

Universidade do Vale do Paraíba  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**Andréa Dellú Franco**

“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS  
REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO E DA ATIVIDADE DAS  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS DE RATOS  
WISTAR SUBMETIDOS A DIFERENTES INTENSIDADES  
RELATIVAS DO TREINAMENTO COM NATAÇÃO”

São José dos Campos  
2005

**Andréa Dellú Franco**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS  
REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO E DA ATIVIDADE DAS  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS DE RATOS  
WISTAR SUBMETIDOS A DIFERENTES INTENSIDADES  
RELATIVAS DO TREINAMENTO COM NATAÇÃO**

**Dissertação de Mestrado apresentada no  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, como complementação dos créditos  
necessários para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas**

Orientador: Dr. Rodrigo Alexis Lazo Osorio  
Co-orientador: Dr. Wellington Ribeiro

São José dos Campos  
2005

F894a

Franco, Andréa Dellú

Avaliação dos níveis plasmáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e da atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos de ratos Wistar submetidos a diferentes intensidades relativas do treinamento com natação/Andréa Dellú Franco. São José dos Campos: UniVap, 2005. 75 f.; il.: 30cm..

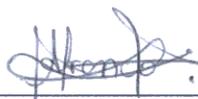
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

1. Estresse Oxidativo 2. Exercício Físico. I. Osorio, Rodrigo Alexis Lazo, Orient. II. Ribeiro, Wellington, Co-Orient. II. Título

CDU:612

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno: \_\_\_\_\_



São José dos Campos, 04 de março de 2005.

**“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO  
ÁCIDO TIobarbitúrico E DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES  
NOS ERITRÓCITOS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A DIFERENTES  
INTENSIDADES RELATIVAS DO TREINAMENTO COM NATAÇÃO”**

Andréa Dellú Franco

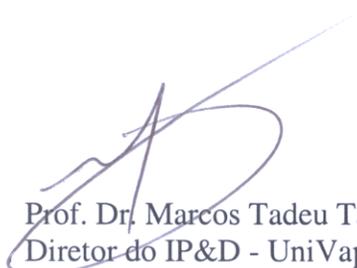
Banca Examinadora:

Prof. Dr. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA (UNIVAP) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. RODRIGO ALEXIS LAZO OSORIO (UFMG) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. JÚLIO ORLANDO TIRAPEGUI TOLEDO (USP) \_\_\_\_\_

Profa. Dra. JUNIA SCARLATELLI CHRISTOFANI (UNIFESP) \_\_\_\_\_

  
Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap  
São José dos Campos, 04 de março de 2005.

Para as pessoas mais valiosas da  
minha vida: meu amado “fofo”  
Alain; meus dedicados e queridos  
pais, Luíz e Célia e minha adorada  
irmã Adriana.

## **Agradecimentos**

Ao onipotente Deus,

razão da minha vitória, todo honra e glória eternamente.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Alexis Lazo Osorio,

orientador e amigo, pelo crédito e guia, muito obrigada por tudo.

A querida Erika Lima Rodrigues,

pela verdadeira amizade, dedicação e fundamental assistência no nosso trabalho.

Aos amigos e colegas que colaboraram diretamente para a realização dessa dissertação:

Karina Bortolin e Rafaela Ferreira França, que ajudaram na chegada dos animais e muito mais;

Profª. Dra. Vânia D'Almeida e seus orientandos, Fernanda Souza, Karen, Adelmo, Paulo, Bruno e todos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UNIFESP que nos receberam com grande carinho e atenção e nos ensinaram todas as técnicas utilizadas na dosagem do estresse oxidativo;

Prof. Dr. Ivan da Cruz Piçarro do Departamento de Fisiologia da UNIFESP, pelo empréstimo do material utilizado para o treinamento;

Prof. Dr. Wellington Ribeiro do Laboratório de Bioquímica e Histologia do IP&DII e meu co-orientador, pelo empréstimo do espectrofotômetro e auxílio nas horas difíceis vividas durante o Mestrado;

Profª. Dra. Cristina Pacheco e Prof. Dr. Newton Soares do Laboratório de Cultura de Células do IP&DI, pelo empréstimo da centrífuga refrigerada;

Prof. Dr. Marcelo Pelisson e Prof. Dr. Milton Beltrame do Laboratório de Bioquímica do IP&DI, pelo empréstimo da balança analítica;

Prof. Dr. Francisco Nóbrega e Profª. Dra. Marina Nóbrega do Laboratório de Genoma do IP&DI, pela doação de muito gelo picado;

Prof. Dr. Paulo Renato e Prof. Dr. Daniel Acosta, pelo auxílio nas análises estatísticas;

Prof. MS.c. Flávio Aimbire, pela permissão do uso do Laboratório de Experimentação Animal para execução de parte do experimento;

Luciano Ramos, Carly Faria Coelho e Gustavo Pinelli, que auxiliaram demais no dia da eutanásia dos animais;

Ao amigo Sidney, pela grande amizade e consideráveis sugestões;

Todos os alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do IP&DII, especialmente a Maria Roberta e Tatiana, que nos ajudaram muito em vários procedimentos experimentais.

