

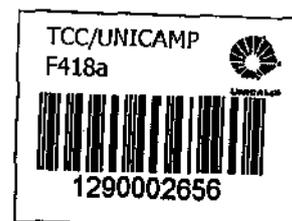
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

DANILO LOPES FERRUCCI

**ANÁLISE DE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS , BIOQUÍMICOS E
INFLAMATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS
A UM PROTOCOLO DE EXERCÍCIO
EXAUSTIVO AGUDO**

Campinas
2005

DANILO LOPES FERRUCCI



**ANÁLISE DE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
INFLAMATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS A
UM PROTOCOLO DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO
AGUDO**

Monografia apresentada à Graduação da Faculdade de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título Professor em Educação Física.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Oliveira Catanho da Silva'.

Orientador: Fernando Oliveira Catanho da Silva

Campinas
2005

UNIDADE FEF/1081
C. HEMATO:
TCC/Unicamp
F418a
V. Ex.
TOMBO BC/ 2656
PROC.
PRFCC 11,00
DATA 24/12/05
N.º CPD 324326
200600578

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA
BIBLIOTECA FEF - UNICAMP**

F418a Ferrucci, Danilo Lopes.
Análise de parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios em ratos submetidos a um protocolo de exercício exaustivo agudo / Danilo Lopes Ferrucci. - Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Fernando Oliveira Catanho da Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas.

1. Exercício físico. 2. Biomarcadores. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação. I. Silva, Fernando Oliveira Catanho da. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física. III. Título.

DANILO LOPES FERRUCCI

**ANÁLISE DE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
IMFLAMATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS A
UM PROTOCOLO DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO
AGUDO.**

Este exemplar corresponde à redação final da Monografia defendida por Danilo Lopes Ferrucci e _____ pela Comissão julgadora em: 06/12/2005.



Fernando Oliveira Catanho da Silva
(Orientador)

Campinas
2005

COMISSÃO JULGADORA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Oliveira Catanho da Silva'. The signature is fluid and cursive, with the first letter 'F' being particularly large and stylized.

Doutorando Fernando Oliveira Catanho da Silva

Dra. Dora Maria Grassi Kassisse

Dra. Vera Aparecida Madruga Forti

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais João e Luciana, por me proporcionarem toda a sabedoria, para trilhar com perseverança, força e coragem o caminho oferecido por Deus, em minha vida. Aos meus irmãos Juliana e Leonardo pelos diversos aprendizados ao longo da vida. Aos companheiros de Labex que sempre contribuíram de alguma forma para enriquecer meus conhecimentos e para conclusão deste trabalho. Ao meu Amigo e Orientador Fernando Catanho, pelas diversas discussões e também pelos aprendizados que somente verdadeiros amigos nos proporcionam na convivência diária. A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus o dom da vida a mim concedido. A minha família sem a qual este momento não seria possível. Aos meus pais que me criaram de maneira ímpar, proporcionando toda a luz, sabedoria, paciência, solidariedade, humildade, carinho, força e perseverança para trilhar o caminho que me foi destinado em vida. PAI sei que não foram muitas as oportunidades pra te dizer, mas nunca é tarde, amo você. MÃE, você é meu anjo, você é o eterno amor da minha vida, amo você, obrigado por tudo. Agradeço aos meus irmãos por todos os momentos que passamos juntos até hoje, pelos aprendizados, pelas lições de vida. LÉO, o exemplo de garra, força, coragem, inteligência, meu espelho em diversas atitudes. JU, o exemplo de serenidade, carinho, compaixão, minha irmã mais nova, minha protegida. Agradeço também a professora Denise por ter me acolhido junto a essa família fantástica que se formou dentro do Labex, por todo o conhecimento compartilhado, e mais que tudo isso por ter me mostrado o caminho brilhante da vida acadêmica, que é a vida da pesquisa, que é a vida de cientista. Agradeço a meu amigo e Orientador Fernando Catanho, pelas inúmeras discussões, e por tudo aquilo que somente os verdadeiros amigos nos ensinam na convivência ao longo da vida. A meu amigo Lazaro por todas as favores e contribuições no presente projeto, pelos esforços, que não foram poucos e sabemos disso. Valeu. Agradeço também a todos os companheiros do Labex, que me proporcionaram horas e horas de discussão contribuindo para o conhecimento adquirido até hoje, mas não só por isso, por todos os momentos de descontração, e pelo ambiente de trabalho que não conheço igual. Aos colegas de sala 02D. Agradeço também em especial e não poderia deixar de ser, meus companheiros que estão desde o início na mesma jornada que eu, Thiago e Duda. A instituição Unicamp, em especial a Faculdade de Educação Física e o órgão de pesquisa CNPQ, por me proporcionarem a oportunidade de conclusão deste trabalho. Enfim a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado a todos!

FERRUCCI, Danilo Lopes. Análise de parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios em ratos submetidos a um protocolo de exercício exaustivo agudo. 2005. 85f. Monografia em Educação Física -Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O treinamento físico, através da quebra da homeostasia, busca causar uma série de adaptações positivas no organismo que proporcionem o aumento do desempenho esportivo. Entretanto, se ocorrer um desequilíbrio constante entre a magnitude do estímulo e tempo de recuperação desses esforços, pode-se levar o organismo a uma situação de fadiga crônica, resultando em queda do desempenho, conhecida na literatura como *overreaching-overtraining*. Dentre as hipóteses existentes para explicar esse fenômeno, uma mais atual correlaciona a instalação do *overtraining* a uma progressão do estágio benigno dos micro-traumas adaptativos induzidos na musculatura esquelética e articulações para um estágio de dano sub-clínico. Segundo essa proposta, a inflamação aguda local que ocorre em resposta aos micro-traumas adaptativos se tornaria crônica, contribuindo dessa maneira para o descontrole do processo inflamatório, resultando em um processo inflamatório sistêmico. Uma segunda hipótese sugere um uma ligação entre o aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), injúria muscular e *overtraining*. **OBJETIVO:** Dessa maneira, nosso objetivo no presente projeto foi acompanhar o efeito agudo de um protocolo de exercício exaustivo, já utilizado pelo Laboratório de Bioquímica de Exercício (Labex), em ratos, bem como traçar a correlação entre EROS e resposta inflamatória, através do monitoramento de um marcador de dano muscular (Creatina Quinase-CK), marcadores de estresse oxidativo (Albumina, Ácido úrico e Catalase), marcadores de processo inflamatório (Proteína C Reativa, Alfa-1-Glioproteína Ácida) e parâmetros hematológicos por meio da contagem total de leucócitos (WBC). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratos do tipo Wistar (n= 72), do sexo masculino, com aproximadamente três meses de idade, foram submetidos à depleção de seus estoques de glicogênio hepático (através de jejum de 30 horas) e, logo em seguida, submetidos a um protocolo de natação com carga de 10% do seu peso corporal. O ponto de exaustão foi definido como aquele em que o animal não conseguia permanecer na superfície da água(dez segundos de submersão). **RESULTADOS:** No momento 6h pós-exercício foi verificado um aumento expressivo nas concentrações plasmáticas de CK, WBC, Albumina e atividade da enzima Catalase no hemolisado; já os parâmetros de processo inflamatório apresentaram um pico 24h pós-exercício, estabelecendo um platô com tendência a aumento até 72h pós-exercício. **CONCLUSÕES:** O protocolo foi capaz de refletir as alterações provenientes do dano muscular, do estresse oxidativo e processo inflamatório, de modo que o dano muscular e a condição estresse oxidativo parecem anteceder o pico da resposta inflamatória.

Palavras-Chave: Exercício Exaustivo Agudo; Reposta Inflamatória; Marcadores de Estresse oxidativo; Marcadores de lesão muscular e Marcadores Hematológicos

FERRUCCI, Danilo Lopes. Analysis of hematologic , biochemistry and inflammatory parameters in rats after acute exhaustive exercise protocol. 2005.85f. Monografia em Educação Física - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Physical training through homeostasis break, can lead to several positive adaptations in the body resulting in performance increment. Although if a constant imbalance between load and recovery time occurs, it can lead to a chronic fatigue resulting in a decreased performance, known as *Overtraining Syndrome*. Among the existent hypothesis to explain this phenomenon, the most up to date correlates *overtraining* to a chronic inflammatory process. According to this purpose, the local acute inflammatory response that occurs from microtrauma adaptative answers would become chronic. In this way it contributes to the inflammatory response imbalance, resulting in a systemic inflammatory response. There is a second hypothesis that suggest a link between an increase in Reactive Oxygen Species (ROS), muscle injuries and *overtraining*. **OBJECTIVES:** Our goal in this project was to follow the acute effect of an exhaustive exercise protocol, used at Labex (Laboratório de Bioquímica do Exercício), in rats, as well as correlating ROS and inflammatory response, through the monitoring of injury muscle marker (Creatine Kinase-CK), Oxidative Stress Markers (Albumine, Uric Acid and Catalase), Inflammatory response Markers (Protein C reactive, Alpha-1-Glycoprotein Acid) and hematologic markers through total white blood cells count (WBC). **METHODS AND MATERIALS:** Male Wistar rats (n=72) with about 3 months old, were firstly submitted to a hepatic glycogen depletion (through 30 hours fasting) and after to a exhaustive swimming protocol (SPE) using 10% of their body mass load. The exhaustion point was defined being the moment when the animal couldn't stay on the water over surface for 10 seconds. **RESULTS:** In the moment 6 hours after SPE, we found an increase in Creatine Kinase(CK), White Blood Cells(WBC) and Albumina plasma concentrations beyond the highest erythrocyte catalase activity; on the other hand the inflammatory response showed a peak 24/48 hours after SPE, establishing a plateau with a tendency of increase until 72 hours after SEP. **CONCLUSIONS:** The protocol was able to reflect the changes in muscle injury, oxidative stress and inflammatory response, showing that muscle injury and oxidative stress conditions occur before the inflammatory response peak.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Vias de formação de EROS e mecanismo enzimático de defesa antioxidante.....	21
Esquema 2 – Mecanismo proposto para a relação entre a resposta inflamatória e danos musculares adicionais mediados pela ação de EROS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Atividade da Enzima Creatina Quinase no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	38
Figura 2 – Concentração de Albumina no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	41
Figura 3 – Atividade da Enzima catalase no hemolisado de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	42
Figura 4 – Concentração de Ácido Úrico no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	43
Figura 5 – Contagem de Leucócitos no sangue total de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	44
Figura 6 – Concentração da proteína Alfa-1-glicoproteína Ácida no plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	45
Figura 7 – Concentração de Proteína-C-Reativa no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	– Teorias responsáveis pelo desencadeamento da Síndrome do <i>Overtraining</i>	26
-----------------	--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Dados de média e desvio padrão dos pesos e tempo de exaustão para os ratos.....31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
LABEX	Laboratório de Bioquímica do Exercício
FEF	Faculdade de Educação Física
ADP	Adenosina Difosfato
A.M.T	Adaptive Microtrauma
ALB	Albumina
AGP	Alfa-1-Glicoproteína Ácida
ATP	Adenosina Trifosfato
AU	Ácido Úrico
CAT	Catalase
C.J	Grupo controle submetido ao jejum
CK	Enzima Creatina Quinase
C.S.J	Grupo controle alimentado
GR	Glutaciona Redutase
GPX	Glutaciona Peroxidase
GSSG	Glutaciona Oxidada
GSH	Glutaciona Reduzida
GOT	Glutamato-Oxaloacetato Transaminase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
LDH	Lactato Desidrogenase
NADPH	Coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
O₂^{·-}	Radical Ânion superóxido
·OH	Radical hidroxila
PCR	Proteína-C Reativa
PFA	Proteínas de Fase Aguda
SOD	Enzima Superóxido Desmutase
SPE	Exhaustive Swimming Protocol
VO₂máx	Consumo Máxima de Oxigênio
WBC	Contagem total de leucócitos
PEE	Protocolo de Exercício Exaustivo
ABPM	Sistema Antioxidante de Baixo Peso Molecular

SUMÁRIO

RESUMO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1. Exercício Físico, Estresse e Homeostasia.....	16
1.2. Adaptação Positiva ao Treinamento: Equilíbrio entre Estímulo vs. Período Regenerativo.....	16
1.3. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio(EROS) no exercício	18
1.4. Sistemas de defesa do Organismo Contra a Produção de EROS.....	20
1.4.1. Superóxido Desmutase (SOD).....	20
1.4.2. Catalase(CAT).....	20
1.4.3. Sistema Glutathiona Peroxidase/Glutathiona Redutase (GPX/GR).....	21
1.4.4. Sistema Antioxidante de Baixo Peso Molecular (ABPM).....	22
1.4.5. Sistema Antioxidante no plasma – Proteínas Plasmáticas.....	22
1.5. Resposta Inflamatória.....	22
1.6. Citoquinas e sua relação com a resposta inflamatória.....	23
1.7. Síndrome do Overtraining: Desequilíbrio Entre Estímulo vs. Período Regenerativo.....	24
1.8. Causas do Overtraining.....	26
2.OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos gerais.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	30
3.MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Animais.....	31
3.2. Metodologia.....	31
3.2.1. Protocolo – Exercício Exhaustivo Agudo.....	31
3.2.2. Fase de Adaptação.....	32
3.2.3. Coleta de sangue e preparo das amostras.....	32
3.2.4. Determinação dos Parâmetros hematológicos.....	33
3.2.5. Dosagens Bioquímicas no plasma.....	33
3.2.5.1. Marcador de lesão muscular – Creatina Quinase(CK).....	33
3.2.5.2. Marcadores de estresse oxidativo	34
3.2.5.2.1. Albumina(AU).....	34
3.2.5.2.2. Ácido Úrico	35
3.2.5.2.3. Atividade da Enzima Antioxidante Catalase.....	36
3.2.5.3. Marcador Resposta Inflamatória.....	36
3.2.5.3.1. Proteína C Reativa (PCR).....	36
3.2.5.3.2. Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP).....	36
3.3. Análises Estatísticas.....	37
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Efeito do protocolo exaustivo agudo sobre os parâmetros de alteração de permeabilidade de membrana.....	38
4.2. Efeito do protocolo exaustivo agudo sobre os parâmetros de estresse oxidativo.....	40

4.3. Efeito do protocolo exaustivo agudo sobre os parâmetros de resposta inflamatória.....	44
4.4. Discussão.....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
APÊNDICES	

1.Introdução

1.1.EXERCÍCIO FÍSICO, ESTRESSE E HOMEOSTASIA

O exercício físico é conhecido por induzir diferentes alterações na homeostasia do organismo (PANG & SHEPARD,1998;COYLE,2000), sendo que diante ao estresse físico causado pela atividade física, os diferentes sistemas do organismo trabalham através de ações integradas para o restabelecimento dos níveis homeostáticos, permitindo assim uma otimização no funcionamento dos sistemas biológicos, e conseqüentemente refletindo no aumento da *performance*.

