



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Cláudio Cesar Zoppi

Adaptações induzidas pelo treinamento físico no metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante em músculo e sangue de ratos e sua correlação com os níveis de lesão muscular

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

23/06/99 - Na M -

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo Departamento de Bioquímica - I.B.

UNICAMP

6871156

Campinas - 1999



UNIDADE	78C
N.º CHAMADA:	
V.	
TEMPO DE	38.166
PROD.	229/99
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/07/99
N.º CPD	

CM-00134268-1

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Zoppi, Cláudio Cesar

Z76a Adaptações induzidas pelo treinamento físico no metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante em músculo e sangue de ratos e sua correlação com os níveis de lesão muscular/Cláudio Cesar Zoppi. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
91f.:ilus.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

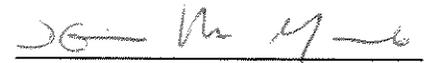
1. Antioxidantes. 2. Metabolismo. 3. Exercício físico. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 23 de Junho de 1999

Banca Examinadora:

Titulares

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



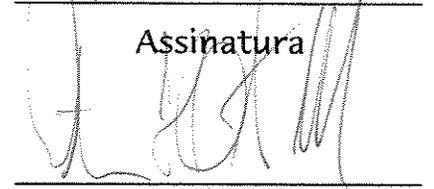
Assinatura

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



Assinatura

Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior
(EEF- USP)



Assinatura

Suplente

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva
(IB-UNICAMP)



Assinatura

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, por acreditar e viabilizar esta nova linha de pesquisa.

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva com quem muito aprendi durante todos estes anos.

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles, Prof. Dr. Hiroshi Aoyama e Profa. Dra. Antonia Dalla Pria Bankoff pelas contribuições e participação no exame de qualificação.

Aos amigos do laboratório, Armindo, Andréa, Léo, Soraya, Guilherme, Maria Eugênia, Agnes, Neto, Fernando e Daniel, pelas discussões e pelos momentos agradáveis.

A todos os colegas do departamento de bioquímica.

Andreia e Marina pelo apoio com a burocracia.

Aos meus pais, sem os quais este momento não seria possível.

A Adriana, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

A FAPESP (processo 96/12473-3) pelo apoio financeiro.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,3 DPG - 2,3 difosfoglicerato
- ADP - Adenosina difosfato
- ATP - Adenosina trifosfato
- BSA - Albumina de soro bovino
- CAT - Catalase
- CS - Citrato sintase
- DCPIP - Diclorofenolindofenol
- DTNB - Ácido 5,5 - ditiobis (2- nitrobenzóico)
- EDTA - Ácido etileno diamino tetracético
- EGTA - Ácido etileno glicol- bis (β -amino éter) N,N,N,N- tetracético
- FADH₂ - Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- GPX - Glutaciona peroxidase
- GR - Glutaciona redutase
- GSH - Glutaciona reduzida
- GSSG - Glutaciona oxidada
- HEPES - [N-(2hidroxietil) piperazina N- (2- ácido etanosulfônico)
- KCl - Cloreto de potássio
- MOPS - Ácido (3-[N-morfolino] propano sulfônico
- NADPH - Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
- PC - Fosfocreatina
- PMSF - Fenil metil sulfonil fluorido
- SDH - succinato desidrogenase
- SOD - Superóxido dismutase
- VO₂max. - Consumo máximo de oxigênio

ÍNDICE

Resumo.....	7
Summary.....	8
Grupo de trabalho envolvido.....	9
Introdução.....	10
Vias metabólicas produtoras de ATP.....	11
Formação de radicais livres de Oxigênio.....	13
Sistemas de defesa antioxidante.....	16
Estresse oxidativo e fadiga muscular.....	18
Treinamento esportivo.....	19
Treinamento físico e lesão muscular.....	21
Aspectos Bioquímicos do músculo esquelético e do sangue.....	23
Adaptações induzidas na capacidade oxidativa pelo treinamento físico..	26
Treinamento físico e estresse oxidativo.....	29
Objetivos.....	31
Materiais e Métodos.....	34
Resultados.....	45
Discussão.....	58
Referências.....	68
Anexo I.....	83
Anexo II.....	85

RESUMO

O treinamento físico é conhecido por induzir uma série de adaptações ao organismo, que podem ser sistêmicas ou localizadas a nível muscular.

Uma das adaptações já bem estabelecida na literatura é o aumento da capacidade oxidativa muscular, devido principalmente ao aumento na atividade de enzimas do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos e também da cadeia de transporte de elétrons.

No entanto é sabido que o exercício físico é responsável pelo aumento na produção de radicais livres, que se não forem devidamente sequestrados, podem iniciar um processo deletério às células através da oxidação de estruturas essenciais ao seu funcionamento tais como proteínas, membranas e até o DNA, ocasionando até a morte celular.

Estudos vem demonstrando que o sistema enzimático de defesa antioxidante também tem sua capacidade aumentada em vários tecidos em decorrência do treinamento físico porém, os resultados nesse sentido ainda são inconclusivos e portanto são alvo de estudos.

Neste sentido, para esta dissertação de mestrado, nossos objetivos foram: inicialmente analisar o perfil adaptativo tanto do metabolismo oxidativo quanto do sistema de defesa antioxidante em músculo esquelético (Sóleo) e também no sangue (Hemáceas). E num segundo momento estudamos as diferenças nas respostas adaptativas induzidas por dois protocolos de treinamento diferentes (contínuo e intermitente) utilizando também os dois sistemas citados anteriormente.

Nossos resultados indicaram que o perfil adaptativo tanto oxidativo quanto do sistema de defesa antioxidante se dão de forma paralela no músculo Sóleo e nas Hemáceas e que o treinamento intermitente é mais eficiente em aumentar a capacidade oxidativa, enquanto que o treinamento contínuo se mostrou mais eficiente em aumentar a capacidade de defesa antioxidante.

SUMMARY

Physical training is known to induce a large number of adaptations in whole body.

One of the most studied is the increase in muscle oxidative metabolism, mainly because the rise in Krebs cycle, β -oxidation of fatty acids and electron transport chain enzymes.

Although, exercise can increase free radicals generation too, and if the cells are not able to detoxify these reactive species, they can start deleterious processes through membrane, protein and DNA oxidation that can lead to cell death.

There are many evidences in literature that enzymatic antioxidant system is enhanced by physical training in various tissues, although the data concerning this issue are not conclusive.

Our objectives in this work were, first, to analyse the oxidative metabolism and enzymatic antioxidant system adaptative profiles in muscle (Soleus) and Blood (erythrocyte), and then we studied the adaptations induced by two kinds of training protocols; endurance and intermittent training, in both systems mentioned above.

Our results showed that adaptative profiles were very close in muscle and erythrocytes, and that intermittent training was more efficient to increase the muscle oxidative capacity, while endurance training was more efficient to enhance the antioxidant defense system.

GRUPO DE TRABALHO ENVOLVIDO

Esta tese está diretamente relacionada com o trabalho de outros alunos do Laboratório de Bioquímica do exercício, do departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP. O grupo de trabalho teve o objetivo de padronizar as técnicas e monitorar vários marcadores bioquímicos em músculo e sangue de ratos submetidos a dois tipos de treinamento diferentes, amplamente empregados na prática desportiva.

A grande quantidade de amostras analisadas e a relativa dificuldade das técnicas empregadas tornam difícil a sua execução em larga escala por uma só pessoa em curto espaço de tempo. Deste modo, o trabalho foi dividido da seguinte forma:

- Padronização das técnicas e análise de marcadores do metabolismo oxidativo, sistemas enzimáticos de defesa antioxidante e níveis de lesão muscular: Claudio Cesar Zoppi;
- Padronização das técnicas e análise de parâmetros bioquímicos alterados pelo ataque oxidativo: Armindo Antonio Alves e Leonardo dos Reis Silveira.

Assim, viabilizou-se o monitoramento de vários biomarcadores ao longo dos dois protocolos de treinamento, que compreenderam 8 semanas consecutivas. Os dados obtidos puderam ser correlacionados uns aos outros, permitindo interpretações mais completas e conclusivas. Desta forma, ao final deste trabalho, faremos referência direta aos dados obtidos pelo grupo, sendo o mesmo feito pelos demais integrantes em suas respectivas teses.

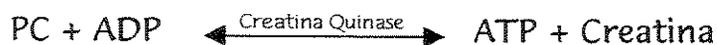
INTRODUÇÃO

VIAS METABÓLICAS PRODUTORAS DE ATP

O exercício físico é uma fonte riquíssima de informações bioquímicas pois induz uma série de adaptações metabólicas específicas, que variam conforme a duração e a intensidade do estímulo empregado. O músculo é o órgão essencial para a motricidade e utiliza somente ATP como fonte de energia para realizar não somente o processo de contração muscular “per se” como também para processar a condução de impulsos nervosos e garantir as reações do metabolismo necessárias para a manutenção de sua atividade.

O fornecimento de ATP para as células musculares também depende da intensidade e da duração da atividade realizada e pode ocorrer de duas formas predominantes: aeróbia e anaeróbia. Existem três processos comuns produtores de energia para a formação do ATP no músculo, dois anaeróbios e um aeróbio:

Sistema ATP-fosfocreatina: Neste sistema, a ressíntese do ATP provém da reserva muscular de fosfocreatina (PC). Como esta via envolve apenas uma reação, catalisada pela enzima creatina quinase, apesar de não ser capaz de prover grandes quantidades de energia, tem a capacidade de ressintetizar ATP de forma extremamente rápida, segundo a reação abaixo:



Hultman & Sjoholm (1983) documentaram que esta via fornece até 9.0 mmoles de ATP por Kg de músculo durante um protocolo de estimulação elétrica com duração de 1,28 segundos. Portanto, este sistema funciona como um tampão energético, haja visto que o mesmo é

extremamente sensível a alterações nas concentrações intracelulares de ATP e ADP (Jones et al, 1985).

Glicólise anaeróbia: Esta é a outra via de ressíntese de ATP que não utiliza oxigênio. Esta via envolve dez reações, onde a quebra parcial da molécula de glicose ou do glicogênio proporciona a formação de ATP também de forma rápida, além de produzir lactato no final do processo:



Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o recrutamento das duas vias anaeróbias de ressíntese de ATP se dava de forma sequencial. Margaria e colaboradores (1964;1969) propuseram que a PC era o único substrato para ressíntese de ATP durante os primeiros 10 segundos de esforço máximo, e que a participação da glicólise anaeróbia só se iniciava após a depleção total das reservas de fosfocreatina. No entanto, estudos mais recentes contestam esta teoria. Saltin et al. (1971) demonstraram que voluntários pedalando 10 segundos em intensidade relativa a 110% de seu $\text{VO}_{2 \text{ max.}}$ apresentaram concentração de lactato muscular aumentada em relação aos valores basais de repouso. Da mesma forma, vários outros autores obtiveram para este mesmo período de tempo, aumento da concentração de lactato em diversos modelos experimentais e modalidades de atividade física (Boobis et al, 1982; Jacobs et al, 1983 Hultman & Sjöholm, 1983; Nevill et al, 1989).

Atualmente acredita-se que a glicólise é a via anaeróbica de ressíntese de ATP mais significativa. Durante esforços de alta intensidade, de aproximadamente 3 minutos, a glicólise anaeróbia é responsável por até 80% do ATP necessário para tal esforço (Spriet, 1995). Embora o saldo energético desta via seja baixo em relação a via aeróbia de

ressíntese de ATP (3 mmol ATP/ mmol unidade glicosil contra 38 mmol ATP/ unidade glicosil da via aeróbia), esta via provê ATP às fibras em atividade também de forma rápida e possui uma capacidade de manutenção energética muito maior que a do sistema ATP- PC (Spriet et al., 1995).

Via aeróbica ou metabolismo oxidativo: Esta via de ressíntese de ATP se utiliza do O₂ molecular como acceptor final de elétrons na membrana interna das mitocôndrias. Através da oxidação total dos carboidratos ou de ácidos graxos a CO₂ e H₂O, utilizando o ciclo de Krebs como redutor de coenzimas, e o sistema de transporte de elétrons, que às custas de oxigênio molecular reoxida as coenzimas reduzidas, é gerada energia na forma de um gradiente protônico ($\Delta\mu H^+$) pela membrana interna, necessário para em última instância, sintetizar ATP pela enzima ATP sintetase (Mitchel, 1961)

Esta via é recrutada principalmente em atividades de longa duração (maratona, triatlon) e também durante as pausas, na recuperação de esforços intensos, onde a creatina é fosforilada a PC e também o lactato é oxidado.

FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

O oxigênio, por ter a particularidade de ser uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais, para ser reduzido necessita receber seus elétrons um a um. Nas mitocôndrias normalmente esta redução é feita na citocromo oxidase (aa₃), que catalisa a transferência simultânea de quatro elétrons, produzindo H₂O como único produto final

da reação (Halliwell & Gutteridge, 1989). Foi calculado que este processo redutor contribui com cerca de 95 a 98% do oxigênio total consumido pelas células. Entretanto, uma pequena fração deste oxigênio é reduzido univalentemente, dando início à formação de “espécies reativas de oxigênio” (EROs) (Jenkins & Goldfarb, 1993). Estas incluem um amplo espectro de espécies radicalares como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH \cdot) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Numa situação de exercício, a demanda energética bem como o consumo de oxigênio estão aumentados, este último podendo aumentar até 20 vezes em relação a situação de repouso (Astrand & Rodahl, 1986). O $O_2^{\cdot-}$ pode ser formado no músculo e também nas hemáceas de várias maneiras (Figura 1): i) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra reduzida (numa situação de anóxia muscular) e é “reperfundida” pelo oxigênio durante, por exemplo, a pausa após um esforço de alta intensidade; ii) por enzimas como xantina oxidase (ativada na mesma situação descrita acima, onde predomina uma baixa concentração de ATP e alta concentração de AMP) e iii) pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase (Hess et al, 1984; Sjödin et al., 1990).

O músculo esquelético também produz óxido nítrico (NO) pela reação da enzima óxido nítrico sintase (Reid, 1996). O óxido nítrico pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito, um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao radical hidroxila (Beckman et al, 1990). Além disso, a presença de ferro (na forma livre ou ligado ao heme) pode converter o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , pela

reação de Fenton, em radical hidroxila, uma das espécies mais reativas que se conhece (Halliwell & Gutteridge, 1989).