As pessoas que fizeram parte da minha vida durante esses dois anos:

Maria Roberta, Emmelin Souza, Flávia, Rina, pela amizade, incentivo e apoio;

Funcionários do IP&D, Dona Ivone, Anderson, Ricardo, Cláudio, Márcio, Cláudia, enfim, todos que sempre foram atenciosos;

Todas bibliotecárias da UNIVAP, pela presteza e

Todos os Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas.

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

pela concessão da bolsa que permitiu a realização do meu Mestrado desde o início.

Aos animais de experimentação,

que auxiliaram não apenas meu crescimento profissional, mas também da corporação científica, meus agradecimentos mais sinceros.

“Tu orarás a Ele, e Ele te ouvirá; e pagarás os teus votos.  
Determinando tu algum negócio, ser-te-á firme, e a luz  
brilhará em teus caminhos.”

(Jô 22:27,28)

## RESUMO

As espécies reativas do oxigênio estão implicadas no mecanismo da lesão oxidativa induzida pelo exercício. Entretanto, os sistemas antioxidantes vêm demonstrando adaptação com o treinamento. O presente estudo avaliou a homeostase entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes de ratos submetidos a 18 semanas de natação. Os seis grupos experimentais consistiram do controle sedentário (SED) e treinado a 50% (CIN), 60% (SES), 70% (SET), 80% (OIT) e 90% (NOV) da carga máxima suportada na água a  $34\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 30 min/dia e 5 dias/semana. Após 48h da última sessão de natação, o sangue foi colhido para determinação da lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes do eritrócito. Os níveis plasmáticos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estavam aumentados para os grupos CIN e NOV em relação ao SED, porém não foram significantes ( $p>0,05$ ). A atividade da superóxido dismutase estava aumentada ( $p=0,05$ ) nos grupos SES, SET, OIT e NOV comparados com o controle e, no grupo CIN em relação ao OIT e NOV. A atividade da glutathione peroxidase estava aumentada ( $p=0,05$ ) para o grupo CIN em relação a todos os grupos treinados e controle. A atividade da catalase estava aumentada ( $p=0,05$ ) para o grupo NOV em relação ao SED, CIN e OIT. Esses resultados sugerem que os grupos SES e SET foram as intensidades mais eficientes na manutenção do equilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo, Exercício Físico.

## **ABSTRACT**

Reactive oxygen species are implicated in the mechanism of exercise-induced oxidative damage. However, antioxidant systems have demonstrated adaptation to chronic exercise. The present study examined pro-oxidant and antioxidant homeostasis in rats submitted 18 weeks of swimming. Six experimental groups consisted of sedentary (SED) and trained at 50% (CIN), 60% (SES), 70% (SET), 80% (OIT) e 90% (NOV) of maximal work load supported into water at  $34\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 30 min/day and 5 days/week. After 48h the last swimming session, blood was collected to determine lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes activity. Thiobarbituric acid-reactive substances plasmatic levels were elevated for groups CIN and NOV in relation to SED, but it were not significant ( $p>0,05$ ). Superoxide dismutase activity was increased ( $p=0,05$ ) in the groups SES, SET, OIT and NOV compared with control and in the group CIN in relation to OIT and NOV. Glutathione peroxidase activity was higher ( $p=0,05$ ) for group CIN in relation to all trained groups and control. Catalase activity was increased ( $p=0,05$ ) for group NOV in relation to SED, CIN and OIT. These results suggest that SES and SET were more efficient in maintenance of the balance between pro-oxidants and antioxidants.

