

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto

**Estudo da Relação Entre Estresse Oxidativo e Síntese de
Proteínas de Estresse “HSP70” no Sangue de Animais
Submetidos a Diferentes Níveis de Exercício Físico**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Departamento de Bioquímica – IB

UNICAMP

Campinas, 2003

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

- An89e** **Antunes Neto, Joaquim M. F.**
Estudo da relação entre estresse oxidativo e síntese de proteínas de estresse "HSP70" no sangue de animais submetidos a diferentes níveis de exercício físico / Joaquim M. F. Antunes Neto.-- Campinas, SP: [s.n.], 2003.
- Orientadora: Lúcia Pereira da Silva
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.
1. Exercício físico. 2. Stress. 3. Leucócitos. I. Silva, Lúcia Pereira da. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III.Título.

Campinas, 17 de Julho de 2003.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva (orientadora)

UNICAMP – Instituto de Biologia – Depto. Bioquímica

Assinatura

Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros

USP – Instituto de Química – Depto. Bioquímica

Assinatura

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

UNICAMP – Instituto de Biologia – Depto. Fisiologia

Assinatura

Prof. Dr. Roberto Vilarta

UNICAMP – Faculdade de Educação Física – DEAFa

Assinatura

Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

USP – Instituto de Química – Depto. Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Camillo José Novello

UNICAMP – Instituto de Biologia – Depto. Bioquímica

Assinatura

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

UNICAMP - Instituto de Biologia – Depto. Bioquímica

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, pela transmissão de seu conhecimento e, acima de tudo, por ter me mostrado o caminho fascinante da ciência...

A Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva, pela confiança e respeito...

A Fernanda Lorenzzi Lazarim, pela grande colaboração e vontade de ajudar em muitos momentos desta tese...

Ao Prof. Dr. Armino Antônio Alves, sempre solidário como amigo e mestre...

A Profa. Dra. Patrícia Melo, Profa. Dra. Giselle Zenker Justo e Maristella C. Anazetti, amigas para sempre...

A Nilcéia da Motta e Moura e Neusa Narita, generosas e perseverantes...

Ao Prof. Dr. Marcos Toyama, um solícito amigo e colaborador...

Aos amigos Daniel, Andréia, Marina e João Batista, pela colaboração fundamental nesta tese...

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Enio** e **Cleonice**, que me ensinaram o valor da dignidade...*

*Aos meus sobrinhos queridos, **Paulo Afonso** e **Enzzo**, doutores
em enfrentar as adversidades da vida...*

*Em especial, à memória de minha irmã, **Deise**,
que tanto sofreu e tão pouco foi agraciada
pela vida...*

ÍNDICE

Lista de Figuras e Tabelas	x
Lista de Abreviatura, Símbolos e Fórmulas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1- Introdução	01
1.1- As Bases da Teoria do Treinamento Físico	01
1.2- A Síndrome do Overtraining	04
1.3- Espécies Reativas de Oxigênio	06
1.4- Sistema de Defesa Antioxidante	10
1.5- Relações Entre Exercício Físico, Estresse Oxidativo e Sistema Enzimático Antioxidante	12
1.6- Proteínas “Heat Shock” Como Parte do Sistema de Defesa Antioxidante	14
1.7- Efeitos das EROs Sobre a Contração Muscular	19
2- Justificativa e Objetivos	23
3- Materiais e Métodos	25
3.1- Animais	25
3.2- Protocolos de Exercícios	25
3.2.1- Exercício Agudo	25
3.2.2- Proposta de Protocolos de Exercícios para Indução de “Overreaching”	26
3.3- Preparo das Amostras dos Ensaio de Estresse Oxidativo	27
3.4- Dosagens Enzimáticas	28
3.4.1- Creatina Quinase	28
3.4.2- Catalase	28
3.4.3- Glutathione Redutase	29
3.5- Dosagem de Hemoglobina no Hemolisado	29
3.6- Dosagem de Grupamento Sulfidril Total no Plasma	30
3.7- Dosagens de Oxidações Celulares	30
3.7.1- Peroxidação Lipídica (TBARS)	30
3.7.2- Carbonilação de Proteínas	31
3.8- Dosagens de Parâmetros Metabólicos	31

3.9- Preparo das Amostras de Leucócitos Totais para Eletroforese	32
3.10- Dosagem de Proteínas das Amostras de Leucócitos Totais	32
3.11- Eletroforese para Detecção de Expressão das Proteínas de Estresse em Leucócitos Totais	32
3.11.1- Padronização da Preparação de Amostras de Leucócitos Totais e da Técnica Eletroforética	33
3.12- Western Blot	39
3.13- Análises Densitométricas	40
3.14- Apresentação Gráfica e Análises Estatísticas	40
4- Resultados e Discussões	42
Capítulo 1	
<i>Estudo de Biomarcadores Sangüíneos de Estresse Oxidativo em Diferentes Tempos Pós-Exercício Exhaustivo</i>	<i>43</i>
1.1- Efeito do Exercício Agudo Sobre Marcadores Plasmáticos de Estresse Oxidativo	44
1.2- Efeito do Exercício Agudo Sobre Biomarcadores de Defesa Antioxidante	46
1.2.1- Expressão de Proteínas de Estresse HSP70 em Leucócitos Totais	46
1.2.2- Sistema Enzimático Antioxidante no Hemolisado	48
1.2.3- Sistema Antioxidante Não Enzimático Plasmático	50
1.3- Efeito do Exercício Agudo Sobre Marcadores de Alterações na Permeabilidade Muscular	51
1.4- Discussão	52
1.5- Conclusão	57
Capítulo 2	
<i>Estudo de Biomarcadores Sangüíneos de Estresse Oxidativo em Diferentes Momentos Durante um Protocolo de Treinamento Contínuo</i>	<i>59</i>
2.1- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Marcadores de Estresse Oxidativo Plasmático	60
2.2- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Biomarcadores de Defesa Antioxidante..	62

2.2.1- Expressão de Proteínas de Estresse HSP70 em Leucócitos Totais	62
2.2.2- Sistema Enzimático Antioxidante no Hemolisado	64
2.2.3- Sistema Antioxidante Não Enzimático Plasmático	66
2.3- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Biomarcadores de Estresse Metabólico..	68
2.4- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Biomarcadores de Alteração Muscular ..	70
2.5- Discussão	72
2.6- Conclusão	80

Capítulo 3

<i>Estudo de Biomarcadores Sangüíneos de Estresse Oxidativo em Diferentes Momentos Durante um Protocolo de Treinamento Intermitente</i>	<i>82</i>
3.1- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Marcadores de Estresse Oxidativo Plasmático	82
3.2- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Defesa Antioxidante	84
3.2.1- Expressão de Proteínas de Estresse HSP70 em Leucócitos Totais	84
3.2.2- Sistema Enzimático Antioxidante no Hemolisado	86
3.2.3- Sistema Antioxidante Não Enzimático Plasmático	88
3.3- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Estresse Metabólico	90
3.4- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Alteração Muscular	92
3.5- Discussão	93
2.6- Conclusão	99

Capítulo 4

<i>A Técnica de Detecção de Limiar de Estresse Aplicada em Jogadores Profissionais de Futebol</i>	<i>101</i>
4.1- Marcadores de Estresse Oxidativo	102
4.2- Marcadores de Defesa Antioxidante	103

4.2.1- Sistema Antioxidante Enzimático – Hemolisado	103
4.2.2- Sistema Antioxidante Não Enzimático – Plasma	104
4.3- Marcadores de Estresse Metabólico	105
4.4- Marcadores de Alteração Muscular	106
4.5- Atletas Individualizados ao Longo do Campeonato	107
4.6- Discussão	108
4.7- Conclusão	109
5- Referências Bibliográficas	110
6- Anexos	125
6.1- Tratamentos Estatísticos	125
6.1.1- Protocolo de Exaustão	125
6.1.2- Protocolo de Treinamento Contínuo	127
6.1.3- Protocolo de Treinamento Intermitente	129
6.2- Publicação de Resumos em Anais de Congressos Científicos	131
6.3- Estágio Docente em Cursos e Disciplinas	133
6.4- Orientação de Monografias de Conclusão de Curso de Graduação e Especialização	133
6.5- Participação de Banca de Avaliação de Monografia	134
6.6- Artigos Submetidos à Publicação	134

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Características do agente estressor e fatores condicionantes do estresse	01
Figura 2. As fases de reação ao estímulo estressor	02
Figura 3. O processo de propagação da atividade do ânion superóxido.	09
Figura 4. Formação do radical ânion superóxido e a ação das enzimas antioxidantes	12
Figura 5. Modelo especulativo para a ativação do fator heat shock em condição de estresse	17
Figura 6. Modelo de mecanismo de dois componentes redox que limitam a força isométrica	21
Figura 7. Perfil eletroforético das amostras de leucócitos totais analisado a partir dos métodos propostos na Tabela 1	36
Figura 8. Teste das amostras de leucócitos totais após armazenamento a -80° C durante 4 meses	37
Figura 9. Eletroforese de concentração de proteínas das amostras após incubação por 24 horas a 37°C	38
Figura 10. Configuração de um box plot	40
Figura 11. Concentração plasmática de PC (A) e TBARS (B) em ratos submetidos a protocolo de exercício agudo (n=5)	44
Figura 12. Expressão de HSP70 em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de exercício agudo (A) e quantificação densitométrica (B) (n=5)	46
Figura 13. Atividade das enzimas CAT (A) e GR (B) no hemolisado de ratos submetidos ao protocolo de exercício agudo (n=5)	48
Figura 14. Concentração plasmática de GST (A) e ácido úrico (B) em ratos submetidos ao protocolo de exercício agudo (n=5)	50
Figura 15. Concentração plasmática de CK em ratos submetidos ao protocolo de exercício agudo (n=5)	51
Figura 16. Concentração plasmática de PC (A) e TBARS (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária do exercício (n=8)	60

Figura 17. Expressão de HSP70 em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas (A) e ao aumento na frequência diária de corrida (B)	62
Figura 18. Atividade das enzimas CAT (A) e GR (B) no hemolisado de ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8)	64
Figura 19. Concentração plasmática de GST (A) e ácido úrico (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8)	66
Figura 20. Concentração plasmática de uréia (A) e creatinina (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n = 8)	68
Figura 21. Concentração plasmática de CK (A) e TGO (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n= 8)	70
Figura 22. Concentração plasmática de PC e TBARS em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária do exercício (n=8)	82
Figura 23. Expressão de HSP70 em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas (A) e ao aumento na frequência diária de corrida (B)	84
Figura 24. Atividade das enzimas CAT e GR no hemolisado de ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8)	86
Figura 25. Concentração plasmática de GST (A) e ácido úrico (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8)	88
Figura 26. Concentração plasmática de uréia (A) e creatinina (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8)	90
Figura 27. Concentração plasmática de CK e TGO em ratos submetidos a protocolo	

de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n = 8)	92
Figura 28. Concentrações plasmáticas de PC (A) e TBARS (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro	102
Figura 29. Atividade no hemolisado das enzimas GR (A) e CAT (B) ao longo dos cinco meses do Campeonato Brasileiro	103
Figura 30. Concentrações plasmáticas de GST (A) e ácido úrico (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro	104
Figura 31. Concentrações plasmáticas de uréia (A) e creatinina (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro	105
Figura 32. Concentrações plasmáticas de CK (A) e TGO (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro	106
 Tabela 1. Protocolo de exercício agudo	 26
Tabela 2. Protocolos distintos de treinamentos contínuo e intermitente aos quais os animais foram submetidos	 27
Tabela 3. Métodos de isolamento de leucócitos totais	33
Tabela 4. Tampões de amostra para diluição dos leucócitos totais, de acordo com os seus respectivos métodos de isolamento.....	34
Tabela 5. Preparação do Gel SDS-PAGE	35
Tabela 6. Atletas individualizados, parâmetro alterado e resultado após duas semanas de individualização do grupo	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

CK – Creatina Quinase

CT – Contínuo

DNPH – 2,2,Dinitrofenilhidrazina

DTNB – Ácido 5,5' - Ditio-bis (2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra-acético

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

GPX – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

GST – Grupamento Sulfidril Total

HSE – Heat Shock Element

HSF – Heat Shock Factor

HSP – Heat Shock Protein

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IT – Intermitente

NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma oxidada)

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (reduzida)

NO – Óxido Nítrico

•OH – Radical Hidroxila

O₂^{•-} - Radical Ânion Superóxido

PC – Proteína Carbonilada

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloro Acético

TGO – Transaminase Glutamato-Oxaloacetato

TRIS – Tris (hidroximetil aminometano)

SOD – Superóxido Dismutase

RESUMO

Nosso estudo investigou em amostras de sangue de ratos do tipo “Wistar” a correlação entre estresse oxidativo (plasma), modulação do estado antioxidante/oxidante (hemácea) e níveis de proteínas de estresse “HSP70” (leucócito total) em diferentes sobrecargas de corrida em esteira rolante: exercício exaustivo agudo e treinamentos contínuo e intermitente crônico e severo. Os resultados mostraram que o exercício agudo em animais sedentários induziu um aumento nos níveis dos marcadores oxidativos em plasma (proteínas carboniladas e TBARS) juntamente com uma elevação da atividade das enzimas antioxidantes (catalase e glutathione redutase) e da expressão de “HSP70” em leucócitos. Os protocolos de treinamento crônico mostraram um mesmo padrão adaptativo: o aumento da sobrecarga de exercícios induziu elevação nos níveis de lesões oxidativas e alterações musculares. Porém, obtivemos nesta situação um aumento de atividade das enzimas antioxidantes e níveis de “HSP70”, o que poderia ser considerado uma resposta adaptativa ao estímulo de treinamento. A estabilização da sobrecarga providenciou um decréscimo nos níveis de estresse oxidativo e expressão de “HSP70” em ambos os protocolos. Porém, os protocolos de treinamento severo, tanto contínuo quanto intermitente, induziram uma acentuada situação de estresse oxidativo e expressão de “HSP70”. A redução no tempo de recuperação entre as sessões de treinamento e a elevação da sobrecarga de corrida foram fatores agravantes para o aumento da severidade do estresse. Concluindo, os marcadores de estresse oxidativo estudados neste trabalho mostraram uma relação direta entre intensidade do exercício e níveis de lesões oxidativas e alterações musculares. A detecção de “HSP70” foi um importante índice para monitorar a severidade do estresse. Assim, análises de marcadores de estresse oxidativo em conjunto com a detecção de “HSP70” poderiam ser uma potente ferramenta para controlar a sobrecarga dos exercícios de treinamento, prevenindo a instalação de situações fisiopatológicas graves.

ABSTRACT

The present study was designed to investigate in blood samples of rats if there are a correlation among oxidative stress, modulation of antioxidant/oxidant status and stress protein levels in different running overloads: acute exhaustive exercise, and chronic and severe (continuous and intermittent protocols) trainings. Our results showed that the acute exhaustive exercise induced in sedentary rats an increase in plasma oxidative markers (carbonyl derivatives and TBARS) together to an upregulation in the erythrocyte antioxidant enzymes (catalase and glutathione reductase) and elevation in HSP70 in leukocytes. The chronic training protocols showed a same pattern of adaptation: the increase in overload of exercise induced an elevation in the oxidative damage and muscle alterations levels. But we had in this situation an increase in antioxidant enzymes activity and HSP70 expression, what would be an adaptative response to the training stimulus. The overload stabilization provided a decrease in the oxidative stress markers levels and HSP70 expression to both protocols. However, the severe training protocols induced a markedly oxidative stress situation and an increase of HSP70 levels. The reduction in the recovery time between the training sessions together an elevation in overload of exercises were an aggravating factor to the increase in the stress severity. In conclusion, the oxidative stress markers studied here showed a close correlation between exercise intensity and oxidative damage and muscle alterations. The HSP70 detection was an important index to monitor the stress severity. Oxidative stress markers analyses and HSP70 detection could be a useful tool to control the overload of training exercises preventing the installation of pathophysiological situations.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- As Bases da Teoria do Treinamento Físico

As respostas dos sistemas biológicos a agentes estressores representam um mecanismo evolutivo conservado de adaptação, pelo qual as células respondem e se defendem contra mudanças abruptas e adversas do meio ambiente (Welch, 1992). Os trabalhos precursores sobre a adaptabilidade do organismo humano a condições de estresse foram realizados por Hans Selye (1965), quando dois pressupostos importantes foram formulados:

- Agentes indutores de estresse, qualitativamente diferentes, mas de igual toxicidade (ou “potencial estressor”) não induzem exatamente a mesma resposta biológica;
- O mesmo grau de estresse, induzido pelo mesmo agente estressor, pode produzir respostas diferentes em indivíduos distintos (efeito específico).

Essas observações levaram Selye (1936; 1965; 1970) a relacionar as respostas ao estresse a *fatores condicionantes*, que propiciariam, seletivamente, o estímulo ou inibição de um ou outro efeito de estresse (*Figura 1*). Os fatores condicionantes poderiam ser de *característica endógena*, como predisposição genética, sexo ou idade, ou possuir *característica exógena*, como fatores alimentares, utilização de medicamentos e estilo de vida. Dessa forma, sob a influência de tais fatores, 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.

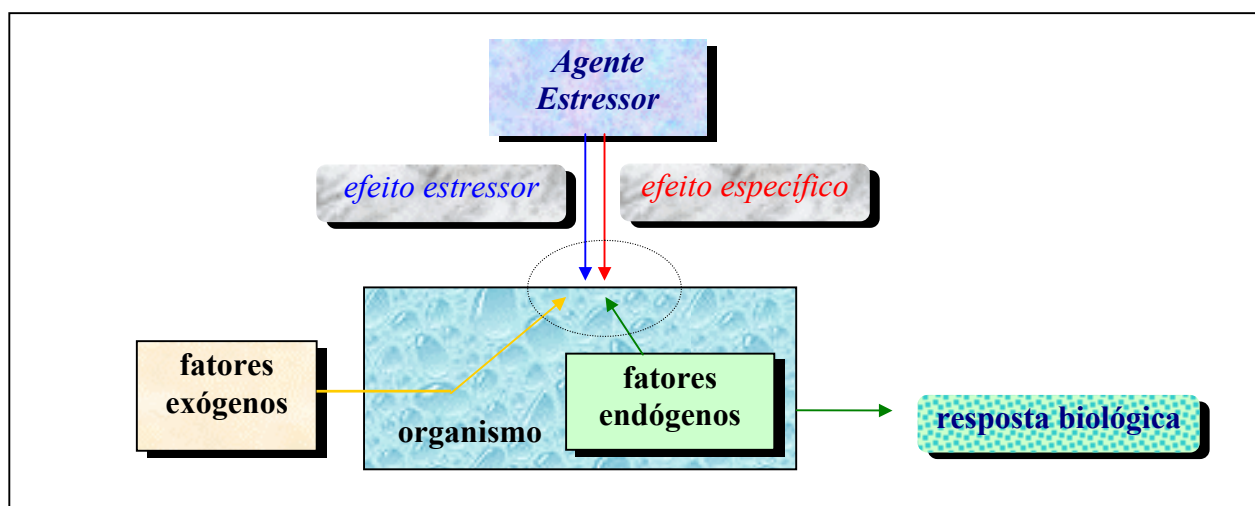


Figura 1. Características do agente estressor e fatores condicionantes do estresse. Adaptado de Selye (1970).

A partir destes fundamentos, Hans Selye (1936) descreveu a teoria da *Síndrome da Adaptação Geral* ou *Síndrome do Estresse Biológico*, que teve papel fundamental na estruturação dos princípios do treinamento. Neste contexto, o exercício físico pode ser considerado um estímulo estressor, que provoca uma série de reações específicas nos indivíduos, influenciadas por diversos fatores, tais a constituição física, o estado de treinamento, a idade, o sexo, condições nutricionais e psíquicas e predisposições genéticas (Astränd, 1992). A teoria proposta por Selye prediz que a reação ao estresse possui três fases: *alarme*, *resistência* e *exaustão*, conforme mostrado na *Figura 2*.

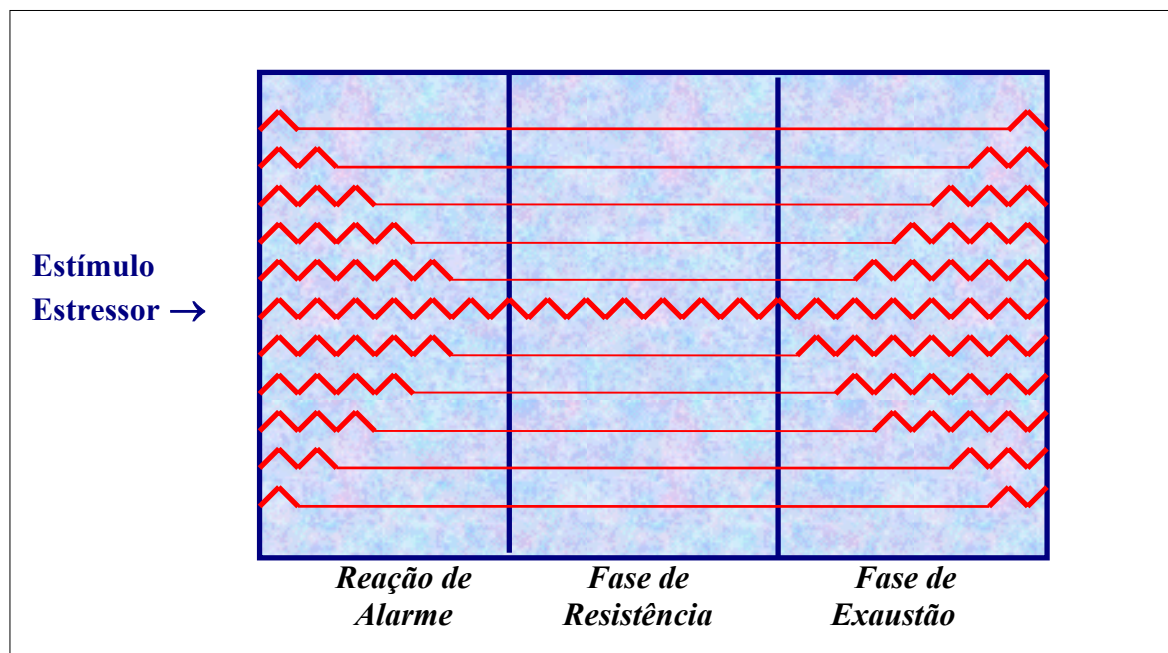


Figura 2. As fases de reação ao estímulo estressor. Adaptado de Selye (1965).

A **Reação de Alarme** constitui o início do processo reativo, sendo desencadeada por uma condição não específica, comum para diversos estímulos e caracterizada pela secreção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e glicocorticóides (corticosterona – ratos, cortisol – humanos). Como a homeostasia dos organismos é controlada por uma série de fatores que “flutuam”, na tentativa de permitir uma adaptação ótima às condições do meio (Rietveld, 1996), na **Fase de Resistência** o organismo tende a atingir novamente um estado ótimo de adaptação frente ao estímulo aplicado, desaparecendo os sintomas que eram evidentes na reação de alarme. A **Fase de Exaustão** é atingida quando o estímulo prevalece em função da recuperação dos

mecanismos homeostáticos. A fase de exaustão não é irreversível, porém pode levar o organismo à morte.

Fazendo um paralelo da teoria de Selye (1936) com o processo do treinamento físico, a fase de alarme tem seu início quando o estímulo do exercício gera um distúrbio agudo nas células e órgãos, relacionado à fadiga, que resulta na quebra da homeostasia intracelular. Na fase de resistência é desencadeado o processo adaptativo, quando se restabelece uma nova homeostase celular, com níveis mais elevados de atividade enzimática e de substratos metabólicos quando comparados aos detectados anteriormente. É importante ressaltar que os processos regenerativos continuam após a restauração da nova homeostase, resultando numa *supercompensação* metabólica, que propicia melhor suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia em atividades físicas que já eram habituais na estrutura de treinamento (Fry et al., 1992). Assim, se um mesmo estímulo estressor for imposto novamente após a ocorrência da adaptação, os mecanismos homeostáticos não serão rompidos na mesma extensão (Fry et al., 1992). Por outro lado, se os intervalos de recuperação/repouso entre sucessivas sessões de treinamento e a regulação da carga de treinamento em cada atividade programada não forem otimizados, podem ocorrer distúrbios homeostáticos severos e até mesmo irreparáveis, atingindo a fase de exaustão. A consequência da fase de exaustão no treinamento físico é o desencadeamento de um estado crônico de fadiga que, em conjunto com outras alterações bioquímicas e fisiológicas, caracterizam a *síndrome do supertreinamento* ou *overtraining* (Tiidus, 1998). A adaptação positiva ao treinamento, portanto, é resultado de uma alternância corretamente programada entre indução de estresse e regeneração (Bompa, 2001).

O objetivo em selecionar os intervalos e cargas de treinamento de modo otimizado encontra-se em assegurar que uma subsequente sessão de treinamento coincida com a fase de supercompensação (Zatsiorsky, 1995), caracterizada como o período de restabelecimento de um determinado substrato metabólico para níveis superiores àqueles encontrados no início da sessão. Dessa forma, as adaptações biológicas a longo prazo são caracterizadas pelos efeitos acumulativos das quebras homeostáticas programadas em termos de intensidade, duração e frequência do próprio estímulo e sua consequente resposta adaptativa, o que leva a um estágio superior de performance física. É importante lembrar que a *quantidade* e *qualidade* do estímulo produzirão um aumento na adaptação sistêmica do organismo somente quando este se encontrar

preparado para “resistir” à inibição que pode ser gerada pela intensificação nas cargas de esforço (Puche, 1993).

O processo de treinamento divide-se em períodos chamados ciclos, que podem ter uma predominância de atividades aeróbias, que podem ser realizadas por longos períodos de tempo (maior volume) em intensidades que variam de sub-máximas a máximas (determinadas pelo VO_{2max} ou limiar anaeróbio), características dos treinamentos do tipo contínuo ou de *endurance*; ou conter atividades de menor duração, realizadas em intensidades supramáximas, com predomínio do metabolismo anaeróbio como gerador de ATP (treinamento intermitente, de resistência anaeróbia). Devido à alta intensidade de esforço empregada, o treinamento do tipo intermitente requer que os exercícios sejam sempre intercalados por pausas curtas, quando predomina o metabolismo aeróbio, importante para facilitar a recuperação, principalmente de fosfocreatina nas células musculares.

1.2- Síndrome do *Overtraining*

Quando não há um sincronismo otimizado entre “intensidade x duração x frequência” de esforço, tempo de recuperação ao exercício e uma metodologia adequada para o desenvolvimento do condicionamento atlético, pode ocorrer uma sobrecarga de determinado sistema biológico, ocasionando superatividades metabólica e funcional e até mesmo desintegração dos sistemas de defesa do organismo (Bompa, 1990). Neste caso, estamos falando da síndrome do supertreinamento ou *overtraining*. Os sinais associados a esta síndrome são alta fadigabilidade e outros distúrbios, tais como respostas inflamatórias, aumento de citocinas circulantes no sangue, desbalanço nutricional, distúrbios hormonais, indisposição ao treinamento físico, que resultam em diminuição do rendimento e aumento na susceptibilidade a lesões (Johnson, Thiese, 1992; Kibler et al., 1992; Lehmann et al., 1993; Pascoe et al., 1993; Eichner, 1995; Hooper et al., 1995; Kuipers, 1996; Traverso et al., 1996; Tenenbaum, 1996; Tiidus, 1998; Lehmann et al., 1998). O *overtraining*, uma vez instalado, não é facilmente revertido, podendo levar várias semanas ou meses para ocorrer a recuperação (Kuipers, Keizer, 1988).

Dentro do contexto neuroendócrino de classificação da síndrome do *overtraining*, Lehmann e colaboradores (1998) relataram a possibilidade de haver duas formas da síndrome: *tipo parassimpática* (aumento do tônus parassimpático em repouso e no exercício), geralmente

uma consequência do desbalanço entre alto volume de treinamento de longa duração e pequeno tempo para regeneração (esportes de *endurance*); e *tipo simpática* (aumento do tônus simpático em repouso), quando há, sobretudo, sessões de treinamentos mais intensivas e intermitentes. Embora os mecanismos fisiopatológicos de ambos os tipos ainda não sejam totalmente conhecidos, surgiu a hipótese de que eles refletiriam estágios diferentes da própria síndrome; durante o estágio inicial, o sistema simpático seria continuamente “alertado”, enquanto que durante os estágios mais avançados, a atividade do sistema simpático seria inibida, resultando em uma prevalência do sistema parassimpático (Kuipers, 1996).

O início do *overtraining* é conhecido na literatura como *overreaching* e se instala quando o repouso entre o próximo treinamento ou competição é insuficiente (Bruin et al., 1994, Tiidus, 1998; Lehmann et al., 1998). Embora esta condição também induza fadiga prematura, pois a recuperação é incompleta, pode ser facilmente revertida com um ou dois dias de pouco ou nenhum treino. Entretanto, como pouco é conhecido em relação à quantidade ótima de treinamento e os fatores que influenciam a recuperação e supercompensação, ainda hoje existe um componente muito grande de empirismo na aplicação dos métodos de treinamento, que são na sua grande maioria empregados sem muita base científica. Ou seja, os atletas normalmente são submetidos a cargas de esforço muito altas, com pouco tempo de recuperação, para não se pecar pela falta de estímulo, sendo impossível prever se a carga de esforço exigida da equipe está excedendo o limite individual de estresse que o organismo pode suportar. Tudo isso torna o limiar entre um treinamento ideal e o *overtraining* muito tênue. O maior problema é que ainda não existem 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*. Além disso, a literatura é carente de protocolos de exercícios que se preocupem em estabelecer esse quadro de desbalanço entre exercício/repouso em animais de laboratório, o que também dificulta o estudo da sensibilidade de biomarcadores nessa situação.

Uma via de sinalização aparentemente envolvida com esses dois processos antagônicos, adaptação e *overtraining*, muito discutida atualmente na literatura e objeto de estudo de nosso grupo de pesquisa, envolve a alteração no estado redox intracelular, induzida pela elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que acompanha o aumento da atividade contrátil muscular (Smolka et al., 2000; Reid, 2001).

1.3- Espécies Reativas de Oxigênio

Radicais livres são espécies químicas independentes, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Isto implica em uma grande instabilidade e, frequentemente, elevada reatividade. Como necessitam completar seus pares de elétrons para se estabilizarem, comportam-se ou como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons. Nesta definição incluem-se os átomos de hidrogênio, vários íons metálicos de transição (ferro e cobre) e o oxigênio molecular (Halliwell, Gutteridge, 1989).

O oxigênio molecular (O_2) possui dois elétrons desemparelhados, localizados em dois orbitais π^*2p . Esses elétrons têm spins iguais, tornando o O_2 bastante estável, pois restringe sua redução ou a moléculas que possuam dois elétrons de spins antiparalelos ou a uma redução univalente, com um elétron de cada vez. A este fenômeno chamamos restrição de spin. Esta restrição limita a reatividade do oxigênio, permitindo que numa atmosfera de 21% de O_2 , como a da Terra, ocorram moléculas constituídas de cadeias carbônicas altamente reduzidas (Halliwell, Gutteridge, 1998). Nos organismos aeróbios, o O_2 é utilizado nas mitocôndrias comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido a H_2O no complexo IV ou citocromo aa_3 . Por força da restrição de spin, o O_2 só pode ser reduzido unieletronicamente.

As quatro etapas de redução ocorrem no interior do complexo IV mitocondrial, liberando H_2O como único produto final da reação. No entanto, está bem documentado na literatura que cerca de 5% do oxigênio consumido é reduzido a radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma forma muito comum de formação de radicais livres nos meios biológicos. O exercício físico aumenta em torno de 25 vezes o volume de oxigênio total consumido (VO_2) e 100 vezes nas fibras musculares ativas (Astränd, Rodahl, 1986; Sjödin et al., 1990), permitindo que o $O_2^{\cdot-}$ possa ser formado de várias maneiras (Beckman et al., 1990; Sjödin et al., 1990; Jenkins, Goldfarb, 1993; Reid, 1996; Tiidus, 1998):

- **Cadeia de Transporte de Elétrons** – Uma das principais fontes de $O_2^{\cdot-}$ é o vazamento de elétrons que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial. Sabe-se que cerca de 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias geram $O_2^{\cdot-}$, principalmente nos complexos I (NADPH-ubiquinona oxidoreductase) e complexo III (citocromo c redutase) (Boveris, Chance, 1972).

- **Enzima Xantina Oxidase** – As reações catalisadas pela xantina oxidase mostram-se uma fonte importante de $O_2^{\cdot-}$, principalmente durante situações de isquemia/reperfusão, quando ocorre grande produção de hipoxantina. Durante exercícios intermitentes de alta intensidade, quando a velocidade de quebra do ATP excede a da fosforilação do ADP, pode ocorrer acúmulo de ADP na musculatura. A fim de manter uma razão ATP/ADP alta, a enzima adenilato quinase catalisa a seguinte reação: $ADP + ADP \rightarrow ATP + AMP$. A desaminação subsequente do AMP a IMP é importante para permitir a ressíntese de ATP por essa via. O IMP é transformado em hipoxantina. Em situações normais a hipoxantina é degradada a ácido úrico pela ação da forma desidrogenase da enzima, que utiliza $NADP^+$ como aceptor de elétrons. Porém, em baixas concentrações de O_2 e altas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , a enzima é transformada na sua forma oxidase, que utiliza O_2 como aceptor de elétrons, produzindo também $O_2^{\cdot-}$ no final do processo (Sjodin et al., 1990).
- **Neutrófilos e Resposta Inflamatória (NADPH oxidase)** – Neutrófilos polimorfonucleares são células sangüíneas que possuem a função de promover a inflamação pós-exercício, importante para a remoção de proteínas danificadas e restos celulares e reparo do tecido danificado. Dessa forma, quando recrutados para o foco da infecção, liberam primordialmente dois fatores, lisoenzimas e $O_2^{\cdot-}$. A produção de $O_2^{\cdot-}$ pelos neutrófilos ocorre através da redução univalente do O_2 na presença de NADPH, numa reação catalisada pela enzima NADPH oxidase, num processo conhecido como *burst respiratório*.
- **Músculo Esquelético** – O músculo esquelético produz óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido arginina, pela reação da enzima óxido nítrico sintase (Tews et al., 1997). O óxido nítrico pode reagir com $O_2^{\cdot-}$, formando peroxinitrito, um intermediário instável, de alta reatividade (Reid, 1998). Evidências experimentais mostram que o NO pode influenciar no balanço oxidante/antioxidante intramuscular (Reid, 1998; Reid, 2002).

A *superóxido dismutase* (SOD), uma enzima do sistema de defesa antioxidante catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 , uma espécie não radicalar, considerada como um agente oxidante fraco (*reação 1*). Contudo, H_2O_2 tem a propriedade de atravessar facilmente membranas celulares e a união com um elétron proveniente de metais de transição,

Fe^{2+} ou Cu^{+} dá origem ao radical hidroxila ($\bullet OH$), uma das espécies radicalares existentes mais reativas (*reação 2*) (Ryan, Aust, 1992; Jenkins, Goldfarb, 1993).



Como os radicais livres são espécies de alta instabilidade, atacam regiões celulares específicas, principalmente fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, proteínas e DNA nuclear e mitocondrial, com o objetivo de se estabilizar (Halliwell, Gutteridge, 1989). A oxidação de lipídeos, processo conhecido como peroxidação lipídica, pode iniciar-se em membranas celulares e sub-celulares, especialmente na membrana interna das mitocôndrias, quando o $\bullet OH$ abstrair o hidrogênio das ligações C — H da cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados. Os carbonos dos fosfolipídios, uma vez oxidados, passam a possuir elétrons desemparelhados, desencadeando as seguintes reações em cascata mostradas na *Figura 3*.

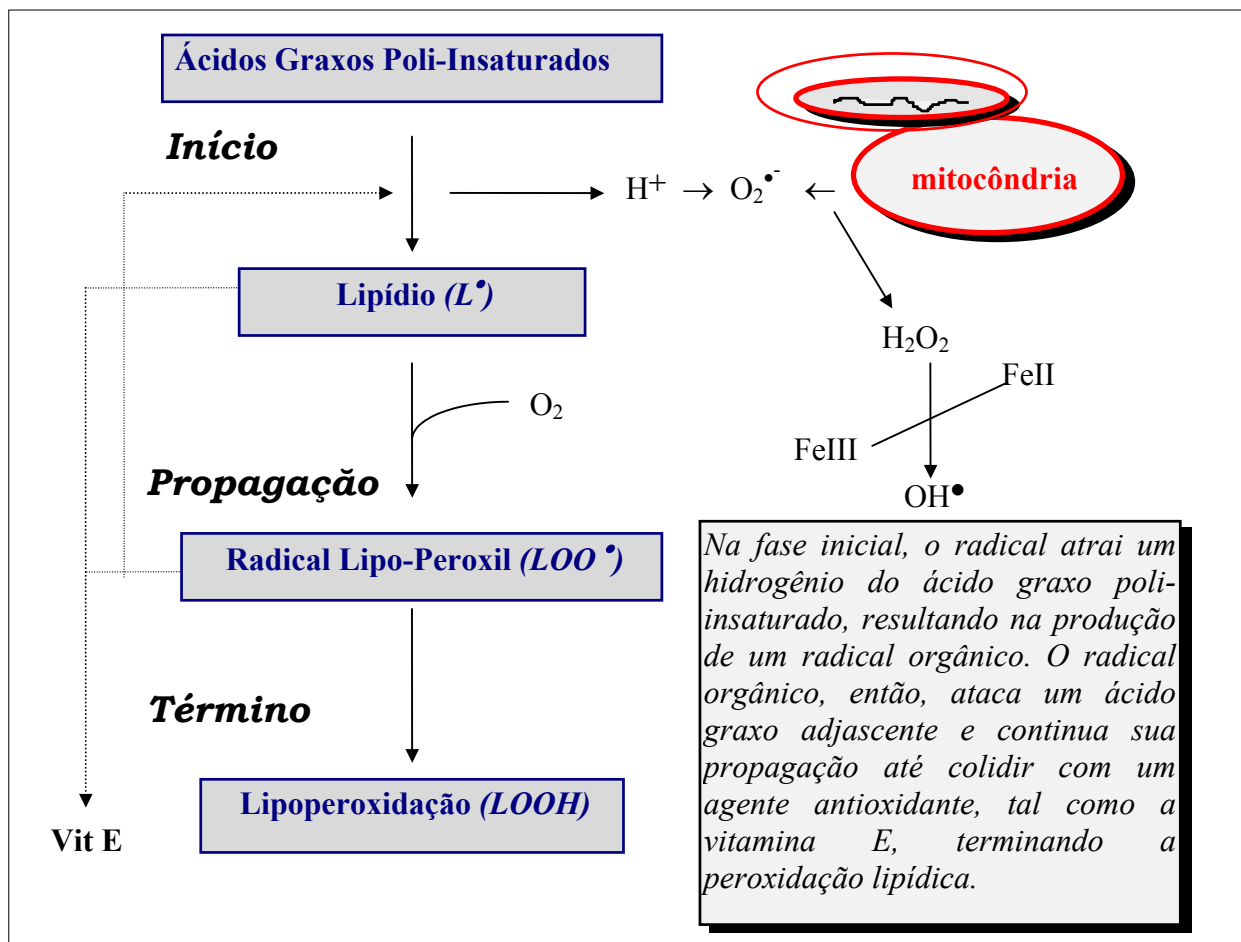


Figura 3. O processo de propagação da atividade do ânion superóxido. Adaptado de Jenkins e Goldfarb (1993).

Os radicais lipídicos desemparelhados ($L^{\bullet}$) rearranjam-se molecularmente em dienos conjugados, que ao reagir com O_2 formam radicais peróxi ($LOO^{\bullet}$); radicais peróxi, pelo fato de serem oxidantes potentes, abstraem um segundo átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, dando continuidade aos processos degenerativos na membrana. Assim, o radical iniciador começa um processo autocatalítico, que converte a maioria dos ácidos graxos dos fosfolipídios das membranas em hidroperóxidos (Bindoli, 1988). Os hidroperóxidos lipídicos formados, na presença de Fe^{2+} , podem ainda ser oxidados a radicais alcoxi ($LO^{\bullet}$), vindo a sofrer quebra na ligação $C - C$ seguinte e originar aldeídos de baixo peso molecular (malonaldeído, β -hidroxinonenal e hidrocarbonetos, como etano e n-pentano). Esses aldeídos de baixo peso molecular reagem com ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexos que podem ser quantificados em virtude da coloração obtida. Tais complexos, utilizados como biomarcadores de

peroxidação lipídica em sistemas biológicos (tecidos e plasma) são medidos por espectrofotometria ou por fluorescência (Yagi, 1976; Ohkawa et al., 1979). A peroxidação lipídica traz consequências homeostáticas severas para as membranas atacadas, refletidas, principalmente, na perda de sua integridade, devido a alteração na sua permeabilidade a íons e pequenas moléculas e perda nas suas características de fluidez (Halliwell, Gutteridge, 1989).

No caso das proteínas, os aminoácidos também constituem-se num alvo importante da ação das EROs, tendo suas estruturas secundárias e terciárias rompidas, com subsequente aumento de hidrofobicidade e perda de função. O $\cdot\text{OH}$ é particularmente proteotóxico, pois pode reagir com o carbono α de qualquer aminoácido (Halliwell, Gutteridge, 1989). Além de modificar a função protéica, sua oxidação também pode marcá-las para serem degradadas em peptídeos e, eventualmente, em aminoácidos (Ryter et al., 1990). Muitos produtos associados com perda ou alteração morfofuncional protéica podem ser obtidos após ataque oxidativo de EROs, entre eles hidroxilação de aminoácidos aromáticos, oxidação de aminoácidos que possuem enxofre (cisteína), peroxidação de aminoácidos alifáticos e formação de grupos carbonila (Dean et al., 1987).