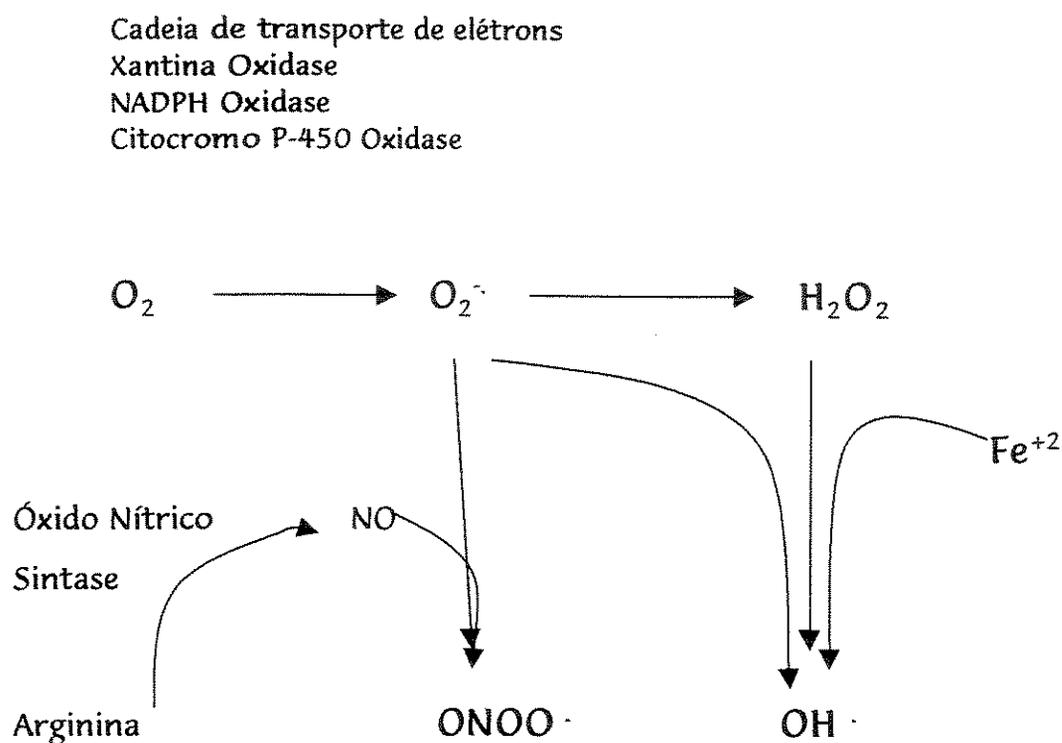


FIGURA 1: Vias de formação de EROs (Essig & Nosek, 1997). O₂^{•-} (Radical ânion superóxido); OH[•] (radical hidroxila); H₂O₂ (peróxido de hidrogênio); NO (óxido nítrico); ONOO[•] (ânion peroxinitrito).

Como os radicais livres são espécies bastante instáveis, eles podem atacar alvos celulares diversos com o objetivo de se estabilizarem; a consequência disto é a oxidação dos fosfolípidos de membranas celulares e subcelulares, DNA e proteínas. Os aminoácidos que compõem as proteínas são suscetíveis a reações com EROs. A oxidação de um ou mais aminoácidos pode romper as estruturas secundária e terciária de

proteínas, aumentando sua hidrofobicidade por exposição dos aminoácidos hidrofóbicos do seu interior. O radical hidroxila é particularmente proteotóxico pois pode reagir com o carbono alfa de qualquer aminoácido (Ryter et al, 1990). Além de potencialmente danificar a função de proteínas, denaturando-as, a oxidação de proteínas também marca as proteínas a serem degradadas em peptídios e eventualmente em aminoácidos.

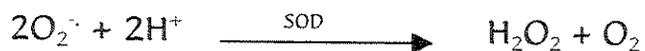
Os ácidos graxos poliinsaturados, constituintes das membranas biológicas são também um alvo importante para o ataque de EROs. A peroxidação lipídica, um processo degradativo que leva a alterações estruturais e funcionais é a consequência do ataque de EROs às membranas (Halliwell & Gutteridge, 1989).

SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Obviamente os organismos vivos desenvolveram mecanismos de defesa eficientes a fim de combater a ação deletéria das espécies reativas de oxigênio. Dentre eles temos quatro enzimas principais, responsáveis pelo “combate” às EROs :

- Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)
- Sistema Glutathione Peroxidase (GPX) (EC 1.11.1.9) / Glutathione Redutase (GR) (EC 1.6.4.2)
- Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

Superóxido Dismutase: As principais isozimas da SOD, são as dependentes de cobre e zinco. A ação direta desta enzima é a de sequestrar os radicais $O_2^{\cdot -}$ formados originando H_2O_2 :



Sistema Glutathiona Peroxidase/Redutase e Catalase: Estas três enzimas, embora se utilizem de diferentes caminhos, apresentam a mesma função, isto é, controlam os níveis de H_2O_2 , através de sua transformação em H_2O e O_2 . Isto faz com que cesse o processo de formação de outros radicais mais potentes, neutralizando conseqüentemente as ações deletérias por eles causadas. As enzimas GPX e GR, atuam em conjunto e necessitam de glutathiona reduzida (GSH) e NADPH, para o perfeito funcionamento deste sistema. A atividade da GPX e da CAT diferem de tecido para tecido dentro do corpo humano, embora especificamente no músculo esquelético não tenha sido observada variação significativa entre a atividade destas duas enzimas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Elas agem, no entanto em locais diferentes da célula. Enquanto a GPX em conjunto com a GR atua tanto dentro das mitocôndrias como no citossol, a CAT se encontra presente em organelas chamadas peroxissomos, no citossol celular.

Além dos sistemas enzimáticos temos outras defesas antioxidantes, dentre elas e talvez a mais conhecida e estudada é a proteção através de pequenas moléculas, no caso as vitaminas A, E e C. Também pertencem a este grupo a própria glutathiona reduzida (GSH) e o ácido úrico, entre outros que não abordaremos neste trabalho.

ESTRESSE OXIDATIVO E FADIGA MUSCULAR

Várias definições de fadiga podem ser encontradas na literatura. Hultman & Sjöholm (1986) fizeram um apanhado geral de todas as definições propostas e concluíram que todas convergem para a incapacidade em se manter a potência de trabalho esperada.

No entanto, as causas da fadiga ainda não são completamente entendidas. Acredita-se que qualquer ponto na cadeia de eventos que resulta na contração muscular pode ser um sítio de fadiga (Kirkendal, 1990).

Após anos de estudo alguns autores caracterizaram os principais pontos responsáveis pelo processo de fadiga, que pode ser tanto ao nível central (sistema nervoso) como periférico (muscular) (Bigland-Ritchie et al., 1978).

Em relação à fadiga do sistema nervoso central há uma proposta que um aumento na razão triptofano/aminoácidos de cadeia ramificada, durante esforços de longa duração, induziria, como resposta final um aumento na quantidade do neurotransmissor Serotonina, que seria responsável pela diminuição de impulsos nervosos, prejudicando assim o desempenho (Davis, 1996). Tal teoria no entanto vem sendo discutida encontrando-se dados na literatura ainda controversos (Chaouloff, 1989).

Em relação a fadiga periférica já há um número maior de evidências que comprovam seus vários pontos, que vão desde a junção neuromuscular, passando pela depleção de glicogênio muscular, chegando até o processo de relaxamento muscular (Kirkendal, 1990).

Além desses, desde 1982, quando Davies e colaboradores demonstraram dano oxidativo ocasionado pelo exercício e sugeriram que este poderia ser a causa da fadiga e/ou dano muscular que acontecem após um exercício exaustivo, tem sido acumulado um número relativamente grande de evidências experimentais consistentes com uma relação tipo causa-efeito entre estresse oxidativo e fadiga muscular (Essig & Nosek, 1997).

Estresse oxidativo é a consequência de um desbalanço entre produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio, podendo se dar tanto pelo aumento na formação destas espécies quanto pela queda na capacidade antioxidante celular (Travacio & Llesuy, 1996). A consequência da instalação deste processo é a perda das funções celulares que podem, em última instância ocasionar sua morte.

TREINAMENTO ESPORTIVO

O treinamento esportivo consiste numa sequência de cargas de esforço repetitivas e crescentes com o objetivo de aumentar a performance de um atleta. O processo de treinamento se divide em períodos chamados ciclos; a quantidade de ciclos durante um ano competitivo pode variar de acordo com a modalidade praticada ou o número de competições que se deseja participar (Weineck, 1989).

No início do ciclo há uma predominância de atividades aeróbias, de menor intensidade e maior duração (treinamento contínuo), e à medida em que se aproxima o período de competição este perfil se altera, contendo atividades de maior intensidade e menor duração, com

predomínio nesta fase do metabolismo anaeróbio como gerador de ATP (treinamento intermitente). Várias formas de se determinar o limiar anaeróbio individual são conhecidas e aplicadas nos esportes para definição da intensidade de trabalho no treinamento e mesmo em algumas competições como a maratona (Denadai, 1995).

A porcentagem de sessões de treinamento contínuo e intermitente varia de acordo com o tipo de desporto praticado. Por exemplo, um jogador de basquete deve ter um percentual maior de sessões de treinamento intermitente em relação a um corredor de maratona e vice-versa em relação a sessões de treinamento contínuo. Quando se chega ao final de um ciclo de treinamento, supõe-se que o atleta tenha atingido o pico de sua forma física, podendo render seu máximo na competição.

Do ponto de vista fisiológico o processo de treinamento é uma somatória de estímulos que resultam na quebra da homeostase intracelular. O estresse induzido pelo exercício é responsável pelo desencadeamento do processo adaptativo que restabelece a homeostase celular atingindo níveis de atividade maiores, principalmente de atividade de enzimas oxidativas, em relação aos anteriores (Virus, 1994). Pela falta de dados disponíveis acerca da quantidade ideal de treinamento, normalmente os atletas são submetidos a cargas de esforço muito altas para não se pecar por falta do mesmo. No entanto, quando uma nova carga de treinamento é executada, sem a prévia restauração da nova homeostase celular o atleta está entrando num processo de "overtraining" e à medida que este processo se repete por meses ou anos a consequência final é a diminuição do rendimento até o desencadeamento de lesões mais graves e muitas vezes irrecuperáveis.

Portanto o limiar entre um treinamento ideal e o "overtraining" é muito tênue e a falta de parâmetros para se estabelecer a capacidade máxima em assimilar cargas de treinamento pode ocasionar um menor rendimento devido ao excesso de cargas de esforço sem pausa para a recuperação ideal (Kuipers, 1998).

Por sua vez, a importância de um treinamento adequado se dá pelo fato da diferença que separa o vencedor do segundo colocado ser mínima, quando pensamos em atletas de nível olímpico. Snyder e Foster (1994) mostraram que a diferença que separava primeiros e segundo colocados num campeonato mundial de "speedskating" era de apenas 0.3%. Dados similares a estes podem ser observados a cada quatro anos durante os Jogos Olímpicos, em várias modalidades

TREINAMENTO FÍSICO E LESÃO MUSCULAR

O treinamento físico, embora induza várias adaptações benéficas também deixa as fibras musculares, pelo fato de sua maior utilização, mais susceptíveis a lesões. Já está bem documentado em várias espécies animais, que atividades exercidas acima da intensidade habitual de esforço induzem níveis de lesão muscular elevados (Rose,1983; Apple,1988; Janssem, 1989). Vários autores já relataram a ocorrência de tais lesões diretamente através de alterações histológicas ao nível de sarcômero após esforço intenso (Friden et al,1983; Newham et al, 1983; Friden et al, 1984) principalmente em atividades que recrutam contrações excêntricas aumentando inclusive a mobilização de linfócitos

e neutrófilos, sinal da instalação de um processo inflamatório (Nosaka & Clarkson, 1995; Pizza et al, 1995).

O nível de lesão pode também ser quantificado indiretamente por parâmetros como o nível de percepção de dor muscular e perda prolongada de força (Clarkson et al, 1992; Newhan et al, 1986). No entanto, a forma indireta mais utilizada é a quantificação no plasma de proteínas musculares específicas, como a mioglobina, lactato desidrogenase e principalmente a creatina quinase (Apple et al, 1985; Jacobs et al, 1987; Clarkson & Tremblay, 1988; Volfinger et al, 1994).

A proposta é que o estresse excessivo causado pelo exercício aumentaria a permeabilidade da membrana celular permitindo o vazamento destas proteínas que se encontram especificamente dentro dos músculos para o plasma (Clarkson & Tremblay, 1988). Embora os fatores que desencadeiam o aumento na permeabilidade não estejam completamente compreendidos e ainda haja controvérsia acerca desta hipótese toda a discussão da literatura se baseia na mesma.

Em revisão feita por Pyne (1994) o autor deixa claro a existência de duas hipóteses para explicar este fenômeno: a primeira argumenta que este extravazamento de proteínas musculares para o plasma se deve principalmente ao estresse mecânico, provocado pelo processo de contração muscular. Assim, o ciclo contração-relaxamento executado pelas miofibrilas, ocasionando o contínuo alongamento e encurtamento do sarcômero, seria suficiente para alterar a estrutura da membrana celular. A outra hipótese propõe que esta perda de integridade se deve principalmente a um estresse metabólico, consequência do ataque de

EROs ao sarcolema ocasionando um processo de lesão oxidativa na membrana (Frankiewicz-Jozko et al., 1996).

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS E DO SANGUE

A) SANGUE

O sangue é um tecido de transporte, que possibilita a especialização da estrutura e função celular dos demais tecidos. O sangue, que perfaz 5% do peso corporal total é uma suspensão de vários tipos de células, em um meio aquoso complexo chamado plasma (Berne & Levi, 1990). O plasma é a fase líquida do sangue, onde além das células se encontram dissolvidos outros componentes fundamentais para o funcionamento do organismo como as proteínas plasmáticas albumina, transferrina e globulinas, eletrólitos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , além de glicose, de extrema importância principalmente para o metabolismo oxidativo do cérebro e anaeróbico das hemáceas. A centrifugação de uma amostra de sangue permite a separação do plasma de seus constituintes celulares:

- Leucócitos
- Plaquetas
- Hemáceas

Os leucócitos são divididos de forma geral em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos. Todos eles são responsáveis pelas complexas respostas imunológicas do organismo contra agentes externos, tais como vírus e bactérias (Berne & Levi, 1990).

As plaquetas desempenham importante função no controle do sangramento e na gênese da trombose, isto é, na formação de coágulo dentro dos vasos sanguíneos (Berne & Levi, 1990).

As Hemáceas ou eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, ocupando cerca de 48% de seu volume total em homens adultos (Berne & Levi, 1990). Embora seja uma célula anucleada e desprovida de mitocôndrias, seu citoplasma possui todo o aparato enzimático necessário tanto para a produção de energia necessária para assegurar a integridade de sua membrana como para manter as concentrações iônicas (internas e externas), converter CO_2 em íon bicarbonato, além de prevenir a transformação oxidativa da hemoglobina em sua forma não funcional, a metamoglobina. (Berne & Levi, 1990).