**Key-Words:** Oxidative Stress, Physical Exercise.

## Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema da produção das espécies reativas do oxigênio (adaptado de COHEN, 1989).....	06
Figura 2 – Porcentagens atingidas no primeiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED.....	30
Figura 3 – Porcentagens atingidas no terceiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED; #p<0,05 em relação ao CIN; □p<0,05 em relação ao SES e ♦p<0,05 em relação ao OIT.....	30
Figura 4 – Porcentagens atingidas no quarto teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p≤0,05 em relação ao SED.....	31
Figura 5 – Pesos corporais obtidos no primeiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED e #p<0,05 em relação ao CIN.....	33
Figura 6 – Pesos corporais obtidos no segundo teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED.....	33
Figura 7 – Pesos corporais obtidos no terceiro teste de carga máxima pelos	

grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED.....	34
Figura 8 – Pesos corporais obtidos no quarto teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED.....	34
Figura 9 – Níveis plasmáticos das TBARS obtidos após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. (ANOVA).....	35
Figura 10 – Atividades da SOD nos eritrócitos obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao SED e #p<0,05 em relação ao CIN.....	36
Figura 11 – Atividades da GPX nos eritrócitos obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao CIN.....	37
Figura 12 – Atividades da CAT nos eritrócitos obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. *p<0,05 em relação ao NOV.....	38
Figura 13 – Atividades da CK sérica obtidas após 48h da última sessão de	

natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED..... 39

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação da intensidade do exercício baseada numa atividade de <i>endurance</i> com 20 a 60 minutos de duração comparando os três métodos (adaptado de POLLOCK; WILMORE (1990) <i>apud</i> WILMORE; COSTILL, 2003).....	17
Tabela 2 – Porcentagens atingidas nos quatros testes de carga máxima pelos grupos sedentário e treinados.....	29
Tabela 3 – Porcentagens atingidas por cada grupo experimental nos quatros testes de carga máxima.....	31
Tabela 4 – Pesos corporais dos grupos sedentário e treinados obtidos nos quatros testes de carga máxima.....	32
Tabela 5 – Níveis das TBARS plasmáticas dos grupos sedentário e treinados obtidos após 48h da última sessão de natação.....	35
Tabela 6 – Atividades da SOD nos eritrócitos dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.....	36
Tabela 7 – Atividades da GPX nos eritrócitos dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.....	37
Tabela 8 – Atividades da CAT nos eritrócitos dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.....	38
Tabela 9 – Atividades da CK sérica dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.....	39
Tabela 10 – Peso cardíaco relativo dos grupos sedentário e treinados obtido após 48h da última sessão de natação.....	40
Tabela 11 – Índice do peso ventricular esquerdo dos grupos sedentário e treinados obtido após 48h da última sessão de natação.....	40
Tabela 12 – Índice do peso ventricular direito dos grupos sedentário e treinados obtido após 48h da última sessão de natação.....	40

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

$^1\text{O}_2$ : Oxigênio *Singlet*

ATP: Adenosina Trifosfato

$\text{Ca}^{2+}$ : Íon Metal Cálcio

CAT: Catalase

CK: Creatina Quinase

$\text{Cu}^{2+}$ : Íon Metal Cobre

CuZn-SOD: SOD zinco-cobre

ADN: Ácido Desoxirribonucléico

ARN: Ácido Ribonucléico

EC-SOD: SOD cobre-zinco

ERNs: Espécies Reativas do Nitrogênio

EROs : Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Frequência Cardíaca

FC<sub>máx</sub>: Frequência Cardíaca Máxima

$\text{Fe}^{2+}$ : Íon Metal Ferroso

$\text{Fe}^{3+}$ : Íon Metal Férrico

FMN: Flavina Mononucleotídeo (forma oxidada)

FMNH<sub>2</sub>: Flavina Mononucleotídeo (forma reduzida)

FpH?: Semiquinona da Flavina da NADH Desidrogenase

Fp: Flavina da NADH Desidrogenase

GPX: Glutaciona Peroxidase

GSH: Glutaciona (L-?-glutamil L-cisteinil- glicina)

GSSG: Glutaciona Oxidada

GR: Glutaciona Redutase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio

HOCl: Ácido Hipocloroso

MDA: Malondialdeído

MET: Equivalente Metabólico

Mn (III): Manganês (III)

mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>: Mililitro/Quilograma de peso/Minuto

mM: Milimolar

Mn-SOD: SOD manganês  
NADH: Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)  
NADPH: Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma reduzida)  
NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma oxidada)  
NADPH/minuto: Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato /Minuto  
nm: Nanômetro (comprimento de onda)  
nmol/g: Nanomol(es)/Gramma  
NO?: Óxido nítrico  
NO<sub>2</sub>: Dióxido de nitrogênio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion Superóxido  
O<sub>2</sub><sup>2-</sup>: Ânion Peróxido  
OH?: Radical Hidroxila  
ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito  
pH: Potencial de Hidrogênio  
rpm: Rotações Por Minuto  
R?: Radical Alquílico  
ROO?: Radical Peróxido  
ROOH: Hidroperóxido  
RO?: Radical alquóxido  
SOD: Superóxido Dismutase  
SOD-CuZn: SOD citosólica (Cobre-Zinco)  
SOD-Mn: SOD mitocondrial (Manganês)  
SOD-EC: SOD extracelular  
TBA: Ácido Tiobarbitúrico  
TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico  
U/mg: Unidade(s)/Miligrama  
UI: Unidades Internacionais  
UqH?: Semiquinona da Ubiquinona  
Uq: Ubiquinona  
VO<sub>2</sub>: Consumo de Oxigênio  
VO<sub>2</sub>máx: Consumo Máximo de Oxigênio  
μL : Microlitros

