GSSG) formada nesta reação é reduzida a GSH, às custas de NADPH pela ação da enzima glutathiona redutase (GR). Embora não seja considerada uma das enzimas principais do sistema enzimático antioxidante, ela é fundamental para a atuação normalizada da GPX.

Neste estudo mostramos o comportamento da atividade das enzimas CAT e GR dosadas em eritrócitos ao longo da temporada competitiva de uma equipe de futebol. Embora a literatura seja carente com relação a estudos conduzidos em jogadores de futebol, alguns trabalhos relataram aumento na atividade das enzimas antioxidantes em

eritrócitos após treinamento aeróbio (Selamoglu et al., 2000) em corredores (Robertson et al., 1991) e ciclistas profissionais (Mena et al., 1991). Brites et al. (1999) mostraram que jogadores de futebol possuíam capacidade antioxidante plasmática total e atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase aumentada em relação a sujeitos sedentários. Nossos dados mostraram que a atividade das enzimas GR e CAT se altera à medida que a equipe atinge fases mais decisivas, o que teóricamente significa intensidades maiores de esforço para os atletas durante os jogos, uma vez que as equipes melhores qualificadas vão se sobrepondo e eliminando equipes menos qualificadas. Nas fases iniciais da competição, a atividade da enzima GR estava aparentemente em seu pico, enquanto a enzima CAT ainda não se encontrava em atividade máxima, atingindo seu pico, justamente, nas fases finais da competição, quando a GR já apresentava queda de cerca de 40% em sua atividade. Ou seja, as duas enzimas parecem funcionar de forma integrada, pois a medida que a atividade da GR diminui, a atividade da CAT aumenta. Os motivos pelos quais tais alterações ocorrem, principalmente nos eritrócitos, ainda não são totalmente conhecidos, e ainda merecem estudos mais detalhados.

Eritrócitos são células anucleadas e portanto não possuem o material genético necessário para que ocorra síntese proteica. Alguns autores sugerem que alterações a curto prazo na atividade destas enzimas induzidas por atividades agudas se dão por interações diretas com a estrutura proteica da enzima (Tauler et al., 1999). Recentemente, Kosenko e colaboradores (1997) propuseram que o  $H_2O_2$  possui efeito estimulatório em outra enzima antioxidante, a superóxido dismutase, enquanto o radical ânion superóxido parece ter efeito estimulante sobre a CAT. O mecanismo molecular deste efeito na atividade da CAT, embora não tenha sido estudado em detalhes, parece estar na redução do  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{2+}$  presente no grupamento heme de sua molécula (Hawkins et al., 1993), deixando a CAT mais ativa quando reduzida. Uma outra possibilidade para se explicar o fenômeno observado é o *Km* da CAT para os peróxidos, o que poderia justificar seu pico de atividade nas fases finais, mais intensas da competição, quando provavelmente a produção de EROs estava mais alta e a capacidade de detoxificação intracelular era menor, observada pela própria queda na atividade da GR.

A queda na atividade da GR na fase final da competição também pode ser atribuída a diminuição na concentração de NADPH. Estudos mostram que atividades de alta intensidade, que induzem aumento na lactacidemia, como é o caso dos esforços do futebol diminuem a concentração de NADPH (Tauler et al. 1999), um dos substratos da GR, sem o qual a reação catalisada por esta enzima não acontece.

### *Marcadores de estresse oxidativo e lesão muscular:*

Os marcadores de estresse oxidativo e lesão muscular aqui estudados não mostraram alterações significativas durante toda a temporada competitiva. Alguns estudos mostram que a concentração plasmática de urato é um bom indicativo da capacidade antioxidante do plasma, além de também atuar como indicativo de danos oxidativo sofridos em decorrência de ataques radiculares (Rosell et al., 1999). Mikami e colaboradores (2000) demonstraram, ainda, uma relação inversa entre a concentração plasmática de ácido úrico e níveis de peroxidação lipídica. Portanto, a ausência de alterações na concentração deste parâmetro observada neste estudo sugere baixos níveis de peroxidação lipídica neste grupo de atletas, embora não tenhamos dosado esse parâmetro nesse trabalho. Concentrações plasmáticas de grupamentos sulfidril totais inalteradas reforçam a hipótese de pequeno dano oxidativo nos atletas analisados. Olinescu e colaboradores (1995) detectaram aumento na oxidação de grupamentos SH livres no plasma em decorrência do estresse oxidativo induzido pelo treinamento físico. De forma contrária aos nossos resultados, Brites e colaboradores (1999), também estudando jogadores de futebol, mostraram que embora os atletas possuísem capacidade antioxidante mais alta quando comparados a sujeitos sedentários, exibiam aumento de alguns marcadores de estresse oxidativo. De forma semelhante, vários outros estudos mostraram aumento de ataque radicalar à diversas estruturas intracelulares, tais como proteínas, lipídeos de membrana e DNA induzidas pelo treinamento físico (Radák et al., 1999). Embora não tenhamos analisado os mesmos marcadores, a diferença em relação aos demais trabalhos pode estar que nesse trabalho fizemos um estudo longitudinal, ao longo de toda a temporada competitiva, utilizando jogadores com histórico de treinamento relativamente grande e submetidos a uma preparação anterior de 90 dias para esta competição.