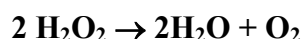
1.4- Sistema de Defesa Antioxidante

A atividade biológica das EROs é limitada por uma série de antioxidantes endógenos e proteínas relacionadas ao estresse (Buczynski et al., 1990; Goldfarb, 1993; Smolka et al., 2000; Reid, Durham, 2002). Os principais sistemas de defesa endógenos compreendem as *vitaminas antioxidantes* (vitaminas A, C e E), *ácido úrico*, *glutathione reduzida* (GSH), *grupamentos sulfidrila livres* e *enzimas antioxidantes* (superóxido dismutase, catalase e sistema glutathione peroxidase/glutathione redutase). As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular, pois eliminam $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e hidroperóxidos que poderiam oxidar os substratos celulares, prevenindo as reações em cadeia dos radicais livres, através da diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo (Yu, 1994).

A primeira defesa contra o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é a enzima **superóxido dismutase** (SOD). A SOD, como já apresentando, dismuta o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 e O_2 . Nos mamíferos, existem duas isoenzimas de SOD; a Cu-Zn-SOD, que localiza-se primariamente no citosol e a Mn-SOD encontrada de forma mais pronunciada na matriz mitocondrial (Halliwell, Gutteridge, 1989).

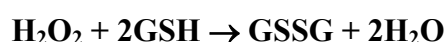
Ambas enzimas catalisam a dismutação do radical $O_2^{\bullet}$ com eficiência similar (Powers et al., 1999). A literatura indica que a atividade da SOD é mais pronunciada nos músculos com capacidade oxidativa elevada (maior porcentagem de fibras do tipo I e IIa), em comparação com músculos com baixa capacidade oxidativa (com grande percentual em fibras do tipo IIb) (Criswell et al., 1993; Powers et al., 1994).

O H_2O_2 é desidratado enzimaticamente a H_2O e O_2 molecular pela enzima *catalase* (CAT), conforme mostrado abaixo:



A CAT é encontrada, sobretudo, nos hepatócitos e eritrócitos, estando presente em grandes concentrações nos peroxissomas e em baixas concentrações nas mitocôndrias (Halliwell, Gutteridge, 1989). Sua atividade também é maior nos músculos com capacidade oxidativa mais elevada (Powers et al., 1994).

A outra enzima responsável pela detoxificação do H_2O_2 , *glutathione peroxidase* (GPX), tem menos especificidade para o substrato, reduzindo também hidroperóxidos a álcool. O K_m para H_2O_2 da CAT e GPX também 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). Nas duas reações catalisadas pela GPX, a glutathione reduzida (GSH) funciona como doador de elétrons:



A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Quando GSH é oxidada pela reação da GPX, há a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, com formação de glutathione oxidada (GSSG). Queda nos níveis de GSH podem prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão GSH/GSSG alta. Para isso, a GSSG formada é reduzida novamente a GSH, às custas de NADPH, pela ação da enzima *glutathione reductase* (GR):



Em muitos tecidos, o NADPH é produzido pela enzima glicose-6 fosfato desidrogenase. Contudo, na musculatura esquelética a via principal advém da ação da enzima isocitrato desidrogenase (Powers et al., 1999). A atividade da GPX é variada, estando presente tanto nas fibras musculares mais oxidativas (tipo I) quanto nas mais glicolíticas (tipo IIb) (Ji et al., 1988). Similarmente à SOD, GPX está localizada no citosol e na mitocôndria. No músculo esquelético,

aproximadamente 45% da atividade da GPX é encontrada no citosol, sendo que os demais 55% de atividade ocorrem na mitocôndria (Ji et al., 1988). A GR possui uma distribuição similar a GPX. Embora não seja considerada uma das enzimas principais do sistema enzimático antioxidante, ela é fundamental para a atuação normalizada da GPX.

A *Figura 4* apresenta um esquema das reações catalisadas pelas enzimas do sistema antioxidante:

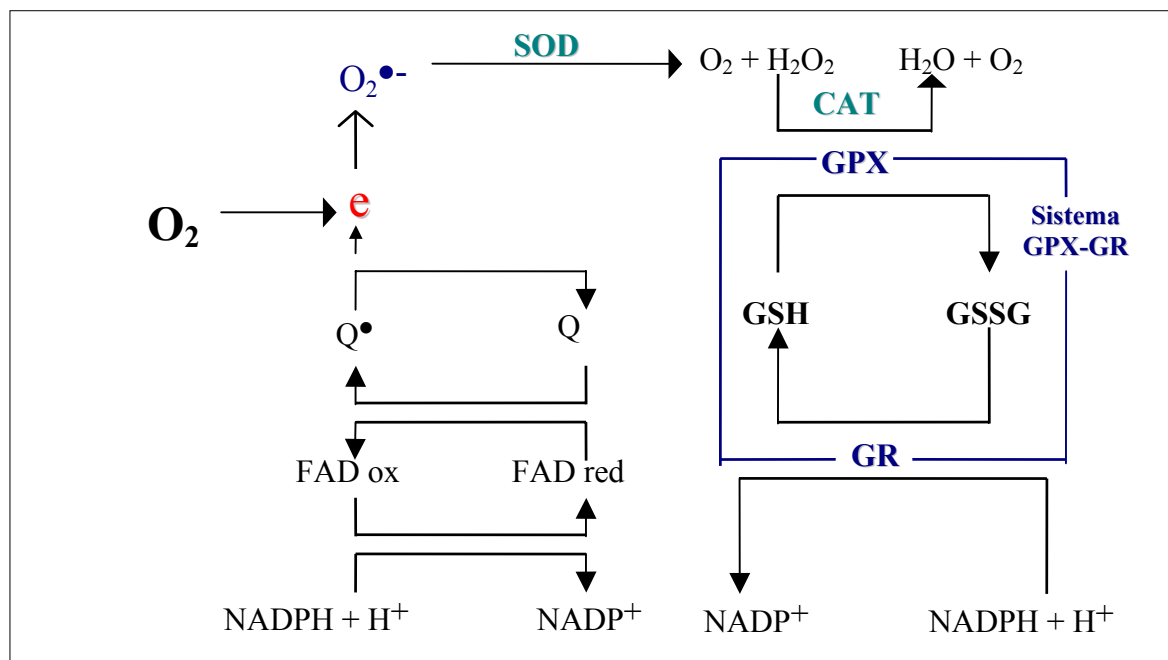


Figura 4. Formação do radical ânion superóxido e a ação das enzimas antioxidantes. Adaptado de Jenkins, Goldfarb (1993).

1.5- Relações Entre Exercício Físico, Estresse Oxidativo e Sistema Enzimático Antioxidante

Pelo exposto acima, fica evidente que a sobrevivência celular frente ao ataque dos radicais livres dependerá de um equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação das espécies reativas. Qualquer circunstância que desequilibre estes dois processos induzirá a instalação de uma condição chamada de **estresse oxidativo**, quando prevalecerá a formação de oxidantes aos antioxidantes (Alessio, 1993). Neste caso, o acúmulo de reações de oxidação pode induzir alterações severas em várias estruturas celulares.

A ação das EROs sobre o sistema enzimático antioxidante parece ter relação direta com seu nível de produção (Alessio, 1993; Smolka et al., 2000; Ji, 2002). Vários trabalhos da literatura mostraram que indivíduos ou animais adaptados a um protocolo de treinamento possuíam níveis mais elevados de enzimas antioxidantes e certos oxidantes não enzimáticos no músculo, demonstrando uma resistência maior ao estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (Sen, 1995, Radák et al., 1999, Smolka et al., 2000; Ji, 2002). Por outro lado, vários autores também mostraram um efeito inibitório na atividade dessas enzimas numa situação de exercício exaustivo, com aumento na concentração de produtos de ataque oxidativo (Davies et al., 1982; Sjödin et al., 1990; Ji et al., 1992; Smolka et al., 2000). A modulação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em resposta ao treinamento físico tem sido descrita principalmente para o treinamento de *endurance*, caracterizado por volumes maiores e intensidades moderadas (Alessio, Goldfarb, 1988; Ji et al., 1988; Laughlin et al., 1990; Criswell et al., 1993; Sen et al., 1994; Powers et al., 1994; Tiidus, 1996). Já o treinamento de alta intensidade raramente é abordado quanto a sua influência sobre a modulação da defesa antioxidante, sendo pobremente descrito, com resultados ainda discrepantes.

Powers e colaboradores (1994) mostraram que ratos treinados exibiam alterações na atividade de enzimas antioxidantes específicas para cada músculo, encontrando também relação entre duração das sessões de treinamento maiores do que 60 min com o aumento da atividade da SOD no músculo sóleo e da GPX no músculo gastrocnêmio vermelho. Criswell e colaboradores (1993) compararam um treinamento intervalado (a aproximadamente 80-95% do $\text{VO}_{2\text{max}}$) com um treinamento contínuo de menor intensidade (70% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$), identificando aumentos na atividade da GPX no músculo sóleo apenas para o grupo intervalado, enquanto a SOD teve sua atividade no músculo sóleo aumentada para os dois tipos de treinamentos. Atalay e colaboradores (1996) observaram aumentos nos níveis de glutathione total e nas atividades das enzimas GPX e GR em músculos de fibras rápidas e mistas de ratos submetidos a um treinamento de alta intensidade. Hellsten e colaboradores (1996) observaram em humanos aumentos nas atividades das enzimas GPX e GR no músculo após 7 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade em bicicleta. Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que após 8 semanas, o treinamento de *endurance* foi mais eficiente que o treinamento intermitente em aumentar a atividade das enzimas CAT e GR no músculo sóleo de ratos, com um efeito inverso sobre a atividade da enzima citrato sintase como marcador de capacidade

oxidativa. Ou seja, o treinamento de *endurance* induziu um aumento menor na capacidade oxidativa que o treinamento intermitente, sugerindo que durante esse tipo de treinamento as próprias enzimas pudessem estar sendo atacadas pela maior quantidade de EROS formada (Smolka et al., 2000).

1.6- Proteínas “Heat Shock” Como Parte do Sistema de Defesa Antioxidante

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 genericamente de **proteínas de estresse** (Locke et al., 1990). O termo “proteína de estresse” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (Welch, 1993). As **Heat Shock Proteins** (HSPs) surgem na literatura como uma das classes de proteínas de estresse melhor estudadas. O aumento na expressão das HSPs foi inicialmente evidenciado em *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962), por meio de choque térmico (incubação em diferentes temperaturas elevadas). Hoje já se conhece que a resposta *heat shock* é uma propriedade geral de todas as células, tanto em condição de hipertermia quanto de demais estados de alteração homeostática, tais como exposição a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição de glicose para fornecimento de energia às células, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos, estresse oxidativo, presença de toxinas, etc. (Schlesinger, 1986; Bienz, Pelham, 1987; Welch, 1992; Yellon, Marber, 1994).

As HSPs são de fundamental importância para a sobrevivência das células, não apenas em condição de estresse, onde se vê aumento na síntese de proteínas dirigidas à reparação de danos celulares, mas também em eventos de transporte e enovelamento (*folding*) de proteínas em formação (Neupert et al., 1990; Gething, Sambrook, 1992; Craig, 1993; Morimoto, 1993; Stuart et al., 1994; Terlecky, 1994). Por isso, são também denominadas de “*chaperonas moleculares*” (Flaherty et al., 1990; Hendrick, Hartl, 1993; Hall, 1994). Algumas classes de proteínas de estresse são constitutivas, sendo denominadas de *proteínas cognatas*. As proteínas cognatas são membros constitutivos de famílias de proteínas de estresse que funcionam em condição fisiológica normal. Por exemplo, a Hsc70 é uma proteína cognata da classe HSP70. As famílias de proteínas com pesos moleculares de 72 kDa, 73 kDa e 90 kDa correspondem às maiores classes de proteínas de estresse expressas pelo organismo (Welch et al., 1983).

As chaperonas moleculares podem ser definidas como uma categoria de proteínas que asseguram a formação correta de outros polipeptídios, embora não sejam componentes próprios da estrutura funcional normal destes (Ellis, Van Der Vies, 1991). O grande problema de proteínas em formação e daquelas recém-sintetizadas é a exposição de suas superfícies interativas com o ambiente intracelular, que poderia facilitar contatos com outras moléculas, desencadeando alterações na conformação estrutural e funcional já programadas da proteína. As chaperonas moleculares têm como função principal assistir a autoformação e enovelamento de cadeias polipeptídicas, por inibição de vias alternativas de ligação de outras proteínas às cadeias que se formam, auxiliando na não formação destas interações incorretas. Os processos apresentados a seguir mostram a atuação geral de chaperonas em relação ao problema de superfícies interativas (Ellis, Van Der Vies, 1991):

- **Síntese de Proteínas.** A região amino-terminal de cada polipeptídio é sintetizada antes da região carboxila-terminal, podendo, nesta condição, haver a atuação de chaperonas interagindo com a proteína em formação, com o objetivo de impedir interações incorretas de elementos da própria estrutura protéica ou com outros componentes celulares.
- **Transporte de Proteínas.** Proteínas que adentram em organelas como retículo endoplasmático, mitocôndrias, plastídios e periplasmos bacterianos atravessam a membrana somente em um estado desdobrado ou semi-enovelado. As proteínas são sintetizadas por ribossomos citossólicos na forma de precursores, sendo que o transporte para o interior de determinada organela pode ser procedido apenas por intermédio de interação com uma chaperona.
- **Função Protéica.** Em muitas situações, o funcionamento normal de complexos oligoméricos envolve mudanças em interações subunidade-subunidade, de forma que exposições transitórias de superfícies de contato destes complexos podem ser mediadas por chaperonas moleculares.
- **Resposta de Estresse.** Estresse ambiental pode causar desnaturação de proteínas. Para a proteção contra o estresse imposto, as células acumulam proteínas que previnem a produção de agregados de proteínas desnaturadas.

Vigh e equipe (1998) sugeriram também que alterações nas propriedades físicas (fluidez e viscosidade) de membranas biológicas pelo aumento na temperatura interna poderiam influenciar

a expressão de genes *heat shock*. Contudo, esta resposta homeostática de organização da membrana parece ser transitória, com duração de poucas horas; o acúmulo de HSPs específicas nas regiões de alteração induziria um aumento na rigidez da membrana, a fim de que esta possa recuperar suas características normais de fluidez; após o restabelecimento das condições pré-estresse, a membrana inativaria os sinais de perturbação e finalizaria a síntese de HSPs. Nesse sentido, Ryan e colaboradores (1991) propuseram que a quantidade de proteínas de estresse HSP70 sintetizadas parece ser dependente da severidade do estresse submetido ao organismo e do nível celular de HSPs existente anteriormente à condição de estresse. Postularam também que a síntese de HSP70 em células expostas ao calor sofre uma redução quando as mesmas células são subsequenteiramente expostas a um segundo estresse térmico. Tal condição adaptativa foi chamada de ***termotolerância adquirida*** (Gerner, Scheneider, 1975), sendo uma importante resposta de regulação térmica ambiental nos mamíferos. O início da atenuação das alterações celulares que podem ser induzidas pelo calor excedente parece ser dependente da presença de HSPs constitutivas no estado pré-estresse (Li et al., 1983; Craig, 1985).

E qual seria a natureza molecular dos “termômetros celulares” que sinalizam a transcrição das HSPs? Hightower (1991) descreveu três possíveis mecanismos:

- Estudos com *Escherichia coli* revelaram que danos celulares são reparados em função de três HSPs - DnaK, DnaJ e GrpE, por aumentar a quantidade do “fator de transcrição *heat shock* σ^{32} ”. A proteína de estresse DnaK é o homólogo bacteriano da família HSP70 eucariótica. Propõe-se que haja uma ligação entre o fator de transcrição σ^{32} e as proteínas de estresse constitutivas, providenciando um complexo regulatório para monitorar a demanda de HSPs.
- O ribossomo poderia ser um sensor de controle para respostas de estresse, gerando a síntese de cadeias polipeptídicas parcialmente dobradas. Tais cadeias polipeptídicas seriam identificadas como proteínas defeituosas ou desnaturadas, vindo a induzir a expressão de HSPs.
- A regulação da transcrição das HSPs poderia ser controlada pelo fator *heat shock* (HSF), presente no citoplasma, que teria a capacidade de ligação com o elemento *heat shock* (HSE), situado no núcleo. Esta, aparentemente, é a hipótese mais aceita e está apresentada na *Figura 5*.

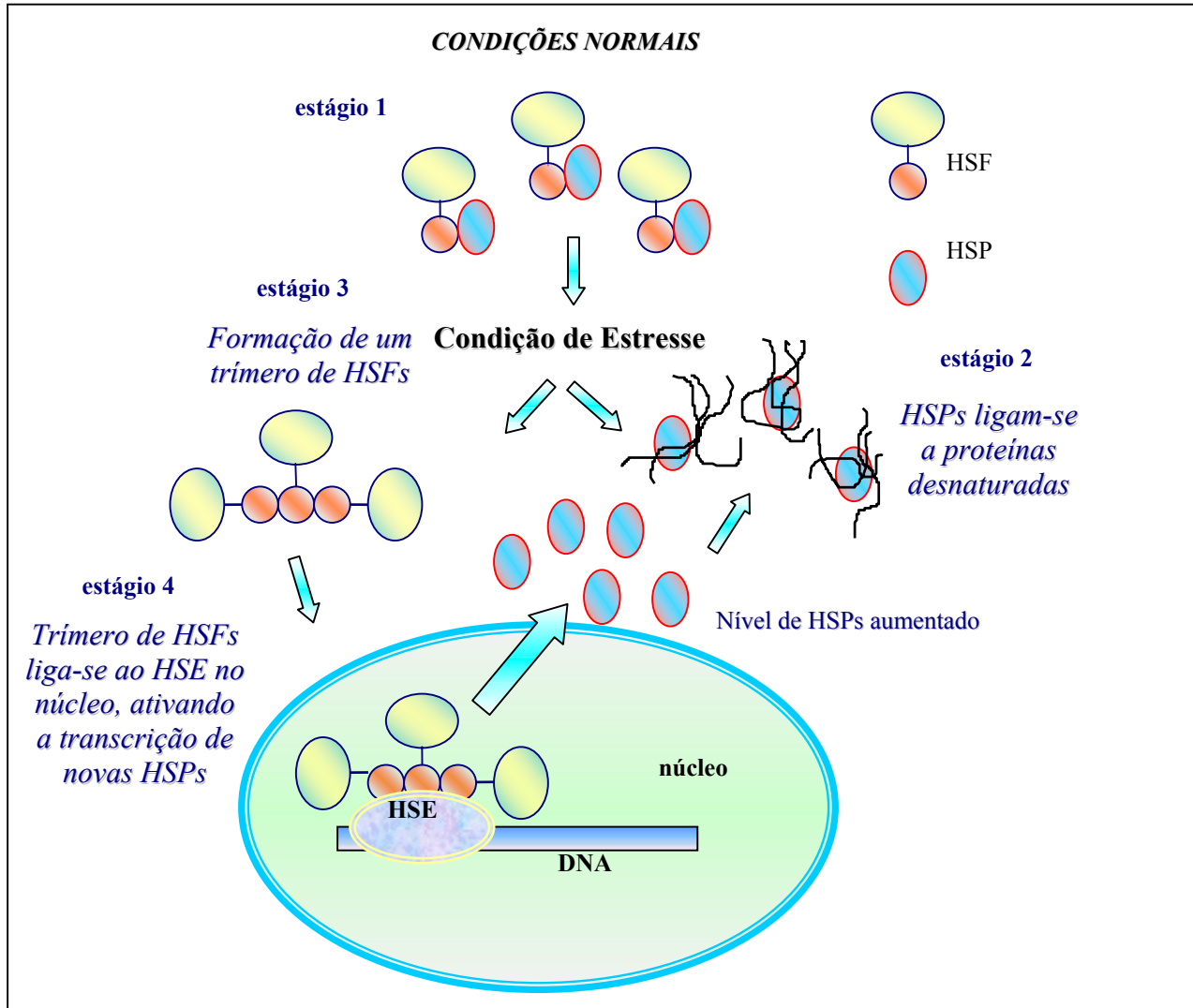


Figura 5. Modelo especulativo para a ativação do fator heat shock em condições de estresse.

Segundo essa proposta, em condições homeostáticas normais as HSPs estão ligadas ao fator *heat shock* (HSF) (*estágio 1*). O HSF pode ser definido como um fator de ativação transcricional, presente no citoplasma em estado monomérico e sem atividade de ligação ao DNA. Em resposta a hipertermia ou a outra condição de estresse há um aumento de proteínas desnaturadas no citoplasma, induzindo um desacoplamento do complexo HSP-HSF. O desacoplamento ocorre em virtude das HSPs constitutivas buscarem ligação com as proteínas desnaturadas, pois sua função é prevenir que tais proteínas desnaturadas agreguem-se em interações deletérias com outras proteínas, que poderiam ocasionar uma condição de estresse

maior (*estágio 2*). Contudo, para que o HSF desencadeie o processo de síntese das HSPs, ele deve adentrar-se no núcleo celular e ligar-se ao elemento *heat shock* (HSE); a entrada do HSF no núcleo só é possível através de sua transição de um estado monomérico (desativado) para um estado oligomérico (ativado) (*estágio 3*). As HSPs regulam o estado de oligomerização do HSF (e assim sua capacidade de ligar-se ao DNA), através da ocultação da superfície de trimerização; uma vez havendo a ligação das HSPs constitutivas com proteínas desnaturadas no citoplasma, a superfície de trimerização fica exposta, tornando possível a formação de trímeros de HSF. Em um estágio subsequente, ocorre a entrada destes trímeros no núcleo e a imediata ligação aos HSEs do DNA, ativando a transcrição das HSPs (*estágio 4*). A síntese de HSPs induzida por um estado de hipertermia é proporcional a duração e severidade do estresse (Storti et al., 1980; Didomenico et al., 1982; Lindquist, 1986; Sorger, 1991; Morimoto, 1993; Feige, Polla, 1994).

Sobre a atividade das proteínas de estresse em situação de exercício físico pouco se sabe ainda. 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 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 quando essa produção exceder a capacidade de defesa, a síntese de HSPs poderia complementar a defesa enzimática antioxidante pré-existente do organismo (Essig, Nosek, 1997). Nesse sentido, resultados prévios de nosso laboratório mostraram aumento na concentração de proteínas carboniladas e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase 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).

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 sequencial após uma atividade contrátil contínua, sendo 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.

1.7. Efeitos das EROs Sobre a Contração Muscular

Parece existir uma situação de dualidade quando se analisa a ação das EROs no organismo; ao mesmo tempo em que iniciam o processo de peroxidação lipídica de membranas, também sinalizam a síntese de HSPs, para proteção da célula aos danos celulares. Por exemplo, aumentos na produção de EROs, numa condição onde haja uma grande demanda de ATP, como em contrações musculares repetitivas, poderá causar fadiga muscular pela desnaturação de proteínas do mecanismo de liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático; simultaneamente, os radicais livres participarão em vias de sinalização para indução transcricional de HSPs, com o objetivo de diminuir os prejuízos do aumento nos níveis de estresse oxidativo em proteínas do retículo sarcoplasmático em uma subsequente atividade contrátil similar (Essig, Nosek, 1997).

Contribuindo com esta abordagem, Davies e equipe (1982) apontaram também que, apesar do exercício exaustivo resultar em decréscimo no controle respiratório mitocondrial, perda de integridade dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático e aumento nos produtos de peroxidação lipídica, microlesões induzidas por radicais livres, em situação de treinamento crônico poderiam providenciar um estímulo para a biogênese mitocondrial como resultado de um treinamento de *endurance*. Assim, na metade da década de 90 começou a ser proposto que as EROs exercem um efeito bifásico sobre as funções contráteis de músculos esqueléticos não fadigados (Essig, Nosek, 1997; Reid, 2001). Mostrou-se que baixos níveis de EROs, presentes em condições basais, eram essenciais para a produção normal de força, pois sua depleção seletiva, pela adição de SOD ou CAT diminuía essa produção. Contrariamente, um aumento modesto na produção de EROS aumentou a força produzida. Este efeito positivo, entretanto, foi revertido em altas concentrações de EROs, sendo que a produção de força caiu de uma maneira tempo e dose-dependente. Esses efeitos negativos foram inibidos pelo pré-tratamento do músculo com antioxidantes e revertidos pela administração de agentes redutores (Andrade et al., 1998; Reid et al., 1993).

Todas essas observações com o músculo não fadigado e fadigado levaram à proposição do modelo homeostático mostrado na *Figura 6*. Este modelo assume que o estado redox citosólico é uma variável regulada fisiologicamente, sendo balanceado pela produção de oxidantes e capacidade de tamponamento antioxidante. Esse modelo prediz que existe um estado redox intracelular que é ótimo para a geração de força. Qualquer desvio desse estado ótimo é prejudicial para a força produzida. Essas relações são aplicáveis para outras variáveis reguladas homeostaticamente, tais como pH, temperatura ou osmolaridade, sendo aparentemente consistentes com o que já sabemos sobre os efeitos de EROs sobre a contração.

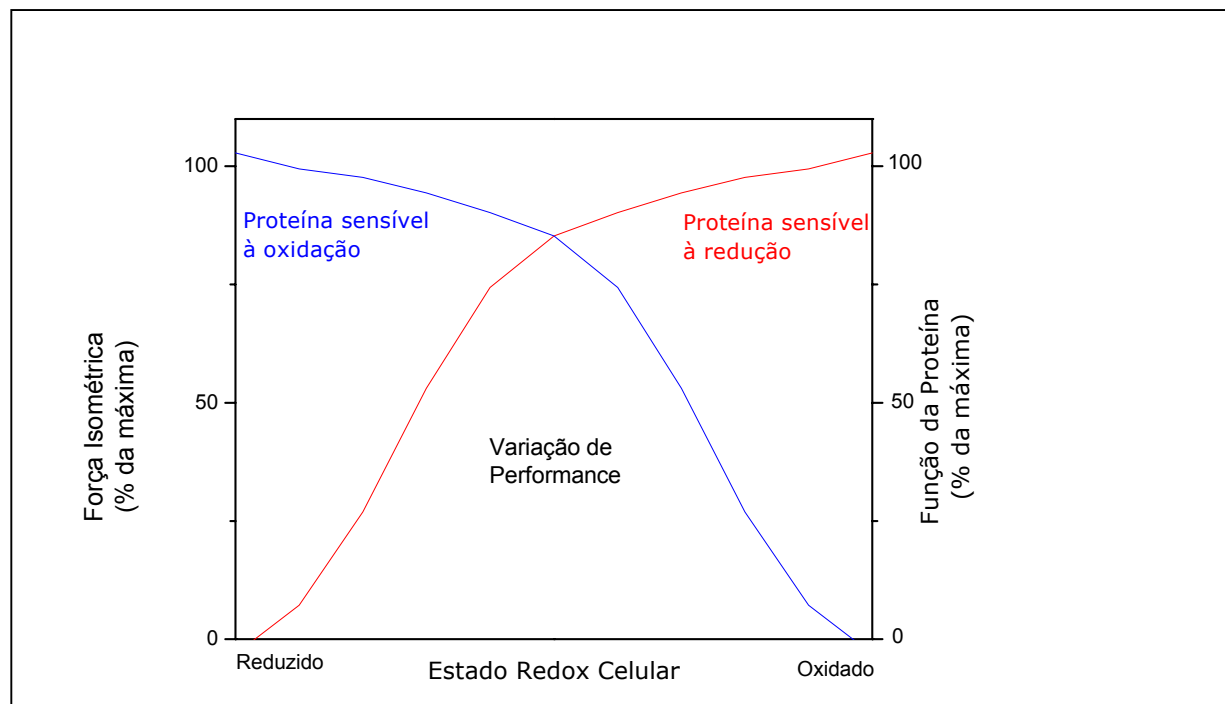


Figura 6 – Modelo de mecanismo de dois componentes redox que limitam a força isométrica. As linhas representam a alteração funcional de duas proteínas hipotéticas reguladoras da contração muscular. Uma é limitada pela oxidação e outra pela redução. O modelo assume que ambas são essenciais para o desenvolvimento da força, embora tenham efeito independente. As curvas estado redox/função definem o limite máximo de desenvolvimento da força ao longo da variação do estado redox. (Adaptado de Reid, 2001).

Por sua vez, a maior utilização das fibras musculares durante o exercício físico também as torna mais susceptíveis a lesões. De fato, já está bem documentado em várias espécies animais que atividades exercidas acima da intensidade habitual de esforço induzem níveis de alteração ou lesão musculares elevados (Clarkson, Tremblay, 1988). Vários autores já relataram a ocorrência de tais lesões após esforço intenso: diretamente, através de alterações histológicas no sarcômero, ou indiretamente, pela quantificação no plasma de proteínas musculares específicas, como mioglobina, a enzima lactato desidrogenase e principalmente a enzima creatina quinase (Jacobs et al., 1987; Apple et al., 1988; Volfinger et al., 1994).

Em revisão feita por Pyne (1994), o autor apontou duas hipóteses para explicar a lesão muscular induzida pelo exercício físico. A primeira argumenta que o extravazamento de proteínas musculares para o plasma deve-se principalmente ao estresse mecânico, provocado pelo processo de contração muscular. Assim, o ciclo contração-relaxamento executado pelas miofibrilas, ocasionando contínuo alongamento e encurtamento do sarcômero, seria suficiente

para alterar a estrutura da membrana celular. A outra hipótese propõe que esta perda de integridade deve-se, sobretudo, a um estresse metabólico, consequência de um ataque de EROs ao sarcolema, ocasionando um processo de lesão oxidativa na membrana (Pyne, 1994; Frankiewicz-Jozko, 1996). A liberação de proteínas musculares, tais como a creatina quinase (CK) é tida como uma evidência de dano muscular, pois normalmente esta enzima é incapaz de atravessar membranas celulares. Desta forma, considera-se que a liberação de CK, via vasos linfáticos, refletiria alterações importantes ocorridas na estrutura das membranas, tornando-as mais permeáveis a grandes moléculas tais como as proteínas.

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O desafio principal no desenvolvimento de metodologias de treinamento físico encontra-se em saber efetivar uma seqüência de estímulos, baseada na relação entre esforço físico e período de regeneração, que propicie ao organismo a aquisição de uma condição funcional favorável para a mobilização de esforços mais elevados com um custo energético menor (Fry et al., 1992; Viru, 1994; Zatsiorsky, 1995). Nesse sentido, o grupo de pesquisadores do Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX), do qual faço parte, tem como principal objeto de interesse responder se as respostas induzidas por diferentes protocolos de exercício podem ser quantificadas através de biomarcadores de estresse e, desta forma, serem aplicadas para o diagnóstico de excesso de treinamento em atletas. Para isso, temos analisado ao longo desses anos diferentes biomarcadores sanguíneos e musculares dos sistemas oxidativo, oxidante e antioxidante em diferentes situações de exercício físico, tais como exercício exaustivo agudo, treinamento contínuo e treinamento intermitente. As análises são feitas em ratos correndo em esteira rolante e em atletas de futebol, vôlei e atletismo, fruto de um trabalho integrado e em equipe de todo o grupo. O objetivo geral é verificar quais biomarcadores são mais eficientes na determinação de sucesso adaptativo ou não, de uma forma confiável e aplicável nos esportes.

Desta forma, o projeto de pesquisa do LABEX prevê o desenvolvimento de uma nova tecnologia de avaliação física, denominada de **Limiar de Estresse**, a ser aplicada em atletas. A determinação do Limiar de Estresse estaria baseada no acompanhamento, ao longo do período de treinamento, da evolução individual dos níveis sanguíneos de biomarcadores de ataque oxidativo e defesa contra radicais livres de O_2 , combinado com os níveis de biomarcadores de lesão muscular e *status* metabólico. A idéia é poder modular a intensidade do treino, independente da metodologia utilizada, através da análise combinada das respostas desses marcadores sanguíneos somente naqueles atletas detectados no limiar de estresse.

Para o desenvolvimento da técnica proposta, um dos objetivos da presente tese foi elaborar dois protocolos de treinamento distintos entre si (contínuo e intermitente) 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) e amostras de sangue em momentos diferentes ao longo das onze semanas de compreenderam esses protocolos. É importante ressaltar que não

existe ainda na literatura um trabalho com essa abordagem experimental. Devido ao número excessivo de amostras, esse trabalho foi dividido entre os pesquisadores, cabendo a mim a análise dos biomarcadores sanguíneos ao longo dos dois protocolos. 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 profissional de um time da primeira divisão durante o Campeonato Brasileiro de 2002.

Os biomarcadores analisados no sangue (plasma, hemáceas e leucócitos totais) foram os seguintes:

- **Sistema de defesa antioxidante:** expressão de HSP70 em leucócitos totais, atividade das enzimas glutathione redutase (GR) e catalase (CAT) no hemolisado de hemácias, concentrações plasmáticas de grupamentos sulfidrilas totais (GST) e ácido úrico;
- **Ataque e dano oxidativo:** concentrações plasmáticas de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteínas carboniladas.
- **Níveis de alteração muscular:** atividade plasmática das enzimas creatina quinase (CK) e transaminase glutamato-oxaloacetato (TGO);
- **Estresse metabólico:** concentrações plasmáticas de uréia e creatinina.

Dessa forma, os **objetivos específicos** da presente tese foram:

- Padronizar as técnicas de isolamento de leucócitos do sangue total;
- Padronizar as técnicas de detecção da expressão de HSP70 em leucócitos totais;
- Monitorar biomarcadores sanguíneos de estresse oxidativo, metabólico e de alteração muscular em diferentes tempos após um protocolo de exercício agudo exaustivo;
- Treinar os ratos em protocolos distintos de exercício físico, que pudessem induzir tanto adaptação ao treinamento quanto um desbalanço entre treino/recuperação, permitindo um estudo global dos eventos adaptativos a essas duas situações;
- Monitorar os efeitos desses dois protocolos em biomarcadores sanguíneos de estresse oxidativo, metabólico e de alteração muscular ao longo das onze semanas de treinamento;
- Monitorar e avaliar a técnica de limiar de estresse em jogadores de futebol ao longo de cinco meses do Campeonato Brasileiro através dos mesmos biomarcadores analisados nos animais.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Utilizamos ratos machos Wistar, obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP, com 2 meses de idade no início dos protocolos de exercícios. Durante toda a execução dos protocolos, os ratos foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 18 - 22°C e fotoperíodo invertido de 12 horas, estando providos de ração de laboratório e água *ad libitum*.

3.2- Protocolos de Exercícios

3.2.1- Exercício Agudo

Procuramos compreender inicialmente como se daria o comportamento dos marcadores de estresse oxidativo em um organismo sedentário. Os ratos foram submetidos a uma única sessão de corrida em esteira rolante com inclinação de -3°. Porém, antes da realização desta sessão de corrida, realizamos um período de adaptação (1 semana) do animal com o equipamento, onde eles chegaram a correr por 5 minutos numa velocidade de 10m/min. Esta semana inicial teve como finalidade separar os animais que corriam voluntariamente daqueles que se recusavam a correr.

No final deste período de adaptação, os animais foram divididos em 6 grupos, compostos cada grupo por 5 animais (n = 5): grupo controle sedentário (CO), grupo sacrificado imediatamente após a exaustão (T0), grupo sacrificado 1 hora após a exaustão (T1), grupo sacrificado 2 horas após a exaustão (T2), grupo sacrificado 3 horas após a exaustão (T3) e grupo sacrificado 4 horas após a exaustão (T4). Desta forma, tivemos a oportunidade de analisar o comportamento cinético dos marcadores estudados ao longo de 4 horas após o exercício agudo. O exercício de exaustão consistiu de atividade contínua e com intensidade progressiva em esteira rolante, com duração de 1 hora, conforme apresentado na *Tabela 1*. Os animais de cada grupo foram sacrificados, para a coleta do sangue, de acordo com seus respectivos tempos de espera pós-corrida.

Tabela 1. Protocolo de exercício agudo.

Tempo	Velocidade
0 - 5 minutos	10 m/min
5 - 15 minutos	15 m/min
15 – 25 minutos	20 m/min
25 – 45 minutos	25 m/min
45 – 60 minutos	30 m/min

3.2.2- Proposta de Protocolos de Exercícios para Indução de “Overreaching”

Os protocolos de exercícios contínuo e intermitente tiveram onze semanas de duração cada um, divididos da seguinte maneira:

- **primeiras oito semanas:** exercícios realizados somente uma vez ao dia, com o objetivo de adaptar os animais;
- **três últimas semanas:** aumento na frequência diária de exercícios com a conseqüente diminuição no tempo de recuperação entre eles, com o objetivo de induzir uma situação de *overreaching* nos animais. A *Tabela 2* mostra os protocolos de treinamento realizados.
- Analisando a *Tabela 2*, podemos observar que os protocolos obedeceram cinco fases distintas ao longo das onze semanas:
- **primeiras quatro semanas (S4):** aumento na carga de esforço;
- **4ª a 8ª semana (S8):** exercícios diários com a mesma carga de esforço alcançada ao final da 4ª semana;
- **semana 2x/dia (9ª semana):** uma semana de exercícios com a mesma carga das semanas anteriores, 2 vezes ao dia, com intervalo de 4 horas entre eles.
- **semana 3x/dia (10ª semana):** uma semana com 3 sessões de treino ao dia, com intervalo de 3 horas entre eles;
- **semana 4x/dia (11ª semana):** uma semana com 4 sessões de treino ao dia, com intervalo de 2 horas entre eles.

Tabela 2. Protocolos distintos de treinamentos contínuo e intermitente aos quais os animais foram submetidos.

Contínuo				Intermitente				
Semanas	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Número de sessões diárias	Velocidade (m/min)	Tempo do Exercício (min)	Pausa (min)	Número de Repetições	Número de sessões diárias
1^a	15	20	1	20	5	2	4	1
2^a	20	30	1	30	2,5	1	4	1
3^a	22,5	45	1	32,5	2,5	1	6	1
4^a	25	60	1	35	2,5	1	6	1
5^a a 8^a	25	60	1	35	2,5	1	6	1
9^a	25	60	2	35	2,5	1	6	2
10^a	25	60	3	35	2,5	1	6	3
11^a	25	60	4	35	2,5	1	6	4

3.3- Preparo das Amostras dos Ensaios de Estresse Oxidativo

Após o animal ter sido anestesiado com hidrato de cloral (10%) via intraperitoneal, realizamos uma secção abdominal de forma que pudéssemos alcançar a veia hepática e coletar todo o sangue possível, que era depositado em tubos heparinizados. O animal, após a extração de sangue, era sacrificado por deslocamento cervical.

Para o preparo das amostras, 2/3 do sangue total obtido de cada animal era reservado para o isolamento dos leucócitos totais (ver item 3.10). Plasma e hemáceas eram obtidos após centrifugação, por 10 min a 3000 rpm, do sangue restante. O plasma obtido era separado e armazenado a -80°C após tratado com butilhidroxitolueno (BHT) 90µM, este que atua como um sequestrador específico de espécies reativas de oxigênio. Para a realização de duplicatas dos experimentos com plasma, alicotávamos os seguintes volumes: 40 µL para Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs); 400 µL para Proteína Carbonilada (PC); 100 µL para Grupamento Sulfidril (GS); 100 µL para creatina quinase

(CK); 300µL para as análises automatizadas (transaminase glutâmica oxaloacética-TGO; Ácido Úrico-AU; Creatinina-Cre; Uréia).

As hemácias eram lavadas com solução gelada de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e centrifugadas a 3000 rpm, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo era repetido três vezes. Aliquotas de 500 µL eram retiradas e hemolisadas com água destilada na proporção 1:1 (v/v), com posterior armazenamento a -80°C para as seguintes análises: catalase (CAT); glutathione redutase (GR); hemoglobina (Hb).

3.4- Dosagens Enzimáticas

3.4.1- Creatina Quinase

A concentração de CK no sangue reflete índices de lesão muscular. A dosagem deste parâmetro era realizada espectrofotometricamente (Boehringer Mannheim MPR 3 kit CK NAC-activated), através de 50 µL de plasma misturados com a solução reagente. A mistura era incubada em banho maria por 1 minuto a 37° C, sendo feita a leitura das absorvâncias em 334 nm.

3.4.2- Catalase

A preparação da amostra iniciava-se com a adição de 900 µL de tampão fosfato, pH 7,4, a 100 µL do hemolisado (1:1), obtendo-se, assim, uma diluição 1:20 da amostra inicial. Deste hemolisado, 1 µL era adicionado ao meio básico de reação, que continha tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da enzima, provocando uma diminuição no valor da absorbância em 240 nm. A diferença na leitura das absorvâncias a 240nm, em um determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite a determinação da velocidade de redução do H₂O₂, que é proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT (Aebi, 1984):

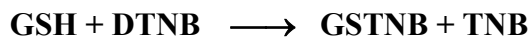
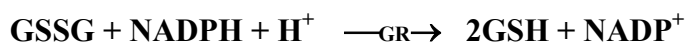


O cálculo da atividade da CAT foi feita pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde Δt é a variação do tempo de reação (15 s), a é o volume de hemolisado na cubeta, b é a concentração de hemoglobina da amostra em g/dL, A₁ é o

valor da absorbância no tempo zero ($t = 0$) e A_2 é o valor da absorbância no tempo final ($t = 15$ s). A unidade final expressa-se em k/gHb/min.