## Sumário

1. Introdução.....	01
1.1 Objetivos.....	04
2. Revisão de Literatura.....	05
2.1 As Espécies Reativas do Oxigênio.....	05
2.2 Produção das Espécies Reativas do Oxigênio.....	06
2.3 A Lipoperoxidação.....	09
2.4 Mecanismos de Defesa Antioxidante.....	11
2.4.1 Superóxido Dismutase.....	11
2.4.2 Glutathione Peroxidase.....	12
2.4.3 Catalase.....	13
2.5 Estresse Oxidativo e Exercício Físico.....	14
2.5.1 Treinamento Aeróbio e seus Fatores.....	15
2.5.2 Respostas ao Estresse Oxidativo Produzido pelo Treinamento.....	18
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1 Condições Ambientais.....	21
3.2 Animais.....	21
3.3 Adaptação à Natação.....	21
3.4 Grupos Experimentais.....	22
3.5 Determinação da Carga Máxima.....	22
3.6 Treinamento Físico.....	23
3.7 Controle do Peso Corporal.....	24
3.8 Observação dos Animais.....	24
3.9 Sacrifício dos Animais.....	24
3.10 Análises Bioquímicas.....	25
3.10.1 Lipoperoxidação.....	25
3.10.2 Superóxido Dismutase.....	26
3.10.3 Glutathione Peroxidase.....	26
3.10.4 Catalase.....	26
3.10.5 Creatina Quinase.....	27
3.11 Análise da Estrutura Cardíaca.....	27

3.12 Análise Estatística.....	27
4. Resultados.....	29
4.1 Evolução das Porcentagens Atingidas nos Testes de Carga Máxima.....	29
4.2 Evolução do Peso Corporal.....	32
4.3 Avaliação da Lipoperoxidação Sistêmica.....	35
4.4 Atividade da Superóxido Dismutase.....	36
4.5 Atividade da Glutathione Peroxidase.....	37
4.6 Atividade da Catalase.....	38
4.7 Atividade da Creatina Quinase.....	39
4.8 Avaliação da Estrutura Cardíaca.....	40
5. Discussão.....	41
6. Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Os organismos aeróbios utilizam o oxigênio para oxidar combustíveis ricos em carbono e hidrogênio – carboidratos, lipídios e proteínas – para a produção de calor e energia química armazenada no composto conhecido como adenosina trifosfato ou ATP (BANERJEE *et al.*, 2003).

A esse processo metabólico dá-se o nome de respiração celular aeróbia que ocorre na mitocôndria, onde o complexo enzimático citocromo c oxidase transfere elétrons do citocromo  $a_3$  para o oxigênio (JI, 1995), que sofre uma redução tetraeletrônica estável produzindo água (CADENAS; DAVIES, 2000).

Porém, estima-se que cerca de 2-5% do fluxo total de elétrons resulta na formação das espécies reativas do oxigênio (BOVERIS; CHANCE, 1973; PRYOR, 1986; TURRENS; BOVERIS, 1980).

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são definidas como sendo uma espécie química independente que contém um ou mais elétrons não pareados em sua última órbita (HILL; BURK; LANE, 1987; LITTLE; GLADEN, 1999). A presença de um elétron não pareado tende a produzir uma grande reatividade para alcançar uma estrutura quimicamente mais estável, levando à interação com numerosas moléculas do organismo (JI, 1999).

A proliferação das EROs pode promover numerosos danos aos sistemas biológicos. Pode causar lipoperoxidação nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas; alterar a estrutura terciária das proteínas, levando a perda de função, fragmentação e ligações cruzadas; e no ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA – desoxirribunucleic acid), induzem modificações que podem levar as mutações (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; ZWART *et al.*, 1999).

Entretanto, as células possuem mecanismos defensivos enzimáticos e não enzimáticos, conhecidos como antioxidantes, que são capazes de anular os efeitos dessas EROs (ZWART *et al.*, 1999).

O exercício físico é capaz de aumentar a produção das EROs com conseqüente possibilidade de dano tecidual e celular (JENKINS, 1993), devido a uma série de fatores desencadeados pelo próprio exercício.