As concentrações plasmáticas da CK estiveram sempre acima dos valores de referência para sujeitos sedentários, evidenciando um maior nível de alteração muscular, ou pelo menos uma maior permeabilidade da membrana sarcolemal neste grupo de atletas. Nossa interpretação é que deve haver uma outra faixa de referência para os valores da CK nesta população, uma vez que os atletas participantes do grupo experimental não apresentaram nenhum tipo de lesão muscular que os impedisse de participar dos jogos por motivo de tratamento. Aliás, a frequência dos atletas ao departamento médico foi praticamente inexistente durante esse período. Corroborando nossa hipótese, inúmeros estudos mostram aumento deste parâmetro em resposta ao

treinamento físico, principalmente em atividades que exigem contrações excêntricas (Newhan et al., 1986; Nosaka e Clarkson, 1995, Lee et al., 2002).

Concluindo, este estudo mostrou que a atividade das enzimas antioxidantes analisadas no grupo de jogadores de futebol foi eficiente em combater um possível efeito deletério induzido pelo aumento de EROs, mantendo níveis baixos de estresse oxidativo mesmo com o aumento na intensidade de esforço, uma vez que a equipe progrediu para as fases finais da competição. Tal eficiência se deve, provavelmente, a um programa de preparação adequado, que levou os atletas a uma boa resposta adaptativa. Por outro lado, embora a capacidade antioxidante tenha se mostrado eficiente, os níveis de alteração muscular de todo o grupo de atletas se mostraram bastante aumentados em relação aos valores de referência para sujeitos não atletas, sugerindo que jogadores de futebol possuem maior atividade plasmática da CK pelo próprio estresse induzido pelo treinamento a que são submetidos diariamente e que tais alterações não são necessariamente de origem oxidativa.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

---

Os dois conjuntos de resultados apresentados nesta tese, embora conduzidos em diferentes grupos experimentais e ainda utilizando amostras diferenciadas parecem ser complementares e dão suporte à proposta da técnica de limiar de estresse.

Esta conclusão se baseia principalmente nos dados obtidos com o grupo de atletas, onde monitoramos o treinamento pelos marcadores de estresse oxidativo e não identificamos nenhum caso de “overtraining” durante toda a temporada competitiva.

Este estudo nos permitiu mostrar que em condições de adaptação ao treinamento, os níveis de estresse oxidativo, bem como de lesão muscular permanecem inalterados, dentro de valores normais.

Por outro lado, os dados obtidos nos animais submetidos ao protocolo de TIO, onde supostamente os animais estariam iniciando o processo de “overtraining” mostram que nesta situação, as células musculares estão submetidas a uma situação de estresse oxidativo, expressando grandes quantidades da proteína de estresse HSP72.

Portanto, estes dados em conjunto nos permitem concluir que :

- O “overreaching” está associado a uma situação de estresse oxidativo e alta expressão de HSP72.
- Este tipo de “overreaching” induz maiores danos às fibras tipo I.
- Os marcadores por nós utilizados são sensíveis e se alteram em resposta ao “overreaching”.

## APÊNDICE I ---

Neste anexo apresentamos as tabelas com os dados de uréia e creatina quinase plasmáticas dosados que constam na tese de doutorado do prof. **Joaquim M.F. Antunes Neto**. Trabalho este que foi executado de forma similar utilizando os mesmos protocolos e inclusive os mesmos animais desta tese e portanto estes dados refletem as mesmas respostas e portanto são dados complementares uns aos outros.

**Tabela III.** Concentração de uréia plasmática ao longo das onze semanas de exercício físico.

| Análise | Significância estatística |    |
|---------|---------------------------|----|
|         | Média<br>±DP              |    |
| CO      | 42.1 ± 11.5               | NS |
| S4      | 63.7 ± 10.9               | NS |
| S8      | 63 ± 9.07                 | NS |
| 2x/dia  | 60.1 ± 10                 | NS |
| 3x/dia  | 57.5 ± 11.3               | NS |
| 4x/dia  | 58.5 ± 9.8                | NS |

**Tabela IV.** Atividade plasmática da enzima creatina quinase (CK) e da glutamato-oxaloacetato transaminase (TGO).

| Análise | Médias e Significância Estatística |                 |                                                                                                                                      |                                                                                   |
|---------|------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
|         | CK<br>(U/L)                        | TGO<br>(U/L)    | CK                                                                                                                                   | TGO                                                                               |
| CO      | 62.2 ±<br>21.4                     | 51.2 ± 6.26     | NS                                                                                                                                   | NS                                                                                |
| S4      | 171.6 ±<br>88.4                    | 63.7 ±<br>10.96 | NS                                                                                                                                   | NS                                                                                |
| S8      | 51 ± 3.96                          | 63.8 ± 6.3      | P<0.05 S4 x S8                                                                                                                       | NS                                                                                |
| 2x/dia  | 83.5 ±<br>22.4                     | 54.6 ± 6.43     | NS                                                                                                                                   | NS                                                                                |
| 3x/dia  | 155.5 ±<br>70.6                    | 61.5 ± 8.76     | NS                                                                                                                                   | NS                                                                                |
| 4x/dia  | 302.2 ±<br>141.3                   | 74.1 ± 7.77     | P<0.001 CO x<br>4x/dia<br>P<0.05 S4 x<br>4x/dia<br>P<0.001 S8 x<br>4x/dia<br>P<0.001 2x/dia x<br>4x/dia<br>P<0.01 3x/dia x<br>4x/dia | P<0.001 CO x<br>4x/dia<br>P<0.001 2x/dia x<br>4x/dia<br>P<0.05 3x/dia x<br>4x/dia |