Dessa forma, a ciência do treinamento é fundamentada por esse mecanismo evolutivo, pelo qual as células e outros tecidos se defendem contra mudanças abruptas e adversas do meio ambiente, se adaptando a elas (WELCH, 1992). Sendo assim, busca-se então, por meio de diferentes estratégias metodológicas, o desequilíbrio da homeostasia, suficiente para provocar um distúrbio agudo nas células, órgãos e estruturas envolvidas com o movimento e relacionado à fadiga (HULTMAN & SJÖHOLM, 1986; BOMPA, 2002), permitindo assim a reorganização do meio interno (ZATSIORSKY, 1995).

Portanto, os diferentes métodos de treinamento através do monitoramento das variáveis quantitativas e qualitativas buscam a adaptação positiva que, por sua vez, refletem em melhoria da *performance*, permitindo o estabelecimento de grandes marcas e recordes no contexto desportivo. Porém indivíduos diferentes podem apresentar diferentes repostas a um mesmo método de treino (*Princípio da Individualidade Biológica*), tornando tênue o limiar entre a adaptação positiva e a deterioração da *performance* observada em situações como a síndrome do *Overreaching/Overtraining* (Smith,2000).

1.2. ADAPTAÇÃO POSITIVA AO TREINAMENTO: EQUILÍBRIO ENTRE ESTÍMULO VS. PÉRIODO REGENERATIVO

O treinamento físico consiste na modulação da intensidade, duração e freqüência de esforço físico durante as sessões de treino, com o objetivo sempre de aumentar o rendimento,através das capacidades biomotoras específicas, que diferem

em ordem de prioridade dependendo da modalidade esportiva em questão (ZATSIORSKY, 1995).

A resposta do organismo ao estresse ocorre através de ações integradas entre cérebro, glândulas, hormônios, sistema imune, coração, musculatura esquelética, sangue e pulmões, permitindo a adequação no fornecimento de oxigênio e energia, aumentos na força e resistência muscular e resistência à dor, acuidade mental, além de uma proteção temporária contra infecções.

A aplicação do princípio da sobrecarga preconizado pelo treinamento físico também induz micro-traumas de graus variados no sistema muscular esquelético, tecido conectivo e articulações, considerados como danos temporários e reparáveis. A literatura usa o termo micro-trauma adaptativo (AMT), porque resulta em uma resposta inflamatória aguda branda, que leva a regeneração desses tecidos, integrando, portanto, a resposta adaptativa positiva associada ao treinamento (EVANS ET AL., 1986; SMITH, 2000).

O microtrauma adaptativo pode ser induzido por alguns mecanismos tais como isquemia/reperfusão locais (SMITH & MILES, 2003), estresse mecânico, através das ações musculares excêntricas (TOURNI & BEST, 2003) e através da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na musculatura esquelética, principalmente após o exercício de alta intensidade, no sentido de reparar o tecido lesado (VENKATRAMAN ET AL., 2000).

De qualquer maneira, é importante ressaltar que as respostas adaptativas positivas que envolvem, entre outras, aumento na concentração de reservas intramusculares de ATP, aumento na atividade de enzimas-chave do metabolismo, síntese de novas proteínas, processo inflamatório, reparo e remoção de restos celulares, se iniciam quando cessa o exercício. Ou seja, as respostas adaptativas positivas propriamente ditas acontecem durante o período de recuperação do esforço realizado, chamado de período regenerativo.

Quando o tempo dedicado ao período regenerativo é adequado em relação às cargas de trabalho, os níveis de atividade enzimática e de substratos metabólicos são restabelecidos acima daqueles detectados antes do treinamento e as fibras musculares se regeneram plenamente dos traumas sofridos. Esse processo é conhecido na

literatura como *supercompensação* e propicia melhor suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia em atividades físicas que já eram habituais na estrutura de treinamento (FRY ET AL., 1992; BRUIN ET AL., 1994). Nesse momento, se uma mesma carga de esforço físico for imposta os mecanismos homeostáticos não serão rompidos na mesma extensão (FRY ET AL., 1992); daí advém à necessidade de estarmos sempre modulando as cargas de esforço num programa de treinamento, para que ele sempre produza a quebra da homeostasia e, conseqüentemente, uma resposta adaptativa positiva. Por outro lado, se não for aplicada uma nova carga de esforço no tempo correto haverá involução dos benefícios adquiridos.

Em suma, as adaptações positivas que ocorrem nos diferentes sistemas do organismo, refletindo em aumento de *performance*, resultam de uma alternância corretamente programada entre indução de estresse (através da modulação das cargas de exercícios) e tempo de período regenerativo. É importante ressaltar que cada indivíduo tem seu próprio potencial de adaptação, determinado por herança genética ou mesmo pelo estímulo proporcionado. Conseqüentemente, os níveis de adaptações alcançadas e manutenção do processo adaptativo são realmente os pontos que diferenciam os atletas de alto nível de indivíduos fisicamente ativos.

1.3. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) NO EXERCÍCIO

O oxigênio (O_2), acceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e de outras reações de óxido-redução, por ter a particularidade de ser uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais, para ser totalmente reduzido necessita receber quatro elétrons, um a um. Nas mitocôndrias, normalmente esta redução é feita na citocromo oxidase (aa_3), que catalisa a transferência univalente de quatro elétrons, produzindo H_2O como único produto final da reação (NICHOLLS, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Este processo contribui com cerca de 95 a 98% do O_2 total consumido pelas células. Entretanto, uma pequena fração deste oxigênio é reduzido em apenas um elétron, produzindo radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que dá início à formação das outras EROs (JENKINS & GOLDFARB, 1993). Estas incluem espécies radiculares, como o $O_2^{\cdot-}$ e radical hidroxila ($\cdot OH$) e não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Numa situação de exercício físico, tanto a demanda energética quanto o consumo de O_2 estão aumentados, podendo aumentar em relação à situação de repouso cerca de 20 vezes no nível sistêmico e acima de 100 vezes na musculatura (ASTRAND & RODAHL, 1986; MEYDANI & EVANS, 1993). Desta forma, O_2^- pode ser formado nos músculos e também nas hemácias de várias maneiras:

1. Na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra reduzida (numa situação de anóxia muscular) e é "reperfundida" pelo O_2 durante, por exemplo, a pausa após um esforço de alta intensidade (convém ressaltar que isto não acontece nas hemácias, que não possuem mitocôndria);
2. Por enzimas como *xantina oxidase* (ativada na mesma situação descrita anteriormente, onde predomina uma baixa concentração de ATP e alta concentração de AMP).
3. Pela enzima *NADPH oxidase* de leucócitos ativados oriundos do processo inflamatório;

A presença de ferro (na forma livre ou ligado ao grupo heme) pode converter o H_2O_2 (reação de Fenton) e o O_2^- e H_2O_2 (reação de Haber-Weiss) em $\cdot OH$, uma das espécies mais reativas que se conhece (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os neutrófilos e macrófagos, paralelamente as células endoteliais regulam a permeabilidade vascular através da ação da enzima *óxido nítrico sintase* aumentando assim a produção de óxido nítrico (CONNER & GRISHAM, 1996; VALLET, 2002). O óxido nítrico pode reagir com O_2^- , formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao $\cdot OH$ (BECKMAN ET AL., 1990).

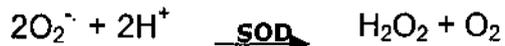
Toda espécie radicalar apresenta em sua última camada de valência, dois ou mais elétrons desemparelhados, devendo doar ou receber elétrons de outras espécies para se estabilizar, se constituindo, portanto em oxidantes potentes. Os principais alvos do ataque oxidativo das EROs são fosfolipídios de membranas celulares e sub-celulares, proteínas e DNA. Não está claro qual o primeiro alvo das EROs, porém HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) sugerem que um ataque ao DNA ocorra antes da oxidação de proteínas ou lipídeos de membrana.

1.4. SISTEMAS DE DEFESA DO ORGANISMO CONTRA A PRODUÇÃO DE EROS

Da mesma forma que durante a evolução a maioria dos organismos vivos passou a utilizar o O₂ como elemento fundamental no processo de produção de energia, foi também desenvolvido um complexo sistema de proteção contra suas ações deletérias (HALLIWELL ET AL., 1999). Ou seja, a consequência biológica da formação diária de EROS pelo organismo inclui a síntese de enzimas, que compõe o principal sistema de defesa antioxidante do organismo. As principais enzimas antioxidantes sintetizadas pelos organismos são:

1.4.1. Superóxido dismutase (SOD)

É uma metaloenzima presente no citosol (dependente de cobre/zinco) e nas mitocôndrias (dependente de cobre/zinco no espaço intermembranas e de manganês na matriz), que catalisa a formação de H₂O₂ e O₂ a partir da dismutação do O₂⁻, diminuindo seus níveis abaixo de 10⁻¹¹ M (FRIDOVICH, 1995).



Pela reação acima, podemos observar que a produção de O₂⁻ é sempre acompanhada pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Como o H₂O₂ é uma fonte importante de [•]OH, para o qual não existem mecanismos diretos de defesa, existem duas vias distintas de detoxificação do H₂O₂:

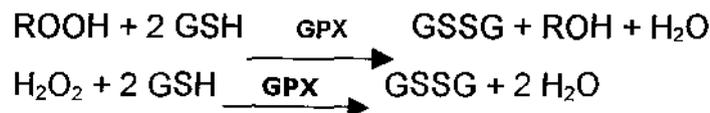
1.4.2. Catalase (CAT)

É uma enzima altamente ativa, encontrada principalmente nos peroxissomos, que decompõe H₂O₂ a O₂ e H₂O:

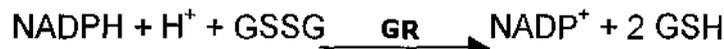


1.4.3. Sistema Glutationa Peroxidase/Glutationa Redutase (GPX/GR)

Estas duas enzimas trabalham de forma integrada e são encontradas tanto nas mitocôndrias quanto no citosol, sendo a GPX, dependente de selênio. A GPX é menos seletiva e catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos além do H_2O_2 a H_2O , em uma reação que envolve o peptídeo glutaciona reduzida (GSH) como substrato (CHANCE ET AL., 1979):

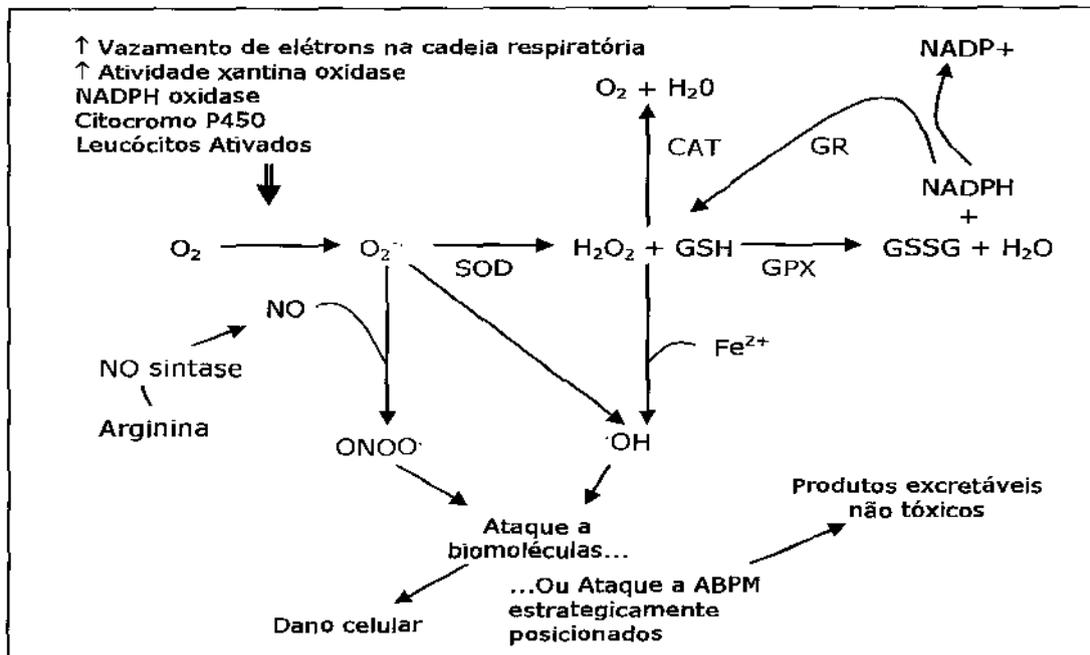


A glutaciona oxidada (GSSG) é reduzida novamente, através da ação da enzima *glutaciona redutase*, tendo como doador de elétrons o NADPH:



Como o K_M para o H_2O_2 da *catalase* (mM) e da *glutaciona peroxidase* (μM) são diferentes, parece que os dois sistemas podem se complementar, dependendo da concentração de EROs produzida durante o treinamento (ZOPPI ET AL., 2003).