O principal componente proteico das hemáceas é a hemoglobina (Hb). Sua função é importantíssima pois o O_2 ligado à Hb nos alvéolos pulmonares, através de uma ligação lábil e reversível, pode se dissociar da molécula de Hb ao chegar aos tecidos, onde a pO_2 é mais baixa. A curva de dissociação da hemoglobina de um sujeito normal apresenta uma configuração sigmóide característica (Terzi, 1992) e vários são os fatores que alteram a afinidade da Hb pelo O_2 . Assim, o fornecimento de O_2 aos músculos esqueléticos pela sua dissociação da molécula de Hb está relacionada a vários fatores, tais como a diferença na pressão parcial de O_2 , abaixamento do pH (efeito Bohr) e a concentração de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). O 2,3 DPG é de fundamental importância, tanto que é encontrado nas hemáceas nas mesmas concentrações que a própria Hb pois sua ligação à hemoglobina estabiliza a forma desoxigenada, promovendo a liberação de O_2 .

B) MUSCULOS ESQUELÉTICOS

O tecido muscular esquelético em conjunto com ossos e articulações, é responsável pelos movimentos executados pelo corpo e apesar de ser constituído de células (fibras musculares) com características gerais semelhantes, estas apresentam diferenças morfológicas e funcionais entre si, o que garante uma alta plasticidade a este tecido.

As principais características diferenciais entre tipos de fibras opostos são:

Fibras de contração rápida ou Tipo II:

Fenótipo: Branco;

Funcionalidade: contrações rápidas com capacidade de gerar altos níveis de força e alto índice de fadiga;

Fonte de energia: carboidratos;

Forma de produção de energia: glicolítica, anaeróbica e aeróbica;

Fibras predominantes: IIa e IIb;

Defesa antioxidante: baixa;

Fibras de contração lenta ou Tipo I:

Fenótipo: Vermelho;

Funcionalidade: contrações lentas e repetitivas, baixos níveis de força;

Fontes de energia: carboidratos e principalmente lipídeos;

Forma de produção de energia: oxidativa (aeróbia)

Fibra predominante: Tipo I;

Defesa antioxidante: alta;

A maior parte dos músculos se encontram em estados adaptativos intermediários, apresentando características “híbridas”, podendo produzir energia tanto de forma aeróbia quanto anaeróbia, havendo contudo uma predominância de uma via em relação a outra que pode sofrer variações nos diversos músculos que compõem o organismo (Maltin et al. 1989).

Tais características se refletem também no recrutamento das diferentes fibras musculares, tendo em vista que a intensidade do esforço exerce influência decisiva no recrutamento de determinada fibra, seguindo o princípio do tamanho. As fibras lentas ou do tipo I, por apresentarem menor área de secção transversal são recrutadas em intensidades de esforço mais baixas, enquanto que fibras rápidas que apresentam maior área de secção transversa são recrutadas somente em esforços de alta intensidade (Edström & Grimby, 1986). Portanto, quando se executa um treinamento intermitente, se atinge principalmente fibras de contração rápida, ao passo que durante um treinamento de endurance as fibras trabalhadas são as de contração lenta.

ADAPTAÇÕES INDUZIDAS NA CAPACIDADE OXIDATIVA PELO TREINAMENTO FÍSICO

As adaptações induzidas pelo treinamento físico podem ocorrer de forma sistêmica, isto é, alterações que afetam o sistema respiratório e circulatório, incluindo o sistema de transporte de oxigênio, a composição corporal e alterações na pressão arterial ou em nível tecidual, onde as

alterações bioquímicas estão relacionadas principalmente com o funcionamento do metabolismo energético.

Ao nível sistêmico, algumas das principais adaptações induzidas são: alteração no volume cardíaco, menor frequência cardíaca de repouso, maior volume de ejeção e aumento no volume sanguíneo e na concentração de Hb.

Com a técnica denominada ecocardiografia, foi possível traçar um perfil adaptativo do aumento do volume cardíaco de forma mais sensível. Utilizando este método, constatou-se que a hipertrofia cardíaca em atletas de modalidades de endurance ou resistência caracteriza-se como uma grande cavidade ventricular com espessura normal da parede do miocárdio (Nutter et al, 1975; De Maria et al, 1978; Ehsani et al, 1978), aumentando assim o volume de ejeção deste tipo de atleta (Ekblom & Hermansen, 1968; Green et al., 1991). Por outro lado, a hipertrofia cardíaca de atletas engajados em modalidades de velocidade ou que envolvem alto nível de força, caracteriza-se como uma parede ventricular mais espessa com cavidade normal (Morganroth et al, 1975; Snoeckx et al, 1982).

Outra alteração sistêmica interessante que o treinamento induz é a bradicardia de repouso (redução da frequência cardíaca). Convém salientar que a magnitude da bradicardia é a mesma tanto em atletas de endurance quanto em atletas de não endurance. Os estudos acerca deste assunto demonstram que esta adaptação ocorre de forma lenta e depende de um longo tempo de treinamento (Frick et al, 1967). Os mecanismos que levam à redução da frequência cardíaca em atletas ainda não está totalmente esclarecido. No entanto estudos evidenciam

que o principal fator desencadeante desta adaptação ocorre ao nível de sistema nervoso autônomo através de um maior tônus vagal e de uma diminuição na influência simpática (Frick et al, 1967; Sirgvardsson et al, 1977; Winder et al, 1978). Outra importante adaptação há muito tempo observada é ao nível sanguíneo, tanto em relação ao aumento do volume plasmático quanto na quantidade total de Hb (Kjellberg et al, 1949; Oscai et al, 1968).

Dentre as adaptações musculares podemos destacar troca no substrato energético utilizado, aumento da quantidade e densidade mitocondrial, da densidade capilar e também na atividade de várias enzimas do ciclo de Krebs, cadeia respiratória e da β -oxidação de ácidos graxos, além de alteração no perfil das proteínas contráteis (Holloszy, 1967; Henriksson et al, 1986; Lash & Bohlen, 1992; Pette & Vrbova, 1992).

As enzimas do sistema de defesa antioxidante também parecem sofrer ação regulatória do treinamento físico, haja visto que uma vez aumentada a capacidade oxidativa, a capacidade em gerar EROs também é potencializada.

Os estudos neste sentido são recentes e ainda pouco conclusivos. Inicialmente os resultados acerca deste assunto se apresentavam de forma contraditória, principalmente pelo fato de diversos protocolos serem empregados e pela falta de um controle mais rigoroso sobre a intensidade do esforço. Atualmente já há um consenso maior que o treinamento, principalmente o de resistência, até pelo fato de ser o modelo mais empregado nos estudos da literatura, induz aumento na atividade das enzimas antioxidantes, tanto no músculo quanto nas

hemáceas, sendo que aparentemente nestas células as enzimas do sistema da glutathiona peroxidase/reductase são as mais sensíveis ao treinamento, exibindo, via de regra, suas atividades aumentadas, embora ainda existam controvérsias (Para uma melhor revisão sobre este assunto ver (Jenkins, 1988; Sen, 1995 e Parker, 1997).

TREINAMENTO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

É interessante notar que a maioria dos trabalhos utilizando protocolos de treinamento do tipo contínuo (realizado a velocidades submáximas e crescentes) mostra sempre um efeito adaptativo benéfico no organismo. Aparentemente, esta situação adapta o organismo a aumentos não somente da capacidade oxidativa, como da defesa antioxidante dos músculos (Alessio e Goldfarb, 1988; Venditti e Meo, 1996) e, deste modo, as adaptações não são acompanhadas por estresse oxidativo acentuado das fibras musculares.

Aumentos no ataque oxidativo sem o concomitante aumento na capacidade de defesa antioxidante parece ser resultado de protocolos de exercício do tipo intermitente, realizado por breves períodos, a alta intensidade (com predomínio do metabolismo anaeróbico) intercalado por pausas curtas (Alessio et al, 1988; Criswell et al, 1993). Convém salientar o quanto este tipo de treinamento simula um processo de "isquemia-reperfusão", conhecido gerador de espécies reativas de oxigênio (Sjödín et al. 1990). Além disso, todos os resultados obtidos com animais submetidos a um exercício físico até a exaustão mostram um aumento nos danos celulares. Nesta situação, foram demonstrados

sensibilidade aumentada a agentes oxidantes, diminuição nos valores de controle respiratório e níveis aumentados de produtos da peroxidação lipídica (Davies et al, 1982; Gollnick et al., 1990). Este tipo de exercício parece afetar também a atividade de várias enzimas quando aplicado tanto em animais sedentários quanto em animais já treinados (Ji et al, 1988).

OBJETIVOS

Para que as fibras musculares possam realizar as adaptações impostas por uma periodização de treinamento é preciso que, primeiramente possa suportar o estímulo. Dependendo da intensidade e natureza do estímulo este pode configurar-se num impacto demasiadamente danoso à célula. Nosso grupo de pesquisa acredita que ao buscar uma situação de maior economia com o máximo de eficiência possível o processo adaptativo deve estar em sintonia com as exigências funcionais a que o músculo está sendo submetido. Num treinamento que leve à adaptação do organismo é de se esperar que sejam fundamentais ao nível muscular as seguintes decisões adaptativas:

- a) Ajustar a capacidade oxidativa (através do aumento no transporte e utilização de oxigênio);
- b) Combater a toxicidade do aumento da produção de radicais livres de forma econômica (através de um aumento na atividade enzimática do sistema antioxidante).

Nosso objetivo, no período que compreendeu desde a iniciação científica até esta dissertação de mestrado, foram:

- a) padronizar as técnicas de análise de biomarcadores dos sistemas oxidativo e de defesa antioxidante no músculo sóleo de ratos submetidos a um protocolo de treinamento de resistência e compará-los com os mesmos biomarcadores nas hemáceas.
- b) Estudar as adaptações induzidas por dois protocolos de treinamento diferentes, contínuo ou intermitente, tanto no sangue

quanto no músculo sóleo, tendo em vista as diferentes vias metabólicas recrutadas durante a execução do esforço e também correlacioná-los com os níveis de lesão muscular provocada pelos dois tipos de atividade.

BIOMARCADORES UTILIZADOS

A) Sangue:

1) Metabolismo oxidativo : [] Hb

 [] Lactato

 [] 2,3 DPG

2) Sistema de defesa antioxidante (hemáceas):

Atividade das enzimas glutathiona redutase e catalase.

3) Lesão muscular:

Atividade da enzima creatina quinase.

B) Músculos (Sóleo)

1) Metabolismo oxidativo:

Atividade das enzimas succinato desidrogenase e citrato sintase.

2) Sistema de defesa antioxidante:

Atividade das enzimas glutathiona redutase e catalase.

Protocolos de Treinamento

Para os 2 tipos de treinamento, utilizamos ratos tipo Wistar, machos, de aproximadamente 2 meses de idade obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP e mantidos em ciclo invertido de claro-escuro por duas semanas antes do período de adaptação. Todos os animais foram submetidos a duas semanas de atividade diária, que consistia em correr a uma velocidade de 10 m/min por 5 minutos. Esta semana inicial teve dupla finalidade, a primeira foi separar os animais que corriam voluntariamente, constituindo os grupos treinados, dos animais que se recusavam a correr, que constituíram o grupo controle sedentário, confinados apenas à movimentação dentro das gaiolas. O segundo objetivo foi adaptar os animais que participaram do treinamento à esteira rolante. Ao final do período de adaptação os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle sedentário (CO), um grupo de treinamento de endurance (ET) e ainda no grupo de treinamento intermitente (IT), na segunda etapa de nosso trabalho.

Os diferentes protocolos tiveram a duração total de 8 semanas e foram realizados em esteira rolante com inclinação de -3° . Ambos foram divididos em duas fases:

- a) Fase I (primeiras 4 semanas): aumento progressivo na intensidade e duração do esforço
- b) Fase II (últimas 4 semanas): manutenção da intensidade e duração do esforço atingidas na 4ª semana.

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

Isolamento de Mitocôndrias de Músculo Esquelético:

Para o isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético foram utilizados os músculos Gastrocnêmio e Sóleo de ratos Wistar machos. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação fracionada, segundo Bhattacharya et al.(1991), com algumas modificações. Inicialmente o animal foi anestesiado com 1mL de hidrato de cloral (1%), o músculo extraído foi colocado sobre um papel de filtro embebido em meio de KCl 46mM, sacarose 100mM, tamponado com MOPS 100mM, pH 7,4, contendo EDTA 10mM, para a retirada de vestígios de gordura. Feito isso o músculo foi emergido em solução gelada idêntica à anterior na proporção de 10 vezes o peso do músculo, picado em pequenos pedaços com uma tesoura e colocado sob agitação por 5 minutos na presença de

Nagarse 20mg% e BSA 0,5%. A Nagarse é uma protease que têm a função de digerir as miofibrilas que podem contaminar a preparação de mitocôndrias isoladas.

Após a lavagem os músculos foram homogeneizados 3 vezes em homogeneizador Potter-Elvehjem (velocidade máxima do aparelho), na mesma solução onde foi agitado. O homogeneizado assim obtido foi filtrado em gaze (a fim de separar as miofibrilas, que estão presentes em maior concentração no homogeneizado) e centrifugado a 28000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, pois continha Nagarse; e o sedimento ressuspense em 30ml de meio contendo sacarose 100mM, KCl 46mM tamponado com MOPS 100mM (pH 7.4), na presença de BSA 0,5%, na velocidade mais lenta do homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante resultante centrifugado a 28000 rpm por 10 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 1,5mL de meio (sem EGTA e sem BSA) manualmente. Todo procedimento se deu entre 0° C e 4° C . A dosagem de proteína foi feita pelo método de Biureto (Gornall et al, 1949), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Preparação do homogeizado de Músculo Esquelético

Para o homogenato de músculo esquelético foi utilizado o músculo sóleo de ratos Wistar machos. Após o animal ter sido anestesiado com 1ml de hidrato de cloral (10%), o músculo foi extraído e colocado sobre um papel de filtro para a retirada de vestígios de gordura e tecido conjuntivo. Feito isso, o músculo foi imerso em nitrogênio líquido, congelado e conservado a -70°C, até os ensaios serem conduzidos. Para

sua utilização este material após ser descongelado e cortado em pequenos pedaços de 30 mg foi imerso em meio contendo sacarose 440 mM, MOPS 50 mM, PMSF 0,01 mM e EDTA 100 mM, pH 7.2. Os músculos foram então homogeneizados em tubos eppendorf 8 vezes, em homogeneizador tipo Polytron (na velocidade máxima do aparelho), por 30 segundos. O homogeneizado assim obtido foi centrifugado a 20.000 rpm por 20 minutos. Desprezou-se o sedimento e o sobrenadante obtido desta centrifugação foi utilizado para os ensaios enzimáticos. Todo procedimento foi feito entre 0°C e 4°C. A dosagem de proteína foi feita pelo método de Biureto (Gornall et al, 1949), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Preparação da papa de Hemáceas

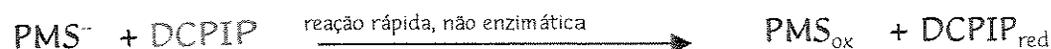
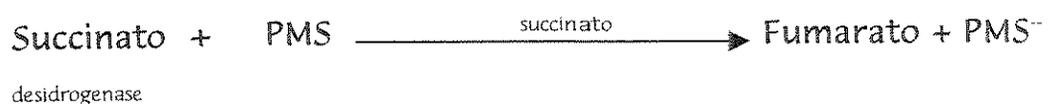
O sangue (cerca de 8 mL) foi coletado na veia hepática do mesmo animal em que se retiraram os músculos. Centrifugamos o sangue 3 vezes a 2.500 rpm por 5 minutos em Tampão fosfato 0.1 M com NaCl 1% pH 7,4. Após o isolamento das hemáceas, estas foram lisadas adicionando-se H₂O (1:1 v/v) e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos por duas vezes, a fim de retirar as membranas remanescentes. Desprezamos o sedimento e o sobrenadante é congelado a -70°C para posterior análise. A dosagem de hemoglobina do hemolisado foi feita pelo método de DRABKIN (Beutler,1975).