## APÊNDICE II

---

### **PUBLICAÇÕES:**

- 1.) Smolka, M.B., Zoppi, C.C., Alves, A.A., Silveira, L.R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., Novello, J.C., Macedo, D.V. (2000) HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.* 279(5): R1539-R1545.
- 2.) Zoppi, C.C., Antunes-Neto, J., Catanho, F.O., Goulart, L.F., Motta e Moura, N. e Macedo, D.V. (2003) Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Revista Paulista de Educação Física* 15:(2) (Aceito para publicação).
- 3.) Zoppi, C.C., Macedo D.V. Training and overtraining effects upon oxidative stress markers and HSP72 expression (Em preparo).

## REFERÊNCIAS

---

Abernethy, P.J., Thayer, R. And Taylor, A.W. (1990) Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise. A review. *Sports Med.* 10(6): 365-389.

Aebi, H. (1984) Catalase. In: *Methods in Enzymology*, edited by L. Packer Orlando FL :Academic, 105: 121-126.

Alessio, H.M. (1993). Exercise-induce oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**: 218-224.

Alessio, H.M., Goldfarb, A.H. and Cutler, R.G. (1988) MDA content increases in fast and slow twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am. J. Physiol.* **255**(24):C874-C877.

Andersen, H.R., Nielsen, J.B. Nielsen, F. and Grandjean, P. (1997) Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 43(4): 562-568.

Anzai, K., Ogawa, K., Ozawa, T. And Yamamoto, H. (2000) Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antiox. Redox Signal* 2: 35-40.

Astr nd, P.O. (1992) Why exercise? *Med. Sci. Sports Med.* 24(2): 153-162.

Astrand, P.O. & Rodahl, K. (1986) Textbook of work physiology. New York: McGraw Hill.

Baldwin, K.M., Winder, W.W., Terjung, R.L., Holloszy, J.O. (1973) Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle: adaptation to exercise. *Am. J. Physiol.* 225(4): 962-966.

Bangsbo, J. (1994) The physiology of soccer. *Acta Physiol. Scand.* Suppl. 619: 1-155.

Baumann, H., Jaggi, M., Howald, H. and Schaub, M.C. (1987) Exercise training induces transitions of myosin isoforms subunits within histochemically typed human muscle fibres. *Pflügers Arch.* 409: 349-360.

Beckman, J.S., Beckman, T. e Freeman, B. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1620-1624.

Bergström, J. and Hultman, E. (1966) The effect of exercise on muscle glycogen and electrolytes in normals. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18: 16-20.

Bernus G., Gonzalez de Suso, J.M., Alonso, J., Martin, P.A., Prat, J.A., Arus, C. (1993) <sup>31</sup>P-MRS of quadriceps reveals quantitative differences between sprinters and long-distance runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25(4): 479-484.

Beutler, E. (1975) *Red Cell Metabolism* In: A manual of biochemical methods, 2<sup>a</sup> ed., Grune & Stratton publishers, London, 1975.

Bienz, M., Pelham, H.R.B. (1987) Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv. Genetics* 24: 31-72.

Bompa, T.O. (1990) Theory and methodology of training: the key to athletic performance. Dubuque: Kendall/Hunt.

Bosquet, L., Leger, L., Legros, P. (2001) Blood lactate response to overtraining in male endurance athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84(1-2):107-114.

Brites, F.D., Evelson, P.A., Christiansen, M.G., Nicol, M.F. Basílico, M.J. Wikinski, R.W. and Liesuy, S.F. (1999) Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin. Sci.* 96: 381-385.

Brooks, G.A. & Mercier, J. (1994) Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J. Appl. Physiol.* 76(6): 2253-2261.

Brooks, G.A. (1998) Mammalian fuel utilization during sustained exercise. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120: 89-107.

Brotto, M.A.P. and Nosek, T.M. (1996) Hydrogen peroxide disrupts  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibres. *J. Appl. Physiol.* 81(2): 731-737.

Bruin, G., Kuipers, H., Keizer, H.A. and Vandervusse, G.J. (1994) Adaptation and overtraining in horses subjected to increased training loads. *J. Appl. Physiol.* 76: 1908-1913.

Campisi, J., Leem, T.H., Greenwood, B.N., Hansen, M.K., Moraska, A., Higgins, K., Smith, T.P., Fleshner, M. (2003) Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues. *Am. J. Physiol.* 284(2):R520-530. Epub 2002 Oct 24.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59(3):527-605.