O esquema 1 resume as principais fontes de EROs durante o exercício e a ação das enzimas do sistema de defesa antioxidante.



Esquema 1: Vias de formação de EROs (azul) e mecanismo enzimático de defesa antioxidante (vermelho). $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Radical ânion superóxido); OH^{\cdot} (radical hidroxila); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); NO (óxido nítrico); ONOO $^{\cdot}$ (ânion peroxinitrito).

1.4.4. Sistema Antioxidante de Baixo Peso Molecular (ABPM)

O sistema de defesa antioxidante é também constituído pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM), que reduzem diretamente as EROS. A glutathiona reduzida (GSH), cisteína, ácido úrico, vitamina C, bilirrubina, β -caroteno e vitamina E são exemplos de ABPM. Eles estão presentes em concentrações muito maiores que os antioxidantes enzimáticos. Os ABPM podem ser sintetizados endogenamente, ser restos metabólicos, ou advir da alimentação. Como os ABPM são hidrofílicos ou lipofílicos, estão presentes nos locais específicos em que ocorrem os danos oxidativos, exercendo dessa forma, um papel fundamental para a capacidade antioxidante total dos sistemas biológicos (HALLIWELL & GUTERRIDGE, 1999; GANDRA ET AL., 2004).

1.4.5. Sistema Antioxidante no plasma – Proteínas Plasmáticas

Proteínas plasmáticas tais como ceruloplasmina, transferrina, melatonina, albumina e metalotioneína podem sofrer oxidação pela ação de EROS, também se constituindo numa forma de defesa do organismo, principalmente porque nos líquidos extracelulares o sistema de defesa antioxidante enzimático não possui grande participação na redução de espécies radicalares, uma vez que este sistema exerce suas funções principalmente dentro dos compartimentos celulares .

1.5. RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Evidências experimentais mostram que em resposta às lesões teciduais induzidas pelo exercício (microtrauma adaptativo), instala-se o processo inflamatório agudo, que, ao seu final, tem a função de promover a regeneração do tecido normal. O processo inflamatório possui basicamente três objetivos: 1) defender o organismo contra substâncias estranhas; 2) remover o tecido morto ou necrosado, de modo que a cicatrização possa acontecer; 3) promover a regeneração do tecido normal. Os sinais e sintomas da inflamação são: dor, calor, rubor, inchaço, perda ou redução da função, sempre visando à cura (SMITH & MILES, 2003; CURI, 2002). No entanto, nem todas as manifestações clínicas são consistentemente detectadas. A severidade da resposta inflamatória aguda depende do tipo, duração, intensidade e do componente de exaustão do exercício físico em questão (MALM, 2001; KING ET AL., 2003), assim como do estado nutricional (SMITH, 2000).

Além dessas, o processo inflamatório desencadeia vasodilatação arteriolar periférica, aumento da permeabilidade vascular, infiltração celular no tecido lesado e ativação das células do sistema imunitário (CURI ET AL., 2002). O aumento da permeabilidade vascular (que permite a migração de leucócitos para o local da inflamação – diapedese) e a vasodilatação arteriolar levam a um maior acúmulo de plasma no espaço intersticial dos tecidos, desencadeando o edema (CALICH & VAZ, 2001). Muitos destes eventos são conhecidos como resposta da fase aguda (Acute Phase Response – APR), que inclui a síntese das citocinas pro e anti-inflamatórias e de moléculas quimioatrativas (quimioquinas), síntese de moléculas de adesão celular e aumento do trânsito dos leucócitos.

Ao mesmo tempo em que essas repostas locais estão acontecendo, duas outras respostas associadas com a ativação sistêmica do evento inflamatório estão acontecendo também: resposta febril e aumento na expressão das proteínas hepáticas de fase aguda (FLECK ET AL., 1983; BAUMANN & GAULDIE, 1994; KOJ & GUZDEK, 1995). Destaca-se que, o número de reagentes envolvidos na resposta de fase aguda e a magnitude da mesma são proporcionais ao grau do trauma sofrido pelo respectivo tecido (SMITH & MILES, 2003).

1.6.CITOQUINAS E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

As citocinas são fatores inflamatórios polipeptídicos sintetizados pelas células de defesa (predominantemente por neutrófilos, monócitos e macrófagos) com a função de efetuarem uma sinalização de “emergência”, buscando integrar a inflamação local e sistêmica. As citocinas atuam, na maioria dos casos, de forma parácrina e autócrina e, em alguns casos, de forma endócrina, mostrando elevada afinidade pelos seus receptores de membrana (GOLDSBY ET AL., 2003). Desse modo, as citocinas, junto das quimioquinas e moléculas de adesão, consideradas os componentes moleculares da inflamação, organizam o tráfego e ativação dos glóbulos brancos, considerados os componentes celulares da inflamação, mediando as modificações locais e sistêmicas, além do término da inflamação (SMITH & MILES, 2003). As citocinas regulam ainda a resposta febril e a síntese de proteínas de fase aguda (PFA) pelos hepatócitos (CURI ET AL., 2002). Outra reação induzida pelas citocinas é o aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), através do *burst* respiratório dos leucócitos via

atividade da enzima NADPH oxidase (CURI ET AL., 2002), podendo deflagrar uma condição de estresse oxidativo local.

As três citocinas mais importantes para o início da resposta inflamatória aguda no exercício são, o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, promovendo e organizando eventos pró-inflamatórios locais e sistêmicos (BAUMANN & GAULDIE, 1994; SMITH & MILES, 2003).

1.7. SINDROME DO *OVERTRAINING*: DESEQUILÍBRIO ENTRE ESTÍMULO VS. PERÍODO REGENERATIVO.

Se ocorrer um desequilíbrio constante entre o tempo dedicado ao período regenerativo e as cargas de treinamento em cada atividade programada, no sentido de diminuição na recuperação, desencadeia-se um estado crônico de fadiga que, em conjunto com outras alterações metabólicas e fisiológicas, caracteriza a síndrome do supertreinamento ou *overtraining* (KUIPERS & KEIZER, 1988; JOHNSON & THIESE, 1992; TIIDUS, 1998; KUIPERS, 1998; PETIBOIS ET AL., 2003).

Os sinais associados ao *overtraining* são: fadiga prematura, respostas inflamatórias com aumento no nível de leucócitos, citocinas e proteínas de fase inflamatória aguda, estresse oxidativo, desequilíbrio nutricional, distúrbios hormonais e indisposição ao treinamento físico (KUIPERS & KEIZER, 1988; JOHNSON & THIESE, 1992; TIIDUS, 1998; KUIPERS, 1998; PETIBOIS ET AL., 2003). KRAEMER & NINDL (1997) propuseram que o termo significa uma mal-adaptação aos estímulos dos exercícios que pode debilitar a *performance* fisiológica e psicológica, alterando o processamento de informações bioquímicas e imunológicas. O constante aparecimento de lesões, depressão e falta de apetite são exemplos práticos da síndrome do *overtraining* (PETIBOIS ET AL., 2003).

No entanto, a única alteração apresentada por todos os atletas é perda da capacidade de rendimento físico, a despeito do aumento ou manutenção nas cargas de treino, embora nem todas as capacidades biomotoras sejam diminuídas simultaneamente ou sofram o mesmo grau de impacto (SMITH, 2000). Isso dificulta a predição desse estado e torna sua interpretação confusa. Quando o *overtraining* se

instala, a recuperação é lenta, podendo levar muito tempo (meses) para ocorrer, sendo essa sua principal característica (PETIBOIS ET AL., 2003).

O início do *overtraining* é conhecido na literatura como *overreaching*. Embora também resulte em queda no rendimento, o *overreaching* pode ser revertido com poucos dias de descanso, ou seja, aumentando-se o período regenerativo (KUIPERS & KEIZER, 1988; JOHNSON & THIESE, 1992; TIIDUS, 1998; KUIPERS, 1998; PETIBOIS ET AL., 2003). A fadiga muscular excessiva, em qualquer tipo de atividade física se caracteriza, em última instância, pela incapacidade das fibras em ressintetizar ATP, diminuindo a capacidade de rendimento esportivo (NOAKES, 2000). Nessa situação ocorre uma diminuição nos estoques de glicogênio e de fosfatos ricos em energia (ATP, ADP) (KUIPERS & KEIZER, 1988). O desequilíbrio entre treino/recuperação não possibilita o pronto restabelecimento, tanto do glicogênio (hepático e muscular) quanto do "pool" de fosfatos ricos em energia (BRUIN ET AL., 1994). Por estes motivos, relaciona-se o *overreaching* a um estresse metabólico (KUIPERS, 1998).

Um dos maiores problemas enfrentados por técnicos e preparadores físicos é que muitas vezes, na prática, a queda no rendimento provocada pelo *overreaching* é confundida com falta de estímulo e não excesso. Essa interpretação equivocada normalmente leva a comissão técnica a aumentar ainda mais a carga de esforço, com diminuição do período regenerativo. Isso pode exceder o limite individual de estresse que o organismo pode suportar, contribuindo para o aumento na susceptibilidade a lesões em decorrência do *overreaching* (SMOLKA ET AL., 2000; ZOPPI ET AL., 2003). Não podemos esquecer que o atleta lesionado também tem que parar suas atividades, e a recuperação das lesões, dependendo do seu grau, muitas vezes também pode ser muito demorada.

Pelo exposto até o momento, parece evidente que um dos principais problemas enfrentado atualmente por técnicos e preparadores físicos é saber como modular a quantidade ótima de treinamento para as várias modalidades e o tempo ótimo de período regenerativo que leve à *supercompensação* e não ao *overreaching/overtraining*.

Uma maneira interessante seria poder utilizar biomarcadores moleculares para detectar sua instalação, e desta forma, evitar as conseqüências mais deletérias, pois o

limiar entre um treinamento ideal e o *overreaching/overtraining* é sempre muito tênue. A complexidade em se estabelecer um determinado marcador, ou um grupo de marcadores para diagnosticar *overreaching*, se dá pelo fato de atletas nessa situação não necessariamente apresentarem as mesmas respostas fisiológicas. A única alteração apresentada por todos os atletas é realmente a perda da capacidade de rendimento, quando a reversão deste processo é extremamente complicada e muito lenta (ROWBOTTOM ET AL., 1998).

1.8. CAUSAS DO OVERTRAINING

QUADRO 1 - Teorias responsáveis pelo desencademaneto da Síndrome do *Overtraining*

TEORIA	AUTOR
Teoria da depleção de glicogênio	Costill et al,1988
Teoria do desbalanço autonômico	Lehmann et al, 1997
Teoria da Glutamina	Newsholme et al,1991
Teoria do Estresse Oxidativo	Alessio, 1993
Teoria da inflamação sistêmica (citoquinas)	Smith,2000

Embora as conseqüências do *overtraining* estejam bem caracterizadas (FRY ET AL, 1991), suas causas ainda estão sendo investigadas.

Há proposições que o alto grau de fadiga que caracteriza o *overreaching* pode ser decorrente de uma proteólise acentuada, que aconteceria principalmente em situações de reposição parcial das reservas de glicogênio muscular pós-exercícios ou jogos (COSTILL ET AL., 1988). A queda nos estoques de glicogênio, por sua vez levaria ao aumento da oxidação de ácidos graxos, bem como de aminoácidos de cadeia ramificada, induzindo aumento na captação de triptofano pelo sistema nervoso central, com conseqüente aumento de serotonina, contribuindo assim para uma fadiga central (COSTILL ET AL., 1988).

DOHM E COLABORADORES (1982) mostraram correlação entre valores plasmáticos de uréia aumentados e traumas na musculatura (gerados através dos próprios estímulos de treino). Esses autores mostraram correlação positiva entre os níveis de lesão muscular refletido pelos valores plasmáticos da enzima creatina quinase (CK) e a magnitude do estresse metabólico, refletido pelo valor plasmático de

uréia. No entanto, existem estudos que já reportaram atletas numa situação de *overtraining* com os depósitos de glicogênio repletos (SNYDER, 1998).

Uma hipótese bem aceita, até por possuir uma quantidade maior de investigações e conseqüentemente mais evidências experimentais, aponta para o desequilíbrio no sistema nervoso autônomo induzido pelo hipotálamo, através da alteração dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal (LEHMANN ET ALI, 1997). Esta hipótese explica, através da alteração nas secreções de catecolaminas, glicocorticóides e testosterona, grande parte, senão todas as alterações já evidenciadas pela literatura em resposta ao *overtraining*.

A teoria da glutamina, proposta por NEWSHOLME (1991) é decorrente de uma série de observações que mostraram queda nas concentrações plasmáticas deste aminoácido em indivíduos super-treinados (KEAST, 1996). ROWBOTTOM E COLABORADORES (1995) analisaram 10 atletas super-treinados de várias modalidades através de vários parâmetros bioquímicos, fisiológicos e imunológicos e mostraram que a glutamina foi o único parâmetro que diminuiu consistentemente em todos os indivíduos. Essa teoria propõe que o estresse excessivo ocasionado pelo desequilíbrio treino/recuperação seria responsável pela queda deste aminoácido no plasma, levando à supressão do sistema imune, pois a glutamina é essencial para a proliferação de linfócitos e a função de macrófagos (NEWSHOLME, 1991).

Uma hipótese mais recente que tenta integrar todas aquelas apresentadas acima propõe que o iniciador do *overtraining* seria uma progressão do estágio benigno dos micro-traumas adaptativos na musculatura esquelética e articulações para um estágio de dano sub-clínico no atleta submetido a treinos intensos e com pouco tempo de recuperação; ou, em decorrência do reinício do treinamento antes da recuperação total de um dano agudo, o que poderia exacerbar o dano inicial (SMITH, 2000). Segundo essa proposta, a inflamação aguda local em resposta aos traumas se tornaria crônica resultando em um processo inflamatório sistêmico, desencadeando o *overtraining*.