Determinação das Atividades Enzimáticas

a) Succinato Desidrogenase

A succinato desidrogenase (SDH) (EC 1.3.99.1) catalisa a oxidação do succinato a fumarato com redução do FAD a FADH₂, que é reoxidado pela ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons.

Fenazina metassulfato (PMS) e seus análogos são os únicos aceptores conhecidos por interagir rápida e diretamente com a desidrogenase. Assim, a atividade da succinato desidrogenase pode ser medida pela redução do corante 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP) através da reoxidação da fenazina metassulfato (PMS). Com a redução o DCPIP perde a cor e a reação pode ser seguida a 600nm, segundo Veeger et al. (1969) da seguinte maneira:



O meio básico de reação consiste em sacarose 125 mM, KCl 65mM, Hepes 10 mM (pH7.6), rotenona 1uM, antimicina 1uM, PMS (1%) e BSA (3%). Utilizamos um inibidor de 2º sítio (antimicina A) para impedir a reoxidação de FADH₂ pela cadeia respiratória. Inclui-se também o BSA para sequestrar vestígios de ácidos graxos.

Após 2 minutos de adição da suspensão mitocondrial (1mg/ml), acrescentou-se o DCPIP 33mM, deixando estabelecer uma linha de base, e então o succinato a fim de iniciar a reação. A medida da atividade da

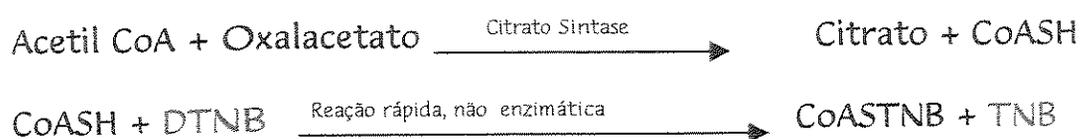
succinato desidrogenase se deu através da velocidade com que o PMS reduziu o DCPIP que ao perder sua cor provoca uma diminuição no valor da absorvância em 600nm.

Para o cálculo da velocidade da reação enzimática usamos a equação de Beer-Lambert:

$A = E \cdot c \cdot l$; onde A é a absorvância da amostra, E é o coeficiente de extinção molar e igual a $21,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o DCPIP, c é a concentração de DCPIP e l é o caminho óptico da cubeta. A leitura das absorvâncias em um determinado intervalo de tempo nos permitiu determinar a sua diferença e nos forneceu a velocidade da reação enzimática catalisada pela enzima succinato desidrogenase.

b) Citrato Sintase

A citrato sintase (CS) (EC 4.1.37) é uma enzima intramitocondrial do ciclo de Krebs, que catalisa a condensação do oxaloacetato (OAA) com acetil CoA, dando início ao mesmo. Medimos sua atividade pelo método proposto por Srere (1969). O meio de reação continha 0.1 mL de DTNB 1mM, 0,03 mL de Acetil CoA 10mM e volume do homogeneizado muscular correspondente a 50 mg/mL. A reação foi iniciada acrescentando-se 0.05 mL de OAA 10 mM, completando com água o volume suficiente para completar 1 mL de volume total na cubeta. A reação foi seguida a 412 nm em espectrofotômetro Beckman DU 640, acompanhando a formação de TNB, segundo as seguintes reações:



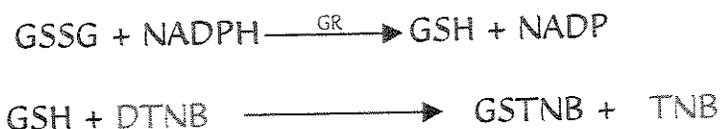
Para o cálculo da velocidade da reação enzimática usamos a equação de Beer-Lambert:

$A = E.c.l$; onde A é a absorvância da amostra, $E=13.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o TNB. A leitura das absorvâncias em um determinado intervalo de tempo nos permitiu determinar a sua diferença e nos forneceu a velocidade da reação enzimática catalisada pela enzima citrato sintase.

c) Glutathiona Redutase.

Os ensaios de ambas as amostras, muscular e sanguínea, são similares e conduzidos de acordo com Smith et al (1988). Optamos por utilizar este método por garantir uma maior variação nos valores de absorvância, diminuindo assim o erro experimental e evitando interferência, principalmente nos ensaios conduzidos nas hemáceas, ocasionadas pela hemoglobina.

As amostras (sangue:1 μL de hemolisado; músculo: volume de homogeneizado correspondente a concentração de 50 mg/mL de proteína) foram adicionadas a um meio de incubação contendo KH_2PO_4 0.2 M e EDTA 2 mM em pH 7.0. Foram adicionados ainda ao meio de reação 50 μL de NADPH 2 mM, 250 μL de DTNB 3mM e 50 μL de GSSG 20 mM, a fim de iniciar a reação. A formação de TNB foi acompanhada como descrito no item anterior, segundo as seguintes reações:



Para o cálculo da atividade da enzima no sangue foi utilizada a seguinte equação: $E = 100 \times A / [Hb]$, onde E é a atividade em unidades internacionais (UI)/grama de hemoglobina, A é o número de unidades de enzima da amostra e é calculada pela equação: $\Delta A / 13.600 \times V_H / V_C$, onde ΔA é a diferença da absorvância a 412nm em 1 minuto, $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ é o valor do coeficiente de extinção molar do TNB a 412nm, V_H é o volume de hemolisado na cubeta, V_C é o volume total da cubeta e $[Hb]$ é a concentração de hemoglobina do hemolisado em g/mL (Beutler, 1975).

Para calcular a atividade desta enzima em homogenato de músculo utilizamos a mesma equação usada para o cálculo da citrato sintase.

d) Catalase:

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras, sangue ou músculo (idem à glutathiona redutase) a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM, (Aebi, 1984). A queda nos valores de absorvância do H_2O_2 é seguida espectrofotometricamente a 240 nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase sanguínea foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde a é o volume de hemolisado na cubeta e b é o volume total da cubeta, A_1 o valor da absorvância em $t=0$ e A_2 é o valor da absorvância no tempo final, que em nosso caso se dá

aos 15 segundos após o início da reação (Aebi,1984). Para o cálculo da atividade desta enzima no músculo foi utilizada a mesma equação descrita para a citrato sintase e glutathione redutase, utilizando o valor de coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240 nm de $43.600 .M^{-1}.cm^{-1}$ (Andersen et al, 1997).

Dosagem de 2,3 DPG

Rose e Liebowitz (1970) descreveram um método de dosagem do 2,3 DPG, baseados no princípio de que este é hidrolisado a 3-fosfoglicerato e fosfato inorgânico (Pi) por uma enzima chamada 2,3 difosfoglicerato fosfatase, sendo o ácido fosfoglicólico um cofator necessário à reação.

A dosagem do fosfato formado pode ser feita fotometricamente segundo Fiske & Subbarow (1925), o qual quantifica a formação do composto fosfomolibdato de amônio (azul) a partir da redução do complexo fosfoamônio em presença de um redutor. Como a quantidade de fosfato (Pi) formado é diretamente proporcional à concentração de 2,3 DPG inicialmente existente, podemos assim determinar a sua concentração sanguínea.

O preparo da amostra consistiu em adicionar o ácido tricloroacético 8% em H_2SO_4 0,07 N gelado ao sangue na proporção de 1:3, para desproteinização, após um repouso de cinco minutos em banho de gelo centrifugou-se a amostra ($250 \times g$ por 2min). Os ensaios foram conduzidos segundo o boletim SIGMA nº 665 (1974) com a utilização de um Kit SIGMA específico para a dosagem de 2,3 DPG.

Dosagem da concentração de lactato sanguíneo

As dosagens de lactato sanguíneo foram feitas com auxílio do lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim) (Fell et al, 1998). As amostras foram coletadas cortando-se a ponta da cauda do animal, após a última sessão de treino da semana e a dosagem foi feita em sangue total.

Dosagem das concentrações de Hemoglobina (Hb) e atividade da enzima Creatina Quinase (CK).

As dosagens destes parâmetros foram executadas com auxílio do aparelho Reflotron (Böehringer Mannheim). As amostras foram coletadas cortando-se a ponta da cauda do animal 48 horas após a última sessão de treinamento da semana e as dosagens foram feitas utilizando-se sangue total (32 μ L). A dosagem da concentração de hemoglobina total, se baseia no princípio da cianometahemoglobina, a atividade da CK é determinada indiretamente, através de reações acopladas, seguindo a decomposição do H_2O_2 .

A análise é feita com auxílio de tiras com uma região reativa onde se encontram os compostos reagentes que quando em contato com o sangue da amostra formam o composto a ser medido por reflectometria.

Análise estatística: Utilizamos o teste t-student e a análise de variância ANOVA, adotando como nível de significância $p < 0.05$.

-----RESULTADOS

PARTE I

Nesta primeira seção mostraremos os resultados obtidos na fase inicial de nosso trabalho, onde acompanhamos semanalmente a variação nos biomarcadores durante um protocolo de treinamento de endurance, no intuito de analisarmos o perfil adaptativo nos dois sistemas, muscular e sanguíneo. Naquele momento, o importante era responder se o que estava acontecendo nos músculos se refletia temporalmente nas hemáceas.

Os gráficos apresentados nas figuras 2, 3 e 4 nos mostram o perfil adaptativo dos marcadores de metabolismo aeróbio, tanto ao nível sanguíneo através das concentrações de Hb e 2,3 DPG quanto ao nível mitocondrial através da determinação da atividade da enzima SDH. Percebemos que enquanto a intensidade do esforço foi incrementada (até a 4ª semana) os níveis de tais marcadores também tenderam a aumentar, atingindo seus respectivos picos exatamente no momento onde a intensidade do treinamento foi mais alta. Notamos também que a medida em que a intensidade do treinamento se estabilizou (5ª até 8ª semana) houve uma estabilização nos níveis de todos os parâmetros estudados, apresentando uma pequena queda em relação ao pico máximo obtido anteriormente, na 4ª semana. No entanto esta estabilização ocorreu em níveis significativamente maiores quando comparados aos valores obtidos no grupo de animais controle.



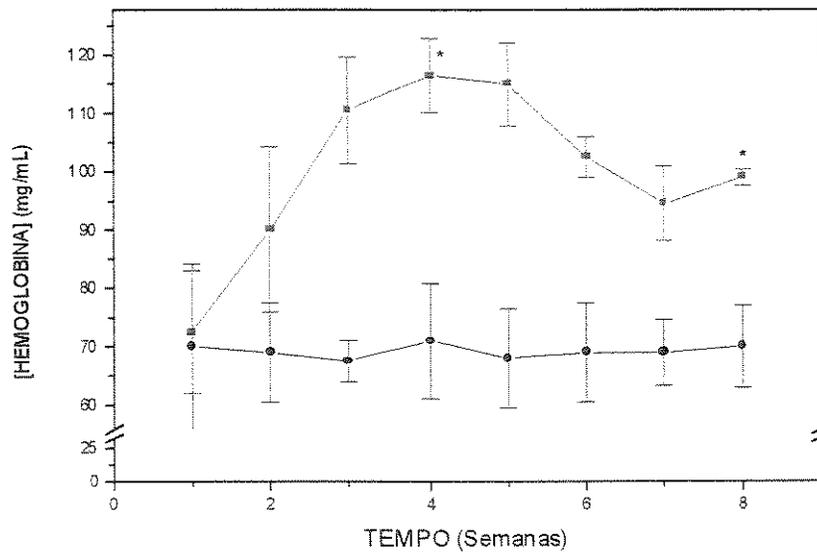


FIGURA 2: Concentração de Hemoglobina durante o período de treinamento. Ratos treinados (—■—) e ratos controle sedentário (—●—). Resultados são média \pm DP (n=3). * p < 0.05 em relação ao controle.

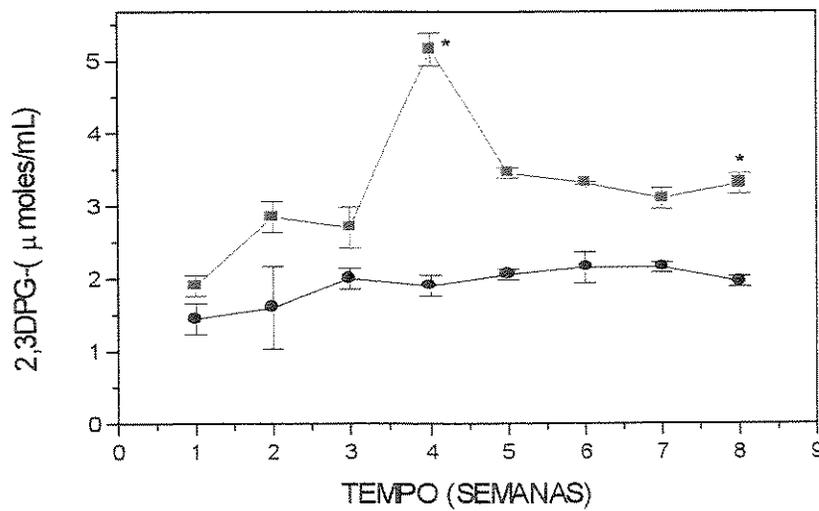


FIGURA 3 : Concentração de 2,3 DPG sanguíneo durante o período de treinamento. Ratos treinados (—■—) e ratos controle sedentários (—●—). Resultados são média \pm DP (n=3). * p < 0.05 em relação ao grupo controle.