Chillibeck, P.D., Bell, G.J., Farrar, R.P., Martin, T.P. (1998) Higher mitochondrial fatty acid oxidation following intermittent versus continuous endurance exercise training. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76(9):891-894.

Clive, D.R. and Greene, J.J. (1996) Cooperation of protein disulfide isomerase and redox environment in the regulation of NF-kappaB and AP1 binding to DNA. *Cell. Biochem. Funct.* 14(1):49-55.

Coggan, A.R., Kohrt, W.M., Spina, R.J., Bier, D.M. and Holloszy, J.O. (1990) Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 68(3):990-996.

Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueri, T. and Wilson, M.T. (2002) Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 280-285.

Costill, D.L., Flynn, M.G., Kirwan, J.P., Houmard, J.A., Mitchell, J.B., Thomas, R., Park, S.H. (1988) Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20(3):249-254.

Coyle, E.F. (2000) Physical activity as a metabolic stressor. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(suppl.): 512S-520S.

Craig, E.A.(1993) Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260: 1902-1904.

Crowder, M.S. and Cooke, R. (1984) The effect of myosin sulphydryl modification on the mechanics of fibre contraction. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 5(2):131-46.

Daiho, T. and Kanazawa, T. (1994) Reduction of disulfide bonds in sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by dithiothreitol causes inhibition of phosphoenzyme isomerization in catalytic cycle. This reduction requires binding of both purine nucleotide and Ca<sup>2+</sup> to enzyme. *J. Biol. Chem.* 1994 Apr 15;269(15):11060-11064.

Davies, K.J., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., Packer, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.

Demirel, H.A., Powers, S.K., Naito, H., Tumer, N. (1999) The effects of exercise duration on adrenal HSP72/73 induction in rats. *Acta Physiol. Scand.* 167(3):227-31.

Didomenico, B.J., Bugaisky, G.E, Lindquist, S. (1982) The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* 31: 593-603.

Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E.E. and Trappel, A.L. (1978) Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* 45: 927-932.

Dudley, G.A., Abraham, W.M., Terjung, R.L. (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53(4): 844-850.

Dulhunty, A., Haarmann, C., Green, D., Hart, J. (2000) How many cysteine residues regulate ryanodine receptor channel activity? *Antioxid. Redox Signal.* 2(1):27-34.

Essig, D.A. and Nosek, T.M. (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can. J. Appl. Physiol.* 22(5):409-428.

Faure, P. and Lafond, J.L. Measurement of plasma sulphydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. (1995) In: *Analysis of free radicals in biological systems*. Favier et alii. Eds. Verlag, Boston, 237-248.

Febbraio, M.A., Koukoulas, I. (2000) HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl. Physiol.* 89(3):1055-1060.

Feige, U., Polla, B.S. (1994) Heat shock proteins: the hsp70 family. *Experimentia* 50: 979-986.

Fitts, R.H., Booth, F.W., Winder, W.W., Holloszy, J.O. (1975) Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am. J. Physiol.* 228(4): 1029-1033.

Foster, C. and Lehmann, M. (1997) Overtraining syndrome. In: *Running injuries*. G.N.Guten (Ed.). Philadelphia: W.B. Saunders company. pp. 173-188.

Fry, A.C., Kraemer, W.J. (1997) Resistance exercise overtraining and overreaching. Neuroendocrine responses. *Sports Med.* 23(2):106-129.

Fry, R.W., Morton, A.R. and Keast, D. (1992) Periodization of training stress- a review. *Can. J. Sports Sci.* 17(3): 234-240.

Fry, R.W., Morton, A.R., Keast, D. (1991) Overtraining in athletes: an update. *Sports Med.* 12: 32-65.

Gastmann, U.A., Lehmann, M.J. (1998) Overtraining and the BCAA hypothesis. *Med .Sci .Sports Exerc.* 30(7): 1173-1178.

Gething, M.J., Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.

Gollnick, P.D. (1986) Metabolic regulation in skeletal muscle: influence of endurance training as exerted by mitochondrial protein concentration. *Acta. Physiol. Scand.* Suppl. 556:53-66.

Gollnick, P.D., Bertocci, L.A., Kelso, T.B., Witt, E.H., Hodgson, D.R. (1990) The effect of high-intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 415(4):407-413.

Gornall, A.G., Bardawill, G.J. and Daid, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-757.

Hall, T.J. (1994) Role of HSP70 in cytokine production. *Experimentia* 50: 1048-1053.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.(1999) Free radicals in biology and medicine. 2<sup>a</sup> ed. Oxford: Clarendon Press.

Hamilton, M.T., Booth, F.W. (2000) Skeletal muscle adaptation to exercise: a century of progress. *J. Appl. Physiol.* 88 (1): 327-331.

Hamilton, S.L. and Reid, M.B. (2000) RyR1 modulation by oxidation and calmodulin. *Antioxid. Redox Signal.* 2(1): 41-45.

Hawley J.A. (2002) Effect of increased fat availability on metabolism and exercise capacity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34(9): 1485-1491.

Haycock, J.W., Jones, P., Harris, J.B., Mantle, D. (1996) Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage: a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. *Acta Neuropathol. (Berl).* 92(4):331-40.