O tecido muscular apresenta uma peculiaridade em relação aos demais. Enquanto a maioria dos tecidos altera pouco sua atividade metabólica, o músculo esquelético pode aumentar muitas vezes seu metabolismo em relação aos níveis basais (ASTRAND & RODAHL, 1986). Isto faz com que suas células fiquem expostas a

maiores concentrações de oxidantes. Em 1978, DILLARD E COLABORADORES foram os primeiros a mostrar que o exercício físico induzia aumento nos níveis de peroxidação lipídica, medida pelo aumento dos níveis exalados de pentano, após os sujeitos pedalarem por 60 minutos, com intensidades relativas variando entre 25 e 75% do $VO_{2máx}$. Desde então, um grande número de estudos vem dando suporte à hipótese que o exercício físico aumenta a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), consistentes com uma relação tipo causa-efeito entre estresse oxidativo e fadiga muscular (DAVIES ET AL., 1982; ALESSIO, 1993; JI, 2002; POWERS & HAMILTON, 1999).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Essa monografia é derivada de projeto de iniciação científica que faz parte de um projeto multidisciplinar, desenvolvida pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex) (Depto Bioquímica/IB), coordenado pela Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, com a colaboração do Prof. Dr. Armindo Antônio Alves, em parceria com os Profs. Dr. Lauro Kubota, do Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS/IQ/Unicamp) e Dr. José Camillo Novello, do Laboratório de Química de Proteínas (Depto Bioquímica/IB), em julgamento na Fapesp dentro do projeto Pronex (03/09923-2P), mas que já se encontra em andamento.

O projeto Pronex prevê o monitoramento simultâneo dos principais marcadores tanto de adaptação quanto de *overreaching/overtaining*, já descritos na literatura e apresentados na introdução do presente projeto, em atletas de diferentes modalidades e pessoas fisicamente ativas e também em ratos submetidos a protocolos de treinamento de alta intensidade com variação na frequência de recuperação ou submetidos a exercícios exaustivos agudos. O objetivo do grupo é poder correlacionar as respostas obtidas nas diversas situações, a fim de discriminar os melhores marcadores de adaptação positiva e *overreaching/overtraining*, que comporão a técnica de Limiar de Estresse.

O desenvolvimento do projeto Pronex obviamente conta com a participação de vários alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado dos diferentes grupos de pesquisa envolvidos, uma vez que a realização simultânea de todas as análises em humanos e animais seria inviável de ser feita somente por um número muito pequeno de pessoas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Esse projeto de monografia faz parte de um projeto temático Pronex (03/09923-2P), de caráter multidisciplinar, e teve como objetivo específico:

- ✓ acompanhar o efeito agudo de um protocolo de exercício exaustivo (PEE), já utilizado pelo Laboratório de Bioquímica de Exercício (Labex), em ratos, através do monitoramento de marcadores de dano muscular (Creatina Quinase-CK), marcadores de estresse oxidativo (Albumina, Ácido úrico e Catalase), marcadores de processo inflamatório (Proteína C Reativa, Alfa-1-Gliproteína Ácida) e parâmetros hematológicos por meio da contagem total de leucócitos (WBC), no sangue de ratos em diferentes momentos após o PEE (3, 6, 12, 24, 48 e 72h);
- ✓ correlacionar o aumento na produção de EROs e a resposta inflamatória;
- ✓ determinar através da cinética desses biomarcadores, momentos agudos da resposta de um protocolo de exercício exaustivo, possibilitando, em outros estudos, a determinação e diferenciação do efeito crônico do exercício físico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

"EX VIVO"

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos do tipo Wistar (n=72), do sexo masculino, com aproximadamente de 3 meses de idade, obtidos no Centro de Bioterismo da UNICAMP e mantidos em local com temperatura controlada em torno de 22°C, em gaiolas apropriadas e em ciclo invertido de luz claro-escuro. Este projeto foi está aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP – (CEEA-IB-UNICAMP) (protocolo 019/2004).

TABELA I: Dados de média e desvio padrão dos pesos e tempo de exaustão para os ratos.(n=72)

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24	48h	72h
P (g) *	353 ±10.4	389.5 ±19.9	383.5 ±26.2	375.4 ±27.8	372 ±20.6	393.3 ±15.5	392.5 ±12.9	381.6 ± 6.1
T. E (Seg.) **	-----	-----	97 ±8	124±15	92±26	101±8	91±12	97±8

* *Peso em gramas*

** *Tempo de exaustão*

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. PROTOCOLO – EXERCÍCIO EXAUSTIVO AGUDO

Devido ao fato dos ratos serem nadadores naturais, protocolos de exercícios baseados na natação são largamente usados com a intensidade monitorada através de pesos ligados à cauda ou ventre do animal, possibilitando uma sobrecarga maior do que em protocolos de exercícios em esteira (MCARDLE & MONTROYE, 1966).

A cinética dos biomarcadores em resposta a um exercício físico agudo foi realizada após o protocolo de exercício exaustivo em natação proposto por Nikolovski e colaboradores (1996), no qual um "n" de 40 ratos entre 300–420g foram submetidos à depleção de seus estoques de glicogênio hepático (através de jejum de 30 horas) e, logo em seguida, submetidos a um protocolo de natação com carga de 10% do seu peso corporal. Os ratos realizaram uma única sessão de natação individualmente, em

tanques com água de dimensões de (85cm x 60cm x 55cm) até a exaustão, à temperatura de 34°C. O ponto de exaustão foi definido como aquele em que o animal não conseguiu permanecer na superfície da água durante certo período de tempo (10 segundos submersos). Um lote de 8 animais foi sacrificado nos seguintes tempos pós-exaustão: 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, com intuito de se analisar a cinética dos diferentes marcadores pós-exercício exaustivo. Doze animais foram divididos em dois grupos compondo respectivamente o grupo controle alimentado ou sem jejum (C.S.J) e o grupos-controle onde os animais foram submetidos ao jejum (C.J), convém ressaltar que os grupos controles não realizaram o processo de adaptação ao meio líquido e nem o protocolo de exaustão.

3.2.2.FASE DE ADAPTAÇÃO

Os ratos foram adaptados ao meio líquido em um tanque com água (85cm x 60cm x 55cm) com uma tela de fundo de profundidade variável. Inicialmente (antes do começo dos experimentos) os ratos permaneceram em água rasa numa temperatura de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ (HARRI, 1986), essa fase consistiu em colocá-los apenas em contato com a água durante 10 minutos, cinco (5) vezes por semana, para que os animais pudessem se familiarizar com o meio aquático e ao manejo, evitando interferências causadas pelo estresse (AZEVEDO, 1994).

A partir do início da segunda semana os animais foram submetidos a uma adaptação aos exercícios, iniciando com sessões de 5 min de nado livre, com incremento para 10 min após 3 dias. Cumprida essa fase, os animais foram induzidos a nadar durante 10 minutos, três vezes por semana possibilitando dessa maneira a familiarização com o meio aquático e ao manejo. Toda a adaptação foi realizada com a utilização da “mochilinha” usada para colocação de chumbo com o intuito dos animais se habituarem com a mesma.

3.2.3.COLETA DE SANGUE E PREPARO DAS AMOSTRAS

Todos os cuidados de higiene e assepsia foram tomados para realização do procedimento cirúrgico. O animal foi anestesiado, via intraperitoneal, com Ketamina (Anestésico geral) e Cloridrato de Xilazina (relaxante muscular), respectivamente na dose de 5 e 10 unidades a cada 100g. Em seguida, foi realizada uma secção na

cavidade torácica para a visualização do coração. Todo o sangue possível (cerca de 10 a 12 ml) foi coletado do ventrículo esquerdo. O sangue em seguida foi colocado em tubos heparinizados para ser processado. O animal, após a coleta de sangue, foi sacrificado por deslocamento cervical. A coleta do sangue foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX). Após a coleta o sangue foi centrifugado por quinze minutos a 3000 x g para separação do plasma e células sanguíneas. O plasma foi armazenado a -70°C em eppendorfs, para posterior análise dos biomarcadores propostos.

3.2.4.DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETRÔS HEMATOLÓGICOS

O material utilizado nas dosagens hematológicas foi sangue total, coletado em tubos EDTA/K3. Os parâmetros analisados foram: WBC (contagem total de leucócitos), RBC (contagem total de hemácias), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito) Para a realização destas análises foi utilizado o contador hematológico CC 530/550 da marca Celm.

3.2.5.DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO PLASMA

As análises bioquímicas das concentrações plasmáticas de CK, albumina, ácido úrico, Alfa-1-Glicoproteína Ácida e Proteína-C Reativa foram realizadas no aparelho automatizado para análises clínicas Autolab 18 (Boehringer Mannheim), baseado na técnica de espectrofotometria, a partir do plasma armazenado em *eppendorfs* a -70°C , através de kits específicos. A metodologia segue descrita abaixo.

3.2.5.1.Marcador de Lesão Muscular - Creatina Quinase(CK)

A creatina quinase muscular (CK/MM) foi dosada no aparelho automatizado Autolab 18 (Boehringer Mannheim) utilizando o kit CK-NAC UV da marca Wiener-Lab.

Princípio do método: A CK catalisa a reação entre a creatina fosfato e adenosina difosfato (ADP), formando creatina e adenosina trifosfato (ATP). O ATP fosforila a glicose sob a ação da hexoquinase (HK), formando glicose-6-fosfato, que é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) na presença de NAD, pela ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). A Atividade enzimática da CK é determinada a 334 nm pela quantificação de NADH reduzido.

Procedimento: Adiciona-se à solução tampão (frasco de 2,5 mL) um comprimido reativo específico, deixando-os em banho-maria a 37°C até a dissolução completa do comprimido. Em seguida, adiciona-se à solução reativa 50 µL de plasma, deixando novamente a mistura em banho-maria a 37°C por um minuto. Durante a mistura ocorrem as seguintes reações:



De forma imediata, realizam-se quatro leituras das absorbâncias de uma mesma amostra a 334 nm, com um minuto de intervalo entre uma leitura e outra, para que seja obtido um valor Δ . A atividade da CK será proporcional à quantidade de NAD reduzido a NADH na amostra, aumentando proporcionalmente a leitura de absorbância ao longo da cinética. O cálculo da atividade de CK (U/L) na amostra foi feito pela equação $CK_p = 8252 \times \Delta \text{absorbância}/\text{minuto}$.

3.2.5.2. Marcadores de Estresse Oxidativo

3.2.5.2.1. Albumina (ALB)

As análises de Albumina foram realizadas no aparelho Autolab 18 (Boehringer Mannheim) utilizando-se o Kit Albumina da marca Bio Técnica.

Princípio do Método: A Albumina presente na amostra reage com o bromocresol em meio ácido, formando um complexo colorido que é quantificado por espectrofotometria.

Kit: Reagente-(Verde de bromocresol 0,17mmol; Tampão Succinato 0,88mmol pH4,2 ;Azida sódica 9mmol). Padrão (Solução de albumina de concentração conhecida).

Procedimento: Mistura-se em tubos de ensaio, para o Branco (1000 µL de Reagente de Trabalho), para o Padrão (5 µL de Padrão + 1000 µL de Reagente de Trabalho) e para a amostra (5 µL de Amostra + 1000 µL de Reagente de Trabalho). Em seguida agitar bem os tubos e deixar 10 minutos à temperatura ambiente. Logo após, ler a

absorbância (A) do Padrão (A_p) e da Amostra (A_a) frente ao branco a 630nm. A leitura de Absorbância é usada para os cálculos de concentração a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{Albumina}] \text{ (g/dL)} = \text{Absorbância da Amostra} \times \text{Concentração do Padrão}$$

3.2.5.2.2. Ácido Úrico (AU)

As Análises da concentração plasmática de Ácido Úrico foram realizadas no aparelho Autolab 18 (Boehringer Mannheim) utilizando-se o kit Uricostat enzimático AA da marca Wiener Lab.



Kit: Padrão (solução de ácido úrico 100 mg/L); Enzimas (frasco contendo uricase-UOD, peroxidase-POD, 4-Aminofenazona e ferrocianeto de potássio); Tampão (solução de 3,5diclorohidroxibenzeno sulfônico – DHS em Tampão fosfatos pH 7,4).

Reagente de Trabalho: Dissolver o conteúdo de um frasco de Enzimas em um frasco de Tampão de Uso. Misturar até dissolução completa e em seguida homogeneizar o reagente.

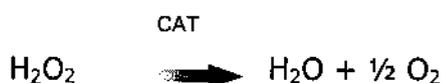
Procedimento: Inicialmente são preparados o Branco, o Padrão e as amostras de valores desconhecidos. Branco (1 mL de Reagente de trabalho). Padrão (1 mL de Reagente de Trabalho + 20 µL de Padrão de ácido úrico). Amostras desconhecidas (1mL de Reagente de trabalho + 20 µL de amostra). Todas as preparações são misturadas suavemente e permanecem em repouso por 20 minutos as temperaturas ambientes (18 a 25°C). Logo em seguida realiza-se a leitura no espectrofotômetro a 505 nm. A leituras de absorbância são utilizadas para calcular a concentração de ácido Úrico a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{Ácido Úrico}] \text{ (mg/l)} = \text{Absorbância} \times f \quad \text{onde } f = 100(\text{mg/l})/S$$

3.2.5.2.3. Atividade da Enzima Antioxidante Catalase (CAT)

Os ensaios para dosagem da atividade da enzima catalase em eritrócito foi realizada adicionando-se as amostras a tampão fosfato 50 mM e H₂O₂ 10 mM, (Aebi, 1984). A

queda nos valores de absorvância é seguida espectrofotometricamente a 240 nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase sanguínea será 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).