3.4.3- Glutathione Redutase

O ensaio era conduzido de acordo com Smith et al (1988). A preparação da amostra dava-se da mesma forma para a análise de CAT, com a diluição 1:20 do hemolisado armazenado a -80°C . Deste hemolisado, 5 μL era adicionado a um meio de incubação contendo KH_2PO_4 0,2 M e EDTA 2 mM, em pH 7,0. Adicionávamos ainda, para a ocorrência da reação, 50 μL de NADPH 2 mM, 250 μL de DTNB 3 mM e 50 μL de GSSG 20 mM. A formação de TNB era acompanhada por espectrofotômetro (Beckman - modelo DU 640) a 412 nm de absorvância. O princípio do método é baseado na redução do 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico), DTNB, com conseqüente aumento de TNB:



Para calcular a atividade da GR, utilizamos a seguinte equação: $E = 100 \times A/[\text{Hb}]$, onde E é a atividade da enzima em unidades internacionais (UI)/gHb, A é o número de unidades de enzima da amostra, sendo calculada pela equação: $\Delta A/13,6 \times V_h/V_c$ (onde ΔA é a diferença da absorbância a 412 nm em 1 minuto, 13,6 é o coeficiente de extinção do TNB a 412 nm, V_h é o volume de hemolisado na cubeta, V_c é o volume total da solução) e $[\text{Hb}]$ é a concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dL (Beutler, 1975). A unidade final expressa-se em UI/gHb/min.

3.5- Dosagem de Hemoglobina no Hemolisado

A determinação da concentração de Hb no hemolisado torna-se fundamental para a obtenção dos valores finais das atividades das enzimas do sistema antioxidante. Os valores eram obtidos através do método de Drabkin (Beutler, 1975), em que a Hb (100 μL da amostra preparada a partir do hemolisado 1:20, descrito no método da CAT), em presença de reagente de Drabkin (2 mL), forma um composto, a cianometahemoglobina, que é absorvida a 540 nm e cujo coeficiente de extinção milimolar é 11,5 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

3.6- Dosagem de Grupamentos Sulfidrilas Totais no Plasma

Os grupos sulfidrilas (SH) do plasma são estruturas associadas à proteína e, portanto, suscetíveis ao dano oxidativo. O método proposto por Faure e Lafond (1995) é baseado na redução do 5,5 ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB).

Adicionávamos a 50 µL de plasma 1 mL de tampão Tris-EDTA, pH 8,2. Realizávamos, em seguida, a primeira leitura (A1) espectrofotométrica a 412 nm. Após a leitura, depositávamos esta mistura em tubo de ensaio e acrescentávamos 20 µL de DTNB 10 mM diluído em metanol (4 mg/mL) e esperávamos 15 minutos para a realização de uma segunda leitura (A2). A amostra padrão (B) continha somente DTNB e tampão Tris-EDTA. O cálculo é efetuado pela seguinte equação: $(A2 - A1) - B$ (DTNB com metanol + meio) $\times 1,57 \text{ mM} \times 1.000$. A unidade final é expressa em µM.

3.7- Dosagens de Oxidações Celulares

3.7.1- Peroxidação Lipídica (TBARS)

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (Yagi, 1976).

A amostra era preparada de acordo com Yagi (1987), onde 20µL de plasma eram diluídos em 4 mL de H₂SO₄ (0,04M). Adicionava-se a esta diluição 0,5 mL de ácido fosfotungstico 10% e aguardavam-se 5 minutos para a centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante era descartado e suspensava-se o precipitado em 2 mL de H₂SO₄ (0,04 mL), seguindo da adição de 0,3 mL de ácido fosfotungstico 10%. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, descartava-se novamente o sobrenadante e dissolvia-se o precipitado em 0,5 mL de H₂O deionizada. Adicionava-se a essa mistura 1 mL da solução composta de ácido tiobarbitúrico 0,67% em ácido acético 50%. A amostra era incubada em banho maria 90°C por 1 hora. Após o resfriamento, era efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com 5 mL de butanol. A medida da emissão da fluorescência

da fase orgânica era feita a 553 nm, enquanto que o comprimento da onda de excitação era 515nm. O espectrofluorímetro utilizado era do modelo SPF-500CTM SLM Aminco (SLM Instruments, Inc). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva-padrão de tetraetoxipropano e os resultados foram expressos em nmol/mL de plasma.

3.7.2- Carbonilação de Proteínas

Os alcenos insaturados, produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal, podem reagir com os grupos sulfidrila formando tioésteres, que possuem grupos carbonila. O método utilizado foi o proposto por Lafond e Paure (1995), onde o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) complexa-se com os grupos carbonila das proteínas, formando bases de Schiff que absorvem a 380 nm de comprimento de onda.

Diluía-se 100 µL de plasma em 900 µL de H₂O deionizada. Adicionavam-se 2mL de ácido tricloroacético 20% para precipitação das proteínas. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, desprezava-se o sobrenadante e o precipitado era incubado durante 50 min a 37°C com 1 mL de DNPH 10 mM dissolvido em HCL 2 M. Paralelamente, os tubos contendo as amostras padrão (branco) sofreram o mesmo processo, sendo a solução de DNPH substituída por HCL 2M. Após a incubação, nova precipitação das proteínas era realizada com TCA 20%, lavando-se o precipitado 3 vezes com uma solução de etanol/acetato de etila (1:1). O sedimento final era ressuspendido com 1 mL de guanidina 6M dissolvida em tampão fosfato de potássio 2 mM, pH 2,3 corrigido com ácido trifluoroacético. A leitura espectofotométrica era realizada a 380 nm. Para o cálculo da concentração de proteínas carboniladas, utilizou-se o coeficiente de extinção molar descrito na literatura ($\epsilon = 22.000/M/cm$) por Faure e Lafond (1995). Os valores foram expressos em µM.

3.8- Dosagens de Parâmetros Metabólicos

As análises de transaminase glutâmica oxaloacética, creatinina, uréia e ácido úrico foram realizadas no aparelho Autolab PM 4000, através de kits de análises clínicas específicos: TGO – kit QUIMIAST, uréia e creatinina – kit QUIMIURE, ambos da Böehringer Mannheim, e ácido úrico – kit específico Roche.

3.9- Preparo das Amostras de Leucócitos Totais para Eletroforese

O sangue reservado para a preparação das amostras de leucócitos totais (2/3 do volume do sangue coletado) era misturado em volume proporcional a solução salina balanceada de Hanks (HBSS). Após, colocávamos para cada tubo de ensaio 3,5 mL de Histopaque (1119 - SIGMA Diagnostics) e 7 mL da mistura sangue-HBSS e centrifugávamos a 1500 rpm durante 30 min. Os leucócitos totais eram coletados e lavados 3 vezes com HBSS a 1500 rpm por 10 min cada lavagem. As células eram lisadas em 400µL de tampão Tris-HCl 0,18M (pH 6,8), contendo SDS 6,9%, glicerol 30%, DTT 0,2M, bromofenol blue 0,001%, uréia 6M, PMSF 0,002M e EDTA 0,005M.

3.10- Dosagem de Proteínas das Amostras de Leucócitos Totais

As proteínas totais das amostras de leucócitos eram dosadas pelo método de Bradford (1976), antes da colocação do tampão de lise.

3.11- Eletroforese para Detecção de Expressão das Proteínas de Estresse em Leucócitos Totais

A eletroforese em gel de poliacrilamida era realizada pelo método descrito por Laemmli (1970). O gel de empacotamento tinha concentração de 5% de acrilamida, sendo 11% a concentração do gel de separação (running gel). As placas eram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (Bio Rad, CA, USA) a 30% e N-N-metileno-bisacrilamida estoque (Bio Rad, CA, USA) a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore - Water Corporation, MA, USA), filtradas em papel de filtro (Whatman número 1) e mantidas a 4°C em frasco âmbar. As eletroforeses SDS-PAGE eram realizadas em sistema SE 400 (16x14 cm) da Hoefer (CA, USA).

A eletroforese ocorria utilizando-se tampão de corrida (Tris-HCL 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1%, sendo o pH desta solução não acertado). A voltagem utilizada compreendia 90V e 200V (SE-400) para o gel de empacotamento e gel de corrida, respectivamente.

O gel do sistema de placas foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) durante três horas. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v). Para a realização do “Western Blot”, o gel não foi corado, passando diretamente para o procedimento de transferência para a membrana de nitrocelulose.

3.11.1- Padronização da Preparação de Amostras de Leucócitos Totais e da Técnica Eletroforética

Apesar de já termos apresentado as técnicas de preparação das amostras de leucócitos totais e de eletroforese, achamos conveniente relatar como se deu a padronização de todo o processo. O nosso primeiro passo foi padronizar a preparação das amostras de leucócitos totais. Para tanto, buscamos na literatura os métodos mais utilizados. A *Tabela 3* apresenta os três métodos de preparação das amostras de leucócitos utilizados por nós em um primeiro momento.

Tabela 3. Métodos de isolamento de leucócitos totais.

Locke et al. (1990) <i>(Método 1)</i>	Adaptado de Rao et al. (1999) <i>(Método 2)</i>	Ryan et al. (1991) <i>(Método 3)</i>
10 mL de sangue total diluídos em 3,5 mL de Ficoll-Hypaque	Diluição do sangue total em HBSS na proporção 1:1	20 mL de sangue total diluídos em 10 mL de Ficoll-Hypaque (1:0,5 - Ficoll:sangue)
Centrifugação: 1.300 rpm por 30/40 minutos	Diluição da mistura sangue: HBSS em Ficoll-Hypaque na proporção 1:0,5	Centrifugação 3.000 rpm por 30 minutos
Leucócitos coletados e lavados 3 vezes com PBS (1.300 rpm por 10 min)	Centrifugação: 400 x g por 30 min	Leucócitos coletados e lavados 3 vezes com HBSS (1.500 rpm por 5-7 minutos)
Células lisadas em 400 µL do tampão de Rodenhiser	Leucócitos coletados e lavados 3 vezes com HBSS (100 x g por 10 min)	Células lisadas em 400 µL de tampão de Laemli
	Células lisadas em 400 µL de tampão pesquisado em nosso Laboratório	

A única diferença entre nossa forma de isolamento de leucócitos e os métodos apresentados na *Tabela 3* encontra-se no tipo de agregador de leucócitos. Os métodos descritos relatam a utilização de Ficoll-Hypaque. O agregador de leucócitos utilizado em nossos experimentos foi Histopaque (1119 - SIGMA Diagnostics).

A *Tabela 4* apresenta os tampões de amostra utilizados para a diluição dos leucócitos coletados, de acordo com os respectivos métodos vistos na tabela anterior:

Tabela 4. Tampões de amostra para diluição dos leucócitos totais, de acordo com os seus respectivos métodos de isolamento.

Tampão - Método 1	Tampão – Método 2	Tampão - Método 3
• Uréia 9 M • PMSF 0,001M • β-Mercaptoetanol 5% • 0,001% Bromofenol Blue	• Tampão Tris-HCl 0,18 M (pH 6,8) • SDS 6,9% • Glicerol 30% • DTT 0,2M • Bromofenol Blue 0,001% • Uréia 6 M • PMSF 0,002 M • EDTA 0,005 M	• Tampão Tris-HCl • 0,0625 M (pH 6,8) • SDS 2% • Glicerol 10% • 2-Mercaptoetanol 5% • Bromofenol Blue 0,001%

A diferença essencial entre os métodos reside na diluição do sangue total. O método de Rao e colaboradores (1999) utiliza solução salina balanceada de Hanks (HBSS) em diluição 1:1 (sangue:HBSS). Tal diluição parece facilitar a extração de leucócitos totais, ficando a “nuvem” de leucócitos menos impregnada de eritrócitos em relação a amostras obtidas diretamente da diluição entre sangue total e Histopaque. Porém, quando se utiliza de HBSS não há a separação do plasma após centrifugação, pois HBSS e plasma ficam retidos na primeira camada de separação. Esta condição impossibilita a realização das análises dos marcadores plasmáticos de ataque oxidativo e metabólicos. Desta forma, quando conseguíamos obter cerca de 12-14 mL de sangue total de cada animal, reservávamos 1/3 deste sangue obtido para uma centrifugação sem o tampão HBSS,

coletando, assim, o volume plasmático. Em casos onde não obtínhamos tal volume de sangue total, optávamos pela extração de leucócitos totais com diluição direta 1:1 entre Histopaque e sangue total.

O que torna evidente um método do outro é o tipo de tampão de amostra utilizado. Resultados preliminares de nosso Laboratório (Smolka, 2000) mostraram que a inclusão de Uréia 6M, para efetuar lise mais efetiva das proteínas, e de PMSF 0,002M e EDTA 0,005M, para melhor conservação da amostra (*Método 2*), proporcionavam uma melhor qualidade eletroforética quando as amostras ficavam armazenadas por um longo período.

As amostras de leucócitos totais foram testadas em gel SDS-PAGE conforme o método de Laemli (1970). Dosagem da concentração de proteínas totais das amostras foram feitas pelo método de Bradford (1976). Utilizamos concentrações de 5% para o gel de empacotamento e 12,5% para o gel de separação das proteínas:

Tabela 5. Preparação do Gel SDS-PAGE.

	Gel 5%	Gel 12,5%
Acrilamida:Bis-Acrilamida (30:0,8)	1,67 mL	12,5 mL
Tris 1M pH 6.8	1,25 mL	11,2 mL
SDS 20%	0,05 mL	0,15 mL
H ₂ O destilada	7 mL	6,2 mL
TEMED	15 µL	20 µL
Persulfato de Amônia (PSA) 0,1M	120 µL	250 µL

A eletroforese permite o isolamento de proteínas segundo sua carga elétrica e peso molecular. As eletroforeses SDS-PAGE foram realizadas em sistema SE 400 (16x14 cm) da Hoefer (CA, USA), com tampão de corrida Tris-HCL 0,025M, Glicina 0,192M e SDS 0,1%. A voltagem utilizada compreendeu 90V e 200V (SE-400) para o gel de empacotamento e gel de corrida, respectivamente.

O gel do sistema de placas foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) durante três horas. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v). Para a realização do “Western Blot”, o gel não foi corado, passando diretamente para o procedimento de transferência para a membrana de nitrocelulose.

Para testar e comparar a eficácia dos tampões de diluição das amostras dos diferentes métodos, realizamos procedimentos eletroforéticos com amostras de sangue de ratos. A *Figura 7* apresenta um padrão dos resultados obtidos:

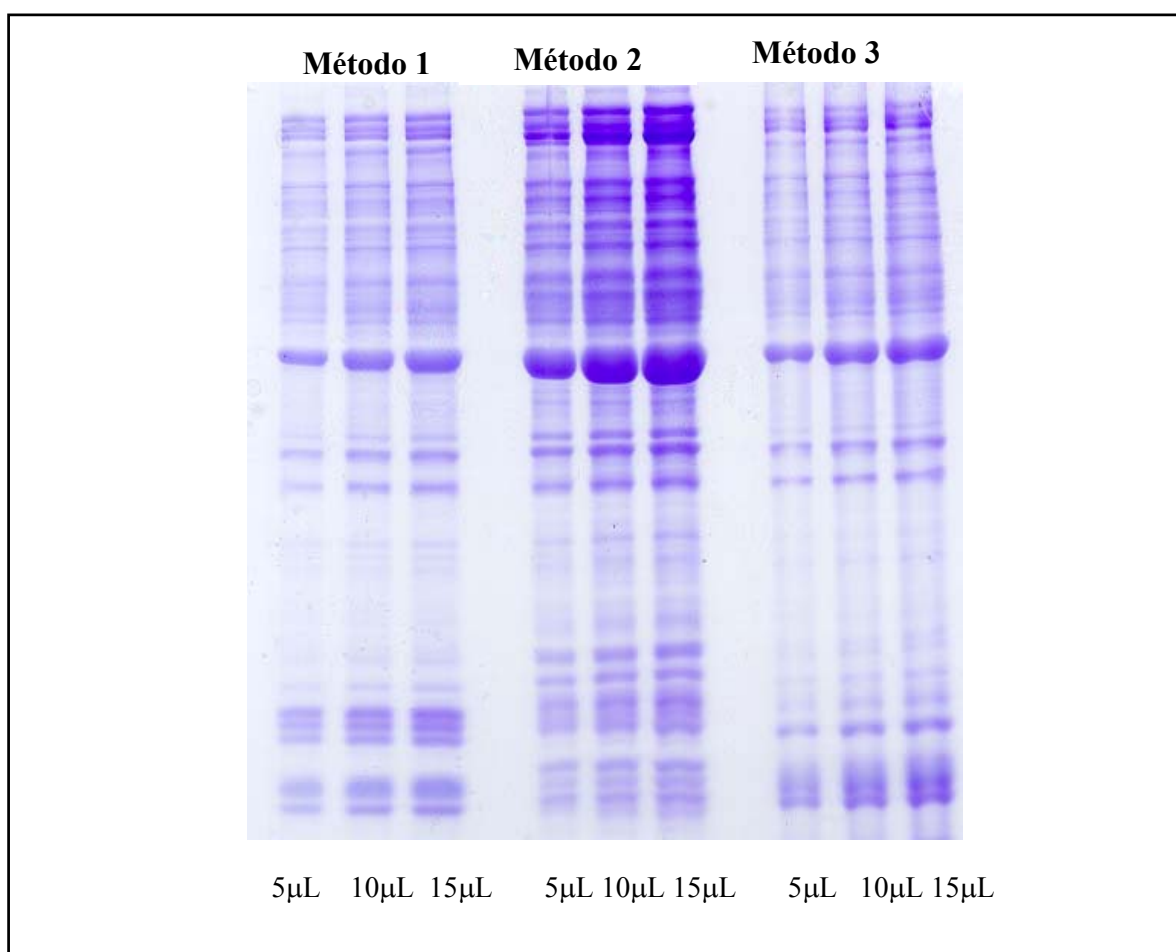


Figura 7. Perfil eletroforético das amostras de leucócitos totais analisado a partir dos métodos propostos na Tabela 1.

Na *Figura 7* observamos o perfil eletroforético de amostras com três volumes distintos (5µL, 10µL e 15µL) obtido pela utilização dos três tipos de métodos. Ressaltamos

que a preparação das amostras foi feita a partir do sangue total coletado de um mesmo rato. O precipitado final de leucócitos obtido foi lisado em tampão HBSS e o volume total dividido em três tubos de ensaio diferentes. Após nova centrifugação de 10 minutos, diluímos os três pequenos precipitados em 50µL dos respectivos tampões já apresentados. As amostras foram armazenadas a -80°C durante 4 semanas. Quando as eletroforeses foram realizadas com amostras recém-preparadas, não se observou diferença entre os 3 métodos (não mostrado).

Fica evidente a melhor resolução da eletroforese obtida a partir do *Método 2*, havendo uma melhor conservação da amostra, pois há uma maior quantidade de proteínas nas suas colunas eletroforéticas. Outro procedimento foi realizar uma eletroforese com amostras armazenadas por 4 meses a -80°C. Efetuamos a mesma conduta de obtenção das amostras relatado na *Figura 7*.

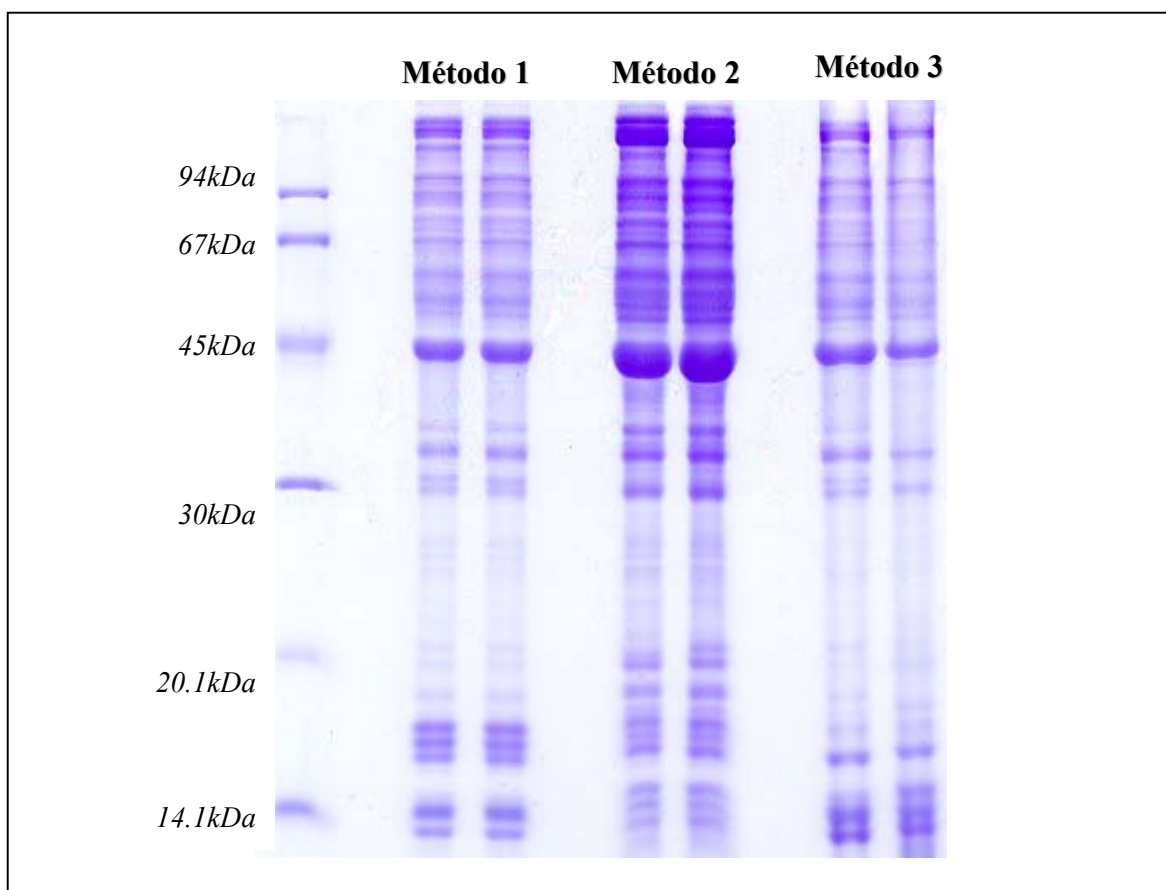


Figura 8. Teste das amostras de leucócitos totais após armazenamento a -80° C durante 4 meses.

Foram aplicados 25 μ L da amostra em cada coluna eletroforética. Mais uma vez pareceu evidente que o *Método 2* permitiu uma melhor conservação das propriedades protéicas. Da mesma forma, o *Método 1* foi mais eficaz na conservação das proteínas do que o *Método 3*.

Para confirmar os melhores resultados obtidos pelo *Método 2* em comparação ao *Método 1*, a *Figura 9* traz uma eletroforese de concentração de proteínas, dosada a partir do método de Bradford (1976), com amostras que foram incubadas por 24 horas a 37°C.

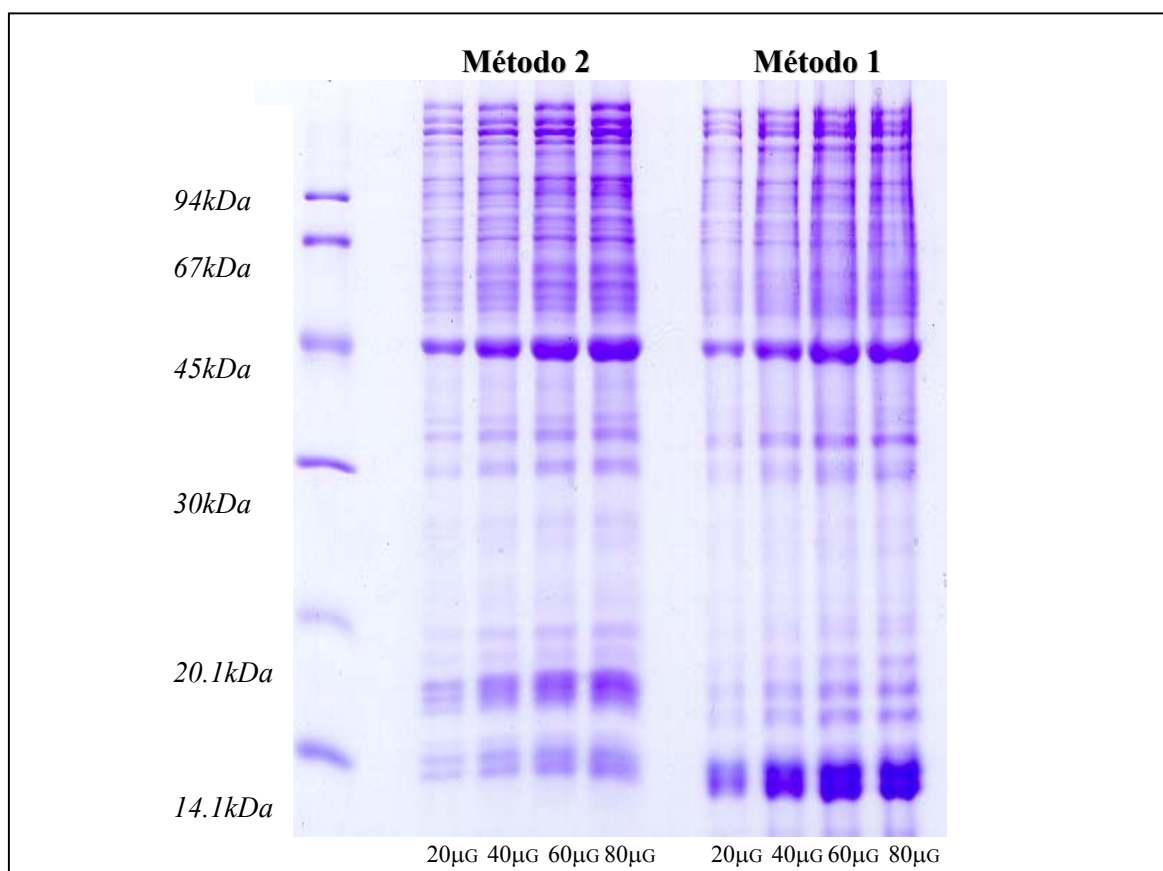


Figura 9. Eletroforese de concentração de proteínas das amostras após incubação por 24 horas a 37°C.

Efetuamos a dosagem de proteínas antes da incubação, para que pudéssemos analisar quais seriam as alterações resultantes. Percebemos que o *Método 2*, novamente, assegurou uma melhor qualidade em resolução eletroforética, o que fica evidente pela maior quantidade de proteínas conservadas após a incubação a 37°C.

3.12- Western Blot

A técnica de *Western Blot* permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida, possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose ou PVDF. As bandas transferidas são passíveis de análise por autoradiografia, imunodeteção e eluídas para análise de aminoácidos ou sequência da cadeia polipeptídica (LeGendre, Matsudaira, 1988).

O tampão de transferência era preparado com 2,2g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900ml de água, com pH 11 acertado com NaOH 2N, e o volume final completado a 1 mL com 100mL de metanol. O gel era colocado sobre a membrana em suporte plástico e a transferência ocorria a 400mA por 60 min a 15°C em sistema refrigerado da série TE (Hoefer,CA,USA).

Para a imunodeteção, a membrana era bloqueada com tampão (pH 7,6) Tris HCL 0,02M, NaCl 0,15M, Twen 0,05% (TBST), contendo 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas em agitação suave e, em seguida, lavada 3 vezes com TBST (10 min cada lavagem) e incubada “overnight” com anticorpo policlonal contra HSP70 (SPA-810, StressGen, Canadá), diluição 1:1000 em TBST. Em seguida, lavávamos a membrana 3 vezes com TBST, por 10 min cada lavagem. Como segundo anticorpo, era utilizado um anticorpo “anti-rabbit” conjugado com peroxidase (Bio Rad, CA, USA) diluído 1:2000 no tampão TBST, deixando-se incubar por 6 horas, seguido por 3 lavagens de 10 min com TBST. Para a revelação, diluímos 50mg do substrato 3-3’ diaminobenzidina em 50 ml de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e adicionamos 1mL de peróxido de hidrogênio 30%. Esta solução foi colocada em contato com a membrana até a definição visual da banda protéica em estudo. A reação de revelação era interrompida com a lavagem da membrana por H₂O destilada.

3.13- Análises Densitométricas

Análises densitométricas eram realizadas 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 processamento dos dados.

3.14 - Apresentação Gráfica e Análises Estatísticas

Os gráficos estão apresentados no modelo “box plot” (software S-Plus), conforme mostra a *Figura 10*.

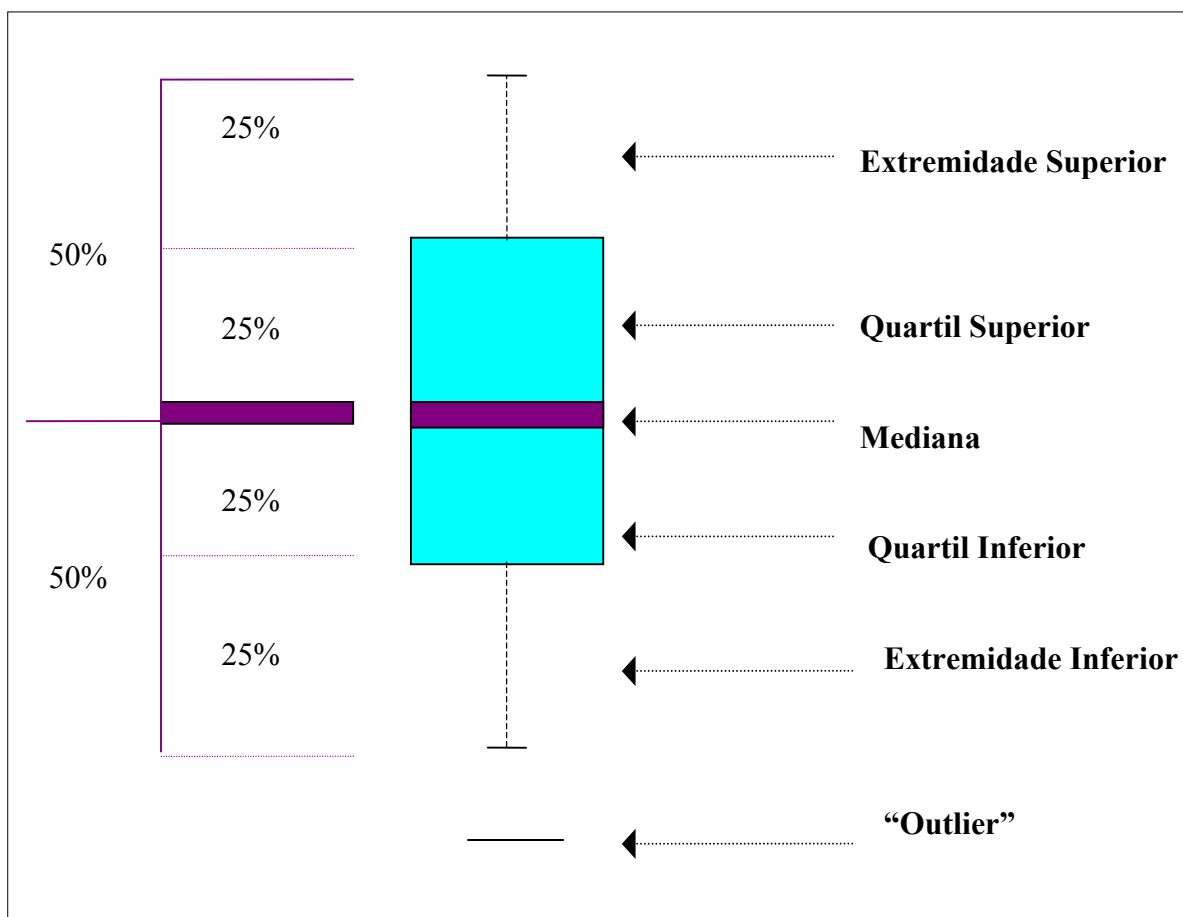


Figura 10. Configuração de um box plot.

O “box plot” ordena os dados pela mediana e os divide em quartis. Ou seja, acima e abaixo da mediana encontram-se 50% dos dados obtidos, 25% acima da mediana e 25% abaixo dela e as duas linhas tracejadas representam os 50% dos valores mais distantes. Os

dados que se diferenciam extremamente do comportamento geral são colocados para fora dos quartis e são chamados de “outliers” ou valores extremos. Optamos por apresentar os resultados obtidos na forma de “box plot” por entendermos que esse tipo de gráfico descreve melhor o comportamento do grupo de animais frente às várias situações de exercício, permitindo uma melhor visualização da variabilidade dos dados. O interessante desta forma de apresentação gráfica é a possibilidade de poder visualizar a disposição de todo o grupo, conseguindo, assim, situar a maior concentração dos resultados (Mcgill et al., 1978).

As análises estatísticas foram feitas através do programa GraphPad InStat® (San Diego, CA). Utilizamos o teste ANOVA para amostras pareadas e, como pós-teste, foi adotado o teste de Tukey. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. Os tratamentos estatísticos dos resultados de experimentação animal encontram-se anexados no final da tese. Optamos por isso pelo fato de nossa apresentação gráfica estar em formato “box plot”, onde o valor de referência é a mediana (com exceção dos gráficos que mostram a quantidade de expressão de HSP70 em leucócitos). Valores de significância estatística são delimitados pela média e desvio-padrão do grupo, o que difere de nossa apresentação.

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos com os animais, apresentarei os dados na forma de capítulos, sendo que o primeiro traz os resultados e discussão das análises de sangue (plasma, hemácias e leucócitos) em diferentes tempos após um protocolo de exercício exaustivo agudo; após, temos os resultados obtidos com as análises de sangue em cinco momentos diferentes das onze semanas de treinamento: 4^a, 8^a, 9^a, 10^a e 11^a semanas, segundo dois protocolos de treinamento distintos. Apresentarei, inicialmente, todos os dados obtidos com o protocolo de exercício contínuo e, na sequência, todos os dados obtidos com o protocolo de exercício intermitente, uma vez que eles não são passíveis de comparação, pois não utilizamos as mesmas cargas de esforço nos dois treinamentos. Isso foi proposital, pois queríamos verificar se os marcadores refletiam diferentes níveis de estresse, independente do protocolo de exercício utilizado. No capítulo final serão apresentados os resultados obtidos com os jogadores de futebol. Tais resultados reforçam a aplicabilidade de nossas técnicas de detecção de um “limiar de estresse” oxidativo.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DE BIOMARCADORES SANGÜÍNEOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-EXERCÍCIO EXAUSTIVO

O mecanismo molecular envolvido no estresse oxidativo e o dano muscular induzido por um protocolo de exercício agudo têm sido objeto de intensa investigação nesses últimos anos (Davies et al., 1982; Maughan et al., 1989; Sahlin et al., 1991; Saxton et al., 1994; Ortenblad et al., 1997; Reid, 2001). No entanto, o efeito do exercício sobre a integridade celular ainda não está totalmente definido na literatura, pois não foi estabelecido se a peroxidação lipídica seria causa ou consequência do dano tecidual (Alessio et al., 2000).

Nesse sentido, a maioria dos trabalhos mostra injúria muscular após vários tipos de protocolos de exercício, através de um aumento na atividade da enzima creatina quinase (CK) plasmática. A controvérsia está em que alguns autores observaram associação entre aumento de CK e níveis aumentados de peroxidação lipídica (Davies et al., 1982; Kanter et al., 1986; Maughan et al., 1989) enquanto outros não observam essa mesma correlação (Viinika et al., 1984; Sahlin et al., 1991; Saxton et al., 1994; Ortenblad et al., 1997). Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que o uso de marcadores plasmáticos de dano oxidativo pode ser uma estratégia importante para evidenciar os mecanismos envolvidos no dano muscular induzido pelo exercício agudo, desde que as amostras sejam coletadas no tempo correto após o exercício, explicando os resultados discrepantes encontrados na literatura (Alves et al., 2002). Nesse trabalho, os autores monitoraram somente as concentrações plasmáticas de CK, TBARS e proteínas carboniladas (PC).

Desta forma, o objetivo dos experimentos apresentados neste capítulo foi aumentar o número de biomarcadores sangüíneos verificados após um protocolo de exercício exaustivo, analisando o plasma, hemácias e leucócitos totais e determinar sua cinética de aparecimento em diferentes tempos pós-exaustão.

1.1- Efeito do Exercício Agudo Sobre Marcadores Plasmáticos de Estresse Oxidativo

A **Figura 11** mostra os níveis de estresse oxidativo através das dosagens das concentrações plasmáticas de PC (Figura 11-A) e TBARS (Figura 11-B) nos tempos imediatamente após, 1, 2, 3 e 4 horas pós-exaustão.

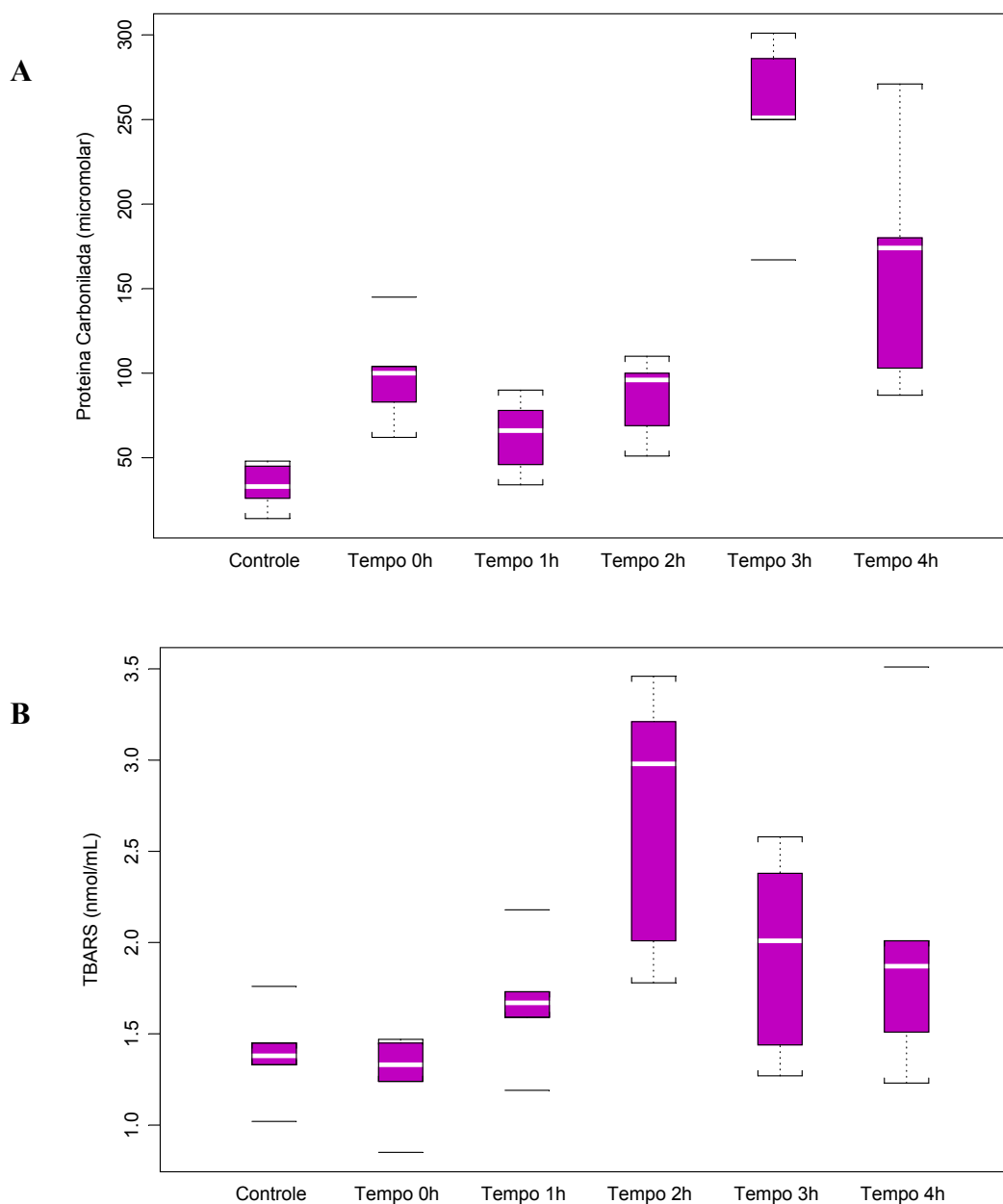


Figura 11. Concentração plasmática de PC (A) e TBARS (B) em ratos submetidos a protocolo de exercício agudo (n=5).