Hedelin, R., Kentta, G., Wiklund, U., Bjerle, P., Henriksson-Larsen, K. (2000) Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(8):1480-1484.

Hellsten, Y. (1994) Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 621: 1-73.

Henriksson, J. and Reitman, J.S. (1977) Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity. *Acta Physiol. Scand.* 99(1): 91- 97.

Hernando, R., Manso, R. (1997) Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* 15;243(1-2):460-467.

Hess, M.L. e Manson, N.H. (1984) Molecular oxygen: Friend and foe. The role of oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16: 969-985 .

Hickson, R.C., Rennie, M.J., Conlee, R.K., Winder, W.W. and Holloszy, J.O. (1977) Effects of increased plasma fatty acids on glycogen utilization and endurance. *J. Appl. Physiol.* 43(5):829-833.

Hill, A.V. (1922) Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen. *Q. J. Med.* 16: 135-171.

Hill, A.V., Long, N.H. and Lupton, H. (1924) Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen: Parts VII-VIII. *Proc. Roy. Soc. B* 97: 155-176.

Holloszy, J.O. (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242(9):2278-82.

Holloszy, J.O. (1973) Biochemical adaptations to exercise: aerobic metabolism. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 1: 45-71.

Holloszy, J.O. and Coyle, E.F. (1984) Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* 56(4): 831-838.

Holloszy, J.O., Kohrt, W.M and Hansen, P.A. (1998) The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Front. Biosci.* 15;3: D1011-D1027.

Hooper, S.L., Mackinnon, L.T., Howard, A., Gordon, R.D., Bachmann, A.W. (1995) Markers for monitoring overtraining and recovery. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27(1):106-112.

Jackson M.J. (1999) Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proc. Nutr. Soc.* 58(3): 673-676.

Jackson, M.J. (1998) Free radical mechanisms in exercise-induced skeletal muscle fiber injury. In: *Oxidative stress in skeletal muscle*, A. Reznick (Ed.). Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag. pp. 75-86.

Jackson, M.J., Mc Ardle, A., McArdle, F. (1998) Antioxidant micronutrients and gene expression. *Proc. Nutr. Soc.* 57: 301-305.

Jenkins, R.R. (1988) Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 5(3): 156-70.

Jenkins, R.R. and Goldfarb, A. (1993) Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 210-212.

Ji, L.L. (1995) Exercise and oxidative stress: role of cellular antioxidant systems In: *Exercise and Sports Science reviews* 23 J. Holloszy (Ed.) Baltimore: Williams & Willkins pp. 135-136.

Ji, L.L. (1999) Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222(3): 283-92.

Ji, L.L. (2002) Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann. N Y Acad. Sci.* 959:82-92.

Ji, L.L., Dillon, D. and Wu, E. (1990) Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 258: R918-R923.

Ji, L.L., Dillon, D. and Wu, E. (1990) Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 258: R918-R923.

Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W. (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 73(5):1854-1859.

Ji, L.L., Stratman, F. And Lardy, H. (1988) Antioxidant enzyme system in rat liver and skeletal muscle: influence of selenium deficiency acute exercise and chronic training. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 150-160.

Jong-Yeon, K., Hickner, R.C., Dohm, G.L., Houmard, J.A. (2002) Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle. *Metabolism* 51(4):460-4.

Jurimae, J., Abernethy, P.J., Blake, K., McEniery, M.T. (1996) Changes in the myosin heavy chain isoform profile of the triceps brachii muscle following 12 weeks of resistance training. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 74(3): 287-292.

Kaliman, P., Canicio, J., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A. (1999) Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-kappaB and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274(25):17437-17444.

Kanter, M.M., Lesmes, G.R., Kaminsky, L.A., La Ham-Saeger, J., Nequin, N.D. (1988) Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 57(1):60-63.

Keast, D. (1996) Immune responses to overtraining and fatigue. In: *Exercise and Immune Function*. L. Hoffman-Goetz (ed.). Boca Rotan, FL: CRC Press, pp. 121-141.

Kemi, O.J., Loennechen, J.P., Wisloff, U. and Ellingsen, O. (2002) Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 93: 1301-1309.

Kosenko, E.A. Kaminsky, Y.G. Stavrovskaya, I.G. Sirota, T.V. Kondrashova, M.N. (1997) The stimulatory effect of negative air ions and hydrogen peroxide on the activity of superoxide dismutase. *FEBS Lett.* 410: 309-312.

Kraemer, W.J., Nindl, B.C. (1998) Factors involved with overtraining for strength and power. In: *Overtraining in Sport* (R.B. Kreider, A.C. Fry, M.L. O'Toole. Editors). Human Kinetics, Champaign, IL.

Kregel, K.C. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92(5):2177-2186.

Kreider, R.B. (1998) Central fatigue hypothesis and overtraining. In: *Overtraining in Sport* (R.B. Kreider, A.C. Fry, M.L. O'Toole. Editors). Champaign, IL, Human Kinetics, pp. 309-334.

Krogh, A. (1919) Studies on the capillariomotor mechanism. I. The reaction to stimuli and the innervation of the blood vessels in the tongue of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 53: 399-419.