3.2.5.3. Marcador Resposta Inflamatória

3.2.5.3.1. Proteína C Reativa (PCR)

A proteína C reativa foi determinada através de reação de aglutinação de látex em lâmina. As partículas de látex são sensibilizadas com anticorpos anti-PCR e estabilizadas. A presença de aglutinação é indicativa de reação positiva para Proteína C-reativa.

Procedimento: misturar 25µl do plasma com 25µl do reativo; homogeneizar com rotação suave e fazer a leitura em 5 minutos.

3.2.5.3.2. Marcador Resposta Inflamatória – Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP)

A alfa-1-glicoproteína ácida foi determinada através de reação de imunoturbidimetria com o reagente AGP Wiener Lab no Espectrofotômetro Beckman DU 640. Inicialmente a amostra é diluída em solução fisiológica (1:10). Mistura-se então 80 µl de amostra diluída com 800µl de tampão AGP, e realiza-se a primeira leitura de absorvância em Espectrofotômetro a 340 nm. (A1). Em seguida são adicionados 120µl de anti-soro anti-AGP. A amostra é misturada e após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente realiza-se e segunda leitura de absorvância também em 340 nm (A2). A diferença entre (A1) e (A2) é calculada e multiplicada pelo fator calculado. Para o calculo do fator, o procedimento realizado é o mesmo do ensaio dos testes, porém é utilizado um padrão de valor conhecido.

3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o programa GraphPad Instat[®] (San Diego,CA) para conduzir as análises estatísticas. Para os biomarcadores estudados, foi utilizado o teste Mann Whitney para amostras não pareadas e não paramétricas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Os resultados estão apresentados na forma de gráfica de boxplot, onde é possível avaliar a variação da mediana e dos intervalos interquartis.

4. Resultados e Discussão

4.1. EFEITO DO PROTOCOLO EXAUSTIVO AGUDO SOBRE OS PARÂMETROS DE ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA

As alterações induzidas na atividade plasmática da enzima Creatina Quinase (CK) em função do protocolo de exercício exaustivo agudo estão apresentadas na figura 2.

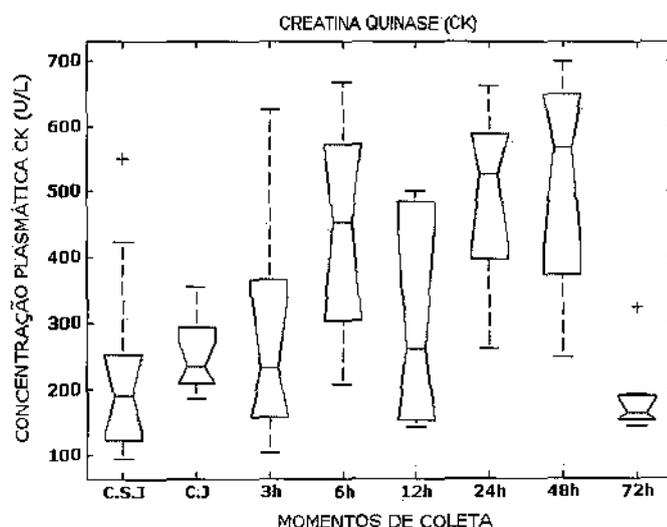


Figura 1: Atividade da Enzima Creatina Quinase no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle (n=12); momentos pós-exaustão (n=8).

Analisando a atividade da enzima CK não verificamos uma influência expressiva do jejum nos valores de mediana dos parâmetros de alteração de permeabilidade de membrana no grupo controle jejum (C.J), comparados aos valores do grupo controle alimentado (C.S.J).

Analisando inicialmente o efeito do exercício, podemos verificar um aumento expressivo nos valores de mediana ($p=0,045$) no momento 6 horas após a aplicação do protocolo de exaustão, comparados as atividades da CK nos grupos controles C.SJ e C.J. Constatamos ainda o estabelecimento de um platô com tendência a aumento quando analisamos os valores de mediana no intervalo de 6 a 48 horas pós-exaustão, comparados aos valores dos grupos C.SJ e C.J.

Após 72 horas da realização do protocolo, a atividade da CK retorna aos valores de mediana quantificados nos grupos controles C.SJ e C.J.

Através desses dados podemos constatar que o exercício exaustivo promove danos agudos às estruturas musculares, refletindo deste modo, no extravasamento de enzimas citosólicas como a CK (VAN DER MEULEN.,1991; VENKATRAMAN ET AL., 2000). Alguns estudos sugerem ainda o extravasamento de outras enzimas como a Lactato Desidrogenase (LDH) ou Glutamato-Oxaloacetato Transaminase(GOT) (VAN DER MEULEN.,1991; VINÃ ET AL.,2000; SACHECK & BLUMBERG,2001). A magnitude de resposta dessa enzima quantificada, em parte, reflete o aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) ou o estresse mecânico representado pelos micro-traumas no tecido muscular esquelético causados pelo exercício físico realizado. Porém, alguns estudos sugerem uma redução no estresse mecânico induzido pelo exercício de natação, uma vez que os ratos são nadadores naturais, ocorrendo, dessa forma, também uma distribuição de fluxo sanguíneo mais eficiente nesse padrão de exercício. Nesse tipo de exercício, verificamos ainda que o output cardíaco e frequência cardíaca apresentam uma faixa estreita de variação de modo que a magnitude de lesão ocorrida via EROS é minimizada também, diminuindo o extravasamento de enzimas citosólicas.(AYDIN ET AL.,2005;RAVI KIRAN.,2004) .

No atual projeto não foi possível diferenciarmos as repostas advindas de ambos os mecanismos, porém, estudos sugerem que o aparecimento das EROS dependem da intensidade e do grau de exaustão no qual o exercício é realizado, sendo mais pronunciada nos exercícios de intensidade máxima e naqueles com uma componente de exaustão acentuada (QUINDRY ET AL.,2003; AYDIN ET AL.,2005) .

VINÃ E COLABORADORES(2000), verificaram que a meia-vida dessas espécies é reduzida e o dano muscular ocorre em uma escala de tempo próximo à produção de EROS. Dessa forma, é estabelecida uma relação de causa-efeito, uma vez que o exercício físico é um potencial indutor na geração de EROS, e portanto, ambos os fenômenos metabólicos e mecânicos, contribuem para progressão do dano muscular e para o estabelecimento da condição de estresse oxidativo pós-exercício (SMITH 2003, AYDIN ET AL.,2005).

Portanto, o aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de mediana na atividade enzimática da CK em relação aos grupos-controle refletem o estresse mecânico e o aumento na produção de EROS durante a aplicação do estímulo exaustivo. Já o platô estabelecido entre os momentos 6 e 48 horas pós-exercício na atividade enzimática da CK, pode ser reflexo do aumento da produção de EROS através da ativação da enzima NADPH-Oxidase (*burst* respiratório) presente na estrutura dos leucócitos recrutados ao sítio da lesão, durante a da reposta inflamatória estabelecida nas figuras 6,7 e 8. Convém ressaltar que durante o processo inflamatório ocorre o aumento significativo no consumo de oxigênio pelos neutrófilos (*burst* respiratório), sendo que, grande parte do oxigênio consumido através da atividade da enzima NADPH - oxidase é convertido a ânion superóxido, ($2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$), acarretando no aumento da produção de agentes oxidantes, como podemos verificar indiretamente nas figuras 3 e 4.

A resposta dos marcadores de estresse oxidativo e resposta Inflamatória apresentados a seguir, mostram uma semelhança comportamental em relação aos dados da atividade plasmática da enzima CK, contribuindo para o entendimento da relação dano muscular, EROS e resposta inflamatória aguda.

4.2.EFEITO DO PROTOCOLO EXAUSTIVO AGUDO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

As alterações induzidas nos marcadores de estresse oxidativo em função do protocolo de exercício exaustivo agudo, representado pelos marcadores albumina, catalase e ácido úrico estão apresentadas nas figuras 3,4 e 5, respectivamente.

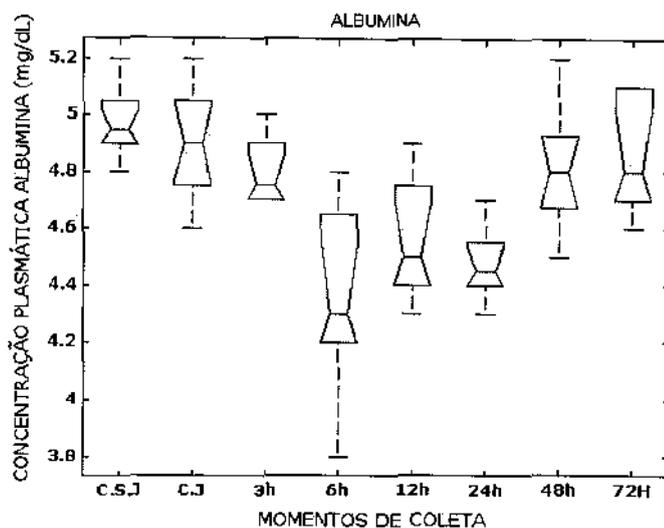


Figura 2: Concentração de Albumina no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle (n=12); momentos pós-exaustão (n=8).

Analisando a cinética da albumina (Figura 3), verificamos uma tendência à diminuição nos valores de mediana 3 horas pós-exercício ($p=0,24$). Podemos observar que 6 horas pós-exercício caracteriza-se uma diminuição significativa ($p=0,003$ e $p=0,001$) nos valores de mediana nas concentrações de albumina no plasma, comparados aos valores observados nos grupos, C.S.J e C.J, respectivamente. O decréscimo observado na concentração de albumina plasmática persiste até 24 pós-execução do protocolo de exaustão. Nos momentos seguintes é verificada uma tendência ao restabelecimento nos níveis plasmáticos desse marcador, sendo que 72 horas pós-exercício observa-se o retorno da mediana a valores próximos aos quantificados nos grupos-controle. Convém ressaltar que o grupo C.J não apresentou diferença significativa em relação ao grupo C.S.J, sendo que os valores observados ao longo da cinética respondem aos efeitos do exercício exaustivo.

Com relação à atividade da enzima catalase, não verificamos um efeito do jejum nos valores de mediana do C.J comparados aos valores de mediana encontrados no grupo C.S.J, como podemos observar na figura 4.

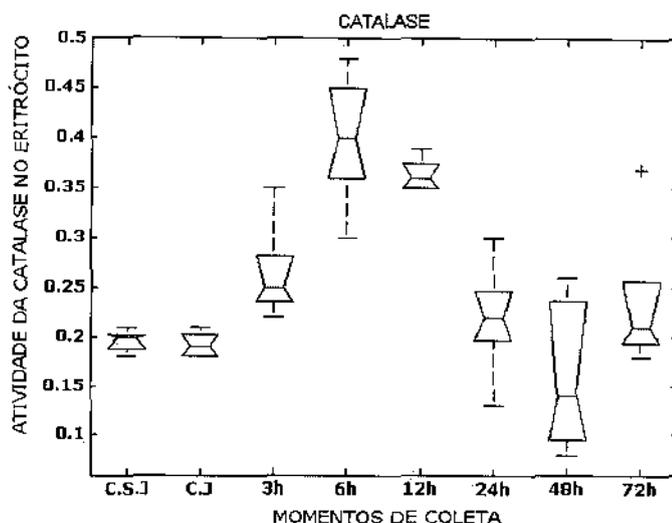


Figura 3: Atividade da Enzima Catalase no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle (n= 5); momentos pós-exaustão (n=5).

Por outro lado, quando observamos os valores de mediana pós-exercício, comparados aos valores encontrados nos grupos C.S.J e C.J, verificamos um aumento significativo na atividade da enzima catalase no momento 3 horas ($p=0,007$) pós-exaustão, estabelecendo um pico ($p=0,007$) de atividade no momento 6 horas e mantendo-se aumentado significativamente ($p=0,007$) até 12 horas pós-exercício. Porém, convém ressaltarmos que no momento 24 horas pós-exaustão os valores de mediana da atividade da enzima, embora não apresentem diferença significativa ($p=0,15$) comparada aos grupos C.S.J e C.J, ainda apresentam-se acima dos valores de mediana dos grupos-controle. A atividade da enzima catalase retorna aos valores encontrados nos grupos C.S.J e C.J 48 a 72 horas pós-execução do protocolo exaustivo agudo.

Ao observamos a cinética de concentração de ácido úrico no plasma (Figura 5), quando comparamos os valores de mediana do grupo C.J em relação ao grupo C.S.J, podemos observar que o jejum reduziu significativamente ($p=0,01$) os níveis plasmáticos de ácido úrico.

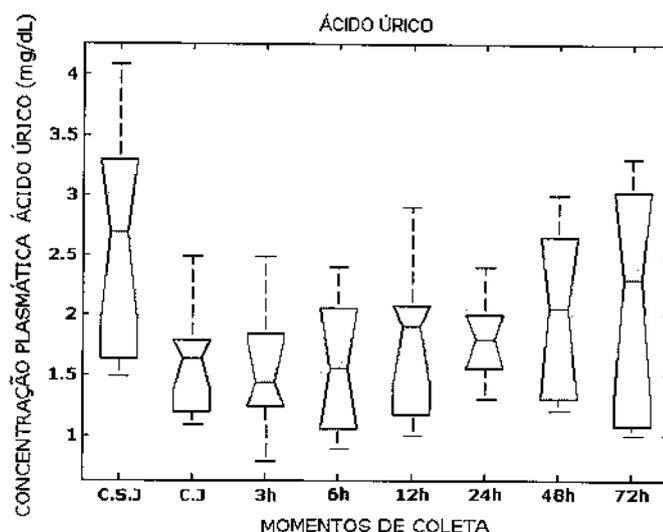


Figura 4: Concentração de Ácido Úrico no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle (n=12); momentos pós-exaustão (n=8).