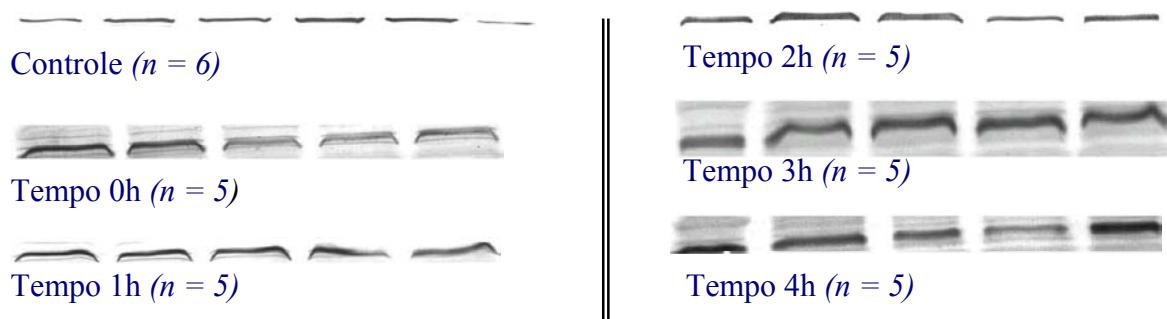
Notamos na *Figura 11A* que houve um aumento bastante significativo na concentração de PC no Tempo 3h, com 75% dos valores acima da mediana. Apesar do comportamento de queda observado no Tempo 4h, em relação ao Tempo 3h (31%), ainda notamos valores representativos de aumento na mediana na concentração plasmática de PC quando o comparamos ao grupo CO (427%) e a T1 (163%). A *Figura 11B* mostra que o pico na concentração plasmática de TBARS (apesar da ligeira queda no valor do tempo Tempo 0h) ocorreu no Tempo 2h. Comparando os valores de mediana do Tempo 1h e Tempo 2h com o obtido pelo grupo CO, temos aumentos de 21% e 116%, respectivamente. Apesar de termos uma queda de 28% e 37.25% nas análises do Tempo 3h e Tempo 4h, respectivamente, em comparação ao Tempo 2h, os valores de mediana permaneceram elevados quando comparados ao grupo CO: 45.6% para o Tempo 3h e 35.5% para o Tempo 4h.

1.2- Efeito do Exercício Agudo Sobre Biomarcadores de Defesa Antioxidante

1.2.1- Expressão de Proteínas de Estresse HSP70 em Leucócitos Totais

A **Figura 12** mostra a expressão de HSP70 (A) e a análise densitométrica (B) em leucócitos totais nos tempos pós-exaustão.

A- Western Blot



B- Análise Densitométrica

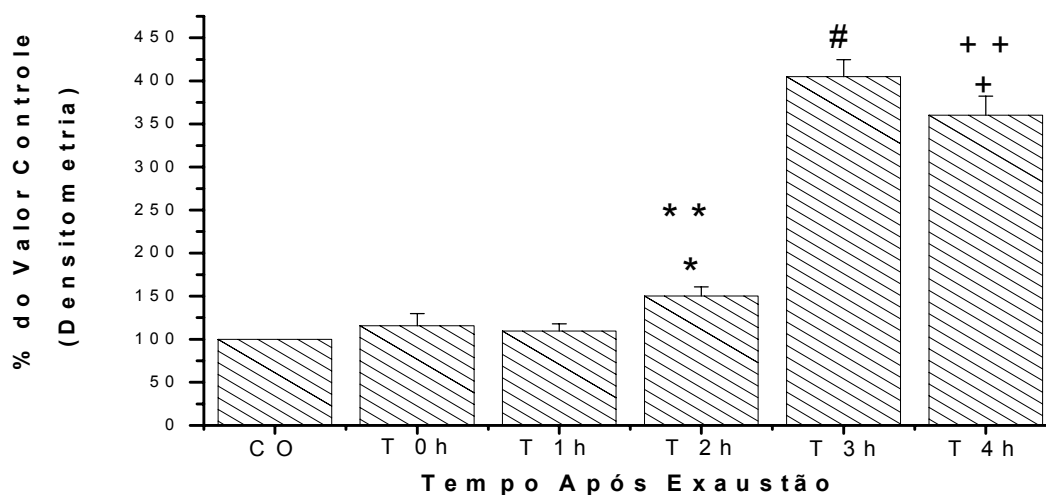


Figura 12. Expressão de HSP70 em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de exercício agudo (A) e quantificação densitométrica (B) (n=5). Onde: * = $P < 0.01$ em relação a CO, ** = $P < 0.05$ em relação a T 1h; # = $P < 0.001$ em relação a CO, T 0h, T 1h e T 2h; + = $P < 0.001$ em relação a CO, T 0h, T 1h, T 2h e T 3h; ++ = $P < 0.01$ em relação a T 3h.

Podemos observar que houve aumento na expressão de HSP70 em 3 momentos distintos após o exercício exaustivo: em T 2h, quando comparado ao grupo CO ($P<0.01$; 50,2%) e a T 1h ($P<0.05$; 37%); em T 3h, quando comparado ao grupo CO ($P<0.001$; 305%), a T 0h ($P<0.001$; 249,7%), a T 1h ($P<0.001$; 269,5%) e a T 2h ($P<0.001$; 169,6%); em T 4h, quando comparado ao grupo CO ($P<0.001$; 260%), a T 0h ($P<0.001$; 210,8%), a T 1h ($P<0.001$; 228,4%) e a T 2h ($P<0.001$, 139%). O pico de expressão ocorreu em T 3h, com queda significativa em T4h ($P<0.01$; -11,2%).

1.2.2- Sistema Enzimático Antioxidante no Hemolisado

A **Figura 13** apresenta as dosagens das atividades das enzimas antioxidantes CAT (Figura 13-A) e GR (Figura 13-B) no hemolisado nas mesmas condições descritas acima.

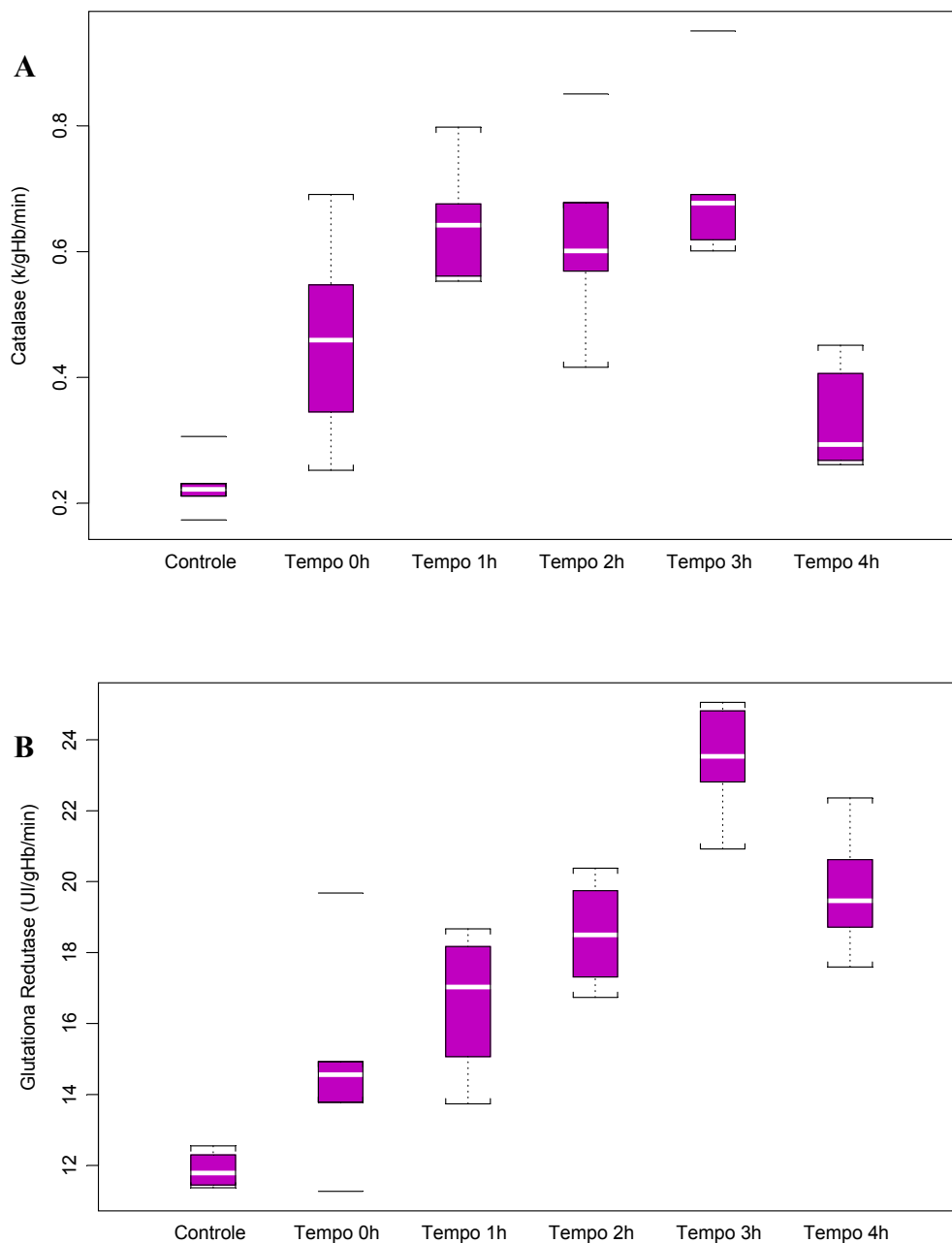


Figura 13. Atividade das enzimas CAT (A) e GR (B) no hemolisado de ratos submetidos ao protocolo de exercício agudo (n=5).

Pela *Figura 13A* notamos que houve aumento evidente na atividade da CAT em 4 diferentes tempos quando comparamos os valores de mediana destes com o obtido pelo grupo CO: no Tempo 0h (104%), no Tempo 1h (190%), no Tempo 2h (172%) e no Tempo 3h (204%). Ainda no Tempo 3h percebe-se que houve aumento na atividade de CAT de aproximadamente 48% em relação ao Tempo 0h. No Tempo 4h notamos uma sensível queda em atividade de CAT em comparação ao Tempo 3h (redução em 56%), Tempo 2h (51%), Tempo 1h (54%) e Tempo 0h (35.6%), chegando o valor de mediana próximo ao obtido pelo grupo CO. Seguindo a tendência obtida para CAT, observamos que no Tempo 3h há o pico de atividade de GR (*Figura 13B*). Os valores no Tempo 3h são bem elevados quando comparados ao grupo CO (95%), ao Tempo 0h (61%), ao Tempo 1h (32%) e ao Tempo 2h (21.3%). Apesar da queda da atividade desta enzima no Tempo 4h, quando comparada ao Tempo 3h, nota-se ainda um aumento considerável no valor de mediana em comparação ao grupo CO (61%) e ao Tempo 0h (33%).

1.2.3- Sistema Antioxidante Não Enzimático Plasmático

A **Figura 14** mostra o estado antioxidante plasmático através das dosagens de GST (Figura 14-A) e ácido úrico (Figura 14-B) em animais submetidos ao protocolo de exercício agudo.

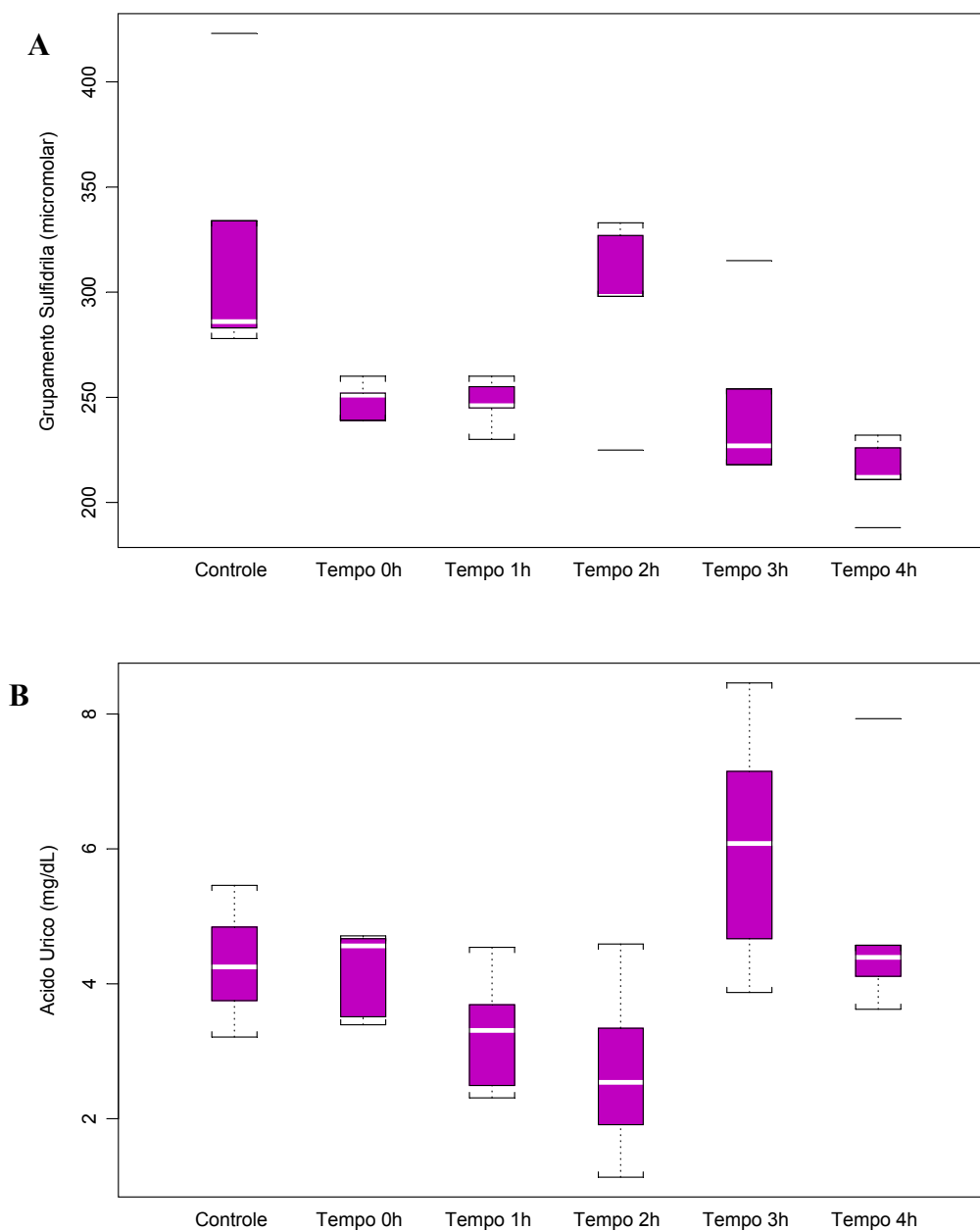


Figura 14. Concentração plasmática de GST (A) e ácido úrico (B) em ratos submetidos ao protocolo de exercício agudo (n=5).

Podemos observar na *Figura 14A* uma diminuição na concentração plasmática de GST imediatamente após a exaustão em relação ao grupo CO (13%), mantendo-se baixa também no Tempo 1h (14%), Tempo 3h (21%) e Tempo 4h (26%), com exceção do Tempo 2h. As análises de ácido úrico, na *Figura 14B*, mostram que o pico de concentração plasmática deste parâmetro ocorreu 3 horas após a realização do exercício exaustivo. Obtivemos aumentos importantes de mediana no Tempo 3h quando comparado ao Tempo 1h e ao Tempo 2h, com alteração de 83% e 139%, respectivamente. No Tempo 4h, o valor de mediana praticamente retornou próximo daquele obtido pelo grupo CO, mesmo apesar de um animal ainda encontrar-se com nível de ácido úrico extremamente elevado.

1.3- Efeito do Exercício Agudo Sobre Marcadores de Alterações na Permeabilidade Muscular

A **Figura 15** apresenta os níveis de alterações musculares dosados a partir de análise da concentração plasmática de creatina quinase (CK).

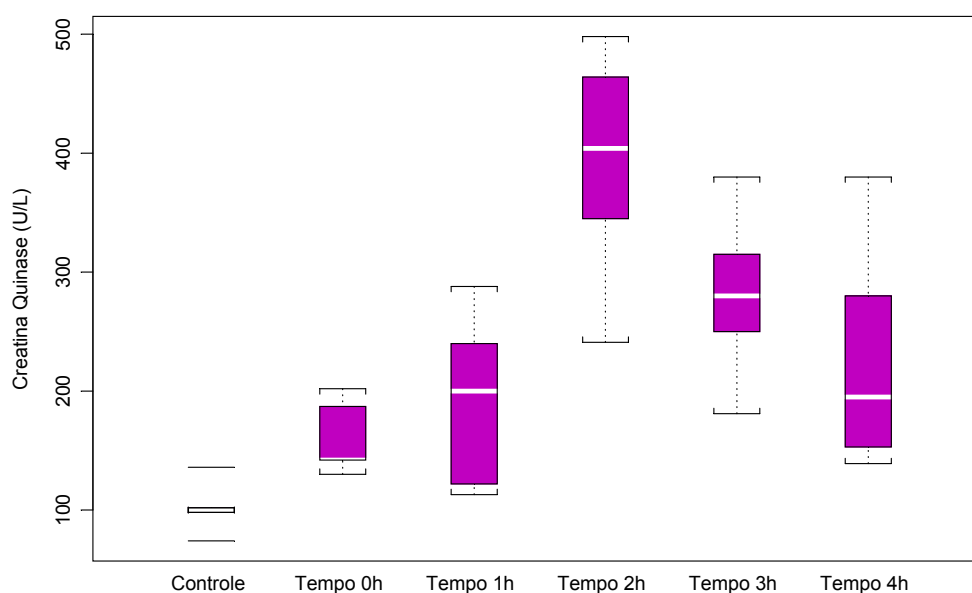


Figura 15. Concentração plasmática de CK em ratos submetidos ao protocolo de exercício agudo (n=5).

Observamos um comportamento de elevação crescente nos níveis plasmáticos de CK até 2 horas após o exercício exaustivo, com valor de mediana máximo de 404 U/L. Neste tempo de 2 horas após o exercício exaustivo contínuo, obtivemos aumento de 304% em comparação ao grupo CO, de 184% em comparação ao Tempo 0h e de 102% em relação ao Tempo 1h. Nos tempos 3h e 4h, nota-se uma queda nos níveis de CK plasmática de 30% e 51%, respectivamente, quando comparamos com o tempo de pico 2h. No Tempo 3h, houve ainda um aumento da mediana de 180% em comparação ao grupo CO. Interessante notar por esta apresentação gráfica que o grupo CO, o qual não passou por qualquer tipo de estímulo de exercício, era muito mais homogêneo. Na medida em que o estímulo foi aplicado, as respostas dos diferentes organismos ao estresse imposto ficaram também diversificadas, o que pode ser percebido pela dispersão dos resultados. Este quadro justifica a teoria do estresse, a qual prediz que o mesmo estímulo aplicado a organismos diferentes pode induzir respostas diversas.

1.4- Discussão

Há evidências na literatura que o estresse oxidativo induzido pelo exercício contribui com os mecanismos de lesão celular (Armstrong, 1984; Balnave, Thompson, 1993; Duarte et al., 1994; McBride et al., 1998). Da mesma forma, infiltração de células inflamatórias pode também contribuir com um evento secundário de lesão na célula muscular (MacIntyre et al., 1995; Nosaka, Clarkson, 1996). Os nossos resultados reforçaram dados prévios, de que as maiores alterações musculares, vistas a partir da dosagem da concentração de CK plasmática, coincidem com o pico de peroxidação lipídica, duas horas após o exercício agudo (Armindo Antonio Alves, Tese de Doutorado). Peroxidação lipídica é um dos índices mais investigados para avaliar danos celulares induzidos por radicais livres, pelo fato da farta presença de fosfolipídios de membranas nos sítios próximos à formação das EROs (De Zwart et al., 1999). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um índice de peroxidação lipídica baseado na reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), permitindo medida espectrofotométrica do produto final (MDA) da degradação oxidativa dos lipídios (Janero, 1990). Vários estudos mostram aumento em produtos de peroxidação lipídica após diferentes protocolos de exercício agudo (Meydani, Evans, 1993; Maughan et al., 1989; Davies et al., 1982).

Estudos sugerem que a intensidade e a duração do exercício podem ser fatores chaves na indução de estresse oxidativo em músculo esquelético (Davies et al., 1982; Ji, 1993). Trabalhos de

Alessio e equipe (1988) e Ji e equipe (1992) mostraram aumentos significativos na concentração de MDA em músculos de ratos sedentários após exercício exaustivo, salientando que a obtenção de níveis severos de peroxidação lipídica é dependente do estado de treinamento do rato. Como consequência da peroxidação de lipídios de membranas, pode haver a ocorrência de aumento na permeabilidade da membrana (o que justifica uma relação direta entre aumento na concentração de TBARS e CK em nosso trabalho), decréscimo no transporte de cálcio no retículo sarcoplasmático, função mitocondrial alterada, formação de metabólitos tóxicos e alteração do metabolismo da glutathione intracelular (Warren et al., 1992; Lovlin et al., 1987). Contribuindo com nossos resultados, Maughan e colaboradores (1989) obtiveram correlação entre os picos plasmáticos de TBARS e CK em indivíduos que executaram exercício exaustivo de corrida por 45 minutos.

A formação e acúmulo de grupos carbonila, em decorrência da agregação de resíduos de aminoácidos, é um indicador de oxidação protéica (Faure, Lafond, 1995). O pico de maior concentração de PC no plasma visto em nosso trabalho ocorreu 3 horas após o exercício exaustivo, 1 hora após o pico observado para TBARS. De Zwart e equipe (1999) colocam que produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, também podem atuar ativamente no ataque oxidativo às proteínas. Desta forma, a ação dos radicais livres em conjunto com os produtos de peroxidação lipídica poderiam ter potencializado o acúmulo tardio de grupamentos carbonila no plasma 3 horas após o exercício agudo. Lee e colaboradores (2002) mostraram relação direta entre elevação nas concentrações de PC e CK no sangue, diminuição de amplitude de movimento, decréscimo em produção de força e prática de exercícios excêntricos. Vale lembrar que os animais, de acordo com nosso protocolo, correram em esteira rolante com inclinação de -3° , o que solicita maior esforço excêntrico da musculatura envolvida diretamente na corrida. O estresse mecânico das ações musculares excêntricas em conjunto com o estresse metabólico poderiam ser considerados mecanismos preponderantes na indução de eventos lesivos em estruturas protéicas e lipídicas.

Como já ressaltamos acima, aumento nos níveis de CK no sangue pode ser o resultado de alterações da membrana da célula muscular, possivelmente devido a reações de hipoxia e isquemia muscular decorrentes do exercício exaustivo, bem como da ação do aumento de cálcio intracelular ativando proteases dependentes de cálcio (Moreau et al., 1995). Contudo, quando indivíduos são submetidos a uma estrutura de treinamento periodizado, dosando-se a intensidade, duração e frequência dos exercícios, observa-se que os valores de CK tendem a ser elevados apenas na primeira semana que prossegue os exercícios iniciais, não demonstrando significativa precipitação a

partir da segunda semana (Newham et al., 1987; Evans et al., 1986). Evidências experimentais ressaltam que a elevação de CK sangüínea não necessariamente reflete quantia de lesão histológica, podendo sugerir mudanças em permeabilidade da membrana celular (Van Der Meulen et al., 1991).

Nossos resultados mostraram que o pico de concentração de CK no plasma ocorreu 2 horas após o exercício exaustivo, indicando que os eventos lesivos na célula muscular possuem um caráter tardio. Tanaki e colaboradores (1992) apresentaram resultados onde o aumento máximo nos níveis de CK plasmática em ratos ocorreu 1 hora após o exercício executado com pesos. Resultados diferentes foram obtidos por Van der Meulen e equipe (1991), que mostraram aumentos significativos na dosagem de CK no plasma imediatamente após o exercício e 2 horas e meia após. Neste experimento, os autores executaram dois protocolos distintos de corrida em esteira (1,5 horas e 2,5 horas de corrida contínua, ambos com velocidade fixa de 15 m/min), utilizando-se ratos machos e fêmeas. Da mesma forma, em experimento utilizando-se cavalos submetidos a corrida prolongada de 15, 30 e 60 Km, com intensidade de 200 m/min, não foram observados aumentos significativos em níveis de CK plasmática durante, imediatamente após e 6 horas após a corrida. Contudo, os valores máximos dosados de CK foram obtidos imediatamente após o exercício (Volfinger et al., 1994).

Torna-se complicado correlacionar os dados da literatura e os nossos obtidos, uma vez que os modelos experimentais apresentam grandes diferenças metodológicas. Fatores que podem interferir severamente no momento de pico plasmático de CK são o tipo de exercício executado e as suas características de intensidade, duração e frequência. Todas as diferenças de intervenção experimental também acarretarão mudanças na velocidade de remoção da CK no sangue. No nosso estudo, vale ressaltar que utilizamos animais sedentários. A magnitude das respostas obtidas pode ser bem diferente daquelas com animais treinados, assim como o tempo de retorno aos níveis normalizados de CK no sangue. Os princípios do treinamento físico enfocam a necessidade de realização de exercícios com intensidade, duração e frequência progressivas, de forma que os eventos de ruptura homeostática não sejam indutores de uma condição de exaustão persistente. O nosso protocolo buscou gerar uma situação de estresse oxidativo, com elevação dos marcadores de ataque oxidativo e dos níveis de lesão celular. Para tanto, era necessário que a intensidade, duração e frequência do exercício estivessem acima de um limiar de adaptação dos animais, o que nos fez escolher a utilização de animais sedentários. Nossos resultados dão indícios do que pode acontecer com indivíduos sedentários que praticam, esporadicamente, atividades físicas não sistematizadas.

Muitas vezes, tais indivíduos, com o intuito de acelerar a aquisição de performance física e melhoria das condições de saúde, pensam que podem também elevar a carga de exercícios físicos de forma drástica. Um dos resultados pode acabar sendo a indução de lesões mais graves, com instalação de processos inflamatórios severos e recuperação tardia das estruturas alteradas.

Considerando agora os resultados das enzimas antioxidantes analisadas no eritrócito, observamos que tanto CAT quanto GR apresentaram uma tendência de pico de atividade no tempo 3 horas após o exercício exaustivo. Ji e colaboradores (1990) colocam que o aumento na atividade das enzimas antioxidantes deve-se a uma elevação na produção de EROs. Se levarmos em conta que os maiores índices de ataque oxidativo foram obtidos entre 2 horas (TBARS) e 3 horas (PC) após o exercício exaustivo, parece haver correlação entre produção de radicais livres e aumento na capacidade enzimática antioxidante. Powers e equipe (1994) também salientam que, além da produção aumentada de radicais livres, o tempo de exposição da célula a essa concentração elevada de espécies radicalares pode ser fator fundamental no aumento de atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e superóxido dismutase.

Porém, já conceituamos estresse oxidativo como o desbalanço entre a produção de espécies radicalares de oxigênio e a atividade do sistema antioxidante. O que notamos foi que as atividades das enzimas antioxidantes sofreram aumento diretamente proporcional aos níveis elevados de ataque oxidativo. Desta forma, essa regulação enzimática positiva seria um mecanismo fundamental na atenuação dos efeitos desestabilizadores do estresse oxidativo às estruturas biológicas. Outros trabalhos enfocam que ratos jovens submetidos a exercícios de exaustão são capazes de regular a atividade das enzimas antioxidantes em condição de estresse oxidativo (Navarro-Arévalo, Sanchez-del-Pino, 1998; Fielding, Meydani, 1997; Stortz et al., 1990). Os fatores que regulam mudanças agudas de atividade das enzimas antioxidantes no eritrócito “in vivo” são atribuídos a interações alostéricas diretas sobre as enzimas, haja visto que o eritrócito não possui um maquinário para sintetizar proteínas. Tauler e colaboradores (1999) atribuem tais mudanças a modificações covalentes de proteínas ou até mesmo a novas interações protéicas de estabilização.

A maioria das proteínas plasmáticas possui resíduos de cisteína (com grupamentos sulfidrilas livres), que podem ser oxidados pela ação de radicais livres. A quantificação da concentração plasmática de grupamentos sulfidrilas (GST) no sangue fornece uma idéia de ataque oxidativo a proteínas plasmáticas e, conseqüentemente, do nível de defesa antioxidante (Halliwell, Gutteridge, 1989). Mesmo apesar do aumento progressivo das atividades das enzimas

antioxidantes até 3 horas após o exercício, houve ataque oxidativo a GST livre no plasma imediatamente após e 1 hora após a exaustão. Este dado sugere que o protocolo de exercício agudo imposto aos animais gerou uma condição de estresse oxidativo. No momento T4h, há ainda uma diminuição maior em concentração de GST plasmática em relação ao grupo CO, em contraponto com os demais marcadores de alterações oxidativas (PC e TBARS), os quais mostraram uma tendência de retorno aos valores controle. Esta condição de maior ataque oxidativo a GST em T4 ocorre justamente no momento onde a atividade enzimática antioxidante e os níveis expressos de HSP70 apresentaram uma tendência de queda, facilitando assim este evento lesivo. O fato dos GST serem estruturas livres e mais expostas nas proteínas plasmáticas, pode ter permitido uma suscetibilidade maior ao ataque oxidativo mesmo quando havia indícios de que a produção de espécies reativas de oxigênio estava decrescendo (T4h).

Os valores obtidos das análises de ácido úrico no plasma permitem concluir, em conjunto com os demais marcadores de ataque oxidativo, que o momento T3 foi onde ocorreu uma situação de estresse oxidativo mais marcada. O ácido úrico, em concentrações fisiológicas ideais, pode desempenhar papel de antioxidante celular. Contudo, sua concentração pode aumentar severamente em situação de exercício intenso, devido a uma maior atividade da enzima xantina oxidase, indicando, nesta condição, um nível de estresse elevado. As formações do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) serão ditadas pelas condições de pH e concentrações de O_2 e xantina. A produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} liberado durante o exercício (Jenkins, Goldfarb, 1993), pode conduzir à reação de Haber-Weiss, tendo-se o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) como produto final ou outra espécie radicalar com similar reatividade (Weiss, 1986).

Hellsten e colaboradores (1997) mostraram que a elevação da concentração de xantina oxidase no sangue, induzida por exercício exaustivo, tem ocorrência tardia, podendo contribuir com a geração de espécies reativas de oxigênio durante eventos inflamatórios secundários. Este dado leva-nos a crer que o aumento da concentração de ácido úrico, em decorrência de um protocolo de exercício agudo, também acompanhará os níveis tardios de xantina oxidase extravazados na corrente sangüínea. Nossos resultados apontam que até duas horas após a realização do exercício exaustivo não há alteração significativa das concentrações plasmáticas de ácido úrico em relação ao grupo controle. Se considerarmos que o nível plasmático de CK teve seu pico 2 horas após o exercício, mantendo-se ainda elevado em relação ao grupo CO no tempo seguinte, a elevação

significativa de ácido úrico em T3 poderia ser reflexo de micro-eventos inflamatórios e degenerativos na célula muscular desencadeados pelo estresse oxidativo.

Como já abordamos, muitas condições podem induzir uma síntese rápida de HSPs para manter ou reparar a conformação de proteínas. O estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, bem como o aumento de temperatura interna e abaixamento de pH podem ser formas importantes na síntese de HSPs. Essig e Nosek (1997) propõem que a síntese de HSPs, em função do ataque de radicais livres a proteínas musculares em condição de estresse oxidativo, pode servir como um mecanismo de defesa complementar para o sistema de defesa antioxidante.

Nossos resultados indicam que as maiores expressões de HSP70 ocorreram nos tempos entre 2 e 3 horas após o exercício exaustivo, com pico de síntese no momento T3h. Torna-se importante correlacionar os níveis plasmáticos elevados de PC e a redução da concentração de GST em T3h com a expressão de HSP70 no mesmo momento, o que nos permite concluir que as proteínas de estresse, nesta situação, podem estar atuando como parte integrante do sistema de defesa antioxidante, na tentativa de diminuir o impacto do ataque oxidativo nas estruturas protéicas. As alterações nas estruturas protéicas, em virtude do estresse oxidativo gerado pelo exercício agudo, podem ter sinalizado a síntese de HSP70 nos leucócitos. Vale, contudo, ressaltar que a atividade enzimática antioxidante alcançou seu pico no momento T3h, conferindo um sistema de defesa antioxidante unificado com as HSPs. Imediatamente após o pico de expressão de HSP70, notamos quedas em todos os valores de ataque oxidativo, bem como nos índices de CK plasmática, sugerindo novamente que a expressão de HSP70 auxiliou na atividade de defesa antioxidante dos tecidos estudados.

Com a atenuação da condição de estresse oxidativo, houve uma tendência de retorno normalizada da atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis de HSP70, o que reforça a idéia que a modulação destes dois sistemas de defesa sofrem o impacto de um mesmo estímulo - o estresse oxidativo. Resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa também apontaram que a HSP72 em músculo atua como parte de um sistema de defesa antioxidante secundário na proteção rápida do sistema principal (Smolka, 2000).

1.5- Conclusão

- Os valores das análises dos marcadores plasmáticos de ataque oxidativo indicaram que as principais alterações em lipídeos (TBARS) ocorreram 2 horas após a execução do exercício

agudo e em proteínas (PC) após 3 horas, sugerindo que as microlesões induzidas pelo exercício podem iniciar um processo inflamatório rápido, repercutindo na geração de mais espécies reativas de oxigênio (EROs).

- Os níveis de HSP70 em amostras de leucócitos foram mais elevados nos animais sacrificados após 3 horas do exercício agudo, acompanhando o mesmo tempo de maior acúmulo plasmático de PC. Esse resultado sugere que as HSPs70 estariam atuando como um sistema estabilizador de proteínas danificadas pelas EROs.
- As enzimas CAT e GR apresentaram um mesmo perfil, com pico de atividade ocorrendo 3 horas após a execução do exercício agudo. Essa condição de defesa antioxidante ocorreu no mesmo momento onde detectamos os níveis plasmáticos mais elevados de ácido úrico, cuja concentração torna-se aumentada em decorrência da ativação da enzima xantina oxidase, uma potente via precursora de EROs.
- Os níveis mais elevados de CK plasmática foram obtidos 2 horas após a execução do exercício agudo, no mesmo momento onde detectamos as maiores concentrações de TBARS. Isso sugere que o maior ataque oxidativo a lipídeos poderia ocasionar um aumento de permeabilidade da membrana plasmática da célula muscular.
- A modulação diretamente proporcional entre atividade enzimática antioxidante no eritrócito e níveis de HSP70 nas amostras de leucócitos totais permite considerar que houve uma ação sistêmica e conjugada de dois tipos celulares distintos para a atenuação das condições de estresse oxidativo instaladas.
- O protocolo de exercício agudo desenvolvido foi satisfatório na indução de alterações severas em estruturas de lipídeos e proteínas, sendo a metodologia empregada sensível na detecção dos níveis de estresse oxidativo instalados.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DE BIOMARCADORES SANGÜÍNEOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES MOMENTOS DURANTE UM PROTOCOLO DE TREINAMENTO CONTÍNUO

Conforme explicado na Introdução da presente tese, poucos são os estudos que buscam evidenciar um quadro mais claro sobre quais biomarcadores são eficientes em mostrar adaptação ou “overreaching”. Assim, neste capítulo e no próximo buscamos analisar as respostas nos marcadores sangüíneos ao longo de onze semanas de um protocolo de exercício contínuo (Capítulo 3 – Treinamento Intermitente), com diferentes cargas de esforço e tempos de recuperação, com o propósito tanto de adaptar os animais quanto de estabelecer um desbalanço entre treino e repouso. É importante ressaltar que não existe ainda na literatura um trabalho com essa abordagem experimental.

2.1- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Marcadores de Estresse Oxidativo Plasmático

A **Figura 16** mostra níveis de estresse oxidativo através das dosagens das concentrações plasmáticas de PC (Figura 16-A) e TBARS (Figura 16-B) nos cinco momentos analisados.

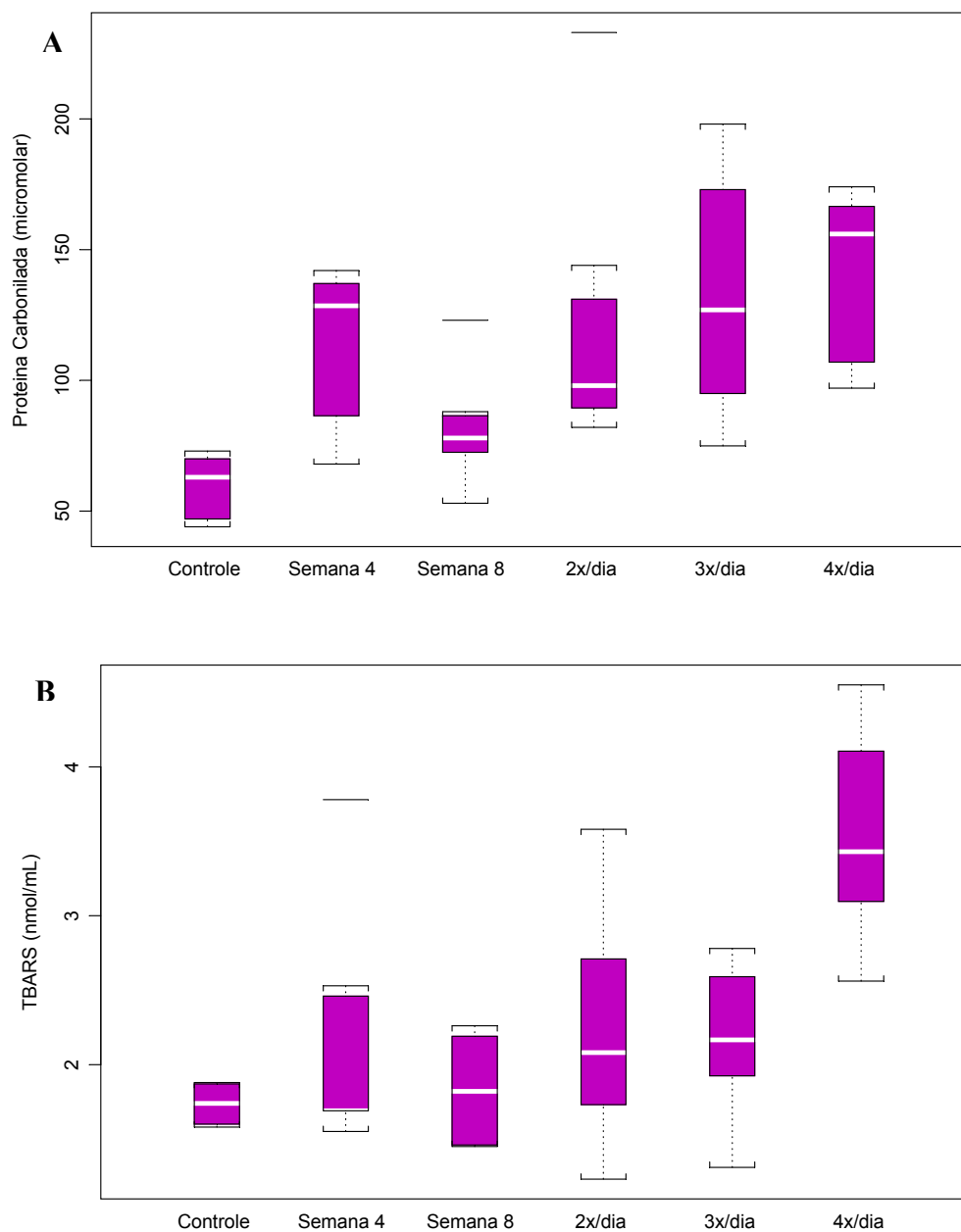


Figura 16. Concentração plasmática de PC (A) e TBARS (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária do exercício (n=8).

Podemos observar que esses parâmetros mostram uma grande heterogeneidade nas respostas desde o início do protocolo, com tendência de elevação nos valores da mediana em relação ao grupo CO, sobretudo, no grupo 4x/dia. Até a análise da semana quatro (S4), os animais haviam sido submetidos a um protocolo de corrida com intensidade e tempo de exercício crescentes, o que refletiu principalmente num aumento de mediana de 104% na concentração de PC em relação ao grupo CO (*Figura 16A*). Com a estabilização da sobrecarga, houve uma queda significativa de aproximadamente 32% na análise da semana oito (S8) em relação a S4. O treinamento contínuo, até a análise S8, não induziu grandes alterações da mediana nas análises das concentrações plasmáticas de TBARS (*Figura 16B*).

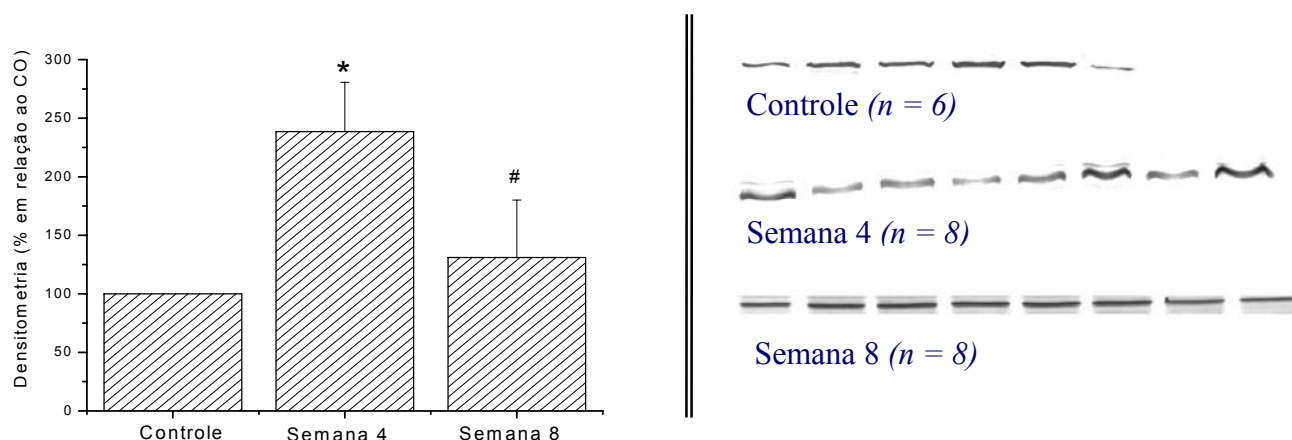
Fica evidente que o aumento das sessões de corrida com diminuição do tempo de recuperação entre as sessões induziu uma elevação considerável nas concentrações de PC e TBARS, o que pode ser notado na análise 4x/dia. Nessa situação de indução de “overreaching”, torna-se interessante analisar as respostas adaptativas obtidas do grupo 4x/dia, que foi submetido a uma circunstância severa de corrida, com aquelas dos animais submetidos ao treinamento planejado (análise S8). Houve um aumento na ordem de 100% e 88.4%, respectivamente, de PC e TBARS, ao compararmos as duas análises, ressaltando a severidade dos níveis de estresse oxidativo alcançada na análise 4x/dia.