Kuipers, H. (1998) Training and overtraining: an introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30(7):1137-1139.

Lawler, J.M. and Powers, S.K. (1998) Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Can. J. Appl. Physiol.* 23(1): 23-55.

Lee, J., Goldfarb, A.H., Rescino, M.H., Hedge, S., Patrick, S. and Apperson, K. (2002) Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34(3):443-8.

Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL. (1994) Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am. J. Physiol.* 267(2 Pt 2): R439-445.

Leeuwenburgh, C., Hollander, J., Fiebig, R., Leichtweis, M., Griffith, M., Ji, L.L. (1997) Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* 272: R363-R369.

LeGendre, N. and Matsudaira, P. (1988) Direct protein microsequencing from Immobilon-P Transfer Membrane. *Biotechniques.* 6(2): 154-159.

Lehmann, M., Foster, C. and Keul, J. (1993a) Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 854-862.

Lehmann, M., Foster, C., Dickhuth, H.H., Gastmann, U. (1998 b) Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30(7): 1140-1145.

Lehmann, M., Foster, C., Netzer, N., Lormes, W., Steinacker, J.M., Liu, Y., Opitz-Gress, A. and Gastmann, U. (1998 a) Physiological responses to short and long term overtraining in endurance athletes. In: *Overtraining in Sport* (R.B. Kreider, A.C. Fry, M.L. O'Toole. Editors). Human Kinetics, Champaign, IL.

Lehmann, M., Knizia, K., Gastmann, U., Petersen, K.G., Khalaf, A.N., Bauer, S. (1993b) Influence of a 6-week, 6 day per week, training on pituitary function in recreational athletes. *Br. J. Sports Med.* 27: 186-192.

Lehmann, M.J., Lormes, W., Opitz-Gress, A., Steinacker, J.M., Netzer, N., Foster, C., Gastmann, U. (1997) Training and overtraining: an overview and experimental results in endurance sports. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 37(1):7-17.

Liu, D.F., Wang, D., Stracher, A. (1990) The accessibility of the thiol groups on G- and F-actin of rabbit muscle. *Biochem. J.* 1; 266(2):453-459.

Locke, M., Noble, E.G., Atkinson, B.G. (1990) Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am. J. Physiol.* 258: C723-C729.

Maltin, C.A., Delday, M.I., Baillie, A.G.S., Grubb, D.A. and Garlick, P.J. (1989) Fiber-type composition of nine rat muscles I. Changes during the first year of life. *Am. J. Physiol.* 257:E823-E827.

Margaritis, I., Tessier, F., Richard, M.J., Marconnet, P. (1997) No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int. J. Sports Med.* 18(3):186-190.

Marin, E., Kretzschmar, M., Arokoski, J., Hanninen, O., Klinger, W. (1993) Enzymes of glutathione synthesis in dog skeletal muscles and their response to training. *Acta Physiol. Scand.* 147(4): 369-373.

Martin, M.E., Chinenov, Y., Yu, M., Schmidt, T.K., Yang, X.Y. (1996) Redox regulation of GA-binding protein- $\alpha$  DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 271(41):25617-25623.

Martin, W.H. 3rd, Dalsky, G.P., Hurley, B.F., Matthews, D.E., Bier, D.M., Hagberg, J.M., Rogers, M.A., King, D.S., Holloszy, J.O. (1993) Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. *Am. J. Physiol.* 265(5 Pt 1): E708-E714.

Meerson, F.Z. (1984) Adaptation, stress and prophylaxis. Berlin. Springer-Verlag.

Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-760.

Mena, P., Maynar, M., Gutierrez, J.M., Maynar, J., Timon, J. and Campillo, J.E. (1991) Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int. J. Sports Med.*;12(6):563-6.

Mikami, T., Yoshino, Y., Ito, A. (2000) Does a relationship exist between the urate pool in the body and lipid peroxidation during exercise? *Free Radic. Res.* 32(1):31-9.

Molnar, A.M., Alves, A.A., Pereira-da-Silva, L., Macedo, D.V., Dabbeni-Sala, F. Mitochondrial complexes activities in different muscles of rats: evaluation by bn-page

colorimetric staining and effects of physical exercise *Braz. J. Med. Res.* (aceito para publicação).

Morgan, W.P., Brown, D.R., Raglin, J.S., O'Connor, P.J., Ellickson, K.A. (1987) Psychological monitoring of overtraining and staleness. *Br. J. Sports Med.* 21(3): 107-114.

Nemirovskaya, T.L., Shenkman, B.S., Nekrasov, A.N., Kuznetsov, A.V. and Saks, V.A. (1993) Effects of physical training on the structure and metabolism of skeletal muscles in athletes. *Biokhimiya* 58(3): 471-479.

Netto, L.E., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (2002) Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol.* 348:260-270.

Neupert, W., Hartl, F.U., Craig, E.A. (1990) How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell* 63: 447-450.

Newhan, D.J., Jones, D.A., Edwards, R.H.T. (1986) Plasma creatine kinase changes after concentric and eccentric muscle contractions. *Muscle & Nerve.* 9: 59-63.