Vários estudos científicos mostram diversas alterações tanto na produção das EROs quanto na defesa antioxidante mediante a prática regular de exercício físico, porém a maioria dos estudos utilizam intensidades iguais ou superiores a 70% do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx) (LUKASKI *et al.*, 1990; MENA *et al.*, 1991; CRISWELL *et al.*, 1993; DERNBACH *et al.*, 1993; POWERS *et al.*, 1994; MARZATICO *et al.*, 1997; CHILD *et al.*, 1998; NAVARRO-ARÉVALO; SÁNCHEZ-DEL-PINO, 1998; BRITES *et al.*, 1999; SELAMOGLU *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2001; SANTOS-SILVA *et al.*, 2001; EVELSON *et al.*, 2002; VARRASO *et al.*, 2002; CAZZOLA *et al.*, 2003; METIN *et al.*, 2003a,b; OSORIO *et al.*, 2003a,b), ou seja, intensidades mais altas do que moderadas ou baixas (JI; STRATMAN; LARDY, 1988; POWERS *et al.*, 1994; SOMANI; FRANK; RYBAK, 1995; OH-ISHI *et al.*, 1996; OH-ISHI *et al.*, 1997a; NAVARRO-ARÉVALO; SÁNCHEZ-DEL-PINO, 1998; RADAK *et al.*, 1999; EYDOUX *et al.*, 2000; NAKAO *et al.*, 2000; SENTÜRK *et al.*, 2001; OZTASAN *et al.*, 2004).

Vale lembrar que grande parte dos indivíduos prefere e sustenta a prática do exercício físico em intensidades iguais ou abaixo de 70% do  $VO_2$ máx (KOKKINOS; FERNHALL, 1999), o que nos mostra maior necessidade em realizar trabalhos com intensidades moderadas a baixas, uma vez que estudos já relataram aumento da atividade antioxidante com treinamento em intensidades mais baixas (POWERS *et al.*, 1994; OH-ISHI *et al.*, 1996; NAKAO *et al.*, 2000), sugerindo aumento das EROs.

Outro fato é que a maioria dos estudos da literatura científica relacionados com estresse oxidativo, utilizou a corrida como forma de treinamento em animais e não a natação. Como sabemos os ratos são nadadores naturais (KRAMER; DIJKSTRA; BAST, 1993; NAKAO *et al.*, 2000). Além disso, um rato não corre facilmente em uma esteira e a natação é menos estressante, uma vez que evita o uso de choque elétrico e lesões nos pés, as quais poderiam produzir EROs não relacionadas ao exercício (RADAK *et al.*, 1999; NAKAO *et al.*, 2000).

Também foi observado que ainda há controvérsias nos resultados (NAKAO *et al.*, 2000), provavelmente, devido a grande variedade entre os protocolos de treinamento (FENTEM, 1994; MOLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996; MARZATICO *et al.*, 1997; JI, 1999; POWERS; LENNON, 1999; COOPER *et al.*, 2002) e de avaliação do estresse

oxidativo (JI, 1995; MOLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996; MARZATICO *et al.*, 1997; JI, 1999; COOPER *et al.*, 2002), o que dificulta a comparação dos resultados.

Todos esses fatos instigaram o interesse no desenvolvimento do presente estudo, de tal forma que foi adotado um protocolo de treinamento com natação com a mesma duração da sessão, porém com intensidades relativas diferentes.

Desta forma, esperávamos que não ocorresse equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes nos eritrócitos conforme aumentasse a intensidade relativa do exercício físico. Como também, esperávamos identificar a intensidade relativa na qual ainda existisse esse equilíbrio.

Apesar de estudos relatarem produção das EROs e melhora da defesa antioxidante com o treinamento, não está claro o que causa as variações no estado oxidativo ou na concentração de antioxidantes, ou em qual extensão eles influenciam o estresse oxidativo (COOPER *et al.*, 2002).

Trabalhos futuros com modificação do protocolo de treinamento do presente estudo, como por exemplo, com durações diferentes das sessões de natação, viriam mostrar novos perfis do estresse oxidativo com a prática regular de exercício físico. Além disso, a análise de outros tecidos, como o muscular e o hepático, para observação do possível estresse oxidativo produzido nesses locais, ampliaria nossos conhecimentos sobre essa área que apresenta crescimento constante.