2.2- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Biomarcadores de Defesa Antioxidante

2.2.1- Expressão de Proteínas de Estresse “HSP70” em Leucócitos Totais

A **Figura 17** mostra a expressão de HSP70 em leucócitos totais após 8 semanas de treinamento contínuo (Figura 17-A) e após 3 semanas de aumento na frequência diária dos exercícios (Figura 17-B).

A – Oito semanas de Treinamento Contínuo



B – Treinamento Contínuo com Aumento na Frequência Diária de Sessões

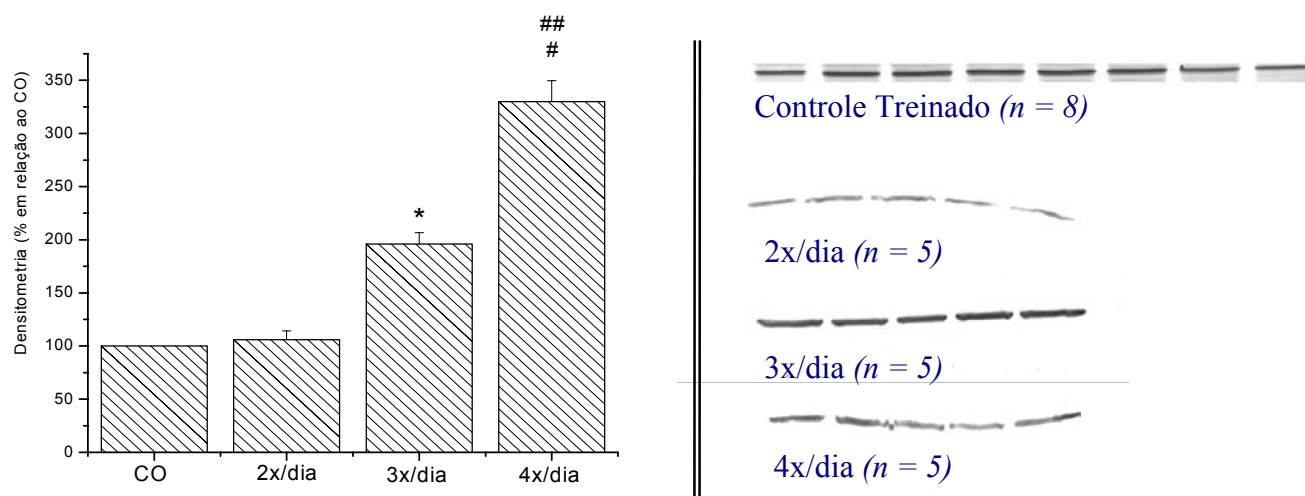


Figura 17. Expressão de HSP70 em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas (A) e ao aumento na frequência diária de corrida (B). Para (A) * = $P < 0.01$ Semana 4 em relação a CO, # = $P < 0.05$ Semana 8 em relação a Semana 4, Semana 8 em relação a CO. Para (B) * = $P < 0.001$ 3x/dia em relação a CO e 2x/dia, # = $P < 0.001$ 4x/dia em relação a CO, 2x/dia; ## = $P < 0.01$ 4x/dia e, relação a 3x/dia.

Observamos na *Figura 17A* que os níveis de HSP70 nos leucócitos foram mais elevados na análise S4, com aumento médio de 130% em relação ao grupo CO ($P<0.01$), o que vem a confirmar que a maior geração de EROs pode sinalizar a expressão desta classe de proteínas de estresse. A redução na expressão de HSP70 na análise S8, com queda de aproximadamente 42% em relação a S4 ($P<0.05$), indica adaptação ao exercício contínuo.

A *Figura 17B* mostra que há aumento crescente na expressão de HSP70 concomitantemente com o aumento na frequência diária de corrida. Utilizamos como grupo CO desta Figura os animais que foram submetidos a oito semanas de treinamento contínuo (grupo S8) e não os animais sedentários. Tal escolha foi feita pelo fato de que apenas ocorrerá a instalação de um quadro de “overtraining” em animais que já se encontram em treinamento. Portanto, torna-se interessante compararmos as respostas do treinamento severo (análises 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia) com animais que estejam adaptados ao nosso protocolo de treinamento contínuo (grupo S8). O que se notou foi que ocorreu aumento na expressão de HSP70 nas análises 3x/dia, quando comparada ao grupo CO ($P<0.001$; 96%) e a análise 2x/dia ($P<0.001$; 85%), e 4x/dia, quando comparada ao grupo CO ($P<0.001$; 230%), a análise 2x/dia ($P<0.001$; 211%) e a análise 3x/dia ($P<0.01$; 68%).

2.2.2- Sistema Enzimático Antioxidante no Hemolisado

A **Figura 18** mostra as dosagens das atividades das enzimas antioxidantes CAT (Figura 18-A) e GR (Figura 18-B) no hemolisado, nos cinco momentos analisados.

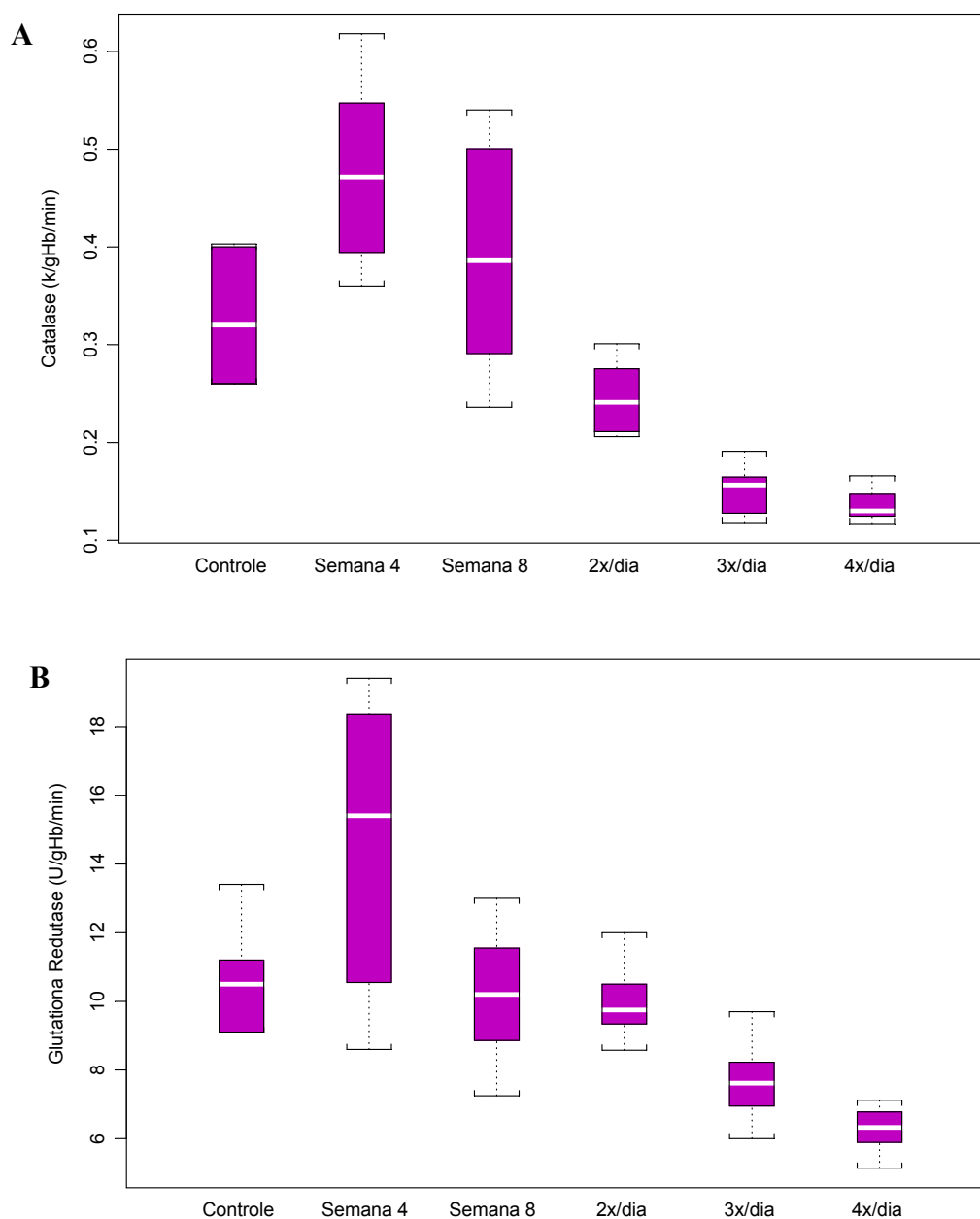


Figura 18. Atividade das enzimas CAT (A) e GR (B) no hemolisado de ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8).

Podemos observar que mesmo com um comportamento do grupo mais heterogêneo, a produção de EROs induzida pelo aumento gradual na carga de esforço nas quatro primeiras semanas (S4) estimulou a atividade das duas enzimas antioxidantes. Obtivemos um aumento na mediana de aproximadamente 47% em S4, para ambas as enzimas, em relação ao grupo CO. Houve uma diminuição nessas atividades, principalmente da GR (*Figura 18B*), na análise S8 (34% em relação a S4), confirmando uma adaptação positiva nessa fase do protocolo (a redução nos níveis de estresse oxidativo atenuou a atividade enzimática antioxidante).

É importante notar, entretanto, que o aumento na frequência dos exercícios levou a uma queda nas atividades de ambas as enzimas, com uma resposta mais homogênea de todo o grupo, sinalizando uma situação de estresse oxidativo importante. Comparando as respostas do grupo dos animais treinados (grupo S8) com as do grupo submetido ao aumento na frequência de corrida (2x/dia, 3x/dia e 4x/dia), notamos, para CAT (*Figura 18A*), queda mediana em atividade enzimática na faixa de 36.9%, 60.53% e 65.79%, respectivamente, considerando a ordem de incremento da frequência de corrida. Para GR, os decréscimos foram de 4.42%, 25.4% e 38.24, respectivamente.

2.2.3- Sistema Antioxidante Não Enzimático Plasmático

A **Figura 19** mostra o estado antioxidante plasmático através das dosagens das concentrações de GST (Figura 19A) e ácido úrico (Figura 19B) nos cinco momentos analisados.

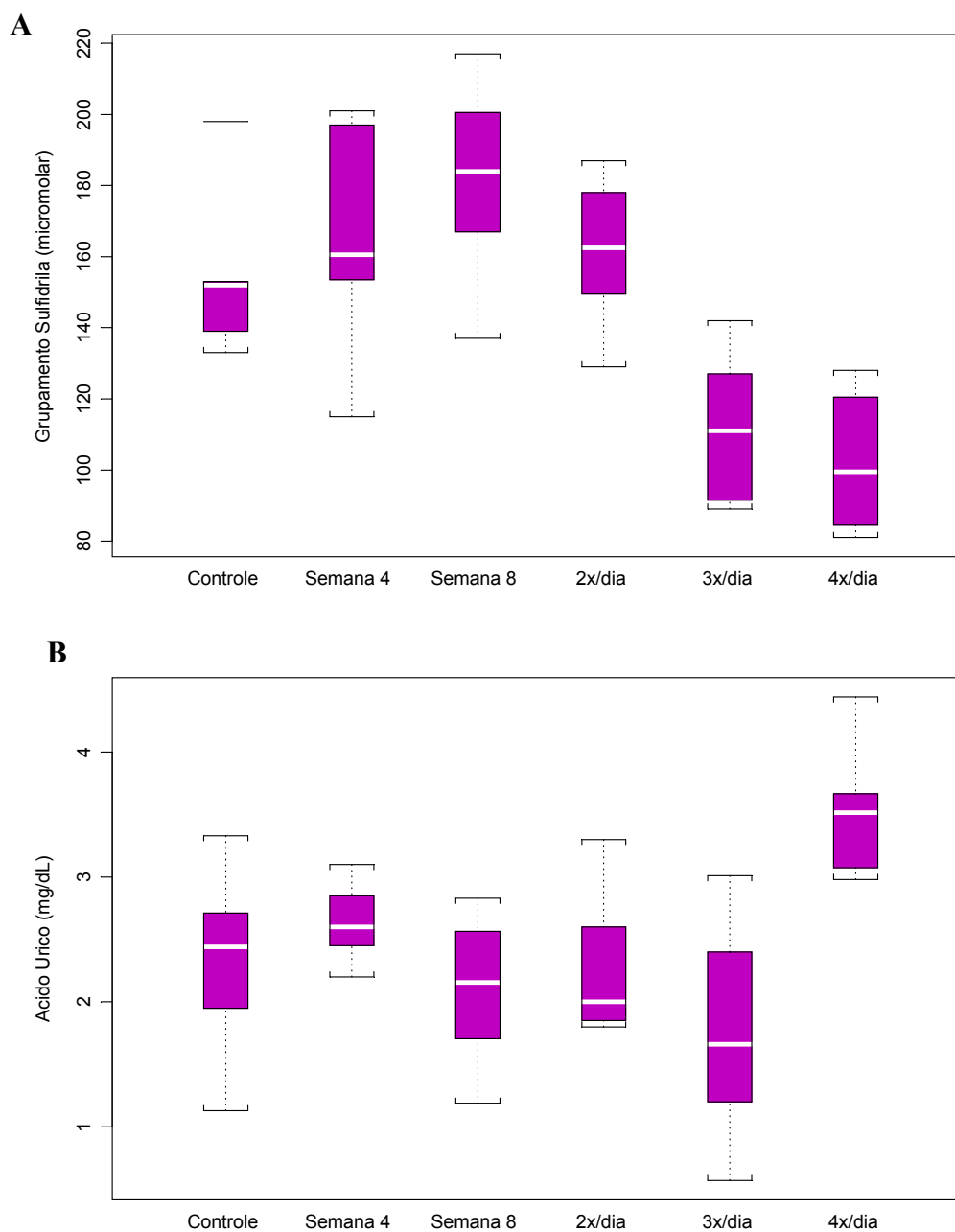


Figura 19. Concentração plasmática de GST (A) e ácido úrico (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8).

Os dados das concentrações plasmáticas de GST e ácido úrico revelam que esses marcadores começam a mostrar alteração mais acentuada somente com o aumento na frequência de exercícios diários. Apesar das análises de GST (*Figura 19A*) nos momentos S4 e S8 apresentarem uma tendência de aumento, em relação ao grupo CO, é possível também observar uma grande dispersão dos resultados.

Contudo, com o aumento das sessões de corrida e diminuição do tempo de recuperação, a partir da nona semana de treinamento (2x/dia), nota-se que os quartis tornam-se mais compactos, o que significa maior homogeneidade dos resultados. O nível de estresse oxidativo nessas circunstâncias de treinamento induziu alterações drásticas de GST para todo o grupo, principalmente para o grupo 4x/dia. Os níveis de GST plasmática reduziram em 39.7% e 46% considerando as análises dos grupos 3x/dia e 4x/dia, respectivamente, em comparação com o grupo treinado S8. Os níveis de ácido úrico (*Figura 19B*) sofreram um aumento considerável somente na décima primeira semana de treinamento (4x/dia), chegando a 65.1% em relação ao valor do grupo S8.

2.3- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Biomarcadores de Estresse Metabólico

A **Figura 20** mostra o estado catabólico protéico através das dosagens das concentrações de uréia (Figura 20-A) e creatinina (Figura 20-B) plasmáticas nos cinco momentos analisados.

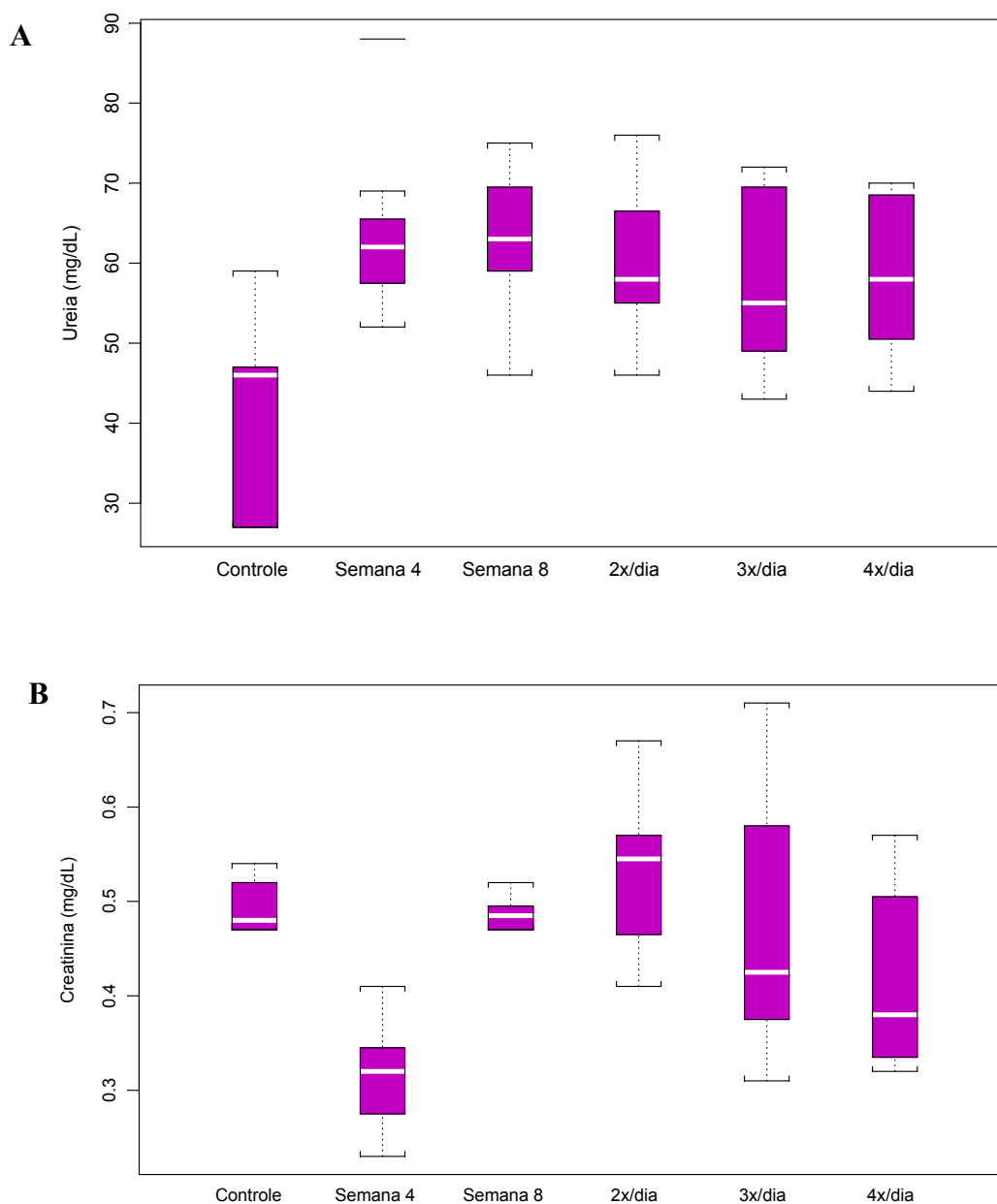


Figura 20. Concentração plasmática de uréia (A) e creatinina (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n = 8).

Nota-se que a concentração de uréia (*Figura 20A*) no plasma aumentou e a de creatinina (*Figura 20B*) diminuiu com o início do treinamento (análise S4), indicando um aumento na taxa catabólica protéica. Esse aumento na concentração de uréia chegou a 34.7% e o decréscimo de creatinina em 33.4%. Os valores medianos de uréia não sofreram alterações drásticas a partir da análise S4, e a variação na distribuição dos resultados em cada momento de análise, apesar de bastante heterogênea, manteve-se similar até a análise 4x/dia. No caso da creatinina, houve uma tendência de retorno em S8 para valores próximos do grupo CO, porém mostrando grande heterogeneidade nos resultados a partir da análise 2x/dia.

2.4- Efeito do Treinamento Contínuo Sobre Biomarcadores de Alteração Muscular

A **Figura 21** mostra os níveis de alterações musculares através das dosagens de CK (Figura 21-A) e TGO (Figura 21-B) plasmáticas dos animais nos cinco momentos analisados.

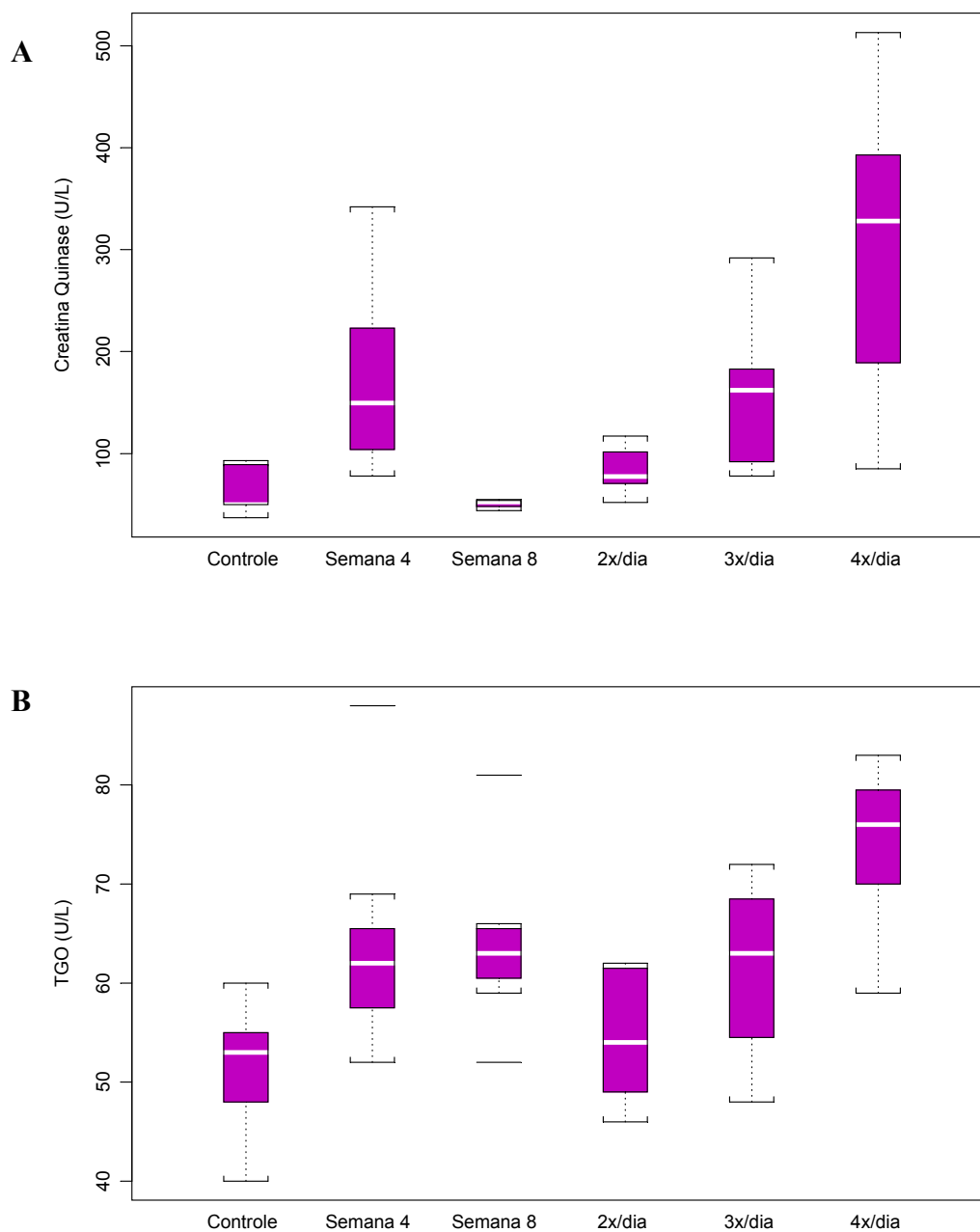


Figura 21. Concentração plasmática de CK (A) e TGO (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n= 8).

Pode-se notar que houve um aumento nos níveis plasmáticos de CK (*Figura 21A*) em S4, com diferença próxima a 200% quando comparamos o valor de mediana deste momento com o valor do grupo CO. Com a estabilização da sobrecarga, da quinta até a oitava semana de treinamento, observa-se em S8 um comportamento bastante homogêneo do grupo de animais, com um decréscimo significativo nos níveis de CK (65% em relação a S4), sugerindo que houve uma adaptação muscular após as oito semanas de treinamentos diários. Por sua vez, o aumento na frequência diária de corrida, com a concomitante diminuição do tempo de recuperação entre as sessões de corrida, levou a uma elevação crescente na liberação de CK no plasma. Os aumentos nos valores de mediana nos grupos 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia foram de 47.6%, 208.5% e 524%, respectivamente, ao compararmos com o valor obtido pelo grupo treinado S8.

O nível plasmático mediano de TGO (*Figura 21B*) sofreu ligeiro aumento (17%) na quarta semana em comparação com o grupo CO. O valor da mediana deste parâmetro apenas suplanta ao valor obtido pelo grupo de animais treinados (S8) na análise 4x/dia, através de um aumento de 20.6%. Esses dados sugerem que entre as duas enzimas, a CK é mais eficiente em detectar as alterações musculares induzidas pelo treinamento contínuo aqui proposto.

2.5- Discussão

Nossos resultados apontam que há uma relação direta entre sobrecarga de treinamento e níveis de alterações celulares. Pudemos observar que os níveis plasmáticos de CK sofreram elevação até a quarta semana de treinamento - momento final do aumento progressivo da sobrecarga de corrida. O estresse muscular induzido pelo exercício contínuo neste período propiciou uma resposta bem heterogênea do grupo, mostrando grande dispersão dos valores nos dois quartis acima da mediana. Porém, era esperado que, sobretudo neste momento inicial do treinamento contínuo (treinamento CT), onde a sobrecarga de corrida teve elevação progressiva, houvesse um aumento nos níveis de liberação de CK no plasma. Relata-se extensivamente na literatura que o exercício físico induz alterações significativas em estruturas de sarcômero, retículo sarcoplasmático e matriz extracelular (Thompson, Riley, 1996; Gibala et al., 1995), caracterizando um quadro que é denominado de microlesão celular.

Há ausência de dados na literatura mostrando a influência de programas de treinamento na liberação de CK e TGO no plasma. As evidências, na maioria dos protocolos publicados, apontam apenas a CK como um índice de lesão muscular em condições agudas de exercício físico. Os resultados destes estudos mostram que, quando uma mesma sessão de exercícios agudos (sobretudo com cargas elevadas de ações excêntricas) é executada após um período recuperativo breve, há uma redução drástica nos níveis de CK plasmática encontrados na primeira análise (Hyatt, Clarkson, 1998; Clarkson et al., 1992, Clarkson, Tremblay, 1988). As evidências sugerem que o exercício físico pode induzir um efeito adaptativo rápido em estruturas musculares. Os resultados do treinamento contínuo indicaram que o pico de CK plasmática está relacionado com o aumento progressivo da sobrecarga (intensidade, duração e frequência de corrida). A estabilização da sobrecarga, da quinta até a oitava semana de treinamento (análise S8), promoveu uma queda notável nos níveis de CK, vindo a sugerir que alterações lesivas na célula muscular possuem relação direta com a elevação da magnitude do estímulo aplicado e que a estabilização da carga de corrida induz o efeito adaptativo visto nos protocolos que aplicaram o mesmo tipo de exercício após um período de recuperação. Estes dados apontam a importância de uma estrutura de treinamento intercalar períodos de elevação da sobrecarga com estabilizadores ou recuperativos, a fim de que as estruturas miofibrilares possam adaptar-se ao estímulo estressor e que o aparato de síntese protéica mantenha-se íntegro.

Analisando o efeito do treinamento severo (2x/dia, 3x/dia e 4x/dia) na liberação de CK no plasma, o que se observou foi que até a implementação de 3 sessões diárias de corrida não houve uma alteração tão drástica. Essa observação deve-se ao fato de que os animais da análise 3x/dia permaneceram no mesmo patamar da mediana visto para o grupo S4, o qual correu apenas uma sessão por dia. Portanto, isso indica que houve uma adaptação benéfica ao protocolo de indução de “overtraining” até esse momento. Porém, com a implementação de mais uma sessão de corrida ao longo do dia (análise 4x/dia), o valor de mediana praticamente dobrou em relação ao obtido na análise 3x/dia. Interessante ressaltar que, com o aumento progressivo das sessões de corrida e a diminuição no tempo de recuperação entre uma sessão e outra, houve uma maior dispersão e heterogeneidade dos resultados, o que indica que alguns animais conseguiram adaptar-se ao protocolo severo de corrida de forma mais eficaz que outros.

Pudemos notar que quando houve um controle da sobrecarga, com aumento e estabilização dos volumes e intensidades dos exercícios de corrida (até a análise S8), tivemos uma diminuição acentuada principalmente nos níveis plasmáticos de CK. Porém, o aumento progressivo da frequência de sessões de corrida induziu elevações significativas nos níveis de liberação das enzimas musculares na análise 4x/dia, sugerindo que a falta de um tempo hábil recuperativo entre as sessões de treinamento é um fator primordial na ampliação de eventos lesivos da célula muscular. Outros estudos vão ao encontro dos nossos resultados, mostrando que a presença de lesões, dores musculares e articulares e níveis elevados de CK no soro aumentam a cada sessão de treinamento em atletas onde houve a detecção da síndrome de supertreinamento (Fry, 1998; Noakes, 1991).

Quanto aos níveis plasmáticos de TGO, houve a ocorrência de um fenômeno distinto daquele visto para valores de CK. O treinamento CT promoveu um aumento significativo em TGO juntamente com a elevação da sobrecarga, persistindo porém mesmo quando houve estabilização nas cargas de corrida. Esse fato indica que a remoção de TGO se dá de forma tardia em comparação ao padrão adaptativo observado para CK. O emprego da análise de TGO durante um treinamento de longa duração pode ser um indicador importante para sinalizar a capacidade adaptativa total das estruturas musculares, pois ela refletiu um tempo adaptativo diferenciado em relação ao visto para CK na análise S8. Seria interessante para um próximo estudo analisar se há uma possível regressão ou elevação nos valores de TGO com a continuidade da estabilização da sobrecarga por um período de tempo maior. Uma outra proposta seria acompanhar o tempo de

remoção, tanto de CK quanto de TGO, após o término do programa de treinamento. O aumento no número de sessões de corrida mostrou, tal como obtivemos nas análises de CK, que há uma alteração mais exacerbada somente na análise 4x/dia, o que denota que os animais conseguiram resistir aos níveis de estresse muscular induzido pelo protocolo de treinamento contínuo até a sua décima semana.

Uma explicação para a maior ocorrência de alterações musculares na análise 4x/dia é uma possível elevação nas respostas inflamatórias localizadas. Tal como colocam Evans e Cannon (1991), as lesões musculares induzidas pelo exercício precedem e sinalizam o início de respostas inflamatórias localizadas. A mudança em homeostasia da concentração de cálcio intracelular, em decorrência das microlesões induzidas pelo exercício, pode conduzir eventos degradativos de estruturas celulares, principalmente de membranas, alterando até mesmo o estado de agentes antioxidantes (Reed, 1985). A mobilização de cálcio intracelular ou o influxo de cálcio extracelular poderá ativar Fosfolipases do tipo A_2 , as quais liberarão ácidos graxos insaturados do C-2 dos glicerídeos. A liberação de ácidos graxos insaturados, em particular de ácido araquidônico, ativa as vias oxigenase e lipoxigenase, produzindo prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores inflamatórios. Os produtos destas vias são hidroperóxidos que, ao serem catalisados por prostaglandina hidroperoxidase, propiciam uma concomitante liberação de espécies altamente oxidantes, tal como o radical hidroxila ($OH^\bullet$) (Flohé et al., 1985). Experimentos também demonstraram que a infiltração de neutrófilos pós-exercício e aumento “in vitro” da capacidade de geração de radical ânion superóxido foram diretamente relacionados ao tempo de liberação de CK na circulação e a lesões na ultraestrutura do músculo (Fielding et al., 1993; Cannon et al., 1990).

A modulação das enzimas antioxidantes parece depender da concentração e do tempo de exposição celular frente as espécies reativas de oxigênio (Ji et al., 1990; Powers et al., 1994). Portanto, o treinamento eficaz será aquele que estimular a geração de espécies radicalares com concomitante aumento da atividade enzimática antioxidante, evitando a instalação de um quadro de estresse oxidativo. De acordo com Navarro-Arévalo e Sánchez-del-Pino (1998), fatores como o tipo, intensidade e duração do exercício físico são fundamentais na modificação da atividade das enzimas antioxidantes. Desta forma, um dos interesses da aplicação do protocolo de treinamento CT foi compreender se este seria eficiente, até o momento da análise S8, em elevar a atividade das enzimas CAT e GR e reduzir o potencial de ataque oxidativo.

Venditti e Meo (1996) mostraram que um treinamento do tipo contínuo (realizado com velocidade submáxima e crescente) induz aumentos da capacidade oxidativa e da defesa antioxidante dos músculos, sendo benéfico na atenuação dos efeitos do estresse oxidativo. Por outro lado, Powers e colaboradores (1999), através de um excelente artigo de revisão, apresentaram vários trabalhos de treinamento de “endurance” com ratos que não alteraram e até reduziram a atividade da CAT em diversos músculos. A controvérsia também é mantida para GR, pois também foram mostrados trabalhos apontando que o treinamento de “endurance” pode induzir decréscimo, aumento e nenhuma alteração da atividade desta enzima (Powers et al., 1999). Contudo, para uma análise ampla deste quadro, torna-se fundamental que haja uma profunda compreensão das diferenças e especificidades de cada protocolo, pois, como já ressaltado, fatores como tipo, intensidade, duração e frequência do exercício afetam a modulação do sistema enzimático antioxidante.

Nossos resultados confirmam a hipótese de que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes possa ser considerado uma resposta a elevação da produção de espécies radicalares de oxigênio (Ji et al., 1990). No protocolo de exercício agudo com animais sedentários, mostramos que o maior pico de atividade antioxidante coincidia com os índices mais elevados de ataque oxidativo, o que entendemos como uma tentativa da célula em defender-se da produção elevada de radicais livres. No caso do treinamento CT, os resultados mais elevados em termos de atividade enzimática antioxidante ocorreram no momento onde a intensidade e duração de corrida atingiram seus picos mais elevados (análise S4), na quarta semana de treinamento. Esta condição pode refletir um mecanismo de adaptação celular ao aumento da produção de radicais livres induzido pela elevação da sobrecarga do exercício. O treinamento CT mostrou-se mais satisfatório para a elevação da atividade das enzimas CAT e GR. Este resultado pode ter relação com o maior tempo de exposição da célula frente a produção das espécies radicalares de oxigênio em condições submáximas de intensidade, o que poderia atenuar a instalação de um quadro de estresse oxidativo.

Com a manutenção da sobrecarga, da quarta até a oitava semana, as atividades das enzimas CAT e GR tenderam a sofrer um retorno próximo aos valores controle. Como os efeitos deletérios dos radicais livres poderiam estar sofrendo uma redução em magnitude, em virtude do aumento da atividade antioxidante até a quarta semana, houve talvez uma atenuação da sensibilidade celular para proporcionar a continuidade da elevação de defesa antioxidante no

momento onde a sobrecarga de treinamento estabilizou-se. Esta situação indica uma adaptação aos níveis de estresse oxidativo.

Considerando que os animais estavam adaptados aos níveis de estresse oxidativo impostos até a oitava semana de treinamento, a próxima etapa do protocolo foi elevar o número de sessões de treino e reduzir o tempo de recuperação entre uma sessão e outra. Os resultados mostraram que as enzimas CAT e GR sofreram decréscimos consideráveis ao longo das análises 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia, sugerindo que a alteração dos níveis enzimáticos antioxidantes é uma primeira resposta para a indução de um quadro de “overtraining”. Essa observação torna-se mais consistente se considerarmos que as alterações musculares mais drásticas ocorreram somente na análise 4x/dia, como se fosse um evento posterior à incapacidade de regulação das enzimas CAT e GR. Interessante notar que houve uma homogeneidade dos resultados obtidos das análises de atividade das enzimas CAT e GR com o aumento das sessões de treino, o que nos leva a concluir que o nível de estresse oxidativo induzido pelo protocolo foi realmente severo para todos os animais.

Um dos marcadores mais estudados para avaliar o nível de defesa antioxidante é a dosagem do conteúdo de glutathiona (GSH). Vários trabalhos na literatura apontam que o treinamento de “endurance” (de característica mais próxima ao protocolo contínuo empregado neste trabalho) aumenta sensivelmente os níveis de GSH nos músculos (Itoh et al., 1998; Leeuwenburg et al., 1997; Leeuwenburg et al., 1994; Sen et al., 1992; Marin et al., 1990). Em nosso trabalho não medimos diretamente os níveis de GSH nos animais treinados, mas podemos sugerir que o aumento da atividade da enzima GR no treinamento contínuo indicou que a reciclagem de GSSG a GSH ocorreu de forma elevada. Conforme apresentado em nossa introdução, queda nos níveis de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão elevada de GSH/GSSG para garantir a disponibilidade de GSH (Powers et al., 1999).

Welch (1992) relata que espécies radicalares de oxigênio, numa condição de estresse oxidativo, podem participar como sinalizadoras na síntese de HSPs. A circunstância para a sinalização da síntese de HSPs seria, possivelmente, o fato das espécies radicalares promoverem exposição de aminoácidos hidrofóbicos das proteínas de membranas (Giulivi et al., 1994): os aminoácidos hidrofóbicos atuariam como regiões de ligação às HSPs, o que poderia conduzir a transcrição de mais proteínas de estresse.

Observamos que os níveis de alterações celulares e índices de ataque oxidativo, principalmente aumento na concentração de PC plasmática no treinamento CT, foram muito elevados na quarta semana de treinamento e na análise 4x/dia. A maior expressão de HSP70 nessas etapas de treinamento vem a confirmar que a produção elevada de espécies radicalares de oxigênio pode realmente sinalizar a transcrição desta classe de proteínas de estresse. Vale lembrar que até a quarta semana de treinamento houve uma elevação progressiva da sobrecarga de treinamento, o que gerou uma situação permissiva para aumento da produção de espécies radicalares. A redução nos níveis de expressão de HSP70 na oitava semana de treinamento reflete a diminuição do potencial de ataque oxidativo, fato que indica uma adaptação aos níveis de estresse impostos pelo treinamento. Fehrenbach e colaboradores (2000), em experimentos com humanos adaptados ao treinamento de “endurance”, postularam que, quando o sistema enzimático antioxidante, estimulado pelo treinamento regular, é eficiente em diminuir os eventos oxidativos, os leucócitos podem reduzir a produção de HSPs.

Por outro lado, o aumento na expressão de HSP70 em leucócitos na análise 4x/dia parece ser reflexo da queda da atividade enzimática antioxidante e do aumento do potencial de ataque oxidativo, solicitando assim uma proteção secundária. Resultados já obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (Smolka et al., 2000), através de análises em músculo, confirmam os aqui apresentados, onde se foi observado que a síntese de HSPs poderia complementar a capacidade de defesa enzimática antioxidante do organismo quando proteínas intracelulares são danificadas pelos radicais livres.

Um outro marcador de defesa antioxidante estudado foi a concentração de grupamento sulfidril total (GST) no plasma. Este parâmetro relaciona-se principalmente aos resíduos de cisteína reduzidos presentes em proteínas plasmáticas, sobretudo a albumina e a glutathiona (GSH), que durante o ataque oxidativo são alvos preferenciais (Halliwell, Gutteridge, 1989). Desta forma, como já ressaltado no protocolo de exercício agudo, a diminuição em GST pode indicar um maior ataque radicalar (Faure, Lafond, 1995). Analisando os resultados, percebemos que o treinamento CT induziu uma forte tendência de elevação na concentração plasmática de GST até a análise da oitava semana (S8). As análises de GST em conjunto com as das enzimas CAT e GR permitem considerar que o treinamento CT, até a sua oitava semana, foi satisfatório em proteger estruturas biológicas de uma situação de estresse oxidativo. Da mesma forma, agora considerando as análises 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia, os níveis de GST no plasma acompanharam a

tendência vista para as enzimas antioxidantes, com quedas consideráveis de sua concentração para valores de mediana muito abaixo dos obtidos pelos animais adaptados (análise S8).