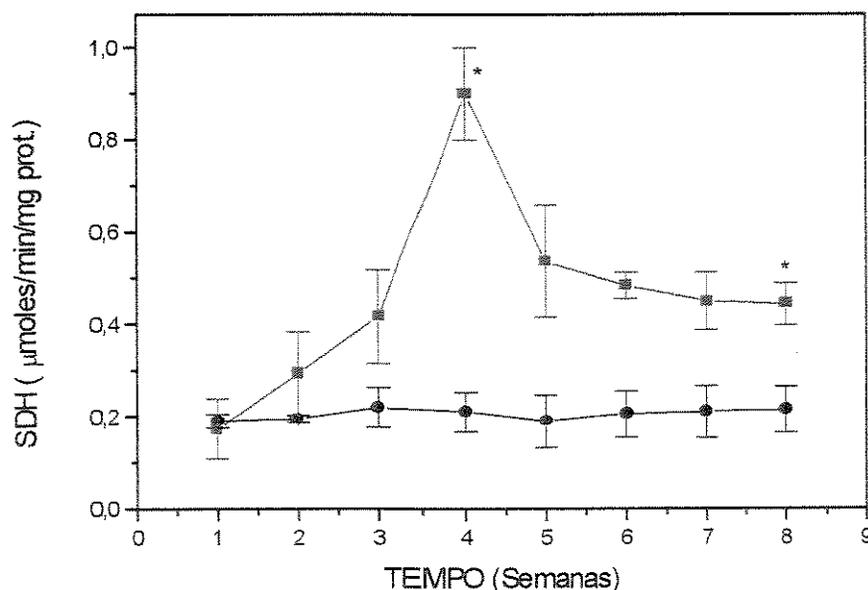


FIGURA 4: Atividade da succinato desidrogenase durante o período de treinamento. Ratos treinados (—■—) e ratos controle sedentário (—●—). Resultados são média \pm DP (n=3). * p<0,05 em relação ao controle.

Estes resultados indicam que a adaptação do sistema aeróbio está intimamente ligada à intensidade do esforço. Estes resultados também nos evidenciam que as adaptações tanto em nível muscular quanto sanguíneo, principalmente no sentido de disponibilizar um aporte de oxigênio maior para o músculo (principal requisito para que haja o processo de fosforilação oxidativa) (Chance et al, 1985) ocorrem paralelamente.

No que diz respeito à capacidade enzimática de defesa antioxidante, os dados estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Notamos que as atividades da enzima glutathiona redutase tanto sanguínea quanto mitocondrial apresentaram praticamente o mesmo perfil de aumento mostrado para o metabolismo oxidativo, sendo que a GR sanguínea teve

seu pico máximo, assim como os demais marcadores na 4ª semana, enquanto que a mitocondrial apresentou seu pico de forma mais tardia, na 6ª semana. Da mesma forma que os demais parâmetros, a atividade da GR, tanto muscular quanto mitocondrial, tendeu a se estabilizar nas últimas semanas do protocolo de treinamento, quando a intensidade permaneceu inalterada, permanecendo também acima dos valores obtidos no grupo controle, principalmente a atividade da GR mitocondrial.

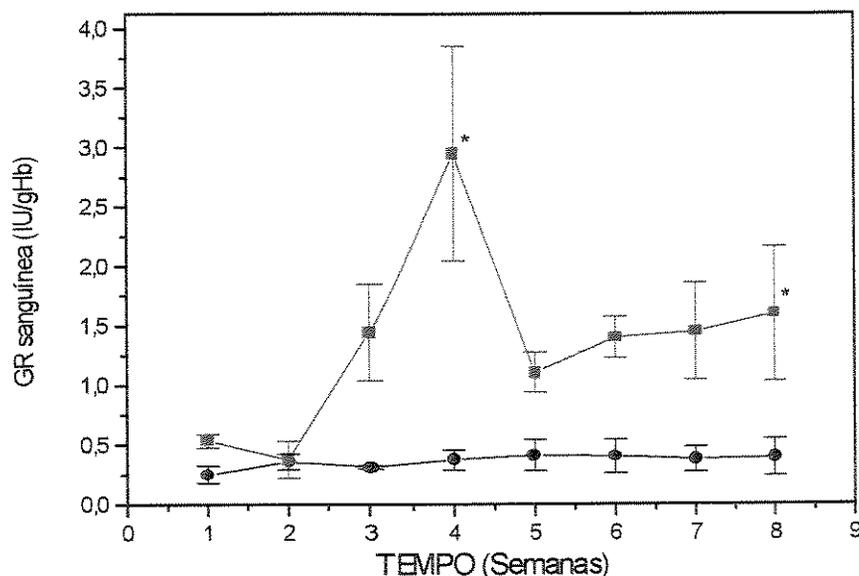


FIGURA 5 : Atividade da glutatona redutase sanguínea durante o período de treinamento. Ratos treinados (—■—) e ratos controle sedentário (—●—). Resultados são média \pm DP (n=3). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

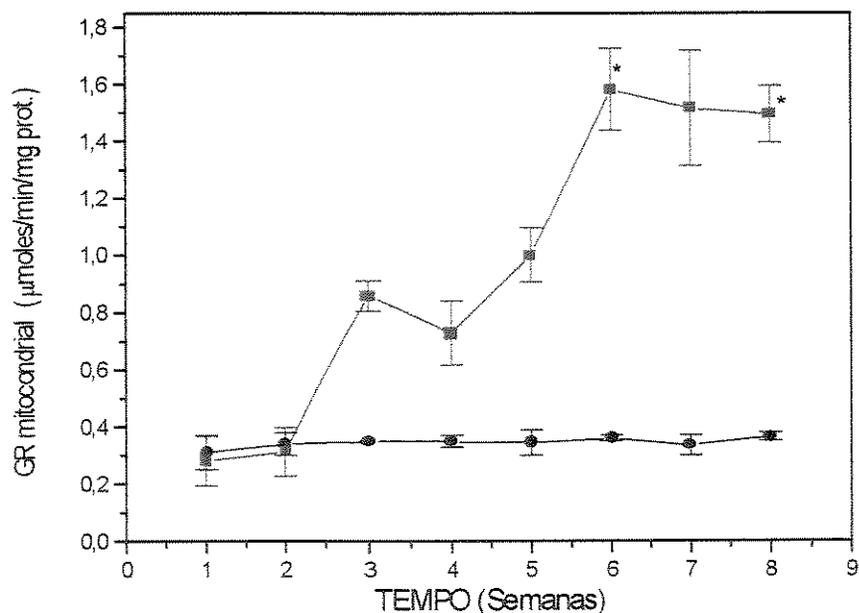


FIGURA 6: Atividade da glutatona redutase mitocondrial durante o período de treinamento. Ratos Treinados (—■—) e ratos controle sedentário (—●—). Resultados são média \pm DP (n=3). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Estes dados sugerem que as adaptações do sistema de defesa antioxidante ao nível sanguíneo e muscular também ocorrem paralelamente.

PARTE II

Nesta segunda parte de nossos resultados, apresentaremos os dados obtidos a partir de 2 diferentes tipos de protocolos de treinamento. Nesta etapa, dividimos os animais em três grupos distintos: O grupo sedentário controle (CO), outro grupo submetido a um treinamento de endurance (ET), e o grupo de animais submetidos a um treinamento intermitente (IT). Nosso objetivo neste momento era

comparar as adaptações induzidas pela utilização de diferentes vias metabólicas de produção de energia.

Os dados da concentração de lactato sanguíneo (Figura 7) mostram que nos dois protocolos (contínuo e intermitente) a intensidade máxima de esforço foi atingida na quarta semana. Tais dados mostram ainda que o treinamento intermitente, como esperado, foi realizado numa intensidade superior quando comparado ao contínuo, onde predominou o metabolismo oxidativo, pois os níveis de lactato sanguíneo estão indicando um trabalho predominantemente anaeróbio ao longo do treinamento intermitente.

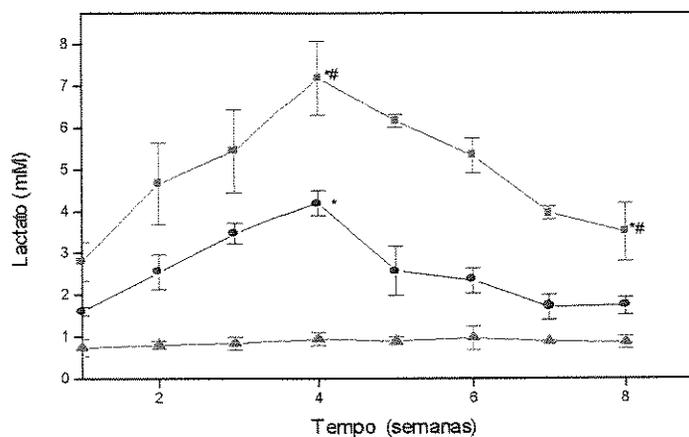


Figura 7: Concentração de lactato durante o período de treinamento. —■— grupo IT, —●— grupo ET e —▲— grupo CO. Resultados são médias \pm DP (n=8). *p < 0.05 comparado com CO; #p < 0.05 comparado com ET.

A Figura 8 evidencia que o treinamento contínuo se mostrou mais eficiente em aumentar a concentração de hemoglobina, principalmente nas primeiras 5 semanas de treinamento, quando a velocidade e duração do esforço foram progressivamente aumentadas. O protocolo de treinamento intermitente, embora tenha induzido um aumento pouco menor nas primeiras 4 semanas, ao final do treinamento apresentou um aumento significativo na concentração de hemoglobina (Figura 8) praticamente igual ao do treinamento contínuo. A resposta adaptativa dos níveis de 2,3 DPG como mostrada na Figura 9 se mostra semelhante aos da Hemoglobina, isto é, na 4ª semana o grupo ET apresentava níveis significativamente superiores aos do grupo IT que ao final do treinamento atingiram o mesmo patamar do outro grupo, que se manteve praticamente inalterado.

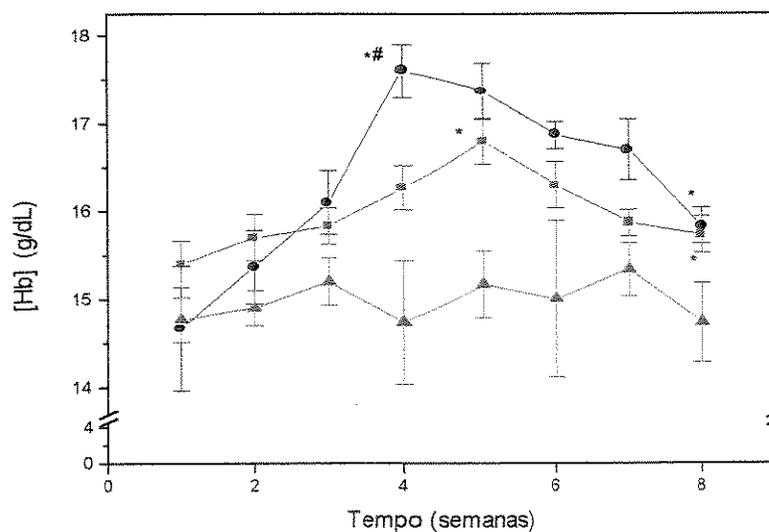


Figura 8: concentração de hemoglobina, durante o período de treinamento. —■— grupo IT, —●— grupo ET e —▲— grupo CO. Resultados são médias \pm DP (n=8). *p<0.05 comparado com CO, # p<0.05 comparado com IT.

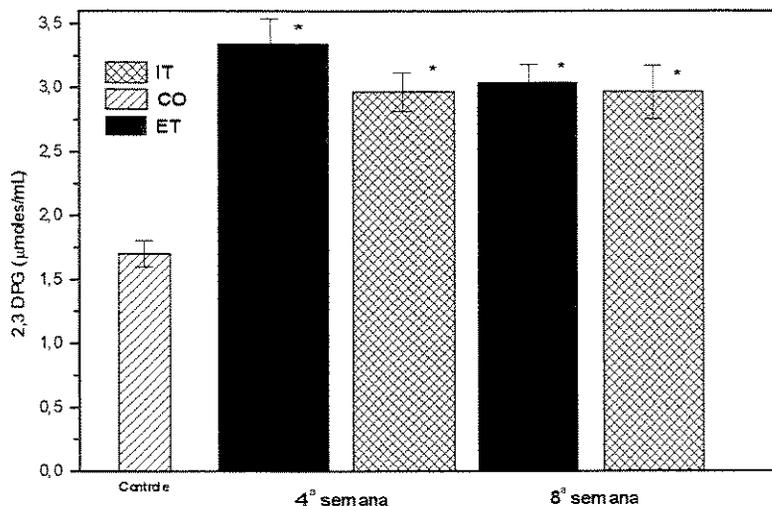


FIGURA 9: Concentração de 2,3 DPG nos grupos CO, ET e IT, na quarta e oitava semana de treinamento. Resultados são médias \pm DP (n=8).
*p<0.05 em relação ao grupo controle.

Quando analisamos a capacidade oxidativa muscular, podemos observar ao final das 8 semanas de treinamento um aumento significativamente maior na atividade da enzima citrato sintase no grupo IT quando comparada ao grupo ET, demonstrando uma eficiência maior do treinamento intermitente ao nível muscular localizado (Figura 10). Estes dados corroboram as observações na prática desportiva, de que o treinamento intermitente é mais eficiente para aumentar a potência aeróbia.

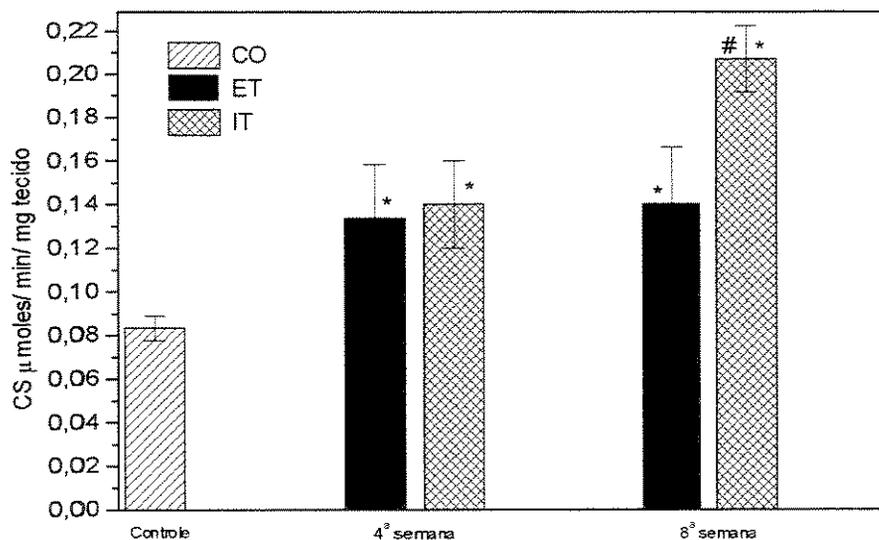


FIGURA 10: Atividade da Citrato Sintase nos grupos CO, ET e IT durante o período de treinamento. Resultados são média \pm DP (n=8). * $p < 0.05$ em relação ao controle e # $p < 0.05$ em relação a ET.

As figuras 11 e 12, mostram a capacidade do sistema enzimático de defesa antioxidante do músculo Sóleo e as Figuras 13 e 14 nas Hemáceas. Podemos observar que os dois treinamentos também induziram um comportamento distinto em relação à adaptação neste sistema, embora desta vez tenha ocorrido o inverso. Apesar de ambos aumentarem a atividade das enzimas glutathione redutase e catalase, ao seu final, o protocolo contínuo teve efeito maior na adaptação deste sistema, principalmente em relação à enzima glutathione redutase muscular. Ou seja, no músculo sóleo a atividade das enzimas do sistema antioxidante no grupo ET sempre permaneceu significativamente maior quando comparadas ao grupo IT (Figuras 11 e 12).