Com relação aos valores de mediana do ácido úrico 3 horas pós-exaustão comparados aos valores do grupo C.J, observamos uma leve tendência à diminuição ($p=0,78$), portanto, não foi possível observar um decréscimo significativo na concentração de ácido úrico no plasma em decorrência ao estímulo do exercício, sendo que o comportamento observado na cinética desse marcador pode se dever ao jejum pré-exercício. Porém, ainda assim, podemos observar um comportamento semelhante entre a cinética de ácido úrico e albumina.

Correlacionando os dados de alteração de permeabilidade de membrana aos dados de estresse oxidativo, podemos verificar que ocorreu um aumento na condição de estresse oxidativo, que se inicia 3 horas pós-exaustão e atingiu um pico 6 horas pós-exaustão, retornando a níveis pré-exaustão (C.S.J e C.J) 48 horas após a aplicação do PEE.

A condição de estresse oxidativo estabelecida pós-exaustão, parece contribuir para a regeneração da função e da morfologia do tecido muscular esquelético lesionado (ALESSIO, 1993; SMOLKA ET AL., 2000; REID, 2001; REID & DURHAM, 2002) entretanto, as EROS produzidas durante essa situação não diferenciam o tecido íntegro do tecido danificado, podendo exacerbar o dano inicial. Dessa forma, a atividade das EROS é controlada com o aumento das proteínas

responsáveis (Proteínas de Fase Aguda - PFA) pelo controle desse ataque oxidativo às estruturas danificadas.

Portanto, o retorno aos níveis basais dos parâmetros de estresse oxidativo estabelecidas pré-exaustão (C.S.J e C.J) no momento 48 horas pós-exaustão, pode se dever ao aumento da expressão das proteínas de fase aguda, característica da resposta inflamatória, como podemos observar nas figuras seguir.

4.3.EFEITO DO PROTOCOLO EXAUSTIVO AGUDO SOBRE OS PARÂMETROS DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA

As alterações induzidas na contagem de leucócitos em função do protocolo de exercício exaustivo agudo estão apresentadas na Figura 6.

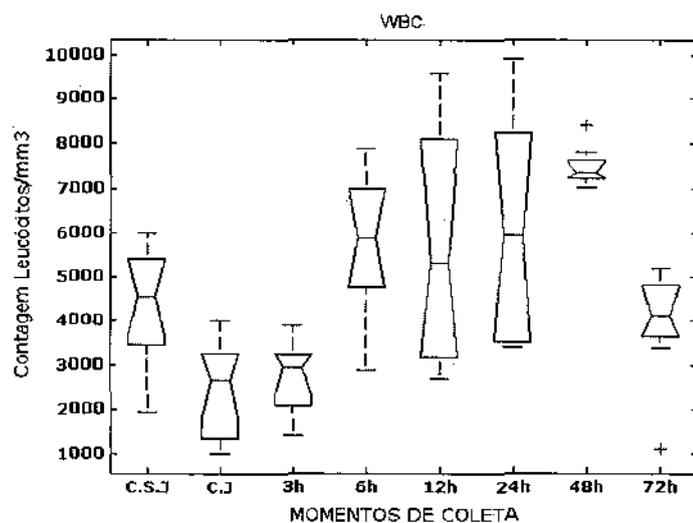


Figura 5: Contagem de Leucócitos no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle (n=12); momentos pós-exaustão (n=8).

Analisando inicialmente a contagem de leucócitos verificamos uma diminuição significativa ($p=0,003$) nos valores de mediana do grupo C.J, comparados aos valores do grupo C.S.J. Podemos constatar, portanto, que o jejum gera uma diminuição na contagem de leucócitos. Alguns estudos sugerem que uma diminuição dos aminoácidos plasmáticos, principalmente a glutamina (NEWSHOLME, 1994), poderia ser um fator responsável por esse comportamento apresentado no gráfico acima, levando a uma diminuição na contagem plasmática de leucócitos (leucopenia) observada na figura 6.

Já analisando o efeito do exercício, podemos verificar uma tendência ($p=0,04$) a um aumento nos valores de mediana 6 horas pós-exercício, comparados aos valores encontrados no grupo C.S.J. Constatamos ainda que nos momentos seguintes, 12 e 24 horas pós-exercício, apesar da dispersão dos dados aumentarem com relação à mediana, observa-se um platô com tendência a aumento nos valores de mediana ($p=0,37$ e $p=0,24$, respectivamente) comparados aos valores do grupo C.S.J.

Enfim, 48 horas pós-exercício observamos um aumento significativo ($p=0,001$) nos valores de mediana na contagem de leucócitos comparados aos valores do grupo C.S.J. Em seguida, 72 horas pós-exercício, verificamos um retorno dos valores de mediana aos valores encontrados no grupo C.S.J, que coincide com o pico das proteínas de fase aguda, como podemos verificar nas figuras 7 e 8.

Na figura 7 estão apresentadas as alterações induzidas na concentração plasmática da proteína Alfa-1-Glicoproteína Ácida em função do protocolo de exercício exaustivo agudo.

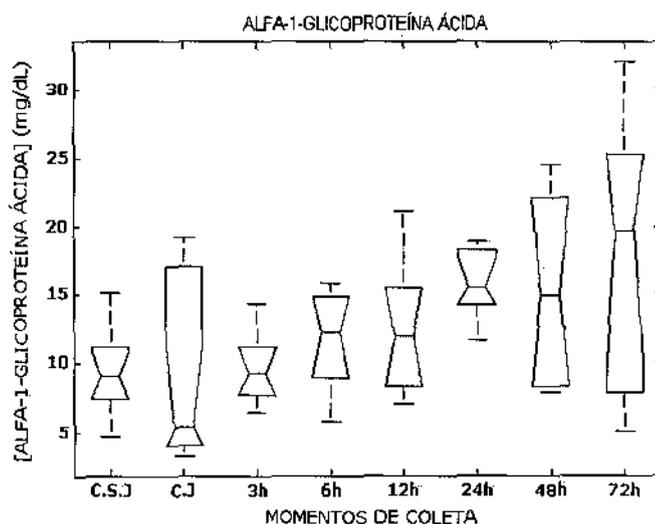


Figura 6: Concentração da proteína Alfa-1-glicoproteína Ácida no plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle ($n=12$); momentos pós-exaustão ($n=8$).

Observando a figura 7, verificamos que o jejum não apresentou influência significativa ($p=0,58$) nos valores de mediana deste grupo, comparado aos valores encontrados no grupo C.S.J. observando-se apenas um aumento na dispersão dos valores em torno da mediana.

Com relação, ao efeito do exercício nas concentrações plasmáticas de Alfa-1-Glicoproteína Ácida, observamos uma leve tendência a aumento ($p=0,20$) nos valores de mediana 6 horas pós-execução do protocolo comparados aos valores do grupo C.S.J.

Ainda analisando os valores de mediana 24 e 48 horas pós-exercício, foi verificado um aumento significativo ($p=0,001$ e $p=0,08$ respectivamente) na concentração plasmática de Alfa-1-Glicoproteína Ácida em relação ao grupo C.S.J, sendo que em 72 horas pós-exercício foi encontrado um pico ($p=0,13$) na concentração plasmática de Alfa-1-Glicoproteína Ácida, corroborando com os dados apresentados na literatura (MOODIE & LABADARIOS,1997).

Um comportamento semelhante pôde ser notado nas alterações induzidas na concentração plasmática da Proteína-C-Reativa (PCR) apresentada na figura 8.

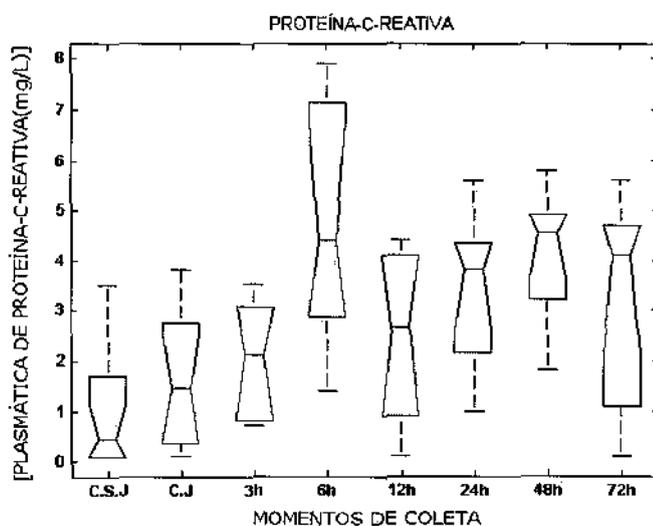


Figura 7 : Concentração de Proteína-C-Reativa no Plasma de ratos submetidos ao protocolo de exaustão. Os resultados são apresentados na forma gráfica de boxplot; grupo controle ($n=12$); momentos pós-exaustão ($n=8$).

Assim como observado na figura 7, verificamos que o jejum não apresentou influência significativa ($p=0,29$) nos valores de mediana do grupo C.J comparados aos valores encontrados no grupo C.S.J com relação à PCR (Figura 8).

Já nos momentos após realização do protocolo, observamos uma leve tendência a aumento ($p=0,08$) 3 horas pós-exercício, sendo que, 6 horas após, verificamos um

aumento significativo ($p=0,001$) nos valores de mediana, comparados aos valores de mediana dos grupos C.S.J e C.J.

Analisando os momentos 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós-exercício, podemos sugerir o estabelecimento de um platô, com diferença significativa, nos valores de mediana comparados aos valores dos grupos C.S.J e C.J. Ainda assim, podemos observar uma tendência à formação de um pico na concentração plasmática de PCR, 48 horas pós-exercício, corroborando com dados encontrados na literatura (VALTCHOUGANSKA ET AL.,2004; GIFFEN ET AL.,2003).

Dessa forma, podemos estabelecer uma relação entre o aumento da concentração plasmática das Proteínas de Fase Aguda 48-72 horas pós-exercício (Figura 7 e 8) e :

- ✓ o retorno dos valores de leucócitos 72 horas pós-exercício aos valores quantificados no grupo controle alimentado;
- ✓ a diminuição do extravasamento de conteúdo citosólico (CK) 72 pós-exercício;
- ✓ diminuição do ataque oxidativo e o retorno a níveis pré-exaustão no sistema de defesa antioxidante 48 horas pós-exercício.

4.4.DISCUSSÃO

No atual projeto, confrontamos os dados quantificados aos dados apresentados na literatura, objetivando delinear a relação causa-conseqüência entre a tríade dano muscular , estresse oxidativo e processo inflamatório

Os estudos observados mostram que o processo inflamatório pode ser desencadeado por diversos mecanismos dentre os quais podemos citar o estresse mecânico, isquemia local e geração de EROS na musculatura esquelética, principalmente após o exercício de alta intensidade, no sentido de reparar o tecido lesado (VENKATRAMAN ET AL., 2000).

A resposta à inflamação é um mecanismo muito bem elaborado e sincronizado, com grande capacidade de amplificação em cada passo, visando o movimento de fluídos, proteínas de fase aguda e de leucócitos da circulação para o local lesionado (HELLSTEN ET AL., 1997; CHILD ET AL., 1999; MALM, 2001)

Primeiramente, os macrófagos localizados no tecido lesado são ativados por alguns fatores locais relacionados à lesão e liberam as “citoquinas alarme” (BAUMANN

ET AL., 1994), que induzem a produção adicional de IL-1 e TNF- α , além de interleucina 6 (IL-6) pelas células endoteliais locais, células epiteliais, fibroblastos, monócitos circulantes e macrófagos.

Simultaneamente à liberação das citocinas de alarme, as EROS contribuem para a ativação de fatores de transcrição gênica localizados no núcleo das células, sinalizando o aumento da produção de citocinas, favorecendo dessa forma a amplificação da resposta inflamatória.

As EROS apresentam um amplo repertório de funções, dentre os quais podemos citar a propagação do dano muscular, remoção de restos celulares, cura e regeneração de tecidos, além de serem potentes estimuladores da expressão gênica de alguns fatores de ativação que contribuem para a consolidação da resposta inflamatória (CLOSA & FOLCH-PUY, 2004).

Este *pool* de citocinas liberado na corrente sanguínea comanda, coordena e integra o tráfego de vários tipos de células de defesa (RHIND ET AL., 1995), juntamente com as moléculas de adesão celular e com as quimioquinas, mediando as modificações locais e sistêmicas, bem como o término da inflamação (SMITH & MILES, 2003). O aumento das citocinas contribuem, dessa forma, para o recrutamento de leucócitos ao tecido lesionado.

Os leucócitos, como parte integrante do sistema imune, são os primeiros a responder à lesão tecidual. Os leucócitos que atuam no sítio da inflamação são de dois tipos: neutrófilos polimorfonucleares (eosinófilos, basófilos, segmentados e bastonetes) e células mononucleares (monócitos e linfócitos) (SMITH, 2000; RANG & DALE, 1999). Os neutrófilos são a primeira sub-população de leucócitos a aparecer no local lesionado (PIZZA ET AL., 2002). Eles são produzidos na medula óssea, e representam cerca de 50 a 60% do total de leucócitos circulantes no sangue (TIDBALL, 1995). Muitos estudos têm reportado um aumento imediato nos neutrófilos circulantes durante e após o exercício, que se correlaciona com o aumento nos níveis plasmáticos dos hormônios epinefrina e cortisol (QUINDRY ET AL., 2003; PYNE, 1994).

Os leucócitos recrutados através da ação das moléculas de adesão celular aderem-se fortemente à parede do endotélio vascular no local inflamado e,

posteriormente, na presença das quimioquinas, ocorre a migração (diapedese) dos leucócitos da corrente sanguínea para o sítio da inflamação (CALICH & VAZ, 2001).