No caso das análises de concentração de ácido úrico no plasma, observamos que não houve uma alteração drástica dos valores de mediana até o momento 3x/dia. Porém, tal como visto para os marcadores de alterações celulares e, a seguir, para os marcadores de ataque oxidativo, obtivemos uma elevação considerável em concentração plasmática de ácido úrico na análise 4x/dia. Este fato sugere que a partir da realização de 4 sessões diárias de corrida foi que realmente houve uma ativação consistente da enzima xantina oxidase, indicando uma situação catabólica do metabolismo de ATP. Sjödín e colaboradores (1990) relatam que o decréscimo dos níveis de ATP em combinação com o acúmulo de hipoxantina e ácido úrico no plasma, em decorrência de exercício exaustivo, poderia implicar que o tecido muscular estaria submetido a um nível de estresse metabólico similar ao observado em casos patológicos de esquiemia.

O monitoramento dos marcadores de ataque oxidativo permite interpretar a modulação dos sistemas antioxidantes. Considerando a primeira fase do protocolo, vimos que o momento de maior elevação de TBARS (peroxidação lipídica) e PC (carbonilação de proteínas) ocorreu na quarta semana de treinamento, coincidindo com o ponto máximo de elevação da intensidade, duração e frequência de corrida dos dois protocolos. Alguns trabalhos sugerem a hipótese de que a elevação, sobretudo nos níveis de PC, em análises de homogenato muscular após treinamento de “endurance”, seja devida a uma inadequada proteção do sistema de defesa antioxidante (Radák et al., 1997; Witt et al., 1992). Este fato já era esperado por nós, pois com a maior exigência metabólica muscular para atender a solicitação dos estímulos elevados de treinamento, a produção de EROs também tenderia a aumentar, resultando em níveis mais elevados de ataque oxidativo. Contudo, esta situação não chegou a caracterizar um quadro clássico de estresse oxidativo, pois também houve a elevação concomitante das enzimas antioxidantes e da concentração plasmática de GST. Vale ressaltar que, segundo Sen (1995), pode ser considerada uma condição de estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre os sistemas que estimulam a geração de espécies radicalares e os sistemas protetores. Com a manutenção da sobrecarga, observamos na análise S8 que houve uma queda significativa nos níveis de PC. Este dado reflete adaptação à sobrecarga de treinamento.

Os maiores níveis de ataque oxidativo, tanto para PC quanto para TBARS, foram detectados na análise 4x/dia, tal como obtido nas análises das concentrações plasmáticas de CK e

TGO. De forma a confirmar a ocorrência de uma situação severa de estresse oxidativo, também obtivemos nesta mesma análise os níveis mais baixos das atividades das enzimas antioxidantes CAT e GR, bem como da concentração de GST no plasma. Tais resultados levam-nos a sugerir que o aumento abrupto na produção de espécies radicalares de oxigênio, em conjunto com respostas inflamatórias agudas, pode elevar o potencial de ataque oxidativo às estruturas lipídicas e protéicas. Tiidus (1998) aponta que este quadro de alterações musculares induzidas pelo “overtraining” favorece a modificação do estado antioxidante celular, refletindo em diminuição da resposta protetora.

As análises das concentrações plasmáticas de creatinina e uréia permitiram estabelecer uma visão mais integrada do estresse metabólico induzido pelo treinamento CT. A uréia, em condições metabólicas normais, é um produto final da degradação dos aminoácidos excedentes, haja visto que os seres vivos não são capazes de armazenar aminoácidos nem proteínas. A degradação do aminoácido ocorre por meio da remoção e excreção do grupo amino e a oxidação da cadeia carbônica remanescente. O grupo amino removido é convertido a uréia e as cadeias carbônicas são convertidas a compostos comuns ao metabolismo de carboidratos e lipídios. Tanto o treinamento CT quanto o IT induziram aumento na concentração plasmática de uréia. Apesar deste parâmetro ser apresentado como um índice sintomatológico da síndrome do “overtraining” (Smith, 2000), Calles-Escandon e colaboradores (1984) salientam que o exercício físico possui um efeito catabólico sobre o metabolismo protéico acompanhado simultaneamente por respostas anabólicas. O “turnover” (relação síntese-degradação) protéico é uma resposta regulatória à sobrecarga do treinamento físico. Podemos observar que, a partir da análise da quarta semana, todas as outras análises de concentração plasmática de uréia permaneceram num mesmo patamar de valor de mediana e dispersão dos quartis, sugerindo que esse parâmetro metabólico não pode, por si só, ser considerado um indicador seguro de alteração metabólica.

A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina. O sistema ATP-Fosfocreatina constitui um sistema imediato de energia para a contração muscular de rápida duração e alta intensidade, sendo um processo estritamente anaeróbico. A creatinina é liberada na circulação e excretada pela urina. A quantidade excretada diariamente é constante, pelo fato de sua formação ser proporcional à massa muscular. Desta forma, ela torna-se um sensível indicador de função renal e alteração metabólica muscular. Nossos resultados mostram uma significativa queda na concentração plasmática de creatinina na análise da quarta semana, a qual coincide com o

momento pico de sobrecarga de corrida. Tal como visto para os valores de uréia, era de se esperar que, caso houvesse alguma alteração deste parâmetro, o aumento progressivo de intensidade do treinamento pudesse, ao invés da diminuição, elevar os índices de creatinina. A literatura não aponta evidências para esta adaptação. Uma possível interpretação seria um aumento na filtração de creatinina pelos rins, em virtude de alguma alteração hormonal. Isto poderia ser comprovado pela dosagem de creatinina excretada pela urina, condição não analisada neste trabalho.

A análise S8 apresentou um quadro bem homogêneo deste parâmetro metabólico, tal como visto para o grupo CO. As demais análises (2x/dia, 3x/dia e 4x/dia) permaneceram num mesmo patamar, com grande dispersão dos resultados, o que dificulta estabelecer uma relação direta com os demais marcadores estudados.

2.6- Conclusão

- Os níveis de HSP70, em leucócitos totais, quantificados no período de adaptação tiveram relação direta com a atividade detectada das enzimas antioxidantes CAT e GR, no hemolisado, e a quantidade de grupamentos sulfidrilas totais (GST), no plasma.
- Os marcadores de catabolismo muscular (uréia e creatinina) não sofreram alterações sensíveis ao longo de todo o processo de treinamento contínuo, indicando que alterações bioquímicas precedem os eventos iniciais de instalação do *overreaching*.
- Os marcadores de ataque oxidativo (PC e TBARS) foram sensíveis na detecção dos níveis de estresse oxidativo observados ao longo do protocolo de treinamento contínuo.
- A atividade das enzimas antioxidantes e a quantidade de GST sofreram quedas no momento de desbalanço entre treino e recuperação, indicando que nas semanas de treinamento exaustivo atingiu-se uma condição de *overreaching*.
- Houve um aumento na quantidade de HSP70 durante o período de exaustão, indicando que alterações severas na estabilidade de proteínas ocorreram em virtude do estresse oxidativo instalado.
- HSP70 pode ser considerada parte do sistema de defesa antioxidante.
- Há a necessidade de se compreender profundamente as relações existentes entre *intensidade x duração x frequência x tempo de recuperação* das atividades propostas por um programa de treinamento físico, a fim de não aplicar uma condição de estresse inviável às condições

momentâneas de mobilização do organismo. Como coloca Jakerman (1994), o treinamento físico é um “desafio” biológico com a preocupação central colocada sobre a previsão dos gastos energéticos para a realização de processos anabólicos. Porém, um “desafio” maior ainda encontra-se em indicar a extensão de tempo requerida para a recuperação metabólica e para a viabilização das adaptações compensatórias, na perspectiva de se evitar a instalação de um quadro de “overtraining”.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DE BIOMARCADORES SANGÜÍNEOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES MOMENTOS DURANTE UM PROTOCOLO DE TREINAMENTO INTERMITENTE

3.1- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Marcadores de Estresse Oxidativo Plasmático

A **Figura 22** mostra os níveis de estresse oxidativo através das dosagens plasmáticas de PC (Figura 22-A) e TBARS (Figura 22-B) nos cinco momentos analisados.

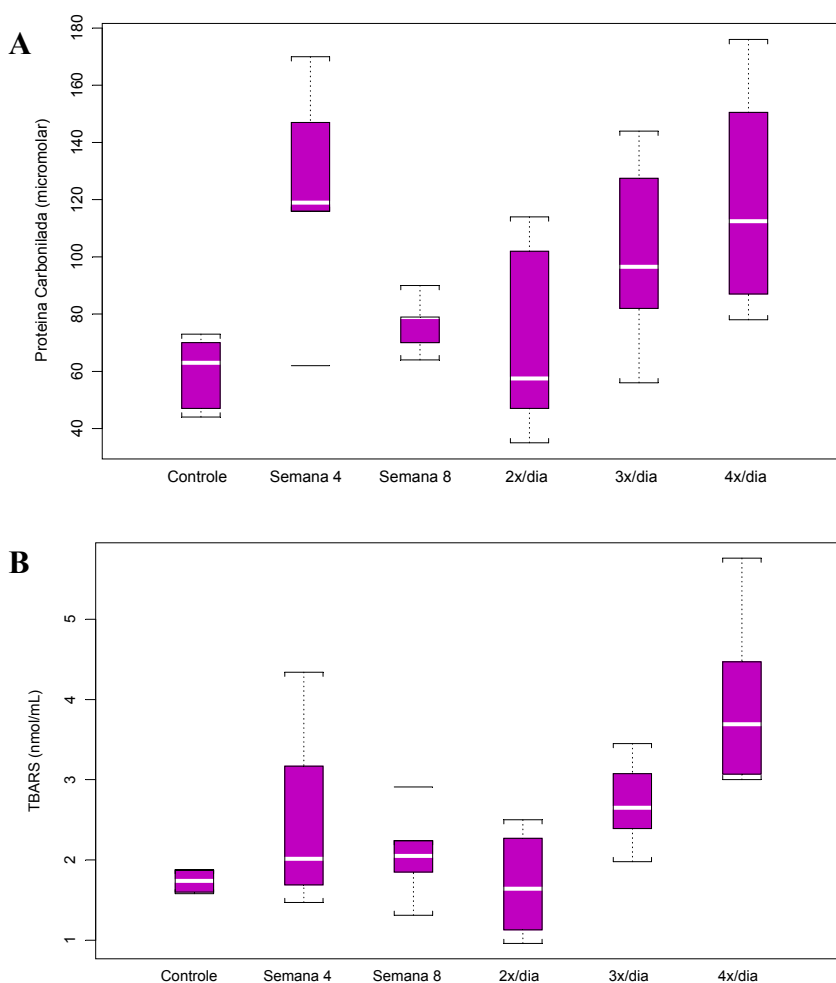


Figura 22. Concentração plasmática de PC e TBARS em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária do exercício (n=8).

Podemos observar praticamente as mesmas respostas obtidas no treinamento contínuo, com uma grande heterogeneidade na distribuição dos quartis desde o início do protocolo, com tendência de aumento, em relação ao grupo CO, mais acentuada nas análises 3x/dia e 4x/dia. A exceção foi vista na análise S4 de dosagem da concentração plasmática de PC (*Figura 22A*). O aumento do valor da mediana nesse momento chegou a 88.8% em comparação ao grupo CO, sendo que na análise 4x/dia obtivemos, ao compará-la também com o grupo CO, um aumento na ordem de 78.5%. Já em relação ao grupo treinado (S8), o aumento mediano chegou a 42.4%. Para TBARS (*Figura 22B*), os valores de mediana, até a análise 2x/dia, permaneceram em níveis muito próximos. Porém, ao compararmos os grupos 3x/dia e 4x/dia com o grupo de animais treinados (S8), observamos aumentos de 27% e 83%, respectivamente.

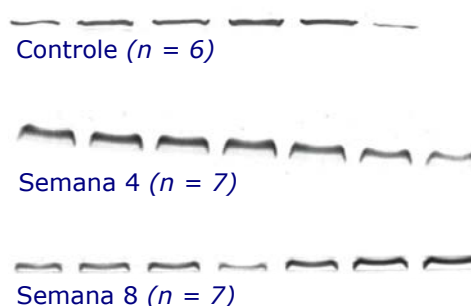
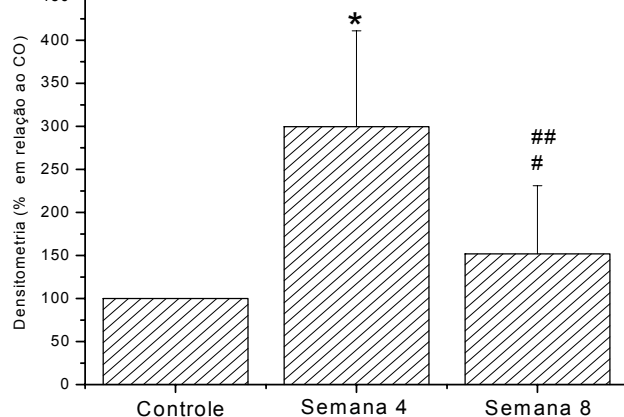
3.2- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Defesa Antioxidante

3.2.1- Expressão de Proteínas de Estresse “HSP70” em Leucócitos Totais

A **Figura 23** mostra a expressão de HSP70 em leucócitos totais após 8 semanas de treinamento intermitente e após 3 semanas de aumento na frequência diária dos exercícios.

A = Oito semanas de Treinamento Intermitente

A- Oito Semanas de Treinamento Intermitente



B – Treinamento Intermitente com Aumento na Frequência Diária de Sessões

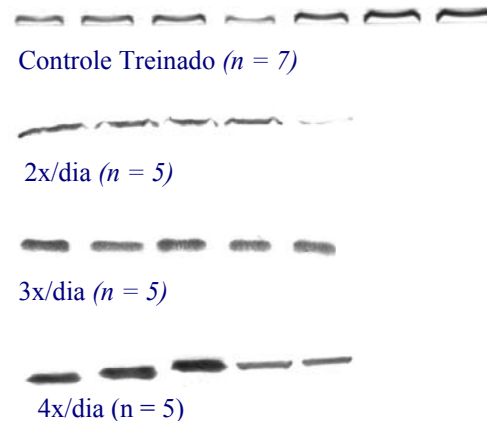
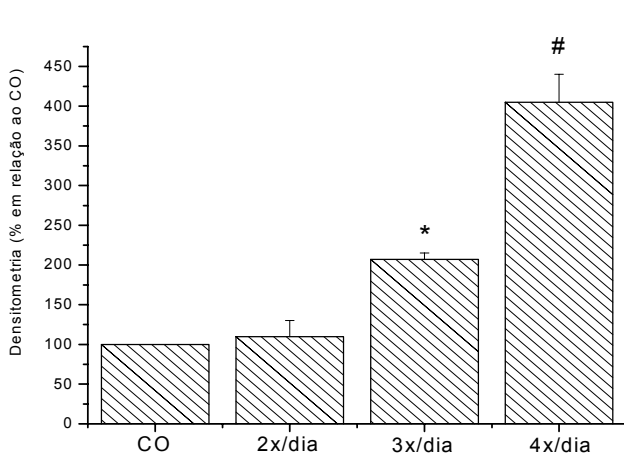


Figura 23. Expressão de HSP70 em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas (A) e ao aumento na frequência diária de corrida (B). Para (A) * = $P < 0.001$ em relação ao CO, # = $P < 0.01$ em relação a semana 4, ## = $P < 0.05$ em relação a CO. Para (B) * = $P < 0.001$ em relação a CO e 2x/dia; # = $P < 0.001$ em relação a CO, 2x/dia e 3x/dia.

Notamos na *Figura 23A* que, da mesma forma que o observado para o protocolo de treinamento contínuo, houve um aumento médio na expressão de HSP70 de aproximadamente 200% em relação ao grupo CO ($P<0.001$) e uma redução por volta de 150% ($P<0.01$) na análise S8 em relação a S4, refletindo adaptação ao treinamento. Apesar da diminuição em quantidade de HSP70 na análise S8, houve a permanência de um aumento de 51,84% nesse período em comparação aos valores controle ($P<0.05$).

A *Figura 23B* mostra o aumento crescente na expressão de HSP70 nas análises onde o objetivo foi induzir uma condição severa de estresse oxidativo. Utilizando o grupo treinado S8 como controle das análises 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia, obtivemos o seguinte quadro: aumentos significativos nas análises 3x/dia, quando comparada ao grupo CO ($P<0.001$; 107%) e a análise 2x/dia ($P<0.001$; 88%), e 4x/dia, quando comparada ao grupo CO ($P<0.001$; 305%), a análise 2x/dia ($P<0.001$; 268%) e a análise 3x/dia ($P<0.001$; 97%).

3.2.2- Sistema Enzimático Antioxidante no Hemolisado

A **Figura 24** apresenta os níveis de estresse oxidativo através das dosagens de CAT (Figura 24-A) e GR (Figura 24-B) nos cinco momentos analisados.

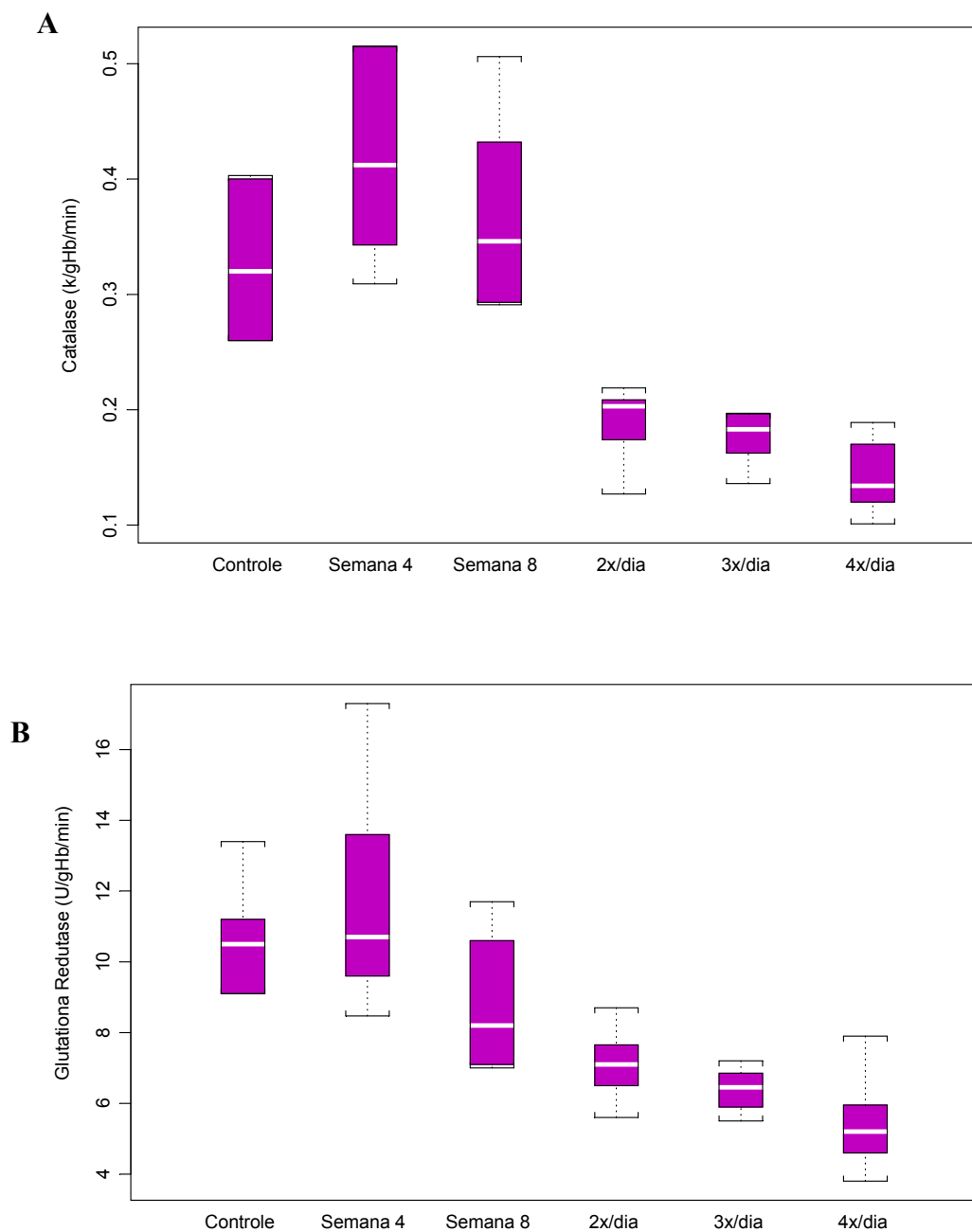


Figura 24. Atividade das enzimas CAT e GR no hemolisado de ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8).

Notamos que o exercício intermitente aumentou os valores da mediana da CAT (*Figura 24A*) em S4 de forma muito mais pronunciada do que para GR (*Figura 24B*). Os aumentos, em comparação ao grupo CO, foram de 28.1% e 1.9% para CAT e GR, respectivamente. Em S8, a atividade da CAT manteve-se elevada em 6.25% em relação ao valor da mediana do grupo CO, porém com queda de 17.1% em relação a S4. A atividade de GR sofreu uma queda de 23.7% em S8 quando comparada a S4. Quando aumentamos a frequência diária dos exercícios, houve uma queda gradual em ambas as enzimas, com uma resposta mais homogênea do grupo. Para CAT, os decréscimos em atividade chegaram a 41.2%, 47.1% e 61.8% ao compararmos os grupos 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia, respectivamente, com o grupo treinado S8. Já para GR, obtivemos decréscimos de 13.5%, 22% e 36.6% considerando os mesmo grupos analisados para CAT.

3.2.3- Sistema Antioxidante Não Enzimático Plasmático

A **Figura 25** mostra o estado antioxidante plasmático por dosagens das concentrações de GST (Figura 25-A) e ácido úrico (Figura 25-B) nos cinco momentos analisados.

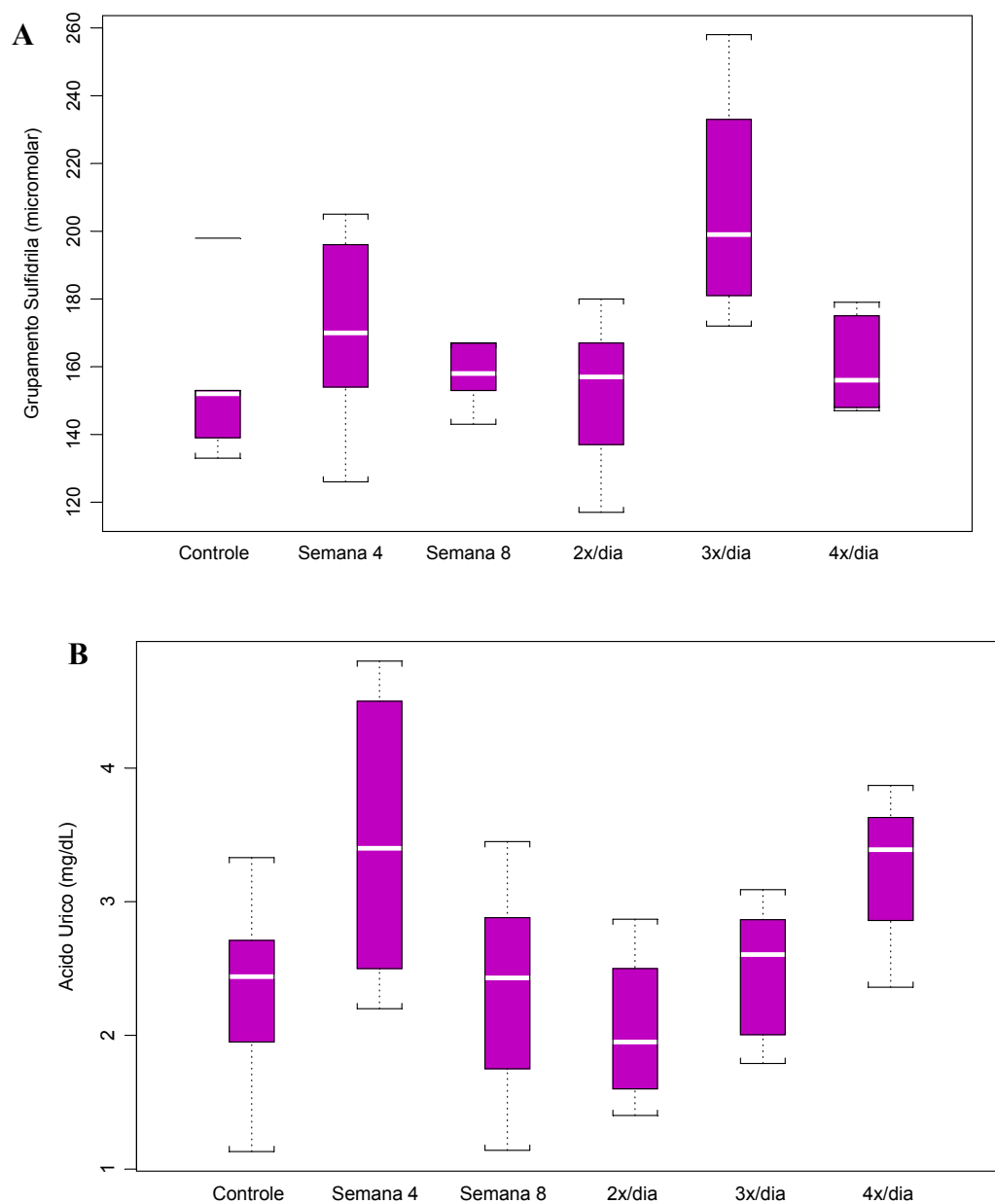


Figura 25. Concentração plasmática de GST (A) e ácido úrico (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8).

Os dados das concentrações plasmáticas de GST (*Figura 25A*) e ácido úrico (*Figura 25B*) mostraram uma grande variabilidade em relação a esse tipo de treinamento, dificultando estabelecer relação entre o potencial de estresse oxidativo e tais marcadores da mesma forma que foi possível através das análises das enzimas antioxidantes e expressão de HSP70. Porém, podemos perceber que o treinamento intermitente, até a quarta semana, propiciou que 75% dos animais tivessem um aumento na concentração plasmática de GST (pode ser visto que 3 quartis do grupo S4 encontram-se acima da mediana do grupo CO), indicando adaptação aos níveis de estresse oxidativo gerados nessa etapa inicial. O aumento na concentração de ácido úrico em S4, na mesma proporção vista para GST, indica que houve elevação nos níveis de estresse oxidativo neste estágio do treinamento.

3.3- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Estresse Metabólico

A **Figura 26** apresenta o estado catabólico protéico através das dosagens das concentrações de uréia (Figura 26-A) e creatinina (Figura 26-B) plasmáticas nos cinco momentos analisados.

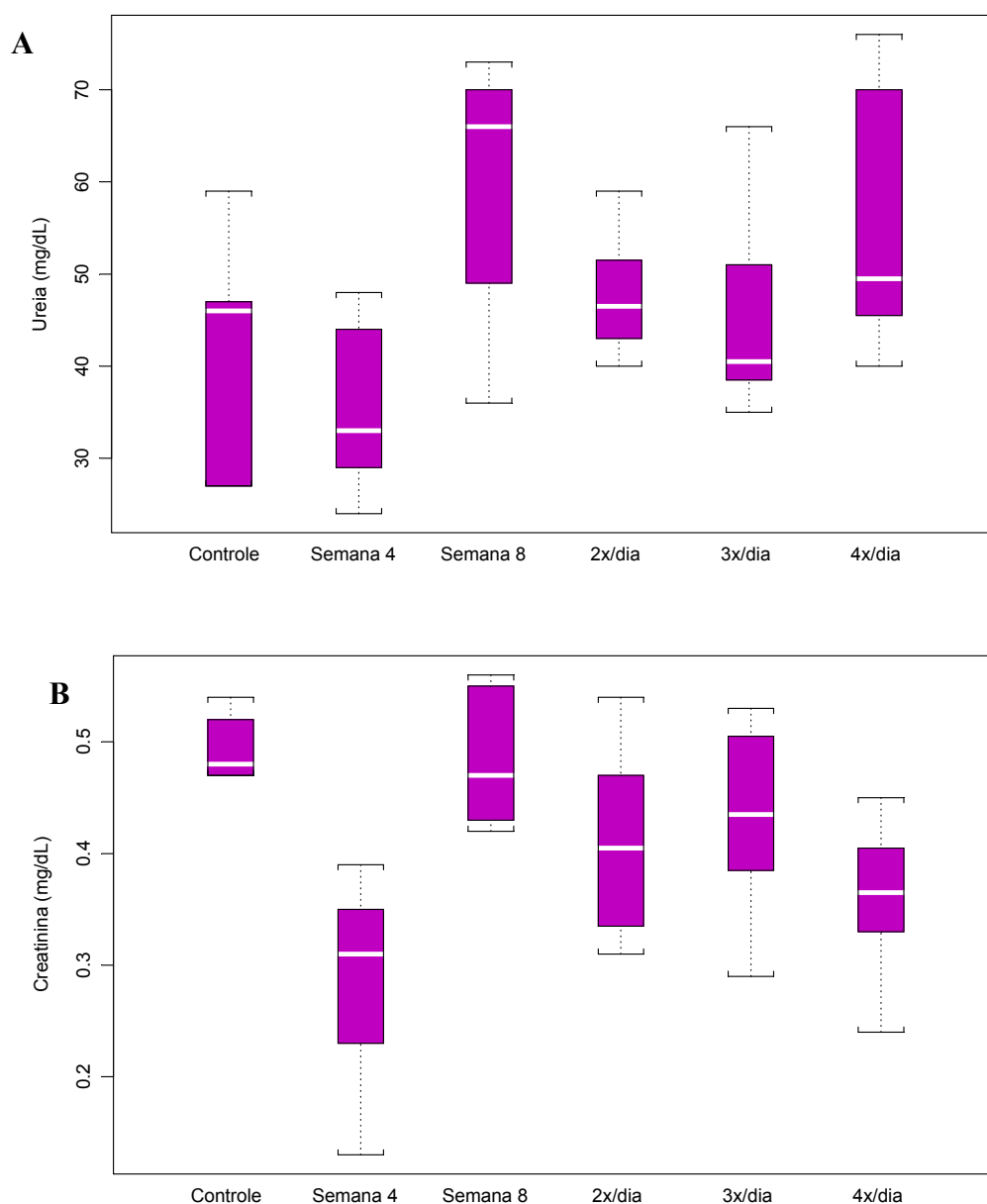


Figura 26. Concentração plasmática de uréia (A) e creatinina (B) em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n=8).

Os valores da mediana da concentração plasmática de uréia (*Figura 26A*) aumentaram a partir da análise S8, sugerindo um efeito mais tardio na taxa catabólica protéica. O aumento mediano em S8, em comparação ao grupo S4, chegou a exatos 100%. Após a análise S8, a concentração de uréia no plasma não se alterou de forma tão acentuada, mesmo com o aumento na frequência diária dos exercícios de corrida. Da mesma forma que o observado para o treinamento contínuo, a concentração de creatinina (*Figura 26B*) diminuiu drasticamente somente após as primeiras quatro semanas de exercício intermitente, voltando a valores próximos do grupo CO na oitava semana. Tal diminuição em S4, em relação a mediana do grupo CO, chegou a 35.5%. Na fase onde houve a tentativa de indução de “overreaching” (análises 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia), obtivemos uma grande dispersão dos resultados, tal como ocorrido em S4, porém com os valores de mediana fluando numa mesma faixa. Esses dados sugerem que o estresse dessas últimas três semanas de treinamento também não foi predominantemente metabólico.

3.4- Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Alteração Muscular

A **Figura 27** mostra os níveis de alterações musculares através das dosagens das atividades da CK (Figura 27-A) e TGO (Figura 27-B) plasmáticas dos animais nos cinco momentos analisados.

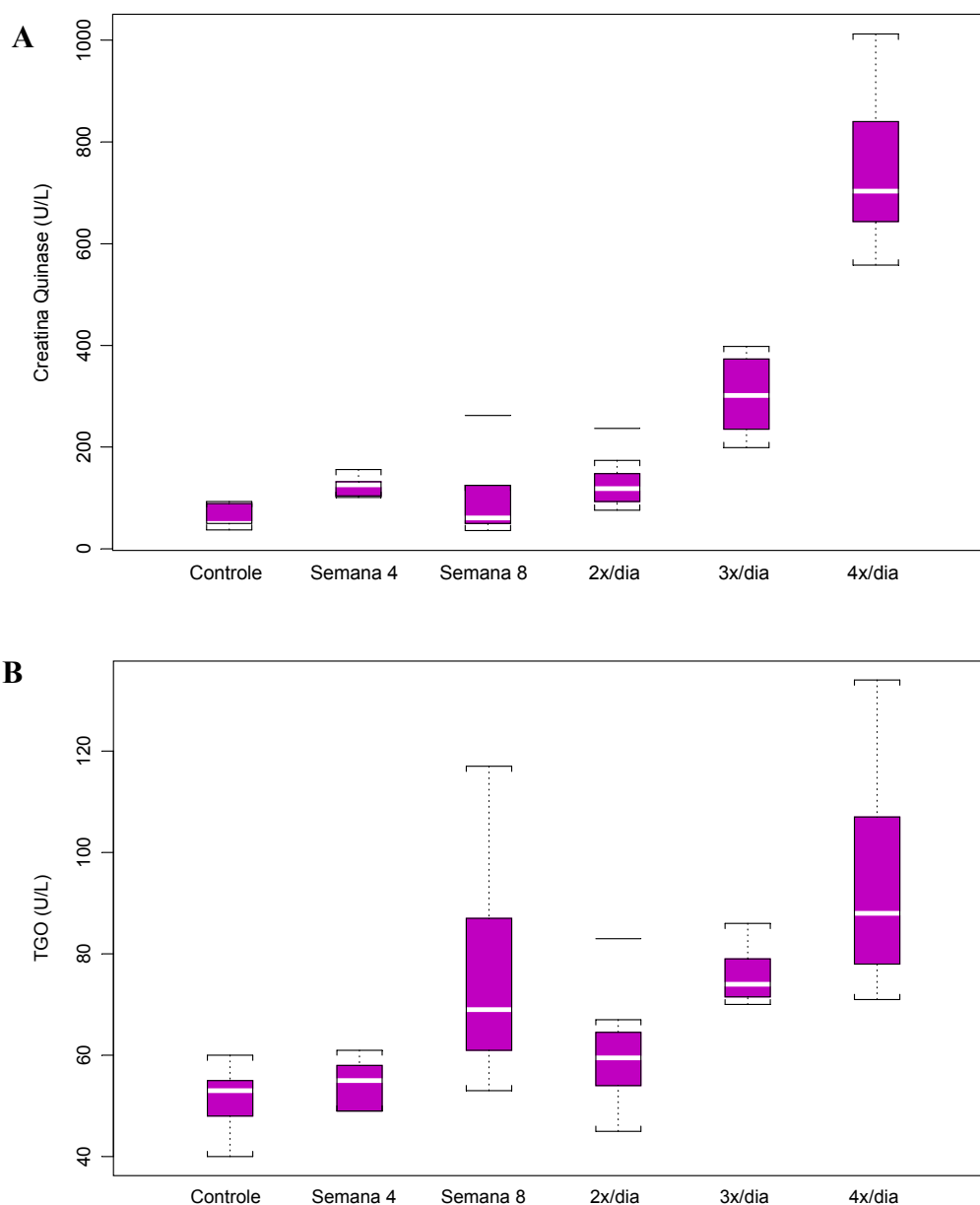


Figura 27. Concentração plasmática de CK e TGO em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida (n = 8).

Notamos que somente a partir da décima semana de treinamento (análise 3x/dia) houve um aumento na liberação de CK (*Figura 27A*) no plasma. Os aumentos da mediana chegaram a 394% (3x/dia) e 1052% (4x/dia) em comparação com o grupo treinado S8. Quanto as análises da atividade de TGO (*Figura 27B*), obtivemos um aumento em mediana de 30% em S8 em relação ao grupo CO. Da mesma forma vista nas análises de CK, os maiores aumentos ocorreram em 3x/dia e 4x/dia, com valores de 39% e 66%, respectivamente, quando são comparadas ao grupo CO. Os resultados sugerem que a dosagem de CK no plasma é um marcador mais efetivo para detecção de alterações musculares severas.

3.5- Discussão

As análises de alterações musculares (CK e TGO) do treinamento intermitente (treinamento IT) não foram muito diferentes daquelas obtidas no treinamento CT. Houve uma tendência de aumento na concentração plasmática de CK na análise da quarta semana de treinamento, refletindo a elevação progressiva da sobrecarga. Contudo, a estabilização da sobrecarga induziu o mesmo efeito visto para o treinamento CT, manifestando queda no valor de mediana para próximo do obtido para o grupo CO. A análise da concentração de TGO também demonstrou que tal enzima possui liberação tardia no plasma em situação de treinamento IT, sendo que o pico obtido foi visto no momento da análise da oitava semana (S8). Podemos considerar que há a indução de alterações nas estruturas musculares independentemente do protocolo e tipo de exercício empregado, sendo o fator primordial para a ocorrência de tais alterações o aumento no volume e intensidade do exercício.

Sendo assim, quando os animais foram submetidos a uma estrutura mais severa de treinamento, com incremento de sessões de corrida no mesmo dia e, desta forma, redução no tempo de recuperação, houve novamente uma grande elevação na concentração plasmática de CK, nas análises 3x/dia e 4x/dia, e de TGO, sobretudo na análise 4x/dia. Esses aumentos suplantaram aqueles obtidos nas análises da quarta semana (para CK) e oitava semana (para TGO). Smith (2000) considera a hipótese de que a presença constante de microlesões no sistema músculo-esquelético e sua persistência podem ser um indício da instalação da síndrome do “overtraining”.

Como já ressaltado, a detecção da síndrome do “overtraining” é uma tarefa difícil e complexa, dependente da análise de multi-fatores, sejam da ordem bioquímica, fisiológica ou comportamental. A análise da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GR ao longo do protocolo CT foi muito pertinente para a detecção do que chamamos de “overreaching”, que é uma condição de estresse com características mais metabólicas, que precede um estado de “overtraining”. Porém, poucos são os estudos na literatura que se utilizam de protocolos intermitentes. Mas parece existir um consenso de que exercícios realizados em alta intensidade (com predomínio do metabolismo anaeróbio) e intercalados por pausas curtas (com predomínio do metabolismo aeróbio) possam simular um quadro de isquemia-reperfusão (anoxia-reoxigenação), o qual é conhecido como grande gerador de espécies reativas de oxigênio (Sjödin et al., 1990). Smolka e colaboradores (2000), neste direcionamento, sugerem que animais treinados por protocolo intermitente podem ser mais vulneráveis a uma situação de estresse oxidativo em comparação a animais submetidos a treinamento contínuo. Apesar desta maior tendência relatada de o treinamento intermitente instalar um quadro de estresse oxidativo, Hellsten e equipe (1996) demonstraram, através de treinamento intermitente de ciclismo em humanos, que é possível a indução da elevação da capacidade anaeróbia de geração de energia e, sobretudo, aumentar os níveis de proteção enzimática antioxidante muscular. Vale novamente ressaltarmos que há a necessidade de levarmos em conta as diferenças entre os protocolos e os sujeitos de cada estudo.

Nossos resultados mostraram que o treinamento IT induziu uma discreta elevação na atividade da CAT na quarta semana de treinamento, mantendo-se a mediana ainda elevada, em relação ao grupo CO, na análise S8. Com o aumento no número de sessões de treino, tanto CAT quanto GR sofreram quedas consideráveis de atividade, sendo que os grupos analisados tornaram-se muito homogêneos. Isso reflete que houve uma influência latente e abrangente a todos os animais dos níveis de estresse oxidativo alcançados nessa fase severa do treinamento, impedindo uma resposta adaptativa satisfatória. Esses resultados novamente corroboram com a premissa de que a modulação das enzimas antioxidantes é um evento dependente da concentração e do tempo de exposição celular frente às espécies reativas de oxigênio (Ji et al., 1990; Powers et al., 1994). O que nos fica claro, portanto, é que há um limiar adaptativo ótimo para a ocorrência de alterações favoráveis no sistema antioxidante, pois o estímulo primário para tal ocorrência é um

aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Se esse aumento ultrapassar um nível satisfatório, o sistema entra em desbalanço e há a instalação de uma situação de estresse oxidativo. Um estudo de Barclay e Hansel (1991) afirma que a presença de radicais livres acelera fadiga muscular oxidativa durante atividades que alternam alta intensidade de exercícios e pausas recuperativas. Ao longo do tempo, podemos especular que o efeito acumulativo desses radicais livres pode vir a gerar uma impossibilidade de recuperação do organismo e interferir na condição adaptativa do sistema enzimático antioxidante.

Os valores de GST no plasma reforçam a idéia que o treinamento IT, até a sua oitava semana, não foi tão satisfatório em aumentar a capacidade antioxidante sistêmica. Na análise S4 percebe-se uma tendência de aumento de mediana na concentração plasmática de GST, porém acompanhada por uma grande dispersão dos resultados, com valores até mais baixos do que observados no grupo CO. Com o aumento no número de sessões de treino, observou-se que na análise 3x/dia houve uma significativa elevação na concentração plasmática de GST, onde o quartil inferior chega a ultrapassar o valor de mediana obtido pela análise da quarta semana de treinamento. Essa resposta adaptativa parece surgir como uma tentativa de compensar a grande queda de atividade enzimática vista no treinamento severo. Mas na análise 4x/dia há um decréscimo em GST bem evidente em relação à análise 3x/dia, com retorno a índices encontrados para o grupo CO, S8 e 2x/dia. Essa queda acentuada pode ser um reflexo da maior condição de ataque oxidativo vista na análise 4x/dia.