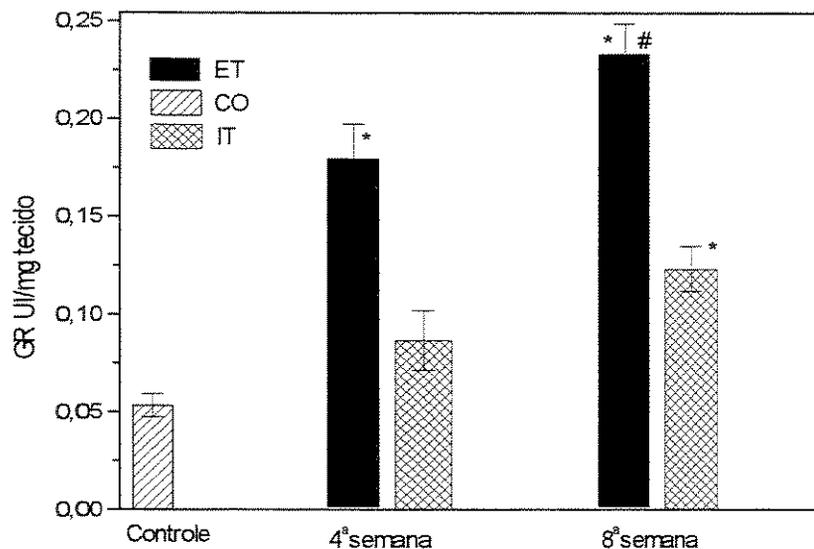


FIGURA 11: Atividade da Glutathione Redutase muscular dos grupos CO, ET e IT. Resultados são média \pm DP (n=8). *p<0,05 em relação ao controle e # p<0,05 em relação ao grupo IT.

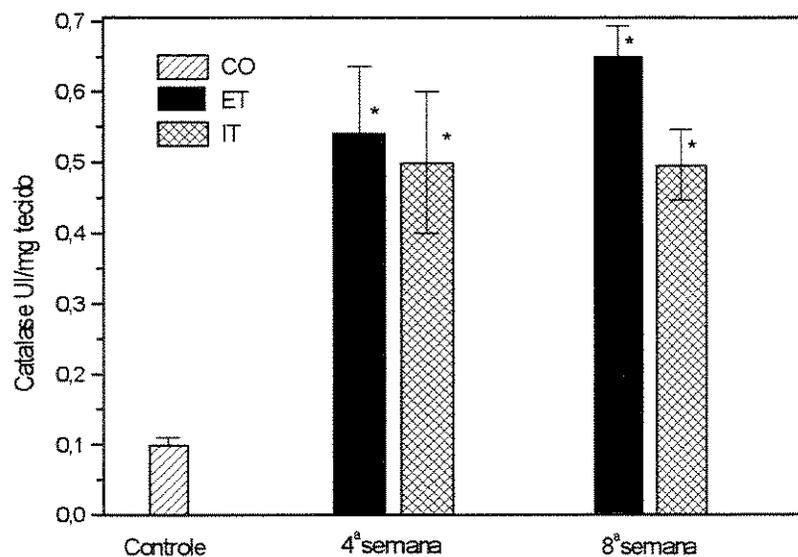


FIGURA 12: Atividade da Catalase muscular nos grupos CO, ET e IT. Resultados são média \pm DP (n=8). *p<0,05 em relação ao controle.

No sangue, no entanto, não observamos este mesmo comportamento (Figuras 13 e 14). A atividade destas enzimas, apesar de na quarta semana estarem significativamente maior no grupo ET, ao

final da oitava semana atingiram praticamente o mesmo nível, independentemente do tipo de treinamento.

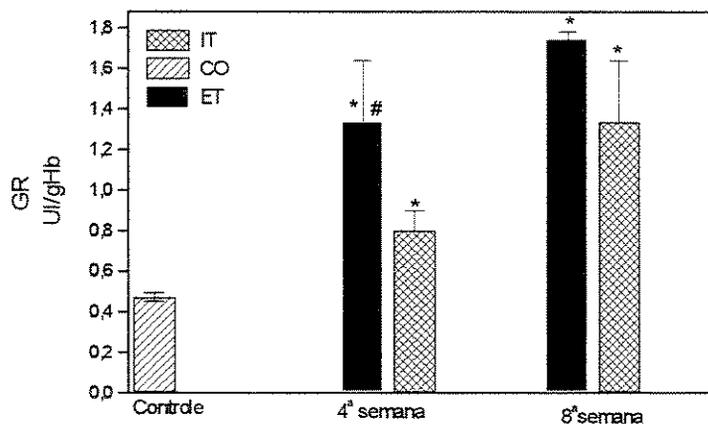


Figura 13. Atividade da Glutathione redutase sanguínea (GR) dos grupos controle (CO), treinamento de endurance (ET) e treinamento intermitente (IT) na 4ª e 8ª semana de treinamento. Resultados são médias \pm DP (n=8). * p < 0.05 comparado com controle; # p < 0.05 comparado ao grupo IT.

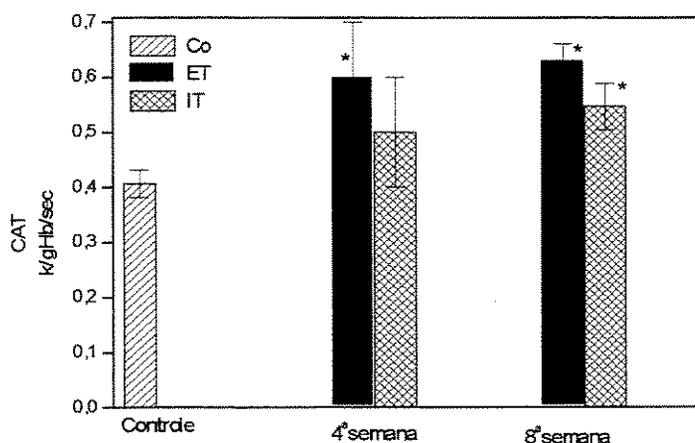


Figura 14: Atividade da Catalase sanguínea (CAT) nos grupos controle (CO), treinamento de endurance (ET) e treinamento intermitente (IT) na 4ª e 8ª semana de treinamento. Resultados são médias \pm DP (n=8). * p < 0.05 entre ET e CO.

Finalmente os dados dos níveis de lesão muscular induzidos pelos dois treinamentos e medidos através da atividade da CK sérica (Figura 15) nos mostram que o grupo IT principalmente até a quinta semana de treinamento, apresentou níveis superiores de lesão em relação ao grupo

ET, tendendo no entanto a diminuir com a manutenção da velocidade e duração do esforço, a praticamente os mesmos níveis dos grupos CO . De qualquer forma, esses resultados evidenciam um nível de lesão muscular maior provocado pelo treinamento mais intenso, principalmente quando este estava na fase de aumento progressivo da intensidade de trabalho. Isto nos permite especular que se a carga continuasse a ser aumentada, o exercício provavelmente causaria um dano muito maior e talvez irreversível.

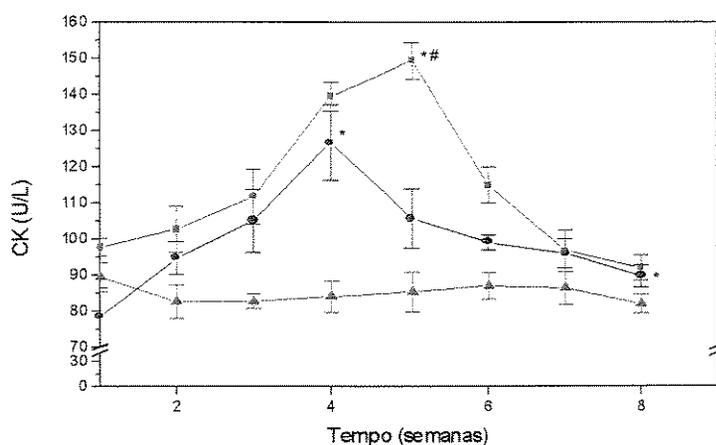


FIGURA 15 : Atividade da CK sérica durante o período de treinamento. —□— grupo IT, —●— grupo ET e —▲— grupo CO .Resultados são médias \pm DP (n=8). *p < 0.05 comparado com CO, #p < 0.05 comparado com ET.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na primeira fase de nosso trabalho, nos mostram que há uma correlação entre os marcadores do metabolismo oxidativo e sistema de defesa antioxidante no músculo e no sangue.

Vimos que todos os parâmetros do metabolismo oxidativo alcançaram seus respectivos picos na 4ª semana de treinamento, onde também foi máximo o esforço exigido dos animais no protocolo utilizado.

No que diz respeito ao sistema de defesa antioxidante, a atividade da enzima GR mitocondrial (Figura 6) atingiu seu pico máximo duas semanas após a sanguínea. É interessante notar que o aumento na atividade da GR mitocondrial se deu somente após uma melhora significativa na capacidade oxidativa mitocondrial, medida pela atividade da enzima SDH (Figura 4). Estes dados sugerem uma relação causa-efeito entre o aumento da capacidade oxidativa e o aumento do sistema de defesa antioxidante. Laughlin e colaboradores (1990) demonstraram também uma relação linear entre a atividade da SDH e da Glutathione Peroxidase. Ji e colaboradores (1990) propuseram que o aumento na produção de EROs, induzido pelo aumento na capacidade oxidativa seria responsável pela sinalização do aumento da atividade do sistema enzimático antioxidante.

Nossos resultados também deixam evidente a eficiente proteção antioxidante induzida por um treinamento de endurance nas mitocôndrias, haja visto o aumento de aproximadamente quatro vezes na atividade da GR em relação aos animais do grupo controle.

Embora vários autores tenham mostrado adaptações induzidas pelo treinamento físico ao nível sanguíneo e muscular (Ohno et al.,

1986; Alessio & Goldfarb, 1988; Duthie et al., 1990; Ji et al., 1992), em nossa revisão bibliográfica, não foi encontrado nenhum trabalho que tivesse um objetivo similar ao por nós proposto nesta parte do trabalho, isto é, analisar semanalmente parâmetros oxidativos e de defesa antioxidante nos dois sistemas a fim de traçar o perfil adaptativo dos mesmos e comparar se as adaptações ocorridas ao nível muscular era também observado nas hemáceas.

Uma vez que nossos resultados desta primeira fase indicaram um grau de correlação grande entre os parâmetros estudados, analisamos as adaptações induzidas pelo protocolo de treinamento intermitente e comparamos com as induzidas pelo treinamento contínuo.

Os resultados apresentados mostram que ao final de 8 semanas, ambos protocolos foram eficientes em induzir adaptações positivas em todos biomarcadores por nós estudados, tanto os oxidativos quanto os do sistema de defesa antioxidante. Em relação aos biomarcadores do metabolismo oxidativo, já é consenso que o treinamento de endurance induz aumento na concentração de hemoglobina (Eichner, 1986), 2,3 DPG (Di Bella, 1996) e na atividade das enzimas oxidativas do ciclo de Krebs e cadeia respiratória (Fitts et al, 1975). Por outro lado, apesar da literatura contar com um número reduzido de investigações acerca de protocolos de treinamento intermitentes, Dudley (1982) evidenciou uma relação positiva entre a intensidade do esforço e capacidade oxidativa mitocondrial analisando a atividade da Citocromo C Oxidase utilizando ratos como modelo experimental. Jacobs et al. (1987) e Duncan et al. (1998) demonstraram também em humanos que o treinamento intermitente é mais eficiente em aumentar a capacidade oxidativa do

músculo, a despeito dos resultados obtidos por Hickson et al. (1976) onde os autores não detectaram nenhuma alteração em enzimas tanto da via glicolítica quanto do ciclo de Krebs em protocolos de endurance e intermitente, muito provavelmente devido à ineficiência do estímulo empregado neste trabalho.

Embora a sinalização intracelular que desencadeia tais adaptações seja desconhecida e ainda alvo de estudos, acredita-se que a hipóxia tecidual seja um dos fatores que contribuam para esta sinalização (Booth & Thomason, 1990). Os resultados apresentados na Figura 10, referentes a atividade da enzima citrato sintase corroboram os dados destes autores pois a atividade da CS, ao final dos treinamentos estava significativamente maior no grupo IT quando comparado ao ET. Além disso os dados da concentração de lactato (Figura 7) confirmam uma situação de hipóxia mais intensa no grupo IT.

Por sua vez no que diz respeito à capacidade antioxidante muscular, os dois protocolos induziram aumentos de forma diferenciada na atividade das enzimas estudadas, apresentando uma tendência em apresentar atividades maiores no grupo ET quando comparadas ao grupo IT, especificamente a GR muscular no grupo ET apresentou atividade estatisticamente maior quando comparada ao grupo IT (Figuras 11 e 12). Em estudo similar ao nosso, Criswell et al. (1993) utilizando um protocolo de treinamento intenso, obtiveram resultados muito próximos aos por nós obtidos, embora mensurando a atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase. Os dados obtidos com o grupo ET são consistentes com dados da literatura, que mostram aumento na atividade das enzimas antioxidantes em resposta a

estímulos crônicos de protocolos de treinamento físico de endurance tanto em ratos quanto em humanos (Sen et al.1995; Dekkers et al., 1996). Somani & Husain (1996) demonstraram um aumento na afinidade pelos substratos das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathiona peroxidase/reductase e catalase através da diminuição no valor da Km, bem como um aumento na Vmax destas enzimas em vários tecidos, dentre eles o tecido muscular, evidenciando aumento na expressão destas enzimas após treinamento de endurance.

Durante o exercício de longa duração há uma queda na razão glutathiona reduzida (GSH)/glutathiona oxidada (GSSG), que não é restrita somente às fibras musculares, mas também se dá no fígado e no sangue sendo que em aproximadamente 96 horas após o término do esforço a concentração de GSH é maior em relação à concentração pré existente, o que sugere uma ativação da enzima glutathiona reductase durante este período (Gohill et al, 1988; Sen et al., 1992 e Tessier et al., 1995).

O fator que nos levou a acrescentar o protocolo de treinamento intermitente, além da pequena atenção dispensada a este tipo de treinamento, foi a proposta de Ji et al. (1990), que uma formação aumentada de radicais livres seria um estímulo para o aumento na atividade das enzimas antioxidantes o que teoricamente sugere que atividades mais intensas, executadas por um protocolo de exercício intermitente, induziriam aumentos maiores na atividade das enzimas antioxidantes quando comparados a um treinamento de endurance. Dados obtidos por Alessio et al. (1988) mostram um índice maior de peroxidação lipídica após esforços mais intensos.