Newsholme, E.A., Parry-Billings, M., McAndrew, N. and Budgett, R. (1991) A biochemical mechanism to explain some characteristics of overtraining. In: *Advances in nutrition and sports*, F. Brouns (editor). Basel: karger. pp. 79-83.

Noakes, T.D. (2000) Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 10(3):123-145.

Nosaka, K. and Clarkson, P.M. (1995) Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 1263-1269.

Nutter, D., Gilbert, C., Heymsfield, S., Perkins, J. and Schlant, R. (1975) Cardiac hypertrophy in the endurance athlete. *Physiologist.* 18(3): 336.

O'Toole, M.L. (1998) Overreaching and overtraining in endurance athletes In: *Overtraining in Sport* (Kreider, R.B., Fry, A.C. e O'Toole, M.L. editors) pp. 3-16. Champaign: Human Kinetics.

Oberly, L., St. Clair, D., Autor, A., Oberly, T. (1987) Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-radiation. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 69-80.

Olinescu, R., Talaban, D., Nita, S. and Mihaescu, G. (1995) Comparative study of the presence of oxidative stress in sportsmen in competition and aged people, as well as the preventive effect of selenium administration. *Rom. J. Intern. Med.*;33(1-2):47-54.

Oscai, L.B. and Holloszy, J.O. (1971) Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise. *J. Biol. Chem.* 25; 246(22): 6968-6972.

Packer, L. (1997) Oxidants, antioxidants, nutrients and the athlete. *J. Sports Sci.* 15: 353-363.

Pernow, B. and Saltin, B. (1971) *Advances in Experimental Medicine and Biology: muscle metabolism during exercise.* New York: Plenum Vol. 11.

Petibois, C., Cazorla, G., Poortmans, J.R., Deleris, G. (2003) Biochemical aspects of overtraining in endurance sports : the metabolism alteration process syndrome. *Sports Med.* 33(2):83-94.

Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., Remacle, J. (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 15;51(3):283-297.

Plant, D.R., Gregorevic, P., Warmington, S.A., Williams, D.A., Lynch, G.S. (2003) Endurance training adaptations modulate the redox-force relationship of rat isolated slow-twitch skeletal muscles. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30(1-2):77-81.

Plant, D.R., Gregorevic, P., Williams, D.A., Lynch, G.S. (2001) Redox modulation of maximum force production of fast-and slow-twitch skeletal muscles of rats and mice. *J. Appl. Physiol.* 90(3):832-838.

Ploutz, L.L., Tesch, P.A., Biro, R.L., Dudley, G.A. (1994) Effect of resistance training on muscle use during exercise. *J. Appl. Physiol.* 76(4):1675-1681.

Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., Dudley, G. (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266(2 Pt 2):R375-380.

Powers, S.K., Ji, L.L., Leeuwenburgh, C. (1999) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review *Med. Sci. Sports Exerc.* 31(7): 987-997.

Powers, S.K., Locke, M., Demirel, H.A. (2001) Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33(3):386-392.

Pyne, D.B. (1994) Exercise-induced muscle damage and inflammation: A review. *Australian J. Sci. Med. Sports* R6(3/4): 49-58.

Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvari, M., Nyakas, C., Goto, S. (1999) The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic. Biol. Med.* 27(1-2):69-74.

Radák, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Taylor, A. W., Ohno, H., Nakamoto, H., Goto, S. (2000) Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 383(1): 114-118.

Rehberg, P.B. (1951) August Krogh. *Yale J. Biol. Med.* 24: 83-102.

Reid, M.B. (1996) Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol. Sci.* 11: 114-119.

Reid, M.B. (2001) Redox modulation of skeletal muscle contraction: What we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90: 724-731.

Rietveld, W.J. (1996) General introduction to chronobiology. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29(1): 63-70.

Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Exper. Bas.* 18: 571-573.

Robertson, J.D., Maughan, R.J., Duthie, G.G. and Morrice, P.C. (1991) Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin. Sci.* 80(6):611-8.

Rodgers, C.D. (1998) Fuel metabolism during exercise: the role of the glucose-fatty acid cycle in mediating carbohydrate and fat metabolism. *Can. J. Appl. Physiol.* 23(6): 528-33.

Roedde, S., MacDougall, J.D., Sutton, J.R., Green, H.J. (1986) Supercompensation of muscle glycogen in trained and untrained subjects. *Can. J. Appl. Sport Sci.* 11(1): 42-6.

Rosell, M., Regnstrom, J., Kallner, A., Hellenius, M.L. (1999) Serum urate determines antioxidant capacity in middle-aged men - a controlled, randomized diet and exercise intervention study. *J Intern. Med.* 246 (2):219-26.

Rowbottom, D.G., Keast, D. and Morton, A.R. (1998) Monitoring and preventing of overreaching and overtraining in endurance athletes. In: *Overtraining in Sport* (R.B. Kreider, A.C. Fry, M.L. O'Toole. Editors). Human Kinetics, Champaign, IL

Rowbottom, D.G., Keast, D., Goodman, C., Morton, A.R. (1995) The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. *Eur. J. Appl. Physiol.* 70(6): 502-509.