Tal como no treinamento CT, utilizamos as análises de concentração plasmática de ácido úrico como um indicador da condição antioxidante plasmática. Vimos que a hipoxantina é convertida a ácido úrico via ativação da enzima xantina oxidase durante exercícios de alta intensidade (Hellsten et al., 1988), condição que caracteriza o nosso protocolo de treinamento IT. Os resultados mostraram que o treinamento IT induziu aumento considerável na concentração plasmática de ácido úrico no momento de implementação da maior sobrecarga de corrida (análises S4 e 4x/dia). Considerando as características metabólicas dos dois tipos de protocolos, o treinamento IT possui uma tendência maior de gerar um quadro de isquemia-reperfusão, pelo fato dos exercícios de corrida de alta intensidade (condição de anoxia) serem intercalados com períodos recuperativos de pausa passiva (condição de oxigenação). A literatura aponta que a

ativação da enzima xantina oxidase ocorre principalmente em eventos onde há isquemia-reperusão da célula (Adkison et al., 1986; Granger et al., 1986).

Fechando a análise do sistema de defesa antioxidante, observamos que o comportamento da expressão de HSP70 induzida pelo treinamento IT foi semelhante ao visto no treinamento CT. Mas em termos de quantificação pela análise densitométrica, o aumento médio em expressão na quarta semana de treinamento foi extremamente significativo ($P < 0.001$) em relação ao obtido no treinamento CT nesse mesmo período. Deve ser ressaltado que os níveis de atividade das enzimas antioxidantes, na quarta semana de treinamento, não sofreram aumentos tão significativos em comparação ao grupo CO. Esses resultados novamente sugerem que as HSPs estariam atuando como um sistema protetor auxiliar das proteínas celulares danificadas oxidativamente. Os resultados da análise da oitava semana sugerem que há uma resposta adaptativa na expressão das HSP70, mediada pela atenuação dos níveis de ataque oxidativo e na estabilização da sobrecarga de treinamento. Nesse caso vale novamente pontuar os pressupostos de Ryan e colaboradores (1991), os quais sugerem que a quantidade de HSP70 sintetizada parece ser dependente da severidade do estresse submetido ao organismo e do nível celular de HSPs existente anteriormente à condição de estresse. Esta resposta adaptativa vista na análise da oitava semana enquadra-se no conceito de “termotolerância adquirida” (Gerner, Scheneider, 1975), o qual supõe que a síntese de HSPs torna-se reduzida quando as mesmas são expostas a um segundo estresse térmico.

O conceito de “termotolerância adquirida” também pode ser observado na análise 2x/dia. Nota-se que, quando comparamos essa análise com a do grupo de animais adaptados (grupo S8, o qual classificamos nesse experimento como grupo CO), não há alteração nos níveis expressos de HSPs. Isso significa que organismos adaptados a certas condições de exposição ao estresse desenvolvem estratégias de resistência a uma segunda exposição até mais severa. Porém, com o aumento na frequência de corrida diária, nas análises 3x/dia e 4x/dia, houve uma resposta diretamente proporcional entre sobrecarga e expressão de HSPs. Os aumentos crescentes dos índices de ataque oxidativo com os decréscimos evidentes de atividade das enzimas antioxidantes geraram uma condição de estresse oxidativo que colaborou para uma maior expressão de HSPs.

Contudo, em situações severas de estresse, torna-se difícil compreender a exata função das HSPs. O dilema é compreender o seguinte paradoxo: a elevação exacerbada da síntese de HSPs representa que a célula é capaz de defender-se dos altos níveis de estresse por meio de seu aparato de síntese nuclear ou que a super expressão de HSPs indica que está havendo uma danificação tão drástica de proteínas a ponto de gerar um quadro de difícil reversibilidade das respostas induzidas pelo estresse? Samali e Orrenius (1998) indicaram que o acúmulo de proteínas danificadas pode não somente sinalizar a indução de HSPs, mas também iniciar um programa de auto-destruição celular, conhecido como apoptose. A apoptose é um processo inato e evolucionário pelo qual as células, sistematicamente, inativam seus componentes estruturais e funcionais. Ocorre normalmente durante o desenvolvimento dos organismos multicelulares através de um programa regulado geneticamente ou durante alterações do sistema imunológico. Condições de estresse como calor, radiação, hipóxia, oxidantes e exposição a metais pesados podem induzir o programa apoptótico (Edwards, 1998; Samali, Orrenius, 1998; Raha, Robinson, 2001). No caso dos nossos protocolos, os marcadores de estresse oxidativo indicaram que houve uma progressão drástica das alterações celulares, podendo ser entendido que a expressão elevada das HSPs foi um dispositivo a mais da célula em “denunciar” os níveis abruptos de estresse aos quais ela estava sendo submetida.

Já colocamos que houve um aumento nos níveis de ataque oxidativo no momento do treinamento severo. Tanto as análises de PC quanto as de TBARS sofreram uma elevação progressiva, em comparação ao grupo de animais treinados (S8), nessa fase do treinamento. O acréscimo em sobrecarga de exercícios induziu um aumento na produção de espécies radicalares de oxigênio, o que resultou em dificuldade de modulação do sistema enzimático antioxidante, com uma efetiva queda de atividade das enzimas CAT e GR, e no aumento de oxidações das estruturas lipídicas e protéicas. Analisando os resultados obtidos no momento 4x/dia, podemos sugerir que houve a instalação de um quadro de estresse oxidativo.

Outro momento onde detectamos elevação na concentração plasmática de TBARS e, sobretudo, de PC foi na análise da quarta semana. Essa condição deve-se ao fato do aumento progressivo de intensidade, duração e frequência de corrida. Mas, tal como observado para o treinamento CT, houve uma modulação positiva das enzimas

antioxidantes estudadas, o que não chega a refletir, portanto, uma situação de estresse oxidativo. Valores de TBARS muito próximos daqueles obtidos pelo grupo CO e uma sensível queda na concentração plasmática de PC foram vistos na oitava semana, sugerindo que os animais treinados estavam respondendo de forma positiva aos estímulos do protocolo.

Os marcadores de alterações metabólicas - uréia e creatinina - tiveram um comportamento muito próximo ao obtido pelo treinamento CT, mostrando grande dispersão dos resultados. Bruin e colaboradores (1994), apesar de terem observado várias alterações metabólicas em cavalos de corrida submetidos a exaustivos treinamentos de endurance e intervalado, que os permitiram classificá-las como “overtraining”, não obtiveram modificações significativas na concentração plasmática de uréia, por exemplo. Não encontramos trabalhos na literatura relacionando alterações de concentração plasmática de creatinina e protocolos de treinamento intermitente. Por isso que se faz importante a utilização de vários marcadores de estresse, sejam de ordem fisiológica ou bioquímica, pois o heterocronismo das respostas orgânicas aos agentes estressores torna-se um fator a mais de dificuldade de detecção da síndrome do supertreinamento.

Concluindo, podemos inferir que o protocolo IT não foi tão satisfatório quanto o protocolo CT, até a análise da oitava semana, para induzir adaptações positivas na capacidade antioxidante. Esse fato pode ser um agravante, pois a característica metabólica de isquemia-reperfusão gerada nessa condição de exercício tende a induzir uma maior produção de espécies radiculares de oxigênio. Isso pode conduzir a uma situação mais pronunciada de estresse oxidativo e alterações musculares graves, de difícil recuperação.

Do ponto de vista metodológico, podemos pontuar a dificuldade em se obter adaptações positivas através de um protocolo intermitente de corrida utilizando-se animais. Um fator chave ao longo do processo de treinamento é manter efetivamente os animais correndo na esteira. Como o tempo de corrida de cada exercício é curto, qualquer descuido do animal pode interferir no resultado das análises. Muitas vezes, o animal consegue permanecer sem correr por ficar encostado na parte posterior da esteira, mesmo esta estando em rotação. Essa posição pode causar lesões em articulações e músculos, sendo um outro fator que pode contribuir com interpretações indevidas dos resultados.

3.6- Conclusão

- O aumento progressivo da sobrecarga, na fase de adaptação do protocolo, induziu elevação na concentração plasmática de PC muito mais evidente do que dos níveis TBARS, de forma que a técnica de dosagem de PC empregada pode ser considerada uma ferramenta eficaz de controle de instalação de estresse oxidativo.
- O aumento da frequência de corrida intermitente, na fase de treinamento severo, induziu um mesmo perfil de elevação progressiva nas concentrações plasmáticas de PC e TBARS, o que indica que os níveis de estresse induzidos pelo exercício foram suficientes para alterações oxidativas severas em estruturas de lipídeos e proteínas.
- Níveis de HSP70 em amostras de leucócitos totais acompanharam a mesma condição de formação de grupamentos carbonila no plasma, tanto na fase de adaptação quanto no período de treinamento severo, novamente sugerindo que as HSP70 respondem tal como um sistema de defesa antioxidante.
- As enzimas antioxidantes CAT e GR sofreram aumento discreto de atividade na fase de adaptação do treinamento, porém com queda significativa no período onde houve aumento da frequência de sessões diárias de corrida. Essa queda severa dos níveis enzimáticos antioxidantes sugere que pode até ter ocorrido degradação das próprias enzimas analisadas.
- O aumento progressivo na concentração plasmática de PC e TBARS, com concomitante redução na atividade enzimática antioxidante, indica que houve a instalação de um quadro de estresse oxidativo no período de indução de “overreaching”.
- Tal como no treinamento contínuo, não houve alterações tão evidentes dos marcadores de catabolismo muscular analisados (uréia e creatinina), sugerindo que eventos bioquímicos precedem mudanças severas dos mecanismos fisiológicos de controle muscular.
- Níveis de alterações da permeabilidade da célula muscular, vistos através das dosagens de CK e TGO, confirmam que o protocolo de treinamento intermitente severo foi capaz de causar mudanças significativas nas estruturas de membrana. Os resultados de peroxidação lipídica (TBARS) colaboram com essa análise.
- Fica evidente que o aumento em frequência de corrida e a diminuição do tempo de recuperação entre uma sessão de treino e outra, independente do protocolo de

treinamento, são fatores cruciais para a instalação de uma condição de estresse oxidativo e “overreaching”.

CAPÍTULO 4

A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE LIMAR DE ESTRESSE APLICADA EM JOGADORES PROFISSIONAIS DE FUTEBOL

Durante o Campeonato Brasileiro de Futebol de 2001 realizamos cinco coletas de sangue em todo o elenco de jogadores da Associação Atlética Ponte Preta, sendo a primeira coleta no *período pré-competitivo* e as outras quatro coletas ao longo do campeonato. Os mesmos marcadores de estresse oxidativo quantificados nos animais foram testados nos jogadores de futebol, com exceção da análise de expressão de HSP70 em leucócitos.

O objetivo deste monitoramento junto aos jogadores de futebol da categoria profissional foi testar a aplicabilidade da técnica de *limiar de estresse*. Dentro dos princípios da nossa técnica, em dois momentos distintos do campeonato realizamos monitoramento individualizado de alguns jogadores, por estes apresentarem valores de certos parâmetros muito diferentes do restante do grupo. Neste momento de detecção da alteração dos parâmetros bioquímicos, os jogadores tiveram a carga de esforço diminuída e o tempo de recuperação aumentado por duas semanas, sendo reavaliados novamente ao final dessas semanas (17/07 e 18/09). Com isso, após os resultados das análises sangüíneas, foi possível individualizar e corrigir as cargas de treinamento e tempo de recuperação daqueles atletas detectados em limiar de estresse, permitindo que todo o grupo alcançasse uma adaptação positiva, sem a ocorrência de lesões musculares mais graves.

4.1- Marcadores de Estresse Oxidativo

A **Figura 28** mostra os resultados das dosagens de concentrações plasmáticas de PC e TBARS dos 18 jogadores presentes em todas as coletas de sangue ao longo do Campeonato Brasileiro.

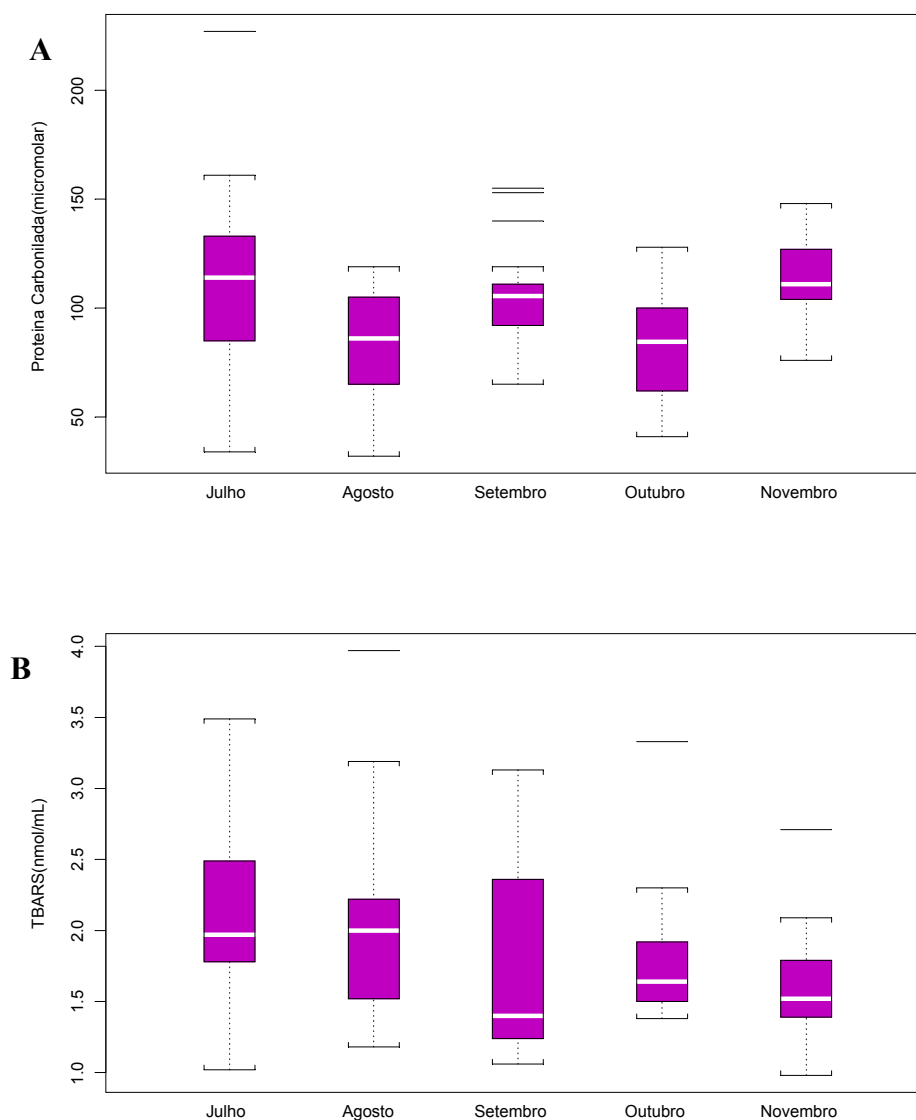


Figura 28. Concentrações plasmáticas de PC (A) e TBARS (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro de 2001.

Podemos observar que alguns atletas mostravam valores bem mais altos que o restante do grupo nos dois parâmetros analisados. Essa condição também coloca em evidência uma dispersão dos

resultados obtidos pelo grupo, com grande variabilidade dos quartis. A mediana dos dados da concentração plasmática de PC praticamente não se alterou nos momentos analisados. Já a mediana dos dados da concentração plasmática de TBARS mostrou uma tendência de queda ao longo do campeonato, indicando um efeito adaptativo.

4.2- Marcadores de Defesa Antioxidante

4.2.1- Sistema Antioxidante Enzimático – Hemolisado

A **Figura 29** mostra as análises de atividades das enzimas CAT e GR no hemolisado dos 18 jogadores presentes em todas as coletas de sangue ao longo do Campeonato Brasileiro.

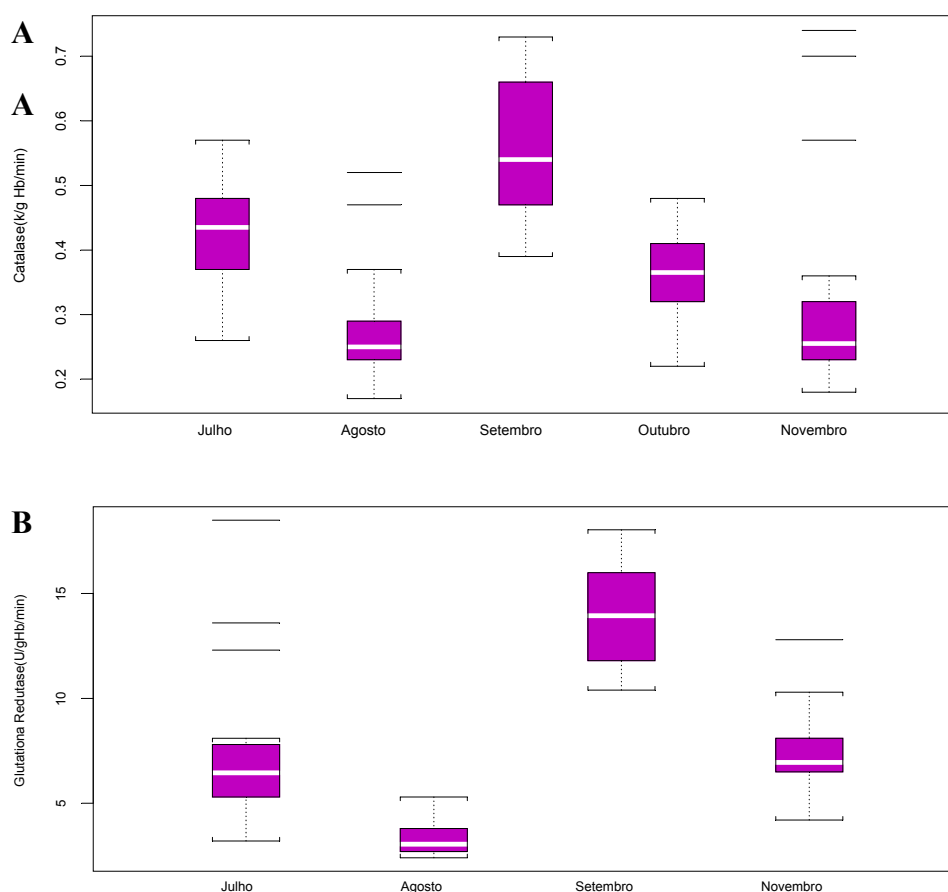


Figura 29. Atividade no hemolisado das enzimas GR (A) e CAT (B) ao longo dos cinco meses do Campeonato Brasileiro. A análise de GR em outubro não foi realizada.

Os valores mais baixos de atividade para as duas enzimas foram detectados na segunda análise, feita após o jogo de estreia no campeonato, sugerindo ser esse um dos momentos mais estressantes da

competição. O aumento nos valores da mediana da atividade de ambas as enzimas, na terceira análise, sugere uma adaptação aos níveis de estresse imposto pelos jogos e treinos. Interessante notar que CAT e GR modulam-se de forma diretamente proporcional, respondendo na mesma frequência às solicitações do estresse imposto. Após o pico de atividade das enzimas antioxidantes, obtido na análise de setembro, há uma forte tendência de queda nas análises subsequentes. Essa condição reflete o efeito cumulativo do estresse gerado pelos jogos e treinamento, mostrando que a tarefa de induzir supercompensação metabólica e recuperação física torna-se difícil, porém extremamente necessária.

4.2.2- Sistema Antioxidante Não Enzimático - Plasma

A **Figura 30** mostra os resultados das concentrações plasmáticas de GST e ácido úrico dos 18 jogadores presentes em todas as coletas de sangue ao longo do Campeonato Brasileiro.

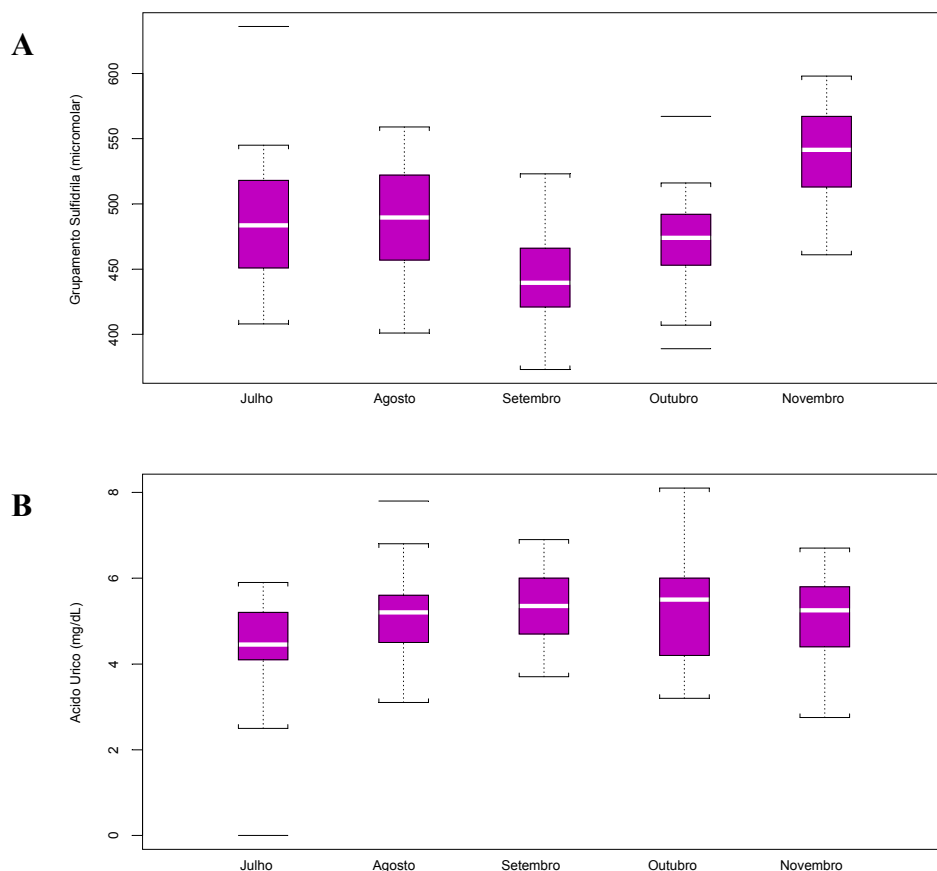


Figura 30. Concentrações plasmáticas de GST (A) e ácido úrico (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro

Os valores apresentados mostram que a defesa antioxidante plasmática praticamente não foi alterada, sendo eficiente para proteger os atletas em todos os momentos analisados.

4.3- Marcadores de Estresse Metabólico

A **Figura 31** mostra os resultados das concentrações plasmáticas de uréia e creatinina dos 18 jogadores presentes em todas as coletas de sangue ao longo do Campeonato Brasileiro.

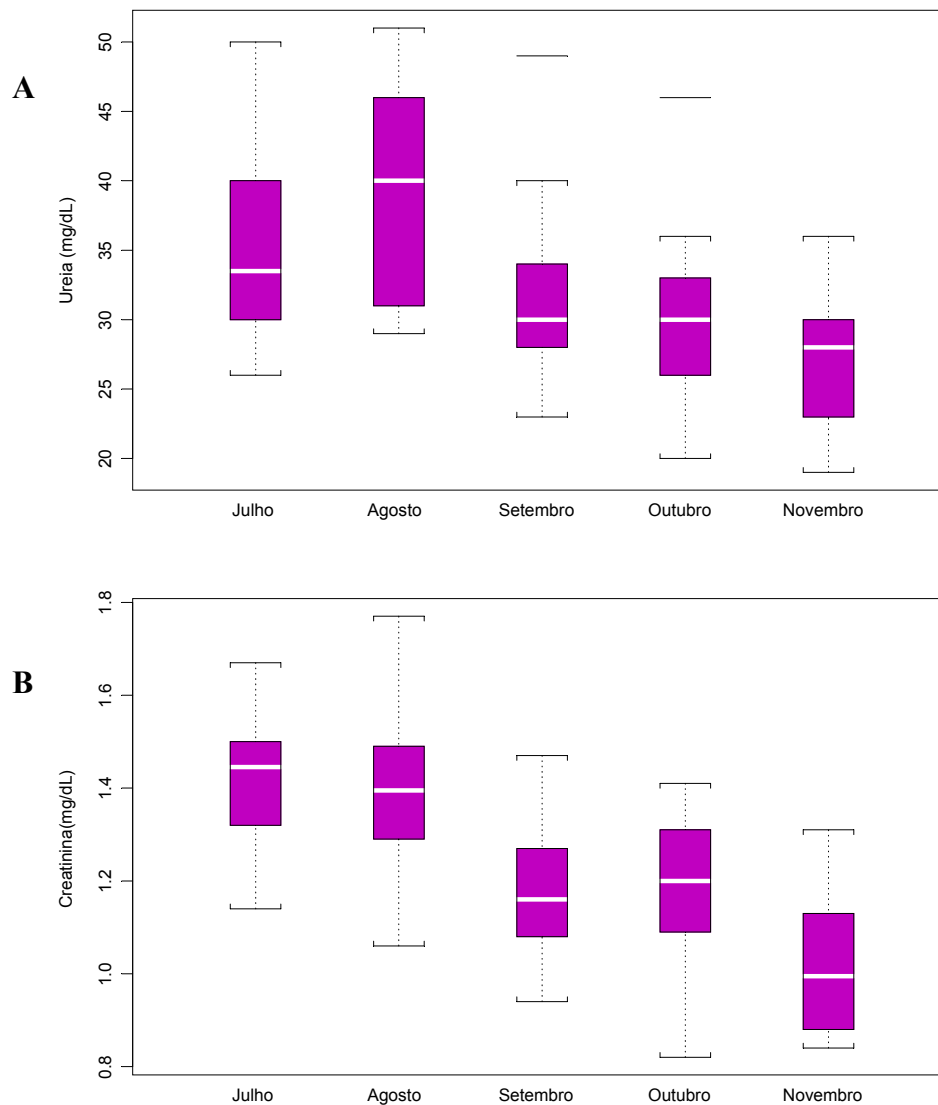


Figura 31. Concentrações plasmáticas de uréia (A) e creatinina (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro de 2001.

Os valores da concentração plasmática de uréia mostram que não houve um aumento acentuado no catabolismo protéico ao longo do campeonato, com níveis de uréia ligeiramente mais elevados no início do campeonato (2ª análise) e decrescentes a partir de então (valores da mediana). Esses dados sugerem que os atletas estavam com seus estoques de glicogênio adequadamente repostos durante todo o período competitivo. A concentração plasmática de creatinina mostrou uma diminuição nos valores da mediana no início do campeonato, refletindo o maior estresse muscular imposto para os jogadores, que depois se estabilizou novamente em valores mais altos (o mesmo comportamento observado nos ratos exercitados).

4.4- Marcadores de Alteração Muscular

A **Figura 32** mostra os resultados das atividades plasmáticas de CK e TGO dos 18 jogadores presentes em todas as coletas de sangue ao longo do Campeonato Brasileiro.

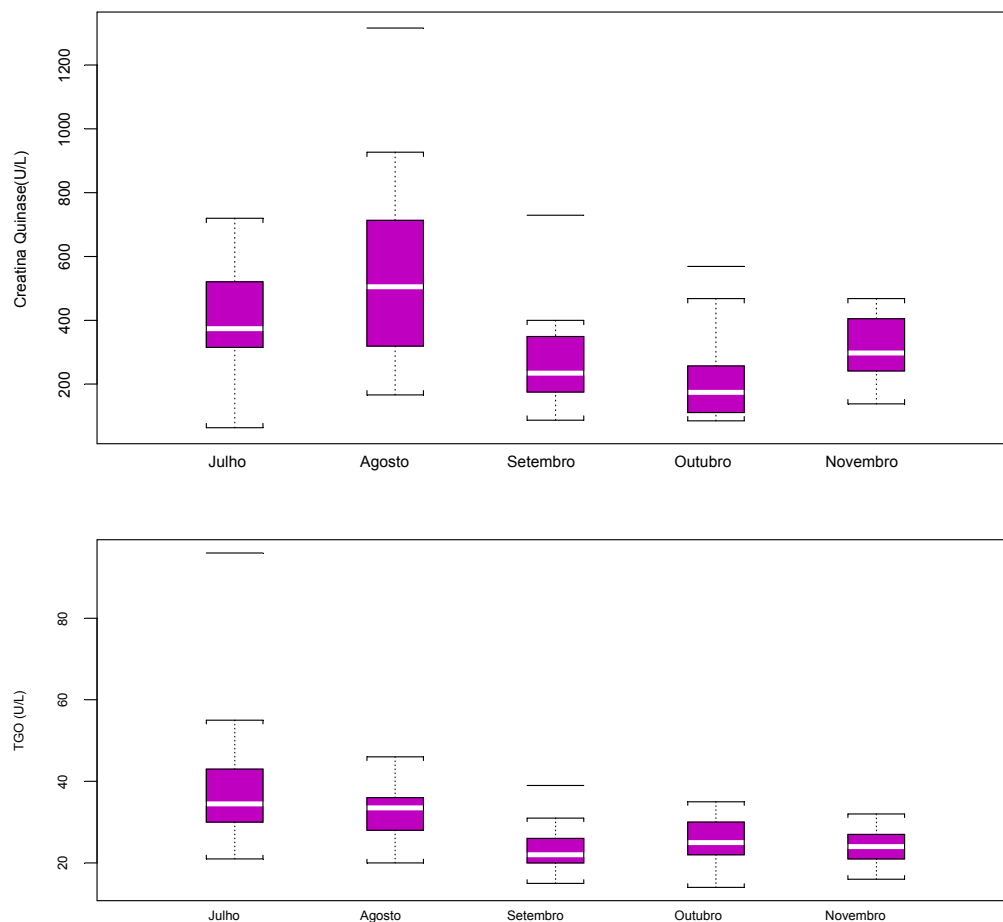


Figura 32. Concentrações plasmáticas de CK (A) e TGO (B) ao longo de 5 meses do Campeonato Brasileiro de 2001.

Podemos observar que houve uma diminuição e estabilização nos valores de CK ao longo dos meses, sugerindo uma adaptação muscular ao estresse do treinamento e competição em todo o grupo. Podemos observar também que os períodos mais críticos para os atletas foram a fase preparatória e o início do campeonato. Não obtivemos grande variação nos níveis plasmáticos de TGO, indicando que a quantidade de esforço físico empregada não foi suficiente para alterar tal marcador.

4.5- Atletas Individualizados ao Longo do Campeonato

A **Tabela 6** mostra os valores alterados nos atletas individualizados após as análises de agosto e setembro e os resultados obtidos naqueles parâmetros após serem mantidos duas semanas em atividades com menor intensidade de esforço.

Tabela 6. Atletas individualizados, parâmetro alterado e resultado após duas semanas de individualização do grupo.

Atletas Individualizados	Parâmetros Alterados	Resultados Após Análise Extra
1	CK = 720 U/L	CK = 431 U/L
2	CK = 1090 U/L	CK = 482 U/L
3	CK = 5133 U/L	CK = 354 U/L
4	CK = 983 U/L	CK = 513 U/L
5	[GS] = 384 μ M GR=2,5 U/g Hb	[GS] = 454 μ M GR=15,5 U/gHb
6	CK = 687 U/L	CK = 819 U/L
7	[Ac. Úrico] = 9,6 mg/dL	[Ac. Úrico] = 6,0 mg/dL
8	CK = 729 U/L GR=5,0 U/gHb	CK = 472 U/L GR=19,0 U/gHb
9	CK = 1154 U/L	CK = 680 U/L
10	[Uréia] = 45 mg/dL TBARS = 3,0 nmol/mL CAT=9,0 k/gHb/min	[Uréia] = 39 mg/dL TBARS = 1,6 nmol/mL CAT=18 k/gHb/min

Podemos observar que o maior cuidado com esses atletas reverteu, na quase totalidade, os efeitos nocivos do estresse a que estavam submetidos, permitindo uma adaptação do organismo, com a volta dos parâmetros bioquímicos alterados para os valores de referência.

4.6- Discussão

A análise dos dados sugere que a fase preparatória (análise 1) e o início do campeonato (análise 2) foram os momentos que apresentaram um maior nível de estresse, decorrentes, sobretudo, dos estímulos do treinamento na pré-temporada e início dos jogos da competição. Neste momento, o treinamento físico estava com progressão da sobrecarga, com grande enfoque para os exercícios de força. Estímulos de força podem induzir alterações em estruturas do sarcômero (Thompson, Rille, 1996), gerando processos inflamatórios secundários e processos degradativos posteriores (Gibala et al., 1995). Uma hipótese aceita é que a ação de macrófagos e demais fatores inflamatórios podem vir a gerar produção localizada de EROs, aumentando, portanto, os níveis de estresse oxidativo. Um ponto importante a ser notado é que a atividade das enzimas antioxidantes sofreu decréscimo na análise 2, o que nos sugere que a condição de treinamento intenso e os níveis de sobrecarga do início do campeonato não permitiram neste momento uma regulação positiva. Contudo, tal condição não significa necessariamente que a organização e planejamento das atividades da periodização não estavam condizentes com a capacidade física dos jogadores. Considerando o treinamento físico uma condição exógena de estresse, a aplicação de estímulos estressores, representados pela intensidade, duração e frequência do exercício físico, deve sempre buscar a alteração da homeostasia dos sistemas biológicos de maneira controlada e consistente com as possibilidades de adaptação do indivíduo.

Quando se discute sobre os mecanismos de adaptação dos sistemas biológicos, deve ficar claro que há eventos que emitem respostas a curto prazo e eventos que necessitam de um maior tempo de interação dos fatores para que o organismo possa gerar alguma forma de adaptação. Trabalhos iniciais de Adolph (1964) já enfatizavam que o agente estressor, no nosso caso o exercício físico, induz uma alteração funcional na constância do sistema afetado, o qual responde prontamente na tentativa de restabelecer seus parâmetros de normalidade. Tal atividade biológica pode ser entendida como um ajuste regulatório, cujo objetivo é solucionar uma condição momentânea de perturbação: ajustes regulatórios não levam, necessariamente, à alterações morfológicas e funcionais duradouras. A supercompensação dos substratos metabólicos é um exemplo de ajuste regulatório, pois pode ocorrer a curto prazo, de uma sessão de treino para outra. No caso dos resultados obtidos na análise 2 – queda do

sistema de defesa enzimático antioxidante e elevação em parâmetros que indicam alterações musculares -, consideramos que tal condição bioquímica teve caráter regulatório e estimulador para a célula ultrapassar a um novo patamar de resistência ao estresse oxidativo. Tal consideração é justificada quando observamos os resultados da análise 3, a qual ocorreu 33 dias após a análise 2. Neste período, obtivemos o maior aumento da atividade das enzimas antioxidantes e decréscimos na atividade plasmática da CK, sugerindo-nos a assimilação pelos atletas das cargas de esforço durante o treinamento e jogos.

Para a manifestação de respostas adaptativas duradouras, os parâmetros de intensidade, duração e frequência do estímulo de treinamento deverão interagir com as condições de adaptabilidade do organismo. Portanto, os ajustes regulatórios podem desempenhar uma primeira etapa indutora para que haja a aquisição de alterações compensatórias estáveis. As adaptações estáveis, deste modo, necessitam de um período a longo prazo para se expressarem, pois seus efetores atuam em atividades com diferentes latências e intensidades, visando as alterações morfo-funcionais.

Nesta perspectiva de adaptação a longo prazo, as análises indicaram que durante o Campeonato os atletas mantiveram-se em condições adequadas para evitar a ocorrência de um quadro de estresse oxidativo. Nossa interpretação é que os estímulos induzidos pelo treinamento e pela própria competição provocaram uma adaptação no sistema de defesa antioxidante, o que evitou a instalação de processos oxidativos mais severos. A queda na defesa enzimática antioxidante no final do campeonato pode ser um reflexo do acúmulo de jogos neste período e da própria rotina de treinamentos. Contudo, ao analisarmos os marcadores de alteração muscular e ataque oxidativo neste momento, percebemos que não há indícios significativos de elevação, o que vem a confirmar que os jogadores encontravam-se bem adaptados aos níveis de estresse oxidativo aos quais estavam sendo submetidos.

4.7- Conclusão

Nossa metodologia para detecção do *limiar de estresse* permitiu compreender o estágio de estresse de cada jogador em relação a ele mesmo e a toda a equipe, de forma que o preparador físico, de posse destes resultados, pudesse individualizar as cargas de treinamento e otimizar a recuperação de eventuais processos de lesões musculares. O sucesso só pode ser estabelecido quando há uma integração entre os pesquisadores e a comissão técnica esportiva, como aconteceu durante esse trabalho. As discussões estabelecidas mostraram-se produtivas, podendo o fruto delas ser observado nos resultados experimentais obtidos e na classificação da equipe para a fase final do Campeonato.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKISON, D., HÖLLWARTH, M. E., BENOIT, J. N. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 126, suppl. 548, p. 101-107, 1986.
- ADOLPH, E. F. Perspectives of adaptation: some general properties. In: DILL, D. B., ADOLPH, E. F., WILBER, C. G. (orgs.). **Handbook of physiology**, section 4. Washington: American Physiological Society, 1964.
- AEBI, H. Catalase. In: **Methods in Enzymology**. Packer, L (editor). Florida: Academic Press, 105, p. 121-126, 1984.
- ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 02, p. 218-224, 1993.
- ALESSIO, H. M., HAGERMAN, A. E., FULKERSON, B. K., AMBROSE, J., RICE, R. E., WILEY, R. L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 02, p. 1576-1581, 2000.
- ALESSIO, H. M., A. H. GOLDFARB. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **Journal of Applied Physiology**, v.64, p. 1333-1336, 1988.
- ALVES, A. A. **Marcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e tecnologia para sua quantificação**. Tese de Doutorado (UNICAMP), 2002.
- ALVES, A. A., SIQUEIRA, M. M., SILVEIRA, L. R., PEREIRA-DA-SILVA, L., MACEDO, D. Oxidative stress biomarkers in blood and soleus muscle after a bout of exhausting exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 05, p. S218, 2002.
- ANDRADE, F. H., REID, M. B., ALLEN, D. G., WESTERBLAD, H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibers from mouse. **Journal of Physiology**, v. 509, p. 565-575, 1998.
- APPLE, F. S., HELLSTEN, Y., CLARKSON, P. M. Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 41-44, 1988.
- ARMSTRONG, R. B., Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 16, n. 03, p.529-538, 1984.

- ÅSTRAND, P. O. Why exercise? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 24, n. 02, p. 153-162, 1992.
- ASTRÄND, P. O, RODAHL, K. **Textbook of work physiology: physiological basis of exercise**. New York: McGraw-Hill, 1986.
- ATALAY, M., MARNILA, P., LILIUS, E. M. Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 74, p. 342-347, 1996.
- BALNAVE, C. D., THOMPSON, M. W. Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v.75, p. 1545-1551, 1993.
- BARCLAY, J. K., HANSEL, M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, p. 279-284, 1991.
- BECKMAN, J. S., BECKMAN, T., FREEMAN, B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Scie. USA**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BEUTLER, E. Red cell metabolism. In: **A Manual of Biochemical Methods**. London: Grune & Stratton Publishers, 1975.
- BIENZ, M., PELHAM, H. R. B. Mechanims of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. **Advances in Genetics**, v. 24, p. 31-72, 1987.
- BINDOLI, A. Lipid peroxidation in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 05, p. 247-267, 1988.
- BOMPA, T. O. **Theory and methodology of training: to key to athletic performance**. Dubuque: Kendall/Hunt, 1990.
- BOVERIS, A., CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal**, v. 34, p. 707-716, 1972.
- BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUIN, G. KUIPERS, H., KEIZER, H. A., VANDERVUSSE, G. J. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 05, p. 1908-1913, 1994.
- BUCZYNSKY, A., BLASZCZYK, J., KEDZIORA, J. Blood platelet superoxide dismutase activity and malonyldialdehyde concentrations in healthy men following

- submaximal physical exercise. In: NAZAR, K., TERJUNG, R. L., USCILKO, H. K. et al. (orgs.). **International perspectives in exercise physiology**. Champaign: Human Kinetics, 1990.
- CANNON, J., ORENCOLE, S., FIELDING, R. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. **American Journal of Physiology**, v. 259, p R1214-R1219, 1990.
- CLARKSON, P. M., NOSAKA, K., BRAUN, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 24, n. 02, p. 512-520, 1992.
- CLARKSON, P. M., TREMBLAY, I. Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptations in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, p. 1-6, 1988.
- CRAIG, E. A. The heat shock response. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 18, p. 239-280, 1985.
- CRAIG, E. A. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. **Science**, v. 260, p. 1902-1904, 1993.
- CRISWELL, D., POWERS, S., DODD, S., LAWLER, J., EDWARDS, W., RENSHLER, K., GRINTON, S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 10, p. 1135-1140, 1993.
- DAVIES, K. J. A., QUINTANILHA, A. T., BROOKS, G. A., PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 04, p. 1198-1205, 1982.
- DEAN, R. T. A mechanism for accelerated degradation of intracellular proteins after limited damage by free radicals. **FEBS Letter**, v. 220, p. 278-282, 1987.
- DE ZWART, L. L., MEERMAN, J. H. N., COMMANDEUR, J. N. M. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, nos. 1/2, p. 202-226, 1999.
- DIDOMENICO, B. J., BUGAISKY, G. E., LINDQUIST, S. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. **Cell**, v. 31, p. 593-603, 1982.
- DUARTE, J. A., CARVALHO, F., BASTOS, M. L. Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? **European Journal of Applied Physiology**, v. 68, p. 48-53, 1994.