## 1.1 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo consistiram em:

- Avaliar a lipoperoxidação sistêmica causada pelas EROs e a estimulação das defesas antioxidantes enzimáticas nos eritrócitos pertencentes ao sistema biológico de ratos da linhagem *Wistar*, através de análises bioquímicas, após treinamento com natação em diferentes intensidades relativas de exercício determinadas como um percentual do teste de carga máxima;
- Identificar a (s) intensidade (s) relativa (s) na (s) qual (is) o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e defesas antioxidantes nos eritrócitos subsistisse.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AS ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO

É importante saber que o termo *radicais livres* é utilizado para definir as espécies químicas que contém um ou mais elétrons não pareados, sendo altamente reativas e possuindo um tempo de vida fugaz, além de serem produzidas em todas as células do organismo (COOPER *et al.*, 2002).

A maioria dos radicais que ocorre *in vivo* são originados ou das espécies reativas do nitrogênio (ERNs) ou das espécies reativas do oxigênio (EROs). Entre as ERNs temos o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) e o potente oxidante peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (COOPER *et al.*, 2002).

Como o presente estudo avaliou a ação das EROs, apenas a produção dos seus constituintes será explicitado a seguir.

A molécula de oxigênio (O<sub>2</sub>), no estado fundamental, pode ser considerada um birradical que possui dois elétrons não pareados com *spins* iguais, isto é, mesmo sentido de rotação (FRIDOVICH, 1998).

O O<sub>2</sub> é um bom agente oxidante, ou seja, ao oxidar um composto, ele se reduzirá pelo ganho de elétrons que ocorre um de cada vez. Se adicionar um elétron no O<sub>2</sub> (redução monoelétrica), o produto obtido será o ânion superóxido, ou sua forma protonada denominada radical hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Em geral, nos sistemas biológicos, a redução parcial do O<sub>2</sub> por aceitação de dois elétrons dá lugar à produção do peróxido de hidrogênio. Contudo, a maioria do O<sub>2</sub> consumido pela mitocôndria na fosforilação oxidativa é reduzido pela citocromo c oxidase, aceitando quatro elétrons (redução tetraelétrica estável) para formar uma molécula de água, sem liberação de intermediários (FRIDOVICH, 1998; LLESUY, 2002).

A união do ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio pode se decompor dando lugar à formação do radical hidroxila que é altamente reativo (GREEN; HILL, 1984).

A molécula de  $O_2$  pode absorver energia, passando a um estado excitado, de maior energia e mais reativo, com os *spins* dos dois elétrons não pareados tomando sentidos opostos. Passa, então, a receber o nome de  $O_2$  *singlet*, possuindo maior poder oxidante que o  $O_2$  (LLESUY, 2002).

Os intermediários da redução parcial do  $O_2$ : o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), junto com o  $O_2$  *singlet* ( $^1O_2$ ) são conhecidos como espécies reativas do oxigênio (Figura 1) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

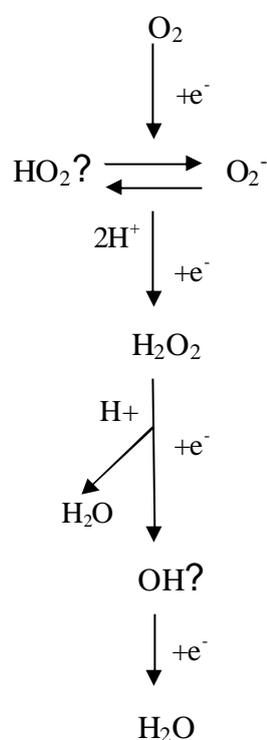


Figura 1 – Esquema da produção das espécies reativas do oxigênio (adaptado de COHEN, 1989).

## 2.2 PRODUÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO

As EROs são geradas durante o metabolismo normal de toda célula eucarionte em diversas localizações celulares. Entre as diversas fontes de geração intracelular dessas espécies, as mitocôndrias são consideradas como a maior fonte (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; BOVERIS *et al.*, 1980).

A produção do  $O_2^-$  ocorre tanto nas mitocôndrias, como no retículo endoplasmático e no citosol. Nas mitocôndrias, se deve a auto-oxidação nos passos univalentes dos componentes da cadeia respiratória (LLESUY, 2002):

1- a oxidação da semiquinona ( $UqH^?$ ) em ubiquinona (CADENAS; BOVERIS, 1980), (equação 1):



2- e pela oxidação da semiquinona da flavina ( $FpH^?$ ) da NADH desidrogenase (TURRENS; BOVERIS, 1980), (equação 2):



No retículo endoplasmático, o  $O_2^-$  é gerado através do citocromo  $P_{450}$  e da flavoproteína NADPH-citocromo  $P_{450}$  redutase (equação 3) e no citosol este radical se forma pela ação da enzima xantina oxidase (equação 4), (LLESUY, 2002):