Tal hipótese entretanto não foi confirmada por nossos resultados, pois apesar das atividades das enzimas do sistema de defesa antioxidante no grupo IT estarem significativamente maiores em relação ao grupo de animais controle, quando comparadas ao grupo ET eram significativamente menores, principalmente a atividade da enzima glutathiona redutase. Um estudo feito por Powers e colaboradores (1994) apresentou resultados semelhantes aos por nós obtidos. Embora estudando a atividade da enzima glutathiona peroxidase, demonstraram que o aumento da atividade desta enzima em músculo predominantemente oxidativo (característica do músculo Sóleo, que foi utilizado em nosso estudo), estava relacionado principalmente à duração do exercício e era relativamente independente da intensidade empregada. O treinamento intermitente mimetiza uma situação de Anóxia-Reperfusão nas células musculares, condição conhecida em aumentar muito a produção de EROs (Sjödín et al., 1990). Nossos resultados sugerem que o aumento na atividade das enzimas glutathiona redutase e catalase está ligado ao tempo de duração de esforço, isto é o tempo de exposição da célula como um todo a uma concentração aumentada de radicais livres, como parece ser o caso do exercício de endurance mas também com a quantidade total de radicais livres formados durante o esforço.

Ao nível de sistema enzimático de defesa sanguíneo o efeito diferenciado dos dois treinamentos ficou menos evidente. Entretanto embora sem diferença significativa os resultados do grupo IT tendem sempre a ser menores que os do ET. Vários trabalhos vem mostrando que a atividade de tais enzimas sofrem aumento após treinamento de

endurance também nas hemáceas (Brady et al. 1977; 1979). Pelo fato de se tratar de uma célula anucleada não existem dados conclusivos na literatura que permitam especular qual a possível sinalização para este aumento.

Pudemos também verificar através do gráfico de atividade da CK sérica que durante a fase I do treinamento, o protocolo intermitente induziu níveis de lesão muscular muito maiores que os do treinamento de endurance. Estes resultados estão em concordância com dados encontrados na literatura (Clarkson & Tremblay, 1988). Outros trabalhos também mostram que atividades mais intensas induzem níveis de lesão mais elevados, principalmente as que envolvem contrações do tipo excêntrica (Newhan et al, 1983 e 1986). Segundo Pyne (1994), os prováveis desencadeadores de lesão muscular são o estresse metabólico e o estresse mecânico. Assim o estresse oxidativo seria um dos fatores desencadeadores de lesões musculares, principalmente devido à peroxidação dos lipídeos da membrana celular. Nesse sentido, Alessio et al (1988) reportaram uma proporcionalidade entre a concentração de malonaldeído muscular e a intensidade do esforço executado. Esta interpretação é reforçada quando observamos que durante a fase II do treinamento, com a manutenção da carga e duração do esforço a atividade da CK sérica voltou praticamente aos mesmos níveis para os três grupos, CO, ET e IT e a atividade das enzimas antioxidantes já se encontravam altas. Esta questão de lesão muscular é melhor entendida quando analisamos também os resultados de peroxidação lipídica (Figura 16), obtidos por outros componentes de nosso grupo de pesquisa (Anexo I)

Pode-se notar, comparando os nossos resultados da atividade da CK (Figura 15) com os apresentados no anexo I, que durante a primeira fase dos dois protocolos de treinamento empregados, onde houve um aumento progressivo na velocidade e duração do exercício, houve também um aumento significativo na concentração de TBARs na urina de ambos os grupos, principalmente para o grupo IT. Isto indica claramente a instalação de um nível de estresse oxidativo maior nesta fase enquanto que na segunda fase do treinamento, com a estabilização da intensidade, os níveis de TBARs retornaram próximos aos do grupo controle. Outra correlação interessante que pudemos notar foi entre os resultados de CK sérica (Figura 15) e os de [TBARs] (Anexo I) sendo os perfis das curvas muito próximos, isto é, enquanto a intensidade de esforço foi aumentada os níveis de ambos foram aumentando, ao passo que uma vez a velocidade e duração do esforço mantidos, a tendência foi voltar aos níveis basais. Frankiewicz-Jozko et al. (1996) mostraram uma correlação positiva entre a concentração de TBARs no músculo Sóleo e a atividade da enzima CK sérica. No nosso caso estamos mostrando uma correlação também positiva entre a concentração de TBARs na urina e a atividade da CK sérica.

Desta forma, os dados aqui apresentados estão em acordo com o que a literatura vem mostrando, isto é, uma relação entre a intensidade do esforço e os níveis de EROs (Davies et al. 1982; Alessio, et al., 1988).

Por outro lado, nossos dados mostram claramente um maior nível de lesão muscular no grupo de animais IT que possivelmente seria resultado de um sistema de defesa contra as EROs menos eficiente (Figuras 12,13). Ji et al. (1998) detectaram queda na atividade

enzimática de várias vias metabólicas e também um aumento na proteólise após um exercício exaustivo. Segundo os autores, esta queda foi resultado da oxidação de grupos tiólicos importantes para a atividade destas enzimas, provavelmente pelo aumento na concentração de EROs ocasionado pelo esforço excessivo. Da mesma forma, Zhang et al (1990) relataram inativação das enzimas componentes da cadeia de transporte de elétrons, inclusive da ATP sintetase, quando expostas a altas concentrações de $O_2^{\cdot -}$ e OH. Utilizando um protocolo de exercício de alta intensidade, Gollnick et al, (1990) reportaram uma queda no controle respiratório em mitocôndrias isoladas e um aumento na concentração de IMP, um produto intermediário da via de degradação do AMP, onde há formação de EROs principalmente na reação catalisada pela enzima xantina oxidase, que utiliza o oxigênio como acceptor de elétrons (Sjodin et al., 1990).

Em estudo analisando o efeito do H_2O_2 , Brotto & Nosek (1996) mostraram que este composto prejudicava o processo de contração muscular por impedir a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, provavelmente pela inativação de alguma proteína que age no processo de excitação-contração, como, por exemplo, a calmodulina e ou a calsequestrina.

Assim, embora exista proposta de alguns autores que os radicais livres também desempenham uma função importante na sinalização das adaptações, aparentemente é necessário que sejam mantidos em níveis aceitáveis, para que possam exercer a função de segundo mensageiro celular (Ji et al, 1990). No caso de estímulos constantes acima dos limites suportados pelo sistema de defesa antioxidante, sem uma recuperação

ideal, a alta concentração de radicais livres fatalmente levaria a célula a um desbalanço metabólico, inibindo a geração de ATP e iniciando um processo de “overreaching”, podendo levar a instauração do “overtraining” (Kuipers, 1998).

Segundo Alessio e colaboradores (1988), o aumento na formação de EROs em relação à intensidade se dá pelo fato de atividades mais intensas recrutarem fibras mais glicolíticas que possuem capacidade antioxidante mais baixa em relação às fibras oxidativas.

Nossos dados, embora não neguem um componente mecânico no aumento detectado na atividade da CK sérica sugerem que o estresse metabólico, induzido por níveis mais altos de estresse oxidativo seria o principal responsável pelos níveis de lesão muscular aumentados observados na fase I de ambos os treinamentos.

Concluindo, os dados apresentados nesta tese são relevantes no sentido de mostrarem que as adaptações induzidas no músculo Sóleo pelo treinamento são praticamente os mesmos observados nas hemáceas, o que permite a utilização de biomarcadores sanguíneos para diagnóstico do efeito do treinamento em atletas. Além disso, mostramos também que o treinamento intermitente é mais eficiente em aumentar a capacidade oxidativa muscular que o treinamento de endurance e de forma contrária, o treinamento de endurance é mais eficiente em induzir aumento na capacidade do sistema de defesa antioxidante, o que também permite a melhor utilização destes 2 métodos de treinamento dentro de uma periodização de treinamento em atletas.

REFERÊNCIAS

- Aebi,H. (1984) Catalase *Meth. Enzymol.* 105 : 121-126.
- Alessio, H. M.; Goldfarb, A. H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J.Appl. Physiol.* 64: 1333-1336.
- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induce oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 218-224.
- Alessio, H.M., Goldfarb, A.H. and Cutler, R.G. (1988) MDA content increases in fast and slow twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am. J. Physiol.* 255:C874-C877.
- Andersen, H.R., Nielsen, J.B., Nielsen, F. and Grandjean, P. (1997) Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 43: 562-568.
- Apple,F.S., Hellsten,Y. and Clarkson,P.M. (1988) Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. *Clin. Chem.* 32: 41-44.
- Astrand,P.-O. & Rodahl, K. (1986) Textbook of work physiology. New York: McGraw Hill.
- Beckman, J.S., Beckman, T. e Freeman, B. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxyntirite: Implications for endotelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1620-1624.
- Berne,R.M. & Levy,M.N. (1990) Fisiologia. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

- Beutler, E. (1975) *Red Cell Metabolism* In: A manual of biochemical methods, 2^a ed., Grune & Stratton publishers, London.
- Bhattacharya, S.K., Thakar, I.H., Johnson, P.L. and Shanklin, D.R. (1991) Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamsters using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic and naganase. *Anal. Biochem.* 192:344-349.
- Bigland-Ritchie, B., Jones, D.A., Hosking, G.P., and Edwards, R.H.T. (1978) Central and peripheral fatigue in maximum voluntary contraction of human quadriceps muscle *Clin. Sci. Mol. Med.* 54: 604-614.
- Boobis, L.H., Willians, C., Wooton, S.A. (1982) Human muscle metabolism during brief maximal exercise. *J. Physiol. Lond.* 338: 21P-22P (Abstract).
- Booth, F.W. & Thomason, D.B. (1991) Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. *Physiol. Rev.* 71: 541-585.
- Brady, P.S., Brady, L.J. and Ullrey, D.E. (1979) Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J. Nutr.* 109: 1103-1109.
- Brady, P.S., Shelle, J.E. and Ullrey, E. (1977) Rapid changes in equine erythrocyte glutathione reductase with exercise. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1045-1047.
- Brotto, M.A.P. & Nosek, T.M. (1996) Hydrogen peroxide disrupts Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibres. *J. Appl. Physiol.* 81: 731-737.

- Chance, B., Leigh, J.S., Jr., B.J., Clark, J., Maris, J., Kent, J., Nioka, S. and Smith, D. (1985) Control of oxidative metabolism and oxygen delivery in human skeletal muscle: A steady state analysis of work/energy cost transfer function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8384-8388.
- Chaouloff, F., (1989) Physical exercise and Brain monoamines: A review. *Acta Physiol. Scand.* 137: 1-13.
- Clarkson, P.M. and Tremblay, I. (1988) Exercise-Induced muscle damage, repair and adaptations in humans. *J. Appl. Physiol.* 65:1-6.
- Clarkson, P.M., Nosaka, K. and Braun, B. (1992) Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc.* 24: 512-520.
- Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K. and Grinton, S. (1993) High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 1135-1140.
- Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brook, G.A. and Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.
- Davis, J.M., (1996) Nutritional influences on central mechanisms of fatigue involving serotonin In: *Biochemistry of Exercise IX* . R.J. Maughan and S.M. Shirreffs (Eds.) Champaign, IL: Human Kinetics, 445-456.
- De Maria, A.N., Neuman, A., Lee, G., Fowler, W. and Mason, D.T. (1978) Alterations in ventricular mass and performance induced by exercise

- training in man evaluated by echocardiography. *Circulation* 57: 237-244.
- Dean, R.T. (1987) A mechanism for accelerated degradation of intracellular proteins after limited damage by free radicals. *FEBS Lett.* 220: 278-282.
- Dekkers, J.C., Van Doornen, L.J.P. and Kemper, H.C.G. (1996) The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 21: 213-238.
- Denadai, B.S. (1995) Limiar anaeróbico: Considerações fisiológicas e metodológicas. *Revista Brasileira de atividade física e saúde* 1: 74-88.
- Di Bella, G., Scandariato, G., Suriano, O., Rizzo, A. (1996) Oxygen affinity and Bohr effect responses to 2,3 diphosphoglycerate in equine and human blood. *Res. Vet. Sci.* 60: 272-275.
- Dudley, G.A., Abraham, W.M. and Terjung, R.L. (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53: 844-850.
- Duncan McDougall, J., Hicks, A.L., McDonald, J.R., McKelvie, R.S., Green, H.J. and Smith, K.M. (1998) Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. *J. Appl. Physiol.* 84: 2138-2142.
- Duthie, G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J. and Morrice, P.C. (1990) Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 78-83.

- Edström, L. & Grimby, L. Effect of exercise on the motor unit (1986) *Muscle & Nerve* 9: 104-126.
- Ehsani, A.A., Hagberg, J.M. and Hickson, R.C. (1978) Rapid changes in left ventricular dimensions and mass in response to physical conditioning and deconditioning. *Am. J. Cardiol.* 42: 52-56.
- Eichner, E.R. (1986) The anemias of athletes. *Phys. Sportsmed.* 14: 122-130.
- Eklom, B. & Hermansen, L. (1968) Cardiac output in athletes. *J. Appl. Physiol.* 25: 619-625.
- Essig, D.A and Nosek, T.M. (1997). Muscle Fatigue and Induction of Stress Proteon Genes: A dual Function of Reactive Oxygen Species. *Can. J. Appl. Physiol.* 22: 409-428.
- Fell, J.W., Rayfield, J.M. Gulbin, J.P., Gaffney, P.T. (1998) Evaluation of the Accusport® Lactate analyser. *Int. J. Sports Med.* 19: 199-204.
- Fiske, C.H. & Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375 .
- Fitts, R.H., Booth, F.W., Winder, W.W. and Holloszy, J.O. (1975) Skeletal muscle respiratory capacity, endurance and glycogen utilization. *Am. J. Physiol.* 228: 1029-1033.
- Frankiewicz-Jozko, A., Faff, J., Sieradzan-Gabelska, B. (1996) Changes in concentration of tissues free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74: 470-474.