- EDWARDS, M. J. Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links? **Cell Stress & Chaperones**, v. 03, n. 04, p. 213-220, 1998.
- EICHNER, E. R. Overtraining: consequences and prevention. **Journal of Sports Sciences**, v. 13, p. S41-S48, 1995.
- ELLIS, R. J., VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annuals Reviews of Biochemistry**, v. 60, p. 321-347, 1991.
- ESSIG, D. A., NOSEK, T. M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 22, n. 05, p. 409-428, 1997.
- EVANS, W., CANNON, J. Metabolic effects of exercise-induced muscle damage. In: **Exercise and sports sciences reviews**. No. 18. Holloszy, J. O. (editor), Williams & Wilkins, Baltimore, p. 99-125, 1991.
- EVANS, W. J., MEREDITH, C. N., CANNON, J. G. Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. **Journal of Applied Physiology**, v. 61, n. 05, p. 1864-1868, 1986.
- FAURE, P., LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: **Analysis of free radicals in biological systems**. Favier, A. E. et al. (editors), Verlag, Boston, p. 237-248, 1995.
- FEHRENBACH, E., PASSEK, F., NIESS, A. M. HSP expression in human leucocytes is modulated by endurance exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 03, p. 592-600, 2000.
- FEIGE, U., POLLA, B. S. Heat shock proteins: the hsp70 family. **Experimentia**, v. 50, p. 979-986, 1994.
- FIELDING, R., MANFREDI, T., DING, W. Acute phase response to exercise. III. Neutrophil and IL-1 β accumulation in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. R166-R172, 1993.
- FIELDING, R., MEYDANI, M. Exercise, free radical generation, and aging. **Aging** (Milan), v. 09, p. 12-18, 1997.
- FLAHERTY, K. M., DELUCA-FLAHERTY, C., MCKAY, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70Kda heat-shock cognate protein. **Nature**, v. 346, p. 623-628, 1990.
- FLOHÉ, L., BECKMANN, R., GIERTZ, H. Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation. In: **Oxidative stress**. SIES, H. (org.). London: Academic Press, 1985.

- FRANKIEWICZ-JOZKO, A., FAFF, J., SIERADZAN-GABELSKA, B. Changes in concentration of tissues free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 74, p. 470-474, 1996.
- FRY, A. C. The role of training intensity in resistance exercise-overtraining and overreaching. In: **Overtraining in Sport**. Kreider, R. B. et al. (editors). Champaign, IL: Human Kinetics, p. 107-130, 1998.
- FRY, R. W.; MORTON, A. R.; KEAST, D. Periodisation of training stress - a review. **Canadian Journal of Sports and Science**, v. 17, n. 03, p. 234-240, 1992.
- GERNER, E. W., SCHENEIDER, M. J. Induced thermal resistance in HeLa cells. **Nature**, v. 256, p. 500-502, 1975.
- GETHING, M. J., SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355, p. 33-45, 1992.
- GIBALA, M. J.; MACDOUGALL, J. D.; TARNOPOLSKY, M. A. Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 78, n. 02, p. 702-708, 1995.
- GIULIVI, C. PACIFICI, R. E., DAVIES, K. J. A. Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxidase-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, p. 329-341, 1994.
- GOLDFARB, A. H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 02, p. 232-236, 1993.
- GRANGER, D. N., HÖLLWARTH, M. E., PARKS, D. A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 126, suppl. 548, 47-63, 1986.
- HALL, T. J. Role of hsp70 in cytokine production. **Experimentia**, v. 50, p. 1048-1053, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- HELLSTEN, Y., AHLBORG, G., JENSEN-URSTAD, M. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 137, p. 341-345, 1988.

- HELLSTEN, Y., FRANDSEN, U., ORTHENBLAD, N. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. **Journal of Physiology**, v. 498, part 1, p. 239-248, 1997.
- HELLSTEN, Y., HANSSON, H. A., JOHNSON, L. Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 157, n. 02, p. 191-197, 1996.
- HENDRICK, J. P., HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annals Reviews of Biochemistry**, v. 62, p. 349-384, 1993.
- HERNANDO, R., MANSO, R. Muscle fiber stress in response to exercise. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 460-467, 1997.
- HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, p. 191-197, 1991.
- HOOVER, S. L., MACKINNON, L. T., HOWARD, A. Markers for monitoring overtraining and recovery. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 27, n. 01, p. 106-112, 1995.
- HYATT, J.-P. K., CLARKSON, P. M. Creatine kinase release and clearance using MM variants following repeated bouts of eccentric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 07, p. 1059-1065, 1998.
- ITOH, H., OHKUWA, T., YAMAMOTO, T. Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. **Life Sciences**, v. 63, n. 21, p. 1921-1929, 1998.
- JACOBS, I., ESBJÖRNSSON, M., SYLVÉN, C., HOLM, I., JANSSON, E. Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fibres types and blood lactate. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 19, p. 368-374, 1987.
- JAKERMAN, P. Base fisiológica de la puesta a punto. **Stadium**, ano 28, n. 163, p. 19, 1994.
- JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 09, p. 515-540, 1990.
- JENKINS, R. R., GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 02, p. 210-212, 1993.
- JOHNSON, M. B., THIESE, S. M. A review of overtraining syndrome: recognizing the signs and symptoms. **Journal of Athletic Training**, v. 27, n. 04, p. 352-354, 1992.

- Ji, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 02, p. 225-231, 1993.
- Ji, L. L. Increasing healthy life span: conventional measures and slowing the innate aging process. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 959, p. 82-92, 2002.
- Ji, L. L., DILLON, D., WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. R918-R923, 1990.
- Ji, L. L., FU, R., MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 1854-1859, 1992.
- Ji, L. L., STRATMAN, F., LARDY, H. Antioxidant enzymes system in rat liver and skeletal muscle: influence of selenium deficiency acute exercise and chronic training. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, p. 150-160, 1988.
- KANTER, M. M., KAMINSKY, L. A., LAHAM-SAEGER, J., LESMES, G. R., NEQUIN, N. D. Serum enzyme levels and lipid peroxidation in ultra marathon runners. **Annals of Sports Medicine**, v. 03, p. 39-41, 1986.
- KIBLER, W. B., CHANDLER, T. J., STRACENER, E. S. Musculokeletal adaptations and injuries due to overtraining. **Exercise and Sports Sciences Reviews**, v. 20, p. 99-127, 1992.
- KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 07, p. 1137-1139, 1998.
- KUIPERS, H. How much is too much? Performance aspects of overtraining. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, v. 67, n. 03, p. S65-S69, 1996.
- KUIPERS, H., KEIZER, H. A. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. **Sports Medicine**, v. 06, p. 79-92, 1988.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAFOND, J. L., PAURE, P. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier and editors. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. Berlin, 1995.
- LAUGHLIN, M. H., SIMPSON, T., SEXTON, W. L., BROWN, O. R., SMITH, J. K., KORTHUIS, R. J. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 68: 2337-2343, 1990.

- LEE, J., GOLDFARB, A. H., RESCINO, M. H. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. **Medicine and Science of Sports and Exercise**, v. 34, n. 03, p. 443-448, 2002.
- LEEUWENBURG, C., FIEBIG, R., CHANDWANEY, R., JI, L. L., Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. R439-R445, 1994.
- LEEUWENBURG, C., HOLLANDER, J., FIEBIG, R. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. R363-369, 1997.
- LEGENDRE, N., MATSUIDAIRA, P. Direct protein microsequence from imobilon-P transfer membrane. **Biotechniques**, v. 6, p. 1154-1159, 1988.
- LEHMANN, M., FOSTER, C., DICKHUTH, H. H., GASTMANN, U. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 07, p. 1140-1148, 1998.
- LEHMANN, M., FOSTER, C., KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 07, p. 854-862, 1993.
- LI, G. C., MEYER, J. L., MAK, J. Y. Heat-induced protection of mice against thermal death. **Cancer Research**, v. 43, p. 5758-5760, 1983.
- LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1151-1191, 1986.
- LOCKE, M., NOBLE, E. G., ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**, v. 258 (Cell Physiol. 27), C723-C729, 1990.
- LOCKE, M., NOBLE, E. G., ATKINSON, B. G. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. **American Journal of Physiology**, v. 261 (Cell Physiol.), C774-C779, 1991.
- LOVLIN, R., COTTLE, W., PYKE, I. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? **European Journal of Applied Physiology**, v. 56, p. 313-316, 1987.
- MACINTYRE, D. L., REID, W. D.; MCKENZIE, D. C. Delayed muscle soreness. The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. **Sports Medicine**, v. 20, n. 01, p. 24-40, 1995.

- MARIN, E., HANNINEN, O., MULLER, D. Influence of acute physical exercise on glutathione and lipid peroxides in blood of rat and man. **Acta Physiologica Hungarian**, v. 76, p. 71-76, 1990.
- MAUGHAN, R. J., DONELLY, A. E., GLEESON, M. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. **Muscle & Nerve**, v. 12, p. 332-336, 1989.
- MCBRIDE, J. M., KRAEMER, W. J., MCBRIDE-TRIPLETT, T. Effect of resistance exercise on free radical production. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 01, p.67-72, 1998.
- MCGILL, R., TUKEY, J. W., LARSEN, W. A. Variations of Box Plots. **American Statistician**, v. 32, n. 01, p. 12-16, 1978.
- MEYDANI, M., EVANS, W. J. Free radicals, exercise, and aging. In: **Free Radical in Aging**. B. P. Yu (editor), Boca Raton, FL: CRC, p. 183-204, 1993.
- MOREAU, D., DUBOTS, P., BOGGIO, V. Effects of electromyostimulation and strength training on muscle soreness, muscle damage and sympathetic activation. **Journal of Sports Sciences**, v. 13, p. 95-100, 1995.
- MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, v. 259, n. 05, p. 1409-1410, 1993.
- NAVARRO-ARÉVALO, A., SANCHEZ-DEL-PINO, M. J. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 104, p. 91-102, 1998.
- NEUFER, P. D., ORDWAY, G. A., WILLIAMS, R. S. Transient regulation of c-fos, α B-crystallin, and hsp70 in muscle during recovery from contractile activity. **American Journal of Physiology**, v. 274 (Cell. Physiol. 43), C341-346, 1998.
- NEUPERT, W., HARTL, F. U., CRAIG, E. A. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? **Cell**, v. 63, p. 447-450, 1990.
- NEWHAM, D. J., JONES, D. A., CLARKSON, P. M. Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 63, n. 04, p. 1381-1386, 1987.
- NOAKES, T. **Lore of running**. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, Inc, p. 408-425, 1991.

- NOSAKA, K., CLARKSON, P. M. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 28, p. 953-961, 1996.
- OHKAWA, H., NOBUKO, O., YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.
- ORTENBLAD, N., MADSEN, K., DJURHUUS, M. S. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. R1258-R1263, 1997.
- PASCOE, D. D., COSTILL, D. L., FINK, W. J. Glycogen resynthesis in skeletal muscle following resistive exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 03, p. 349-354, 1993.
- PYNE, D. B. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. **Australian Journal of Science in Medicine Sports**, R6, p. 49-58, 1994.
- POWERS, S. K., CRISWELL, D., LAWLER, J., JI, L. L., MARTIN, D., HERB, R. A., DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. R-375-R380, 1994.
- POWERS, S. K., JI, L. L., LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 07, p.987-997, 1999.
- PUCHE, P. P. El sistema deportista y sus capacidades. **Stadium**, ano 27, n. 159, p. 13-16, 1993.
- RADÁK, Z., ASANO, K., LEE, K-C. High altitude training increases reactive carbonyl derivatives but not lipid peroxidation in skeletal muscle of rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 06, p. 1109-1114, 1997.
- RADÁK, Z., TAHARA, S., NAKAMOTO, H., OHNO, H., SASVÁRI, M., NYAKAS, C., GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 69-74, 1999.
- RAHA, S., ROBINSON, B. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 106, p. 62-70, 2001.
- RAO, D. V., JONES, G. L., WATSON, K. A comprehensive analysis of heat shock protein synthesis in human peripheral lymphocytes: the effect of penicillin/streptomycin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 31, p. 861-868, 1999.

- REED, D. J. Nitrosoureas. In: **Oxidative stress**. SIES, H. (org.). London: Academic Press, 1985.
- REID, M. B. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. **News of Physiology and Science**, v. 11, p. 114-119, 1996.
- REID, M. B. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 162, p. 401-409, 1998.
- REID, M. B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 724-731, 2001.
- REID, M. B., DURHAM, W. J. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle – potential impact on aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 959, p. 108-116, 2002.
- REID, M. B. KHAWLI, F. A., MOODY, M. R. Reactive oxygen in skeletal muscle III. Contractility of unfatigued muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 1081-1087, 1993.
- RIETVELD, W. J. General introduction to chronobiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 01, p. 63-70, 1996.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experimentia Basel**, v. 18, p. 571-573, 1962.
- RYAN, A. J., GISOLFI, C. V., MOSELEY, P. L. Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 01, p. 466-471, 1991.
- RYAN, T. P., AUST, S. D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 01, p. 119-141, 1992.
- RYTER, S. W., PACIFICI, R. E., DAVIES, K. J. A. Constitutive and inducible repair system in oxidative stress. In: **Biological Oxidation Systems**. New York: Academic Press, p. 929-952, 1990.
- SAHLIN, K., REN, J. M. Relationship of contraction capacity to metabolic changes during recovery from a fatiguing contraction. **Journal of Applied Physiology**, v. 67, p. 648-654, 1989.
- SAHLIN, K., EKBERG, K., CIZINSKY, S. Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 142, p. 275-281, 1991.

- SAMALI, A., ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress & Chaperones**, v. 3, n. 04, p. 228-236, 1998.
- SAXTON, J. M., DONNELLY, A. E., ROPER, H. P. Indices of free radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. **Journal of Applied Physiology**, v. 68, p. 189-193, 1994.
- SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins: the search for functions. **Journal Cell Biology**, v. 103, n. 02, p. 321-325, 1986.
- SELYE, H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 01, p. 32, 1936.
- SELYE, H. **Stress: a tensão da vida**. São Paulo: Ibrasa, 1965.
- SELYE, H. The evolution of the stress concept: stress and cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 26, p. 289-298, 1970.
- SEN, C. Oxidants and antioxidants in exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 03, p. 675-686, 1995.
- SEN, C. K., MARIN, E., KRETZSCHMAR, M. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 1265-1272, 1992.
- SJÖDIN, B., WESLING, H., APPLE, S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v. 10, p. 236-254, 1990.
- SJÖDIN, B., WESTING, Y. H. Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. **International Journal of Sports and Medicine**, v. 11, p. 493-495, 1990.
- SMITH, I. K., VIERHELLER, T. L., THORNE, C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, v. 175, p. 408-413, 1988.
- SMITH, L. L., Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 02, p. 317-331, 2000.
- SMOLKA, M. B., ZOPPI, C. C., ALVES, A. A., SILVEIRA, L. R., MARANGONI, S., PEREIRA-DA-SILVA, L., NOVELLO, J. C., MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology**, v. 279, p. R1539-R1545, 2000.
- SORGER, P. K. Heat shock factor and the heat shock response. **Cell**, v. 65, p. 363-366, 1991.

- STORTI, R. V., SCOTT, M. P., RICH, A., et al. Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. **Cell**, v. 22, n. 03, p. 825-835, 1980.
- STORZ, G., TARTAGLIA, L. A., AMES, B. N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. **Science**, v. 248, p. 189-194, 1990.
- STUART, R. A., CYR, D. M., NEUPERT, W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. **Experimentia**, v. 50, p. 1002-1011, 1994.
- TAULER, P., GIMENO, I., AGUILÓ, A., GUIX, M. P., PONS, A. Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. **European Journal of Physiology**, v. 438, p. 782-787, 1999.
- TENENBAUM, G. Theoretical and practical considerations in investigating motivation and discomfort during prolonged exercise. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 36, n. 03, p. 145-154, 1996.
- TERLECKY, S. R. Hsp70s and lysosomal proteolysis. **Experimentia**, v. 50, p. 1021-1025, 1994.
- TEWS, D. S., GOEBEL, H. H., SCHNEIDER, I., GUNKEL, A., STNNERT, E., NEISS, W. F. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. **Neuropathology Applied of Neurology**, v. 23, p. 141-149, 1997.
- THOMPSON, J. L.; RILEY, D. A. Ultrastructure of muscle eccentric lesions. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 28, n. 05 (supplement), p. S113, 1996.
- TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, p. 533-538, 1998.
- TRAVERSO, A., OTTONELLO, G. A., SENAREGA, D. Exercice physique et prévention de la douleur musculaire squelettique due à des facteurs psychologiques. Utilité diagnostique du EMG-biofeedback. **Médecine du Sport**, v. 70, n. 05, p. 223-230, 1996.
- VAN DER MEULEN, J. H., KUIPERS, H., DRUKKER, J. Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, n. 03, p. 999-1004, 1991.

- VENDITTI, P., MEO, S. D. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, p. 63-68, 1996.
- VIGH, L., MARESCA, B., HARWOOD, J. L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? **TIBS**, v. 23, p. 369-374, 1998.
- VIINIKA, L., VUORI, J., YLIKORKALA, O. Lipid peroxides, protacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 16, p. 275-277, 1984.
- VIRU, A. Molecular cellular mechanisms of training effects. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 34, n. 04, p. 309-322, 1994.
- VOLFINGER, L. V., LASSOURD, J. M., MICHAUX, J. P., BRAUN, J. P., TOURTAIN, P. L. Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. **American Journal of Physiology**, v. 35, p. R434-R441, 1994.
- WARREN, J., JENKINS, R., PACKER, L. Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, p. 2168-2175, 1992.
- WEISS, S. J. Oxygen, ischemia and inflammation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 126, suppl. 548, p. 9-37, 1986.
- WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 04, p. 1063-1081, 1992.
- WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, n. 05, p. 34-41, 1993.
- WELCH, W. J., GARRELS, J. I., THOMAS, G. P. Biochemical characterization of the mammalian stress protein and identification of two stress proteins as glucose- and Ca^{2+} -ionophore-regulated proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 11, p. 7102-7111, 1983.
- WITT, E., REZNIK, A. Z., VIGUIE, C. A. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. **Journal of Nutrition**, v. 122, p. 766-773, 1992.
- YAGI, K. A. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemistry and Medicine**, v. 15, p. 212-216, 1976.
- YELLON, D. M., MARBER, M. S. Hsp70 in myocardial ischaemia. **Experimentia**, v. 50, p. 1075-1083, 1994.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 01, p. 139-162, 1994.

ZATSIORSKY, V. M. **Science and practice of strength training**. Champaign: Human Kinetics, 1995.

6- ANEXOS

6.1- Tratamentos Estatísticos

6.1.1- Protocolo de Exaustão

Tabela 1. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de PC e TBARS dos animais submetidos ao protocolo de exercício agudo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	PC (μM)	TBARS (nmol/mL)	PC (μM)	TBARS (nmol/mL)	PC	TBARS
CO	33	1.38	33.2 ± 13.95	1.38 ± 0.26	---	---
T0	100	1.33	98.8 ± 30.68	1.26 ± 0.25	---	---
T1	66	1.67	62.8 ± 22.8	1.67 ± 0.35	---	---
T2	96	2.98	85.2 ± 24.4	2.68 ± 0.74	---	<i>P</i> <0.05 CO x T2 <i>P</i> <0.01 T0 x T2
T3	251	2.01	251 ± 51.9	1.93 ± 0.57	<i>P</i> <0.001 CO x T3 <i>P</i> <0.001 T0 x T3 <i>P</i> <0.001 T1 x T3	---
T4	174	1.87	163 ± 73.2	2.02 ± 0.88	<i>P</i> <0.001 CO x T4 <i>P</i> <0.001 T1 x T4	---

Tabela 2. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de atividade das enzimas CAT e GR dos animais submetidos ao protocolo de exercício agudo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	CAT [*]	GR [#]	CAT [*]	GR [#]	CAT	GR
CO	0.22	12.05	0.22 ± 0.04	12.95 ± 2.45	---	---
T0	0.45	14.56	0.45 ± 0.17	14.8 ± 3.0	---	---
T1	0.64	17.67	0.64 ± 0.09	17.4 ± 2.6	<i>P</i> <0.001 CO x T1	---
T2	0.60	19.4	0.62 ± 0.15	19.4 ± 2.3	<i>P</i> <0.001 CO x T2	<i>P</i> <0.01 CO x T2
T3	0.67	23.53	0.70 ± 0.14	23.4 ± 1.6	<i>P</i> <0.001 CO x T3 <i>P</i> <0.001 T0 x T3	<i>P</i> <0.001 CO x T3 <i>P</i> <0.01 T1 x T3
T4	0.29	19.46	0.33 ± 0.08	19.7 ± 1.8	<i>P</i> <0.01 T1 x T4 <i>P</i> <0.05 T2 x T4 <i>P</i> <0.01 T3 x T4	<i>P</i> <0.001 CO x T4 <i>P</i> <0.05 T0 x T4

* = k/gHb/min; # = UI/gHb/min

Tabela 3. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de GST e ácido úrico dos animais submetidos ao protocolo de exercício agudo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	GST (μM)	Ácido Úrico (mg/dL)	GST (μM)	Ácido Úrico (mg/dL)	GST	Ácido Úrico
CO	286	4.25	320.8 ± 61.42	4.3 ± 0.88	---	---
T0	251	4.56	248.2 ± 9.08	4.16 ± 0.65	$P < 0.05$ CO x T0	---
T1	246	3.31	247.2 ± 11.47	3.26 ± 0.91	$P < 0.05$ CO x T1	---
T2	298	2.54	296.2 ± 42.95	2.7 ± 1.3	---	---
T3	227	6.08	246.4 ± 41.08	6.04 ± 1.8	$P < 0.05$ CO x T3	$P < 0.05$ T1 x T3 $P < 0.01$ T2 x T3
T4	212	4.39	213.8 ± 17	4.92 ± 1.7	$P < 0.01$ CO x T4 $P < 0.05$ T2 x T4	---

Tabela 4. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de CK dos animais submetidos ao protocolo de exercício agudo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	CK (U/L)	CK (U/L)	CK (U/L)	CK (U/L)	CK	CK
CO	100	102 ± 22	---	---	---	---
T0	142	160.6 ± 31.7	---	---	---	---
T1	200	192.6 ± 75.3	---	---	---	---
T2	404	390.4 ± 101.9	$P < 0.001$ CO x T2 $P < 0.001$ T0 x T2 $P < 0.01$ T1 x T2	---	---	---
T3	280	281.2 ± 74	$P < 0.01$ CO x T3	---	---	---
T4	195	229.4 ± 100	$P < 0.05$ T2 x T4	---	---	---

6.1.2- Protocolo de Treinamento Contínuo

Tabela 5. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de PC e TBARS dos animais submetidos ao protocolo de treinamento contínuo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	PC (µM)	TBARS (nmol/mL)	PC (µM)	TBARS (nmol/mL)	PC	TBARS
CO	63	1.74	59.29 ± 11.19	1.71 ± 0.12	---	---
S4	128.5	1.69	114.25 ± 29.46	2.12 ± 0.76	<i>P</i> <0.05 CO x S4	
S8	78	1.82	81.25 ± 19.97	1.83 ± 0.35	---	---
2x/dia	98	2.08	119 ± 50.24	2.23 ± 0.75	<i>P</i> <0.05 CO x 2x/dia	---
3x/dia	127	2.16	132.87 ± 45.19	2.18 ± 0.49	<i>P</i> <0.01 CO x 3x/dia	---
4x/dia	156	3.43	141.25 ± 32.3	3.54 ± 0.67	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.05 S8 x 4x/dia	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 2x/dia x 4x/dia <i>P</i> <0.001 3x/dia x 4x/dia

Tabela 6. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de atividade das enzimas CAT e GR dos animais submetidos ao protocolo de treinamento contínuo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	CAT*	GR [#]	CAT*	GR [#]	CAT	GR
CO	0.32	10.5	0.32 ± 0.06	10.47 ± 1.57	---	---
S4	0.47	15.4	0.47 ± 0.09	14.57 ± 4.21	<i>P</i> <0.01 CO x S4	<i>P</i> <0.01 CO x S4
S8	0.38	10.2	0.39 ± 0.11	10.18 ± 1.96	---	<i>P</i> <0.01 S4 x S8
2x/dia	0.24	9.75	0.24 ± 0.03	9.97 ± 1.07	<i>P</i> <0.001 S4 x 2x/dia <i>P</i> <0.01 S8 x 2x/dia	<i>P</i> <0.01 S4 x 2x/dia
3x/dia	0.15	7.61	0.15 ± 0.02	7.66 ± 1.12	<i>P</i> <0.001 CO x 3x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 3x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 3x/dia	<i>P</i> <0.001 S4 x 3x/dia
4x/dia	0.13	6.3	0.13 ± 0.01	6.28 ± 0.65	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.05 S8 x 4x/dia <i>P</i> <0.05 2x/dia x 4x/dia	<i>P</i> <0.01 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.01 S8 x 4x/dia <i>P</i> <0.05 2x/dia x 4x/dia <i>P</i> <0.001 3x/dia x 4x/dia

* = k/gHb/min; [#] = UI/gHb/min

Tabela 7. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de GST e ácido úrico dos animais submetidos ao protocolo treinamento contínuo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	GST (μM)	Ácido Úrico (mg/dL)	GST (μM)	Ácido Úrico (mg/dL)	GST	Ácido Úrico
CO	152	2.24	153.1 ± 21.2	2.34 ± 0.68	---	---
S4	160.5	2.6	167.2 ± 29.5	2.63 ± 0.28	---	---
S8	184	2.15	182.1 ± 26.3	2.1 ± 0.56	---	---
2x/dia	162.5	2	162 ± 19.3	2.25 ± 0.56	---	---
3x/dia	111	1.65	111.2 ± 20.4	1.76 ± 0.83	P<0.05 CO x 3x/dia P<0.001 S4 x 3x/dia P<0.001 S8 x 3x/dia P<0.001 2x/dia x 3x/dia	---
4x/dia	99.5	3.55	102.2 ± 19	3.5 ± 0.47	P<0.01 CO x 4x/dia P<0.001 S4 x 4x/dia P<0.001 S8 x 4x/dia P<0.001 2x/dia x 4x/dia	P<0.01 CO x 4x/dia P<0.001 S8 x 4x/dia P<0.01 2x/dia x 4x/dia P<0.001 3x/dia x 4x/dia

Tabela 8. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de uréia e creatinina dos animais submetidos ao protocolo treinamento contínuo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Uréia	Creatinina
CO	46	0.48	42.1 ± 11.5	0.49 ± 0.02	---	---
S4	62	0.32	63.7 ± 10.9	0.31 ± 0.05	---	P<0.01 CO x S4
S8	63	0.48	63 ± 9.07	0.48 ± 0.01	---	P<0.01 S4 x S8
2x/dia	58	0.54	60.1 ± 10	0.53 ± 0.08	---	P<0.001 S4 x 2x/dia
3x/dia	55	0.42	57.5 ± 11.3	0.47 ± 0.16	---	P<0.01 S4 x 3x/dia
4x/dia	58	0.38	58.5 ± 9.8	0.41 ± 0.09	---	---

Tabela 9. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de CK e TGO dos animais submetidos ao protocolo treinamento contínuo.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	CK (U/L)	TGO (U/L)	CK (U/L)	TGO (U/L)	CK	TGO
CO	50	53	62.2 ± 21.4	51.2 ± 6.26	---	---
S4	149.5	62	171.6 ± 88.4	63.7 ± 10.96	---	---
S8	52.5	63	51 ± 3.96	63.8 ± 6.3	P<0.05 S4 x S8	---
2x/dia	77.5	54	83.5 ± 22.4	54.6 ± 6.43	---	---
3x/dia	162	63	155.5 ± 70.6	61.5 ± 8.76	---	---
4x/dia	328	76	302.2 ± 141.3	74.1 ± 7.77	P<0.001 CO x 4x/dia P<0.05 S4 x 4x/dia P<0.001 S8 x 4x/dia P<0.001 2x/dia x 4x/dia P<0.01 3x/dia x 4x/dia	P<0.001 CO x 4x/dia P<0.001 2x/dia x 4x/dia P<0.05 3x/dia x 4x/dia

6.1.3- Protocolo de Treinamento Intermitente

Tabela 10. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de PC e TBARS dos animais submetidos ao protocolo de treinamento intermitente.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	PC (µM)	TBARS (nmol/mL)	PC (µM)	TBARS (nmol/mL)	PC	TBARS
CO	63	1,7	59.28 ± 11.1	1,71±0,12	---	---
S4	119	2,11	121.71 ± 33	2,36±1	<i>P</i> <0.01 CO x S4	
S8	79	2,19	76.57 ± 8.18	2,05±0,48	<i>P</i> <0.05 S4 x S8	---
2x/dia	57.5	1,5	70.25 ± 31.14	1,69±0,63	<i>P</i> <0.05 S4 x 2x/dia	---
3x/dia	96.5	2,76	101.5 ± 30.5	2,70±0,47	---	---
4x/dia	112.5	3,6	119.25 ± 36.8	3,90±0,97	<i>P</i> <0.01 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.05 2x/dia x 4x/dia	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 2x/dia x 4x/dia <i>P</i> <0.001 3x/dia x 4x/dia

Tabela 11. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de atividade das enzimas CAT e GR dos animais submetidos ao protocolo de treinamento intermitente.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	CAT*	GR [#]	CAT*	GR [#]	CAT	GR
CO	0.32	10.5	0.32 ± 0.06	10.47 ± 1.57	---	---
S4	0.41	10.7	0.41 ± 0.08	11.7 ± 3	---	---
S8	0.34	8.2	0.37 ± 0.08	8.92 ± 1.8	---	<i>P</i> <0.05 S4 x S8
2x/dia	0.20	7.1	0.18 ± 0.03	7.1 ± 0.96	<i>P</i> <0.001 CO x 2x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 2x/dia <i>P</i> <0.01 S8 x 2x/dia	<i>P</i> <0.01 CO x 2x/dia <i>P</i> <0.01 S4 x 2x/dia
3x/dia	0.18	6.4	0.17 ± 0.02	6.38 ± 0.58	<i>P</i> <0.001 CO x 3x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 3x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 3x/dia	<i>P</i> <0.001 CO x 3x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 3x/dia
4x/dia	0.13	5.2	0.14 ± 0.03	5.4 ± 1.2	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 4x/dia	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.01 S8 x 4x/dia

*= k/gHb/min; # = UI/gHb/min

Tabela 12. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de GST e ácido úrico dos animais submetidos ao protocolo treinamento intermitente.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	GST (μM)	Ácido Úrico (mg/dL)	GST (μM)	Ácido Úrico (mg/dL)	GST	Ácido Úrico
CO	152	2.24	153.1 ± 21.2	2.33 ± 0.68	---	---
S4	170	3.4	170 ± 26.38	3.48 ± 0.99	---	<i>P</i> <0.05 CO x S4
S8	158	2.43	158 ± 8.48	2.35 ± 0.74	---	<i>P</i> <0.05 S4 x S8
2x/dia	157	1.95	152.42 ± 20.7	2.04 ± 0.53	---	<i>P</i> <0.01 S4 x 2x/dia
3x/dia	199	2.6	207 ± 37	2.47 ± 0.49	<i>P</i> <0.001 CO x 3x/dia <i>P</i> <0.05 S8 x 3x/dia <i>P</i> <0.01 2x/dia x 3x/dia	---
4x/dia	156	3.39	161 ± 15	3.24 ± 0.53	<i>P</i> <0.05 3x/dia x 4x/dia	<i>P</i> <0.05 2x/dia x 4x/dia

Tabela 13. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de uréia e creatinina dos animais submetidos ao protocolo treinamento intermitente.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Uréia	Creatinina
CO	46	0.48	42.14 ± 11.52	0.49 ± 0.02	---	---
S4	33	0.31	36 ± 8.9	0.29 ± 0.08	---	<i>P</i> <0.001 CO x S4
S8	66	0.47	59 ± 13.7	0.48 ± 0.05	<i>P</i> <0.01 S4 x S8	<i>P</i> <0.001 S4 x S8
2x/dia	46.5	0.40	47.62 ± 6.1	0.40 ± 0.08	---	<i>P</i> <0.05 S4 x 2x/dia
3x/dia	40.5	0.43	45.12 ± 10.6	0.43 ± 0.08	---	<i>P</i> <0.01 S4 x 3x/dia
4x/dia	49.5	0.36	55.7 ± 14	0.36 ± 0.06	<i>P</i> <0.05 S4 x 4x/dia	<i>P</i> <0.05 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.05 S8 x 4x/dia

Tabela 14. Valores de mediana, média e desvio-padrão e significância estatística da média das análises de concentração plasmática de CK e TGO dos animais submetidos ao protocolo treinamento intermitente.

Análise	Mediana		Média ± Desvio-Padrão		Significância Estatística da Média	
	CK (U/L)	TGO (U/L)	CK (U/L)	TGO (U/L)	CK	TGO
CO	50	53	62.2 ± 21.4	51.2 ± 6.26	---	---
S4	126	55	123.7 ± 18.85	54.85 ± 4.59	---	---
S8	61	69	95.42 ± 78.9	75.71 ± 21.8	---	<i>P</i> <0.05 CO x S8
2x/dia	118.5	59.5	129 ± 52.7	60.5 ± 4.3	---	---
3x/dia	301.5	74	302.25 ± 76.9	75.62 ± 5.5	<i>P</i> <0.001 CO x 3x/dia <i>P</i> <0.01 S4 x 3x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 3x/dia <i>P</i> <0.01 2x/dia x 3x/dia	<i>P</i> <0.05 CO x 3x/dia
4x/dia	703	88	742.8 ± 155.3	93.87 ± 21.66	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S8 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 2x/dia x 4x/dia <i>P</i> <0.001 3x/dia x 4x/dia	<i>P</i> <0.001 CO x 4x/dia <i>P</i> <0.001 S4 x 4x/dia <i>P</i> <0.001 2x/dia x 4x/dia

6.2- Publicação de Resumos em Anais de Congressos Científicos

- Apresentação de **painel** no XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, realizada em Caxambu no período de 27 a 30 de maio de 2000, com o tema “*Study of the Muscle Damage Levels and Adaptations in Biomarkers of Oxidative Stress in Volleyball Players*”.
- Apresentação de **comunicação oral** no I Congresso Científico Latino-Americano FIEP-UNIMEP, realizado em Piracicaba no período de 21 a 25 de junho de 2000, com o tema “*Perfil dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Atletas Juvenis das Modalidades Futebol e Voleibol*”.
- Apresentação de **painel** no I Congresso Científico Latino-Americano FIEP-UNIMEP, realizado em Piracicaba no período de 21 a 25 de junho de 2000, com o tema “*Alterações da Composição Corporal e Performance Após Suplementação de Creatina*”.
- Apresentação de **painel** no “48th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine”, realizado em Baltimore, USA, no período de 30/05 a 02/06/2001, com o tema “*Oxidative Stress Biomarkers and Performance Parameters in Volleyball Players*”.
- Apresentação de **painel** no XXIV Simpósio Internacional de Ciências do Esporte, realizado em São Paulo no período de 11 a 13 de outubro de 2001, com o tema “*O Período Preparatório da Periodização para o Campeonato Paulista dos Jogadores Juniores de Futebol da Associação Atlética Ponte Preta: Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo.*”
- Apresentação de **painel** no XXIV Simpósio Internacional de Ciências do Esporte, realizado em São Paulo no período de 11 a 13 de outubro de 2001, com o tema “*Pré-Temporada da Equipe de Futebol de Juniores da A.A.P.P. IV: Efeito da Suplementação de Vitaminas C e E na Atividade de Biomarcadores de Estresse Oxidativo.*”
- Apresentação de **painel** no II Congresso Internacional Gatorade Sports Science Institute de Ciências do Esporte, realizado em São Paulo nos dias 3 e 4 de maio de

2002, com o tema “*Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Jogadores Juniores de Futebol*”.

- Apresentação de **painel** no II Congresso Internacional Gatorade Sports Science Institute de Ciências do Esporte, realizado em São Paulo nos dias 3 e 4 de maio de 2002, com o tema “*Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Jogadores Profissionais de Futebol*”.
- Apresentação de *painel* no XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International, realizado na René Descartes University, Paris, França, no período de 16 a 20 de julho de 2002, com o tema “*HSP70 Expression and Oxidative Stress Biomarkers After an Acute Bout of Exhaustive Exercise*”.
- Apresentação de *painel* no XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International, realizado na René Descartes University, Paris, França, no período de 16 a 20 de julho de 2002, com o tema “*Continuous Training Monitoring Through Oxidative Stress Biomarkers*”.
- Apresentação de *painel* no XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International, realizado na René Descartes University, Paris, França, no período de 16 a 20 de julho de 2002, com o tema “*Vitamins C and E Supplementation in Soccer Players Under Regular Training*”.
- Apresentação de *painel* na XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, realizada em Salvador-Bahia, no período de 28 a 31 de agosto de 2002, com o tema “*Modulação na Expressão da Proteína de Estresse HSP70 e em Níveis de Estresse Oxidativo po Decorência de Exercício Exaustivo*”.
- Apresentação de *painel* na XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, realizada em Salvador-Bahia, no período de 28 a 31 de agosto de 2002, com o tema “*Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Ratos Submetidos ao Treinamento de Endurance*”.
- Apresentação de **painel** no XXIV Simpósio Internacional de Ciências do Esporte, realizado em São Paulo, no período de 11 a 13 de outubro de 2002, com o tema “*Análise de Biomarcadores de Estresse Oxidativo e Capacidades Físicas em Jogadores de Futebol*”.

- Apresentação de **painel** no XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, realizada em Caxambu no período de 17 a 20 de maio de 2003, com o tema “*HSP70 Expression in Rat Leukocytes is Modulated by Different Levels of Exercise-Induced Oxidative Stress*”.

6.3- Estágio Docente em Cursos e Disciplinas

- **Professor** do *Programa de Estágio de Capacitação à Docência - UNICAMP*, atuando na Faculdade de Educação Física na disciplina **MH 220 - Bases Biológicas da Atividade Física**, no período de março a julho de 2000.
- **Professor** do *Programa de Estágio à Docência - UNICAMP*, atuando no Instituto de Biologia na disciplina **BB110 - Bioquímica Básica**, sob supervisão da Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, no período de agosto a dezembro de 2000.
- **Professor** da disciplina à distância **BD 990 - Bioquímica da Nutrição**, do Instituto de Biologia - Departamento de Bioquímica - UNICAMP, sob a supervisão do Prof. Dr. Bayardo B. Torres e do Prof. Dr. Eduardo Galembeck, no período de fevereiro a julho de 2000.
- **Professor** do *Programa de Estágio à Docência - UNICAMP*, atuando na Faculdade de Educação Física na disciplina **MH 220 - Bases Biológicas da Atividade Física**, no período de março a julho de 2001.
- **Professor** do **Curso de Extensão Bioquímica e Fisiologia do Exercício**, oferecido pelo Instituto de Biologia - Departamento de Bioquímica - UNICAMP, no período de março a maio de 2002.

6.4- Orientação de Monografias de Conclusão de Curso de Graduação e Especialização

- Orientador da monografia de final de curso em “Bacharelado em Treinamento Esportivo” (Faculdade de Educação Física da UNICAMP) do aluno **Jankiel Waldman Neto**, com o tema “*Requerimentos Metabólicos e Nutricionais do Futebol Competitivo*”. Apresentação do trabalho: 24/02/2000.
- Orientador da monografia de final de curso em “Bacharelado em Treinamento Esportivo” (Faculdade de Educação Física da UNICAMP) da aluna **Ana Carolina**

Pinheiro do Amaral Gurgel, com o tema “*A Importância do Aquecimento e Alongamento como Métodos Preventivos de Lesões Musculares*”. Apresentação do trabalho: 12/12/2001.

- Orientador da monografia de final de curso em “Bacharelado em Treinamento Esportivo” (Faculdade de Educação Física da UNICAMP) do aluno **Paulo Guimarães Gandra**, com o tema “*Fisiologia do Basquete e Variação da Concentração de Glicose, Uréia, Lactato e Desempenho em Testes de Salto Durante a Partida*”. Apresentação do trabalho: 25/05/2002.
- Orientador da monografia de final de curso de especialização em “Treinamento Desportivo (Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU) do aluno **Edgar Teruhiko Hatore**, com o tema “*Mecanismos de Lesão e Reparação do Treinamento de Musculação*”. Trabalho ainda não apresentado.

6.5- Participação de Banca de Avaliação de Monografia

- Professor convidado para avaliar a monografia “*Análise Histoquímica e Bioquímica do Músculo Semi-Tendinoso de Ratos Submetidos ao Treinamento Intermitente*”, realizada por **Alexandre Donizete Ferreira** e sob a orientação do Prof. Dr. Gerson Silva. **Local:** Faculdade de Educação Física da UNICAMP, 26 de novembro de 2002.

6.6- Trabalhos Submetidos à Publicação

JOAQUIM M. F. ANTUNES NETO, PAULO A. RIBEIRO, SORAYA EL-KATHIB, CLÁUDIO C. ZOPPI, LUCIA PEREIRA-DA-SILVA and DENISE VAZ DE MACEDO. Oxidative Stress and Physical Performance Monitoring in Volleyball Players During a Championship. Acta Physiologica Scandinavica.

ZOPPI, C. C., ANTUNES NETO, J. M. F., CATANHO, F. O., GOULART, L. F., MACEDO, D. V. Alterações de biomarcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e lesão muscular sangüíneos em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. Revista Paulista de Educação Física. (ACEITO).