Roy, R.R., Hutchison, D.L., Pierotti, D.J., Hodgson, J.A., Edgerton, V.R. (1991) EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. *J. Appl. Physiol.* 70(6):2522-2529.

Ryter, S.W., Pacifici, R.E. and Davies, K.J.A. Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress. In: *Biological Oxidation Systems*, pp. 929-952. New York: Academic Press, 1990.

Sahlin, K.S., Broberg, S. and Ren, J.M. (1989) Formation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during incremental dynamic exercise. *Acta Physiol. Scand.* 136: 193-198.

Salo, D.C., Donovan, C.M., Davies, K.J. (1991) HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 11(3):239-246.

Schlesinger, M.J. (1986) Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell Biol.* 103(2): 321-325.

Selamoglu, S., Turgay, F., Kayatekin, B.M., Gonenc, S. and Yslengen, C. (2000) Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol. Hung.* 87(3):267-73.

Sen CK. (2001) Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33(3): 368-370.

Sen, C.K. (1998) Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1747-1758.

Sigvardsson, K., Svanfeldt, E. and Kilbom, A. (1977) Role of the adrenergic nervous system development of training-induced bradycardia. *Acta Physiol. Scand.* 101: 481-488.

Sjödin, B., Wesling, H., Apple, S. (1990) Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 10: 236-254.

Smith, I.K., Vierheller, T.L. and Thorne, C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.

Smith, L.L. (2000) Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(2):317-331.

Smolka, M.B., Zoppi, C.C., Alves, A.A., Silveira, L.R., Marangoni, S., Pereira-Da-Silva, L., Novello, J.C., Macedo, D.V. (2000) HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.* 279(5): R1539-R1545.

Snyder, A.C. (1998) Overtraining and glycogen depletion hypothesis. *Med. Sci Sports Exerc.* 30(7):1146-1150.

Srere PA. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13: 3-11.

Staron, R.S. and Johnson, P. (1993) Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B (3): 463-475.

Staron, R.S., Karapondo, D.L., Kraemer, W.J., Fry, A.C., Gordon, S.E., Falkel, J.E., Hagerman, F.C., Hikida, R.S. (1994) Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J. Appl. Physiol.* 76(3):1247-1255.

Storti, R.V., Scott, M.P., Rich, A.(1980) Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell* 22(03): 825-835.

Storz, G. & Polla, B.S. (1996) Transcriptional regulators of oxidative stress-inducible genes in prokaryotes and Eukaryotes. In: *Stress-Inducible cellular responses*, pp. 239-254. (U. Fiege, R.I. Morimoto, I. Yahara and B.S. Polla, editors). Basel: Birkhauser Verlag.

Stuart, R.A., Cyr, D.M., Neupert, W. (1994) HSP70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experimentia* 50: 1002-1011.

Tauler, P., Gimeno, I., Aguiló, A., Guix, M.P. and Pons, A. (1999) Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflügers Arch.* 438: 782-787.

Termin, A., Staron, R.S. and Pette, D. (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92: 453-457.

Tiidus, P.M. (1998) Radical species in inflammation and overtraining. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76(5):533-538.

Town, M.H., Gehm, S., Hammer, B. (1985) A sensitive colorimetric method for the enzymatic determination of uric acid. *J. Clin. Chem. Clin. Bio.* 23(9):591-591.

Travacio, M. & Liesuy, S.(1996) Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 48 (1/2): 9-13.

Urhausen, A., Kindermann, W. (2002) Diagnosis of overtraining. What tools do we have? *Sports Med.* 32: 96-102.

Venditti, P., Masullo, P., Meo, S.D. (1999) Effect of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1; 368(1): 112-120.

Viru, M. (1994) Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 34: 217-227.

Voet, D., Voet, J. and Pratt, C.W. (1999) Fundamentals of Biochemistry. New York. John Wiley & Sons Inc.

Volfinger, L., Lassourd, V., Michaux, J.M., Braun, J.P. Tourtain, P.L. (1994) Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *Am. J. Physiol.* 266: R434-R441.

Welch, W.J. (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72(4):1063-1081.

Welch, W.J. (1993) How cells respond to stress. *Sci. Am.* 268(5): 34-41.

Xu, K.Y., Zweier, J.L., Becker, L.C. (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ. Res.* 80(1): 76-81.

Yagi K. (1987) Lipid peroxides and human diseases. *Chem. Phys. Lipids* 45: 337-351.

Yarasheski, K.E., Zachwieja, J.J., Bier, D.M. (1993) Acute effects of resistance exercise on muscle protein synthesis rate in young and elderly men and women. *Am. J. Physiol.* 265(4 Pt 1): E210-E214.

Yellon, D.M., Marber, M.S. (1994) HSP70 in myocardial ischaemia. *Experimentia* 50: 1075-1083.

Yu, B.P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74(1): 139-162.

Zatsiorsky, V.M. (1995) Science and practice of strength training. Champaign: Human Kinetics.

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernest, L. and Davies, K.J.A. (1990) The inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 265:16330-16336.

Zoppi, C.C., Antunes-Neto, J., Catanho, F.O., Goulart, L.F., Motta e Moura, N. e Macedo, D.V. (2003) Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Revista Paulista de Educação Física* 17:(2) 119-130