O  $H_2O_2$  é gerado nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos peroxissomas e no citosol. A produção mitocondrial do  $H_2O_2$  se dá a partir da dismutação do  $O_2^-$ , catalisada pela superóxido dismutase (McCORD; FRIDOVICH, 1969), (equação 5):



No retículo endoplasmático o  $H_2O_2$  é produzido quimicamente por uma auto-oxidação do citocromo  $P_{450}$  ( $FMNH_2$ ) do citocromo c NADPH redutase (FREEMAN; CRAPO, 1982; GOEPTAR; SCHEERENS; VERMEULEN, 1995), (equação 6):



Nos peroxissomas, encontramos uma série de proteínas que geram  $H_2O_2$ . Elas são a urato oxidase, a  $\alpha$ -hidroácido oxidase e a D-aminoácido oxidase. A equação 7 mostra a reação que dá origem ao  $H_2O_2$  nesta organela, sendo  $AH_2$  uma substância que se oxida como o ácido úrico, a -OH-ácido (LLESUY, 2002).

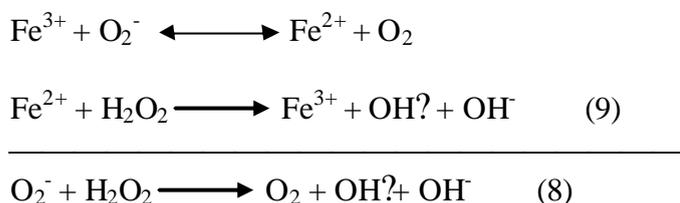


No citosol este radical se forma pela ação da superóxido dismutase sobre o  $O_2^-$  produzido pela enzima xantina oxidase (JI, 1999).

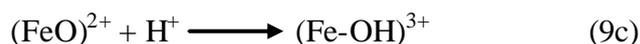
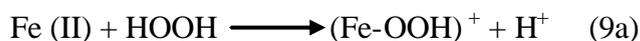
A partir da produção do  $O_2^-$  e do  $H_2O_2$  pode-se gerar outras EROs como o radical  $OH^?$ .

A reação proposta por Fritz Haber junto com Joseph Weiss, em um trabalho publicado em 1934, mostra a produção do radical  $\text{OH}^\bullet$  através de uma interação entre o  $\text{O}_2^-$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Essa reação de Haber-Weiss resulta no sistema biológico desfavorável termodinamicamente e requer um catalisador (metais de transição, como agentes redutores), para que possa ocorrer.

A equação de Haber-Weiss (equação 8) catalisada pelo ferro, que faz uso da química de Fenton (equação 9), é considerada como o principal mecanismo pelo qual o radical  $\text{OH}^\bullet$  – altamente reativo – é produzido nos sistemas biológicos (FRIDOVICH, 1974).



A equação 9 pode ser desarranjada em uma série de passos como se segue (FRIDOVICH, 1998):



Os produtos desse processo ( $(\text{FeO})^{2+}$ ,  $(\text{Fe-OH})^{3+}$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ) seriam lesivos às células (FRIDOVICH, 1998).

Das EROs citadas, apenas o  $\text{O}_2^-$  e a  $\text{OH}^\bullet$  apresentam um elétron não pareado, sendo verdadeiramente espécies radicais livres (CHAKRABORTI *et al.*, 1998). Todas as EROs, radicais propriamente ou intermediárias, têm contudo um elevado potencial tóxico para as células, ou seja, são agentes citotóxicos (FRIDOVICH, 1998), que devem levar a perda da fluidez da membrana, aumento da sua permeabilidade com perda de proteínas citosólicas (BLOOMER; GOLDFRAB, 2004).

Além disso, as EROs estão envolvidas na patogênese de muitas doenças, tais como, a diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e inflamação.

E também estão envolvidas com importantes processos fisiológicos, como o envelhecimento (VIÑA *et al.*, 2000).

### 2.3 A LIPOPEROXIDAÇÃO

A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica é um processo fisiológico comum que ocorre em baixos níveis, em todos os seres humanos (LITTLE; GLADEN, 1999) e é definida como a deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados (STARNES *et al.*, 1989).

Os ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contêm pelo menos duas duplas-ligações entre carbonos. Tanto as membranas celulares como as organelas – tais como as mitocôndrias e os peroxissomas – contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados que podem se tornar radicais peróxidos (LLESUY, 2002).