A função predominante dos neutrófilos é a remoção dos elementos indesejáveis relacionados à lesão tecidual por fagocitose (SMITH, 2000). Os neutrófilos ativados também liberam proteases lisossomais, que degradam as proteínas locais, além de formar EROS pós-exercício, como resultado do *burst* respiratório (QUINDRY ET AL., 2003; PYNE, 1994). As EROS incluem um amplo espectro de espécies radicalares, como o radical ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($\cdot OH$) e não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que exibem em maior ou menor grau, atividade oxidante. Dessa forma, as EROS produzem uns ambientes hostis, causando morte ou destruição tecidual, sendo que parte desta destruição permite regeneração do tecido lesionado.

Porém, a destruição pode se estender também ao tecido sadio, visto que os neutrófilos podem conter mais de 40 enzimas hidrolíticas e moléculas tóxicas em seus grânulos, além de poder gerar vários oxidantes (PYNE, 1994; SMITH, 2000; TOURNI & BEST, 2003). Nesse sentido, os neutrófilos estariam contribuindo para um dano secundário no músculo através da liberação de EROS pós-exercício durante a fagocitose, podendo levar a um quadro de inflamação crônica (TOURNI & BEST, 2003), que também obriga o atleta a parar suas atividades (PYNE, 1994).

Os monócitos formam a segunda sub-população de leucócitos a aparecer no local lesionado. Quando essas células se movem da circulação para os tecidos são transformados em macrófagos (TIDBALL, 1995). Os dados encontrados por PIZZA parecem indicar que os macrófagos aumentam no músculo somente quando os principais sinais de lesão são evidentes (PIZZA ET AL., 2002). Quando estão ativados, ou como monócitos circulantes ou como macrófagos teciduais, são capazes de secretar cerca de 100 compostos químicos diferentes, constituindo-se num passo central do processo inflamatório local e sistêmico (AZEVEDO ET AL., 2001; HUGHES, 1998).

Sistemicamente, a $TNF-\alpha$ e a $IL-1$ são capazes de atuar no sistema nervoso central, com receptores no hipotálamo, promovendo febre. A ligação das citocinas no hipotálamo também resulta em ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e núcleo

simpático, resultando em concentrações elevadas de cortisol e catecolaminas, respectivamente, os tradicionais hormônios do estresse (SMITH,2000). O cortisol e citocinas antiinflamatórias agem concomitantemente e induzem uma série de eventos responsáveis pelo término do processo inflamatório, bem como a cura (WEICKER & WERLE,1991).

Além de sua atuação no sistema nervoso central, as citocinas promovem também a síntese hepática de proteínas de fase aguda (alfa-1-glicoproteína ácida, PCR e amilóide sérico A) (BAUMANN,1994; FALLON ET AL,2001;RIDKER ET AL,2001). A síntese dessas proteínas representa um aspecto crucial da resposta imune/inflamatória, pois são elas que ajudam a conter a amplificação potencialmente letal da inflamação, servindo como agentes protetores junto ao dano excessivo que pode ser resultado do evento inflamatório, ocasionado pelas enzimas catabólicas e EROS liberadas pelas células fagocitárias (FLECK ET AL., 1983; MACINTYRE, 1988; BAUMANN & GAULDIE, 1994; KOJ & GUZDEK, 1995), que podem levar ao aumento nos níveis de dano muscular, conforme mostrado na Figura 9.



Esquema 2. Mecanismo proposto para a relação entre a resposta inflamatória e danos musculares adicionais mediados pela ação de EROS.

5.Considerações Finais e Conclusões

Analisando os dados da atividade plasmática da enzima CK, apresentados no presente projeto foi possível verificar que *durante e após* a realização do protocolo de exercício exaustivo agudo parece ocorrer um aumento na produção de EROS, bem como o estresse mecânico na estrutura músculo-tendínea em decorrência da sobrecarga proporcionada pelo do exercício de natação.

Tanto o estresse mecânico como a produção de EROS durante o estímulo desempenham papéis de mediadores da resposta inflamatória, refletindo dessa forma no aumento de leucócitos na corrente sanguínea e no sítio da lesão muscular. Os leucócitos, através do aumento do consumo de oxigênio (*burst* respiratório), proporcionam o aumento adicional na produção de EROS na musculatura esquelética, promovendo paradoxalmente a regeneração tecidual e ao mesmo tempo contribuindo para desencadear uma cascata de eventos, dentre eles o aumento das proteínas de fase aguda verificados nas Figuras 7 e 8, que contribuem para o término da resposta inflamatória e conseqüentemente a cura e o restabelecimento da homeostasia.

Assim, o protocolo foi capaz de refletir as alterações provenientes do dano muscular, do estresse oxidativo e da resposta inflamatória, de modo que o dano muscular e a condição estresse oxidativo parecem anteceder e mediar o pico da resposta inflamatória 48 a 72 horas pós-exercício. Enquanto isso o pico da condição de estresse oxidativo iniciou-se no momento 6 horas retornando as condições basais nos momentos 24 a 48 horas pós-exaustão .

Os dados apresentados nessa monografia corroboram para o progresso no entendimento e delineamento da relação entre a formação de EROS e a instalação da resposta inflamatória. Porém,o entendimento dessa relação tem sido dificultado pela falta de modelos apropriados de processo inflamatório em humanos e ratos.

Portanto dentro das conclusões retiradas do projeto, observou-se a necessidade de aprimorar nosso modelo de exercício agudo a partir desses dados, de forma a visualizar com clareza a instalação do processo inflamatório independente da condição de jejum, posteriormente objetivamos analisar uma situação crônica de desequilíbrio

entre estímulo e recuperação (*overreaching /overtraining*), buscando utilizar os mesmos biomarcadores para diagnosticar a magnitude desse desequilíbrio e validar seu uso na detecção do (*overreaching /overtraining*).

Referências Bibliográficas

ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.*v.25, p.218-224, 1993.

ASTRAND, P.-O. & RODAHL, K. **Textbook of Work Physiology.** Physiological Bases of Exercise, New York: McGraw-Hill inc, 1986.

AYDIN C, INCE E, KOPARAN S, CANGUL IT, NAZIROGLU M, AK F. Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochem Funct.*Sep, v.5, p. 2005 (*in press*)

AZEVEDO,R.B.,CHAVES,S.B.,MIYASAKA,C.K.,LACAVA,Z.G.M.,CURI,R. Antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages: Regulation by Sex steroids. **Braz Med Biol Res**, 2001 (*in press*).

BAGBY, G.J., SAWAYA,D.E., CROUCH,L.D., SHEPHERD,R.E. Prior exercise suppresses the plasma tumor necrosis factor response to bacterial lipopolysaccharide. **J Appl Physiol.**v.77,n.3,p.1542-1547,1994.

BAUMANN,H.,GAULDIE,J. The acute phase response. **Immunol Today.** v.15,p.74-80, 1994.

BECKMAN, J.S., BECKMAN, T. & FREEMAN, B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endotelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87:1620-1624, 1990.

BOMPA,TUDOR O. **Periodização: Teoria e Metodologia do Treinamento.** Phorte Ed. São Paulo,1ª Edição,2002.

BRUIN,G., KUIPERS, H., KEIZER, H.A. & VANDER VUSSE, G.J. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **J. Appl. Physiol.** v.76, n.5, p.1908-1913, 1994.

CALICH, V., VAZ, C. Imunidade natural e inflamação. *In: Imunologia*, p.11-30, Ed. Revinter, Rio de Janeiro/RJ, 2001.

CHILD, R., BROWN, S., DAY, S., DONNELLY, S., ROPER, H., SAXTON, J. Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. **Clin. Sci. (Colch)**, v.96, p.105-115, 1999.

CLOSA, D., FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB Life**. Apr, V.56, n.4, p.185-191, 2004. Review.

CONNER, E.M., GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals and antioxidants. **Nutrition**. v.12, n.4, p.274-277, 1996.

COSTILL, D. L., FLYNN, M. G., KIRWAN, J. P., HOUMARD, J. A., MITCHELL, J. B., THOMAS, R. & PARK, S. H. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.20, n.3, p.249-254, 1988.

CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, C.K., PROCOPIO, J. Ácidos graxos e função dos leucócitos. *In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. p.301-305, Editora Manole, São Paulo/SP, 2002.

DAVIES, K.J.A., QUINTANILHA, A. T., BROOKS, G. A. & PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Acta**. v.107, p.1198-1205, 1982.

DOHM, G. L., WILLIAMS, R. T., KASPEREK, G. J. & VAN RIJ, A. M. Increased excretion of urea and N-methylhistidine by rats and humans after a bout of exercise. **J. Appl. Physiol.** v.52, p.27-33, 1982.

DILLARD, C. J. LITOV, R. E., SAVIN, W. N., DUMELIN, E. E. & TAPPEL, A. L. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. **J. Appl. Physiol.** v.45, n.6, p.927-32, 1978.

EVANS, W.J., MEREDITH, C.N., CANNON, J.G., et al. Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. **J Appl Physiol**. v.61, p.1864-1868, 1986.

FALLON, K.E., FALLON S.K., BOSTON, T. The acute phase and exercise: count and field sports. **Br J Sports Med.**, v. 35, p.170-173, 2001.

FANG, C., YOON, S., TINDBERG, N., JARVELAINEN, A., LINDROS, K.O., INGELMAN-SUNDBERG, M. Hepatic expression of multiple acute phase proteins and down-regulation of

nuclear receptors after acute endotoxin exposure. **Biochem Pharmacol.** v.67, n.7, p.1389-97, 2004.

FLECK, C.M., COLLEY, A.W., GOODE, A.W., MULLER, B.R., MYERS, A.P.P. Early time course of the acute phase protein in man. **J. Clin. Pathol.** v.36, p.203-207, 1983.

FLESHNER, M. Exercise and neuroendocrine regulation of antibody production: protective effect of physical activity on stress-induced suppression of the specific antibody response. **Int J Sports Med.**v.21, n.1, p.14-19.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** 64, 97, 1995.

FRY, R. W., MORTON, A. R. & KEAST, D. Overtraining in athletes: an update. **Sports Med.** v.12, p.32-65, 1991.

FRY, R. W., MORTON, A. R. & KEAST, D. Periodization of training stress - a review. **Can. J. Sports and Sci.** v.17, n.3, p.234-240, 1992.

GANARAJA, B., PAVITHRAN, P., GHOSH, S. Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress. **Indian J. Med. Sci.** v.58, n.4, p.150-154, 2004.

GANDRA, P. G., ALVES, A. A., MACEDO, D. V. & KUBOTA, L. T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, 2004, aceite.

GIFFEN,P.S., TURTON,J., ANDREWS,C.M., BARRETT,P., CLARKE, C.J., FUNG,K.W., MUNDAY,M.R., ROMAN,I.F., SMYTH,R., WALSHE,K., YORK,M.J. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. **Arch Toxicol.** v.77,n.7,p.392-402, 2003

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Tell me about free radicals, doctor: a review. **J. R. Soc. Med.** 82 (12): 747-752, 1989.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **In: Free Radicals in Biology and Medicine.** 3^a ed. Oxford University Press, 1999.

HAYASHI,T, SUDA,K, IMAI,H, ERA,S. Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the investigation of dynamic changes in the redox state of rat serum albumin. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v.772, n.1, p.139-146, 2002

HARRI,M., KUUSELA,P.Is swimming exercise or cold exposure for rats? Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand.**Feb,v.126, n.2, p.189-97,1986.

HELLSTEN, Y., FRANSEN, U., ORTHENBLAD, N., SJODIN, B., RICHTER, E.A. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. **J. Physiol.** v.498, p.239-248, 1997.

HUGHES,D.A. In vitro and in vivo effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on human monocyte function. **Proc Nutr Soc.** v.57,p.521-525,1998.

HULTMAN, E. & SJÖHOLM, H. Substrate availability. In: Knuttgen, H. G., Vogel, J. A., Poortmans, J. (eds). **Biochemistry of Exercise V**, Champaign: Human Kinetics, 1986.

JENKINS, R.R. & GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 25 (2): 210-212, 1993

JOHNSON, M. B. & THIESE, S. M. A review of overtraining syndrome: recognizing the signs and symptoms. **J. Athletic Training.** v. 27, n.4, p.352-354, 1992.

JONSDOTTIR, I.H. Exercise immunology: neuroendocrine regulation of NK-cells. **Int. J. Sports Med.** v.21, n.1, p. 20-23, 2000.

KOJ, A., GUZDEK, A. Modified proteins as possible signals in the acute phase response. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.762, p.108-119, 1995.

KRAEMER, W. J. & NINDL, B. C. Factors involved with overtraining for strength and power. In: Kreider, R. B., Fry, A. C. & O'Toole, M. L. (eds). **Overtraining in sports. Champaign: Human Kinetics**, 1997.

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

KING, D.E., CAREK, P., MAINOUS, A.G., PEARSON, W.S. Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.35, n.4, p.575-581, 2003.

KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.30,n.7,p.1137-1139, 1998.

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

LEHMANN, M.J., LORMES, W., OPITZ-GRESS, A., STEINACKER, J.M., NETZER, N., FOSTER, C. & GASTMANN, U. Training and overtraining: an overview and experimental results in endurance sports. **J. Sports Med. Phys. Fitness.**v.37, n.1, p.7-17, 1997.

LEONARD, P., HEARTY, S., BRENNAN, J., DUNNE, L., QUINN, J., CHAKRABORTY, T., O'KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. **Enzyme Microb. Tech.** v.32,p.3-13, 2003.

McARDLE, W.D., MONTOYE, H.J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. **J. Appl. Physiol.** v.21, n.4, p.1431-1434, 1966.

MACINTYRE, S.S. C-reactive protein. In: **Methods Enzimology**, v.163, p.383-399, 1988.

MALM, C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? **Acta Physiol. Scand.** v.171, n.3, p.233-239, 2001.

MEYDANI, M. & EVANS, W. J. Free radicals, exercise and aging. In: **Yu, B.P., Ed. Free Radical in Aging.** Boca Raton, FL: CRC Press, p.183-204, 1993.