- Frick, M., Elovainio, R. and Somer, T. (1967) The mechanism of bradycardia evoked by physical training. *Cardiologia* 51: 46-54.
- Friden, J., Kjorell, U. and Thornell, L.E. (1984) Delayed muscle soreness and cytoskeletal alterations. An immunocytological study in man. *Int. J. Sports Med.* 5: 15-18.
- Friden, J., Sjostrom, M. and Ekblom, B. (1983) Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int. J. Sports Med.* 4: 170-176.
- Gohil, K. Viguie, C., Stanley, W.C., Brooks, G.A. and Packer, L. (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J. Appl. Physiol.* 64: 115-119.
- Gollnick, P.D., Bertocci, L.A., Kelso, T.B., Witt, E.H. and Hodgson, D.R. (1990) The effect of high-intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 415: 407-413.
- Gornall, A.G., Bardawill, G.J. and Daid, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-757.
- Green, H.J., Sutton, J.R., Coates, G., Ali, M. and Jones, S. (1991) Response of red cell and plasma volume to prolonged training in humans. *J. Appl. Physiol.* 70: 1810-1815.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.
- Henriksson, J., Chi, M.M.Y., Hintz, C.S., Young, D.A., Kenneth, K.K., Salmons, S. and Lowry, O.H. (1986) Chronic stimulations of mammalian muscle:

- Changes in enzymes of six metabolic pathways. *Am. J. Physiol.* 251 (Cell Physiol.): C614-C632.
- Hernando, R. e Manso, R. (1997) Muscle fiber stress in response to exercise. *Eur. J. Biochem.* 243, 460-467.
- Hess, M.L. e Manson, N.H. (1984) Molecular oxygen: Friend and foe. The role of oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16: 969-985 .
- Hickson, R.C., Heusner, W.W. and Van Huss, W.D. (1975) Skeletal muscle enzyme alterations after sprint and endurance training. *J. Appl. Physiol.* 40: 868-872.
- Holloszy, J.O. (1967) Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242: 2278-2282.
- Hultman, E. & Sjoholm, H. (1986) Biochemical causes of fatigue. In: *Human muscle power*, N.L. Jones, N.M. Courtney and A.J. Mc Comas (Eds.). Champaign, IL: Human Kinetics, 215-235.
- Hultman, E. & Sjoholm, H. (1983) Energy metabolism and contraction force of human skeletal muscle *in situ* during electrical stimulation. *J. Physiol. Lond.* 345: 525-532.
- Jacobs, I., Esbjörnsson, M., Sylvén, C., Holm, I. and Jansson, E. (1987) Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fibres types and blood lactate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 19: 368-374.
- Jacobs, I., Tesch, P., Bar-Or, O., Karlsson, J., Dotan, R. (1983) Lactate in human skeletal muscle after 10 and 30 s of supramaximal exercise. *J. Appl. Physiol.* 55: 365-367.

- Jenkins, R.R. (1988). Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Med.* 5: 156-170.
- Jenkins, R.R. and Goldfarb, A. (1993) Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 210-212.
- Ji, L.L., Dillon, D. and Wu, E. (1990) Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 258: R918-R923.
- Ji, L.L. (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 225-231.
- Ji, L.L., Stratman, F.W. and Lardy, H.A. (1988) Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 137-149.
- Jones, N.L., McCartney, N., Graham, T., Spriet, L.L., Kowalchuk, J.M., Heigenhauser, G.J.F., Sutton, J.R. (1985) Muscle performance and metabolism in maximal isokinetic cycling at slow and fast speeds. *J. Appl. Physiol.* 59: 132-136.
- Kirkendall, D.T. (1990) Mechanisms of peripheral fatigue *Med. Sci. Sports Exerc.* 22: 444-449.
- Kjellberg, S., Rudhe, U. and Sjostrand, T. (1949) Increase of the amount of hemoglobin and blood volume in connection with physical training. *Acta Physiol. Scand.* 19: 136-145.
- Kuipers, H. (1998) Training and overtraining: an introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30: 1137-1139 .

- Lafond, J.L. and Paure, P. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: *Analysis of free radicals in Biological Systems* (Favier et al. eds.) Berlin.
- Lash, J.M. & Bohlen, G. (1992) Functional adaptations of rat skeletal muscle arterioles to aerobic exercise training. *J. Appl. Physiol.* 72: 2052-2062.
- Laughlin, M.H., Simpson, T., Sexton, W.L., Brown, O.R., Smith, J.K. and Korthuis, R.J. (1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 68: 2337-2343.
- Maltin, C.A., Delday, M.I., Baillie, A.G.S., Grubb, D.A. and Garlick, P.J. (1989) Fiber-type composition of nine rat muscles I. Changes during the first year of life. *Am. J. Physiol.* 257:E823-E827.
- Margaria, R., Cerreteli, P., Mangili, E. (1964) Balance and kinetics of anaerobic energy release during strenuous exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 19: 623-628.
- Margaria, R., Oliva, D., Di Prampero, P.E., Cerreteli, P. (1969) Energy utilization in intermittent exercise of supramaximal intensity. *J. Appl. Physiol.* 26: 752-756.
- Margaritis, I., Tessier, F., Richard, M. J. and Marconnet, P. (1997) No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int. J. Sports Med.* 18(3): 186-190.
- Mitchel, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 191: 144-148.

- Morganroth,J., Maron,B., Henry,W., Epstein,S. (1975) Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann. Intern. Med.* 82: 521-524.
- Nevill,M.E., Boobis,L.H., Brooks,S., Williams,C. (1989) Effect of training on muscle metabolism during treadmill sprinting. *J. Appl. Physiol.* 67: 2376-2382.
- Newhan, D.J., Jones, D.A., Edwards, R.H.T. (1986) Plasma creatine kinase changes after eccentric and concentric contractions. *Muscle & Nerve* 9: 59-63.
- Newhan, D.J., Mills, K.R., Quigley, B.M., Edwards, R.H.T. (1983) Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. *Clin. Sci.* 64: 55-62.
- Nosaka,K. & Clarkson,P.M. (1995) Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med.Sci. Sports Exerc.* 27: 1263-1269.
- Nutter,D., Gilbert,C., Heymsfield,S., Perkins,J. and Schlant,R. (1975) Cardiac hypertrophy in the endurance athlete. *Physiologist.* 18: 336.
- Ohno,H.,Yamashita,K.,Sato,Y.,Doi, R., Arai, K. Kondo, T. and Taniguchi,N. (1985) The effect of brief physical exercise on free radical scavenging enzyme systems in human blood cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64: 1263-1265.
- Oscari,L., Willians,B. and Hertig,B. (1968) Effect of exercise on blood volume. *J. Appl. Physiol.* 24: 622-624.
- Packer, L. (1997) Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J. Sports Sci.* 15: 353-363.

- Pette, D. and Vrbová (1992). Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.* 120: 115-202.
- Pizza, F.X., Mitchell, J.B., Davis, B.H., Starling, R.D., Holtz, R.W. and Bigelow, N. (1995) Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 363-370.
- Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A. and Dudley, G. (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266: R375-R380.
- Pyne, D.B. (1994) Exercise-induced muscle damage and inflammation: A review. *Australian J. Sci. Med. Sports*, R6(3/4):49-58.
- Reid, M.B. (1996) Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol. Sci.* 11: 114-119.
- Rose, Z.B. & Liebowitz, J. (1970) Direct determination of 2,3 diphosphoglycerate. *Anal. Biochem.* 35: 177-180.
- Ryter, S.W., Pacifici, R.E. and Davies, K.J.A. (1990) Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress. In: Biological Oxidation systems, pp. 929-952. New York: Academic Press.
- Saltin, B., Gollnick, P.D., Eriksson, B.-O., Piehl, K. (1971) Metabolic and circulatory adjustments at onset of maximal work. In: Gilbert, A., Guille, P., eds. *Onset of Exercise*. Toulouse: University of Toulouse Press: 63-76.
- Sen, C.K. (1995) Oxidants and antioxidant in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79: 675-686.

- Sen, C.K., Marin, E., Kretzschmar, M. and Hänninen, O. (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 73: 1265-1272.
- Sigvardsson, K., Svanfeldt, E. and Kilbom, A. (1977) Role of the adrenergic nervous system development of training-induced bradycardia. *Acta Physiol. Scand.* 101: 481-488.
- Sjodin, B., Wesling, H. e Apple, S. (1990) Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 10:236-254.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L. and Thorne, C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.
- Snoeckx, L.H.E.H., Abeling, H.F.M., Lanbreghts, J.A.C., Smitz, J.J.F., Verstappen, F.T.J. and Reneman, R.S. (1982) Echocardiographic dimensions in athletes relative to their training programs. *Med. Sci. Sports Exerc.* 14: 428-434.
- Snyder, A. C. and Foster, C. (1994) Physiology and nutrition for skating. In: *Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine*, D.R. Lamb, H.G. Knuttgen and R. Murray (Eds.) Carmel, IN, Cooper Publishing Group, 25-114.
- Somani, S.M., Husain, K. (1996) Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38: 587-595.

- Spriet, L.L. (1995) Anaerobic metabolism during high-intensity exercise
IN: Hargreaves, M., ed. *Exercise Metabolism* 1^a ed. Human Kinetics: 1-40.
- Srere, P. A. (1969) Citrate Synthase. *Meth. Enzymol.* 13: 3-5.
- Terzi, R.G.G. (1992) Equilíbrio ácido-básico e transporte de oxigênio 1^a ed.
São Paulo: Manole.
- Tessier, F., Margaritis, I., Richard, M.J., Moynot, C. and Marconnet, P.
Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: 390-396, 1995.
- Thomason, D.B., Baldwin, K.M. and Herrick, R.E. (1986). Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 60: 1923-1931.
- Travacio, M. & Llesuy, S. (1996) Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 48(1/2): 9-13.
- Veeger, C., Der Vartanian, D. V. and Zeylemaker, W. P. (1969) Succinate Dehydrogenase. *Meth. Enzymol.* 13: 81-90.
- Venditti, P. and Di Meo, S. (1997) Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int. J. Sports Med.* 18: 497-502,.
- Viru, A. (1984) The mechanism of training effects: A hypothesis. *Int. J. Sports Med.* 5: 219-227.
- Volfinger, L., Lassourd, V., Michaux, J.M., Braun, J.P. and Tourtain, P.L. (1994) Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by

calculation of amount of creatine kinase released. *Am. J. Physiol.* 266(35):R434-R441.

Weineck, J.(1989) Manual do treinamento esportivo. São Paulo: ed. Manole, 2^a ed.

Winder, W.W., Hagberg,J.M., Hickson,R.C., Ehsani,A.A. and McLane,J.A. (1978) Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *J. Appl. Physiol.* 45: 370-374.

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

ANEXO I

Neste anexo apresentaremos os dados de peroxidação lipídica, obtido por outro componente de nosso grupo de pesquisa, para traçar um espectro maior das adaptações e danos induzidos pelos dois diferentes tipos de treinamento.

A figura 16 nos mostra os resultados de peroxidação lipídica analisada na urina durante o período de treinamento nos grupos CO, ET e IT, podemos notar que o perfil deste gráfico é muito semelhante ao por nós obtidos em relação à atividade da CK sérica, utilizada como marcador de lesão muscular. Notamos que o grupo IT de forma geral apresentou índices de peroxidação lipídica maiores em relação ao grupo ET, atingindo seus picos máximos na 3ª semana nos grupos ET e IT. Estes resultados foram obtidos pôr Armindo Antônio Alves (Tese deDoutorado).

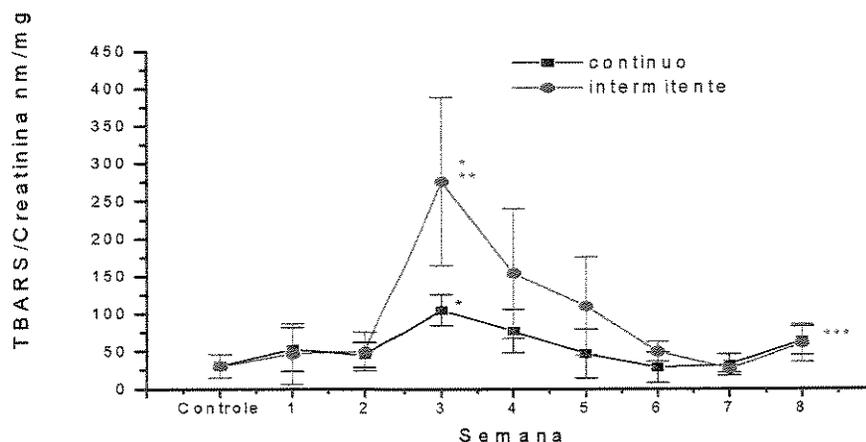


FIGURA 16: Concentração de TBARs em urina durante o período de treinamento. Resultados são média \pm DP (n=8). * $p < 0.05$ em relação ao controle, ** $p < 0.05$ em relação ao grupo contínuo e *** $p < 0.05$ em relação a 4ª semana.

-----ANEXO II

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS:

Zoppi,C.C., Pereira-da-Silva,L. e Macedo,D.V. (1997) "Exercise induced adaptation of oxidative metabolism and antioxidant enzymes" 44th Annual meeting of the American College of Sports Medicine (ACSM), Denver, Colorado, USA.

Gondim,F.,Zoppi,C.C., Macedo,D.V. (1998) "Determination of the aerobic\anaerobic threshold in equines using the LMS (Lactate minimum speed) protocol." CESMAS, Cordoba, Spain.

Zoppi, C.C., Silveira, L.R., Alves,A.A, Pereira-da-Silva, L and Macedo, D.V.(1998) " Analysis of oxidative stress biomarkers during competition" 45th Annual meeting of the American College of Sports Medicine (ACSM), Orlando, USA.

Alves, A.A., Zoppi, C.C.,Galvez, M.I., Pereira-da-Silva,L. and Macedo, D.V. (1998) " Metabolic versus mechanical stress in muscle tissue injury"45th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (ACSM), Orlando, USA.

Silveira,L.R., Zoppi,C.C., Leitão, R., Braghini,R. e Macedo, D.V. (1998) "Cinética de remoção do lactato e sua correlação com o limiar anaeróbico em fundistas e fisiculturistas" XXI Simpósio Internacional de Ciências do Esporte (CELAFISCS), São Paulo, Brasil.

Zoppi, C.C., Silveira, L.R., Alves, A.A., Macedo, D.V. (1999) "Blood Antioxidant enzymes adaptations and oxidative stress biomarkers status during endurance and intermittent training" 46th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (ACSM), Seattle, USA.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS NACIONAIS

A .A .Alves, T.P.Rigoletto, A .M. Molnar, A .B. Arthur, C.C. Zoppi, P.E.S. Paterniani, D.V. Macedo, L. Pereira-da Silva.(1994) "A suitable procedure to get mitochondria for undergraduate practical courses". XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú MG.

Arthur,A .B., Molnar,A .M., Zoppi,C.C., Pereira-da-Silva,L.,Macedo,D.V. (1995) "A influência dos tipos de exercício físico no grau de peroxidação lipídica". X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Serra Negra SP.

Zoppi,C.C., Campos, G.E.R., Macedo,D.V. (1996) “Fibras musculares divididas (SPLITTING) em ratos submetidos a treinamento de endurance”. XI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambú MG.

Zoppi,C.C., Molnar,A .M.,Stoppa,G., Barros,B.F., Torsoni, M.A ., Macedo, D.V. (1996) “Adaptação de enzimas oxidantes e antioxidantes induzida por exercício físico”. XI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambú MG.

Zoppi,C.C., Pereira-da-Silva,L. e Macedo,D.V.(1997) “Relação entre a intensidade do esforço e as adaptações do metabolismo oxidativo e enzimas antioxidantes” XII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambú MG.

ATIVIDADES DIDÁTICAS

Monitor da disciplina BB 110 (Bioquímica básica para Educação física da UNICAMP),1994, 1996,1997 e 1998.

Professor da disciplina BD 890 (Tópicos em biologia IV, Bioquímica do exercício), 1997. Disciplina eletiva para alunos de graduação da UNICAMP.

ATIVIDADES EM COLABORAÇÃO

Marcus Bustamante Smolka, Tese de mestrado “EFEITO DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA NA QUANTIDADE DE HSP72 DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO”.