MOODIE, I.M., LABADARIOS, D.A. rapid method of monitoring the acute phase response in a rat model. **S Afr Med J.** Jan, v.87, Suppl1, p.100-2.1997

MOROZOV, V.I., PRYATKIN, S.A., KALINSKIM M.I., ROGOZKIN, V.A. Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.89, n.3-4, p.257-262, 2003.

NIKOLOVSKI,S.,FAULKNER,D.L,PALMER,T.N,FOURNIER,P.A. Muscle glycogen repletion from endogenous carbon sources during recovery from high intensity exercise in the fasted rat. **Acta Physiol Scand**.v.157(Aug),n.4,p.427-34,1996.

NEWSHOLME,E.A. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. **Int J Sports Med**. Oct ,v. 15, Suppl 3, p.142-7,1994.

NEWSHOLME, E. A., PARRY-BILLINGS, M., MCANDREW, N. & BUDGETT, R. A biochemical mechanism to explain some characteristics of overtraining. In: **Advances in nutrition and sports**, F. Brouns (editor). Basel: karger. pp. 79-83, 1991.

NICHOLLS, D. G. **Bioenergetics: an introduction to the chemiosmotic theory**. Academy Press Inc. London, 1982.

NOAKES, T. D. Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. **Scand. J. Med. Sci. Sports**.v.10, n.3, p.123-145, 2000.

PIZZA, F.X., KOH, T. J., MCGREGOR, S. J., BROOKS, S.V., Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. **J Appl Physiol**. v. 92, p.1873-1878, 2002.

PETIBOIS, C., CAZORLA, G., POORTMANS, J. R. & DELERIS, G. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. **Sports Med**. v.33, p.83-94, 2003.

POWERS, S. K. & HAMILTON, K. Antioxidants and exercise. **Clin. Sports Med**. v.18 n.3, p. 525-536, 1999.

PYNE,D.B.Regulation of neutropil function during exercise. **Sports Med**. v.17, p.245-258, 1994.

QUINDRY,J.C,STONE,W.L.,KING,J.,BROEDER,C.E.The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress.**Med Sci Sports Exerc**.Jul,v.35,n.7,p.1139-45.2003

RANG, H. P., DALE, M.M. *in Farmacologia*, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

RAVI KIRAN,T.,SUBRAMANYAM,M.V.,ASHA DEVI,S.Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration.**Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**.Feb, v.137, n.2, p.187-196.

REID, M. B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.33, n. 3, p. 371-376, 2001.

REID, M. B. & DURHAM, W. J. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle – potential impact on aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.959,p.108-116, 2002.

RHIND,S.G.,SHEK,P.N.,SHEPHARD,.R.J. The impact of exercise on cytokines and receptor expression. **Exp. Immunol. Rev.** v.1, p.97-148, 1995.

RIDKER, P. M., STAMPFER, M. J., RIFAI, N., Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. **JAMA.** v. 285, n.19, p.2481-2485, 2001.

ROWBOTTOM, D. G., KEAST, D., GOODMAN, C. & MORTON, A. R. The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.70, n.6, p. 502-509, 1995.

ROWBOTTOM, D. G., KEAST, D., GREEN, S., KAKULAS, B. & MORTON, A. R. The case history of an elite ultra-endurance cyclist who developed chronic fatigue syndrome. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.30,n.9,p.1345-1348, 1998.

SACHECK,J.M.,BLUMBERG,J.B. Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. **Nutrition.** Oct.v.17,n.10,p.809-814.Review. 2001

SMITH,L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stresses? **Med.Sci.Sports Exerc.**v.32, n.2, p.317-331, 2000.

SMITH, L.L., MILES, M.P. Lesão muscular e inflamação induzidas pelo exercício físico. **In: A ciência do exercício e dos esportes** (Garrett, W.E., Kirkendall, D.T.), p.431-441, Editora ARTMED, Porto Alegre/RS, 2003.

SMOLKA, M. B., ZOPPI, C. C., ALVES, A. A., SILVEIRA, L. R., MARANGONI, S., PEREIRA-DA-SILVA, L., NOVELLO, J. C., MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol.** v.279, p.1539-R1545, 2000.

SNYDER, A. C. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.30, n.7, p.1146-1150, 1998.

TIDBALL, J.G., Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med and Sci in Sports and Exerc.** v. 27, n. 7, p.1022-1032, 1995.

TIIDUS, P.M. Free Radical species in inflammation and overtraining. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.76, n.5, p.533-538, 1998.

TOURNI, H., BEST, T. M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? **Br J Sports Med.**v.37, p.284-286, 2003.

UTSUYAMA, M., ICHIKAWA, M., KONNO-SHIRAKAWA, A., FUJITA, Y., HIROKAWA, K. Retardation of the age-associated decline of immune functions in aging rats under dietary restriction and daily physical exercise. **Mech. Ageing Dev.** v.91, n.3, p.219-228,1996.

VALLET, B. Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. **Crit Care Med.** May, v.30, Suppl5, p.229-34, 2002.

VAN DER MEULEN,J.H.,KUIPERS,H.,DRUKKER,J.Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats.**J Appl Physiol.**v.71, p.999-1004.1991.

VENKATRAMAN, J.T., LEDDY, J., PENDERGAST, D. Dietary fats and immune status in athletes: clinical implications. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.32, n.7,p.389-395, 2000.

VINA J, GOMEZ-CABRERA MC, LLORET A, MARQUEZ R, MINANA JB, PALLARDO FV, SASTRE J.Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants.**IUBMB Life.**Oct-Nov,v.50, n.4-5, p.271-277.2000.Review.

WEICKER,H.WERLE,E. Interaction between hormones and the immune system. **Int J Sports Med.** v.12,p.30-37,1991

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

ZOPPI, C. C., ANTUNES-NETO, J. M., CATANHO, F. O., GOULART, L. F., MOTTA E MOURA, N. & MACEDO, D. V. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. Paul.Ed. Fis.** v.17, n.2, p.119-130, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - VALORES REFERENTES À CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA ENZIMA CREATINA QUINASE (CK)

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24h	48h	72h
1	125	211	164	396	294	524	249	187
2	98	239	467	284	228	386	390	322
3	94	226	625	208	499	525	355	192
4	216	323	246	322	486	610	620	148
5	265	207	221	614	482	260	641	155
6	150	335	103	508	141	662	700	141
7	240	230	155	668	145	567	657	154
8	200	210	263	531	161	406	515	172
9	184	244						
10	121	189						
11	423	293						
12	580	290						
MÉDIA	225	250	281	441	305	493	516	184
DESVIO PADRÃO	144	48	177	164	161	133	166	59
MEDIANA	192	235	234	452	261	525	568	164
VALOR MÍNIMO	94	189	103	208	141	260	249	141
VALOR MÁXIMO	580	335	625	668	499	662	700	322

* UNIDADE : (U/L)

**APÊNDICE 2 - VALORES REFERENTES À CINÉTICA DA CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS
(WBC)**

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24h	48h	72h
1	6000	2800	3100	5700	3667	3433	7400	4150
2	3500	1266	3300	6100	4267	7500	8400	3400
3	5400	1000	3150	7900	6800	7400	7500	1100
4	5400	2500	2200	5000	2700	4500	7050	3900
5	5500	4000	1400	4500	9600	9900	7805	4600
6	4800	1300	2800	6200	2700	3600	7200	5200
7	4300	1400	2000	7800	9400	3400	7250	5000
8	1950	3500	3900	2900	6400	9000	7300	4100
9	2700	2800						
10	5000	3000						
11	3400	3800						
12	3900	2200						
MÉDIA	4321	2464	2731	5763	5692	6092	7488	3931
DESVIO PADRÃO	1250	1039	810	1665	2798	2665	432	1286
MEDIANA	4550	2650	2950	5900	5334	5950	7350	4125
VALOR MÍNIMO	1950	1000	1400	2900	2700	3400	7050	1100
VALOR MÁXIMO	6000	4000	3900	7900	9600	9900	8400	5200

* UNIDADE : Contagem/mm³

**APÊNDICE 3 - VALORES REFERENTES À CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA
PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR)**

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24h	48h	72h
1	0,1	2,8	0,7	1,4	1,3	1,0	4,5	2,1
2	0,1	3,8	0,8	2,8	4,4	4,4	4,6	5,6
3	3,5	2,5	3,2	4,8	4,2	4,3	1,8	4,1
4	0,1	1,9	1,7	2,9	4,0	3,1	2,4	4,1
5	0,1	0,1	0,8	4,0	3,5	5,6	5,2	4,6
6	0,1	1,0	3,5	7,9	0,5	1,2	5,2	4,8
7	1,2	0,1	2,5	6,7	1,8	3,5	4,0	0,1
8	0,6	0,2	2,9	7,6	0,1	4,1	4,6	0,1
9	0,3	2,7						
10	3,5	0,6						
11	2,2	3,1						
12	1,7	0,5						
MÉDIA	1,1	1,6	2,0	4,8	2,5	3,4	4,0	3,2
DESVIO PADRÃO	1,3	1,3	1,2	2,4	1,7	1,6	1,3	2,1
MEDIANA	0,5	1,5	2,1	4,4	2,7	3,8	4,6	4,1
VALOR MÍNIMO	0,1	0,1	0,7	1,4	0,1	1,0	1,8	0,1
VALOR MÁXIMO	3,5	3,8	3,5	7,9	4,4	5,6	5,2	5,6

* UNIDADE : (mg/L)

APÊNCIDE 4 - VALORES REFERENTES À CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ALFA-1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP)

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24h	48h	72h
1	14,0	17,4	7,1	14,9	21,1	14,6	17,5	24,4
2	10,7	16,8	14,4	14,8	16,2	18,2	21,4	26,1
3	11,2	16,6	10,1	15,8	14,8	14,6	7,9	32,1
4	8,7	19,0	12,2	8,9	14,4	16,4	24,5	20,8
5	7,9	19,2	8,4	14,8	9,6	18,5	22,8	18,5
6	6,9	3,4	6,4	9,7	7,0	18,9	12,3	7,8
7	4,7	3,8	10,1	5,8	8,6	14,0	8,2	8,0
8	8,3	4,5	8,4	9,1	7,9	11,7	8,4	5,1
9	11,2	5,7						
10	15,1	3,3						
11	9,4	4,2						
12	6,2	5,0						
MÉDIA	9,5	9,9	9,6	11,7	12,5	15,9	15,4	17,9
DESVIO PADRÃO	3,1	7,0	2,7	3,8	5,0	2,6	7,0	9,9
MEDIANA	9,1	5,4	9,3	12,3	12,0	15,5	14,9	19,7
VALOR MÍNIMO	4,7	3,3	6,4	5,8	7,0	11,7	7,9	5,1
VALOR MÁXIMO	15,1	19,2	14,4	15,8	21,1	18,9	24,5	32,1

* UNIDADE : (mg/dL)

APÊNDICE 5 - VALORES REFERENTES À CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ALBUMINA (ALB)

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24h	48h	72h
1	5,2	4,6	4,7	4,1	4,4	4,4	4,5	4,7
2	5,1	4,6	4,9	4,3	4,4	4,4	4,8	4,8
3	5,0	4,9	4,8	4,3	4,4	4,3	4,7	4,6
4	5,1	4,8	4,7	3,8	4,3	4,5	4,6	4,7
5	5,0	4,7	4,9	4,3	4,8	4,7	5,2	5,1
6	4,9	5,2	5,0	4,6	4,9	4,4	4,8	5,1
7	4,8	4,9	4,7	4,8	4,6	4,6	5,0	5,1
8	5,0	5,0	4,7	4,7	4,7	4,5	4,9	4,8
9	4,9	5,0						
10	4,9	5,1						
11	4,9	4,9						
12	4,9	5,1						
MÉDIA	5,0	4,9	4,8	4,4	4,6	4,5	4,8	4,9
DESVIO PADRÃO	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
MEDIANA	5,0	4,9	4,8	4,3	4,5	4,5	4,8	4,8
VALOR MÍNIMO	4,8	4,6	4,7	3,8	4,3	4,3	4,5	4,6
VALOR MÁXIMO	5,2	5,2	5,0	4,8	4,9	4,7	5,2	5,1

* UNIDADE : (g/dL)

**APÊNDICE 6 - VALORES REFERENTES À CINÉTICA DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE
ÁCIDO ÚRICO (AU)**

RATOS	C.SJ	C.J	3h	6h	12h	24h	48h	72h
1	3,4	1,7	1,2	1,8	2,9	1,8	2,6	2,5
2	4,1	1,7	1,6	1,1	1,9	2,4	3,0	3,1
3	3,2	2,5	2,1	1,3	2,6	2,3	2,7	3,0
4	3,0	1,9	1,5	2,3	1,9	1,9	2,4	2,3
5	3,2	2,0	1,3	2,4	1,3	1,7	1,3	1,1
6	2,4	1,7	2,5	1,8	1,9	1,8	1,3	3,3
7	1,5	1,1	0,8	1,0	1,2	1,4	1,2	1,2
8	1,7	1,1	1,4	0,9	1,1	1,6	1,7	1,0
9	3,4	1,3						
10	1,5	1,1						
11	1,6	1,6						
12	2,3	1,4						
MÉDIA	2,6	1,6	1,6	1,6	1,9	1,9	2,0	2,2
DESVIO PADRÃO	0,9	0,4	0,5	0,6	0,7	0,3	0,7	1,0
MEDIANA	2,7	1,7	1,5	1,6	1,9	1,8	2,1	2,4
VALOR MÍNIMO	1,5	1,1	0,8	0,9	1,1	1,4	1,2	1,0
VALOR MÁXIMO	4,1	2,5	2,5	2,4	2,9	2,4	3,0	3,3

* UNIDADE : (mg/dL)