A lipoperoxidação biológica é um processo que envolve um mecanismo de fases, ou seja, reações em cadeia que pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Geralmente, o desencadeamento da peroxidação de lipídios é causado pelo ataque do radical  $\text{OH}^\bullet$ , sendo capaz de extrair um átomo de hidrogênio da dupla ligação de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) do lipídio (ZWART *et al.*, 1999), (equação 10):



O novo radical alquílico formado ( $-\dot{\text{C}}\text{H}-$  ou  $\text{R}^\bullet$ ) geralmente se estabiliza através de um rearranjo molecular formando um dieno conjugado (LLESUY, 2002), o qual é um dos produtos da lesão pelas EROs.

Nas condições aeróbias, esse radical centrado em carbono ( $\text{R}^\bullet$ ) se combina com o  $\text{O}_2$  levando a formação do radical peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), (equação 11):



Em continuidade, os radicais peróxidos são capazes de extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio dando origem ao hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) e mais um radical alquílico, caracterizando a propagação do ciclo da lipoperoxidação que pode se repetir várias vezes (LLESUY, 2002), (equação 12):

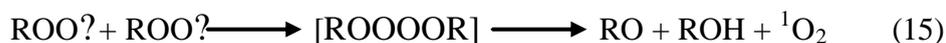
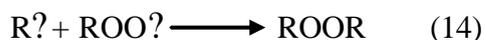


A partir do hidropéroxido, metais de transição ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) podem participar desse processo, catalisando a formação de radicais lipídicos alquóxidos ( $\text{RO}\cdot$ ) ou péroxidos ( $\text{ROO}\cdot$ ), produzindo também mais radicais  $\text{OH}\cdot$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Um único evento de iniciação pode resultar na formação de vários radicais péroxidos, conseqüentemente causar inativação das proteínas de transporte ou enzimas da membrana ou das mitocôndrias, além de aumentar a permeabilidade da bicamada lipídica, alterando a homeostase dos íons, levando a lise das membranas celulares (CALDARERA; GUARNIERI; LAZZARI, 1973; GOHIL *et al.*, 1986).

Essa degeneração nas membranas lipídicas causada pela propagação das reações é usualmente acompanhada da formação de uma grande variedade de produtos (complexos oxidados), incluindo alquenos, dienos conjugados e aldeídos (ZWART *et al.*, 1999).

A etapa de terminação inclui todas aquelas reações nas quais os radicais se combinam entre si (LLESUY, 2002), (equações 13, 14, 15, 16):



Esta última reação mostra a formação de um intermediário tetróxido instável a partir dos radicais péroxidos (mecanismo de Russel), que se decompõe formando o  $\text{O}_2$  *singlet* ( ${}^1\text{O}_2$ ) e grupos carbonilas excitados ( $\text{RO}^*$ ), entre outros produtos (LLESUY, 2002).

Portanto, nesta fase da terminação, produtos oxidados são formados, com rearranjo estável destes, desaceleração da cascata formadora de radicais livres, além da queda das EROs pela ação antioxidante endógena.

Os produtos resultantes da lipoperoxidação constituem desta forma parâmetros atrativos para o monitoramento da lesão produzida pelas EROs (ZWART *et al.*, 1999), entre eles o malondialdeído (KRAMER; MAK; WEGLIKI, 1984), que é capaz de modificar ambos ADN e proteínas (KRAMER; MAK; WEGLIKI, 1984; TOYOKUNI

*et al.*, 1994), resultando em eventos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos (ROTH, 1997).

## 2.4 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Apesar dos benefícios do metabolismo aeróbio, ou seja, da utilização do  $O_2$  pelos organismos vivos, houve necessidade do desenvolvimento de defesas contra a considerável toxicidade desse gás altamente oxidante (FRIDOVICH, 1998).

O eficiente sistema de defesa antioxidante é constituído por compostos não enzimáticos e enzimáticos, encarregados de manter níveis baixos das EROs. Entre os não enzimáticos, temos as vitaminas antioxidantes (E, C e  $\beta$ -caroteno) envolvidas no sequestro direto de radicais livres e do  $O_2$  *singlet* (YU, 1995), e a glutatona, além de outros tióis (por exemplo, o ubiquinol) importantes na manutenção do estado redox (óxido-redução) das células (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Já as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPX) e a catalase (CAT) catalisam a redução de um elétron das EROs (CHANCE; SARONIO; LEIGH, 1975). Além disso, elas auxiliam outras enzimas na formação de potentes redutores (NADPH – nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato), tais como a glutatona redutase e a glicose-6-fosfato desidrogenase (JI, 1995).

No presente estudo as atividades das enzimas antioxidantes (SOD, GPX e CAT) foram avaliadas. Portanto, seus mecanismos de ação serão abordados nos próximos parágrafos.

### 2.4.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A primeira enzima de defesa celular é a SOD, responsável pela formação do  $H_2O_2$  através da dismutação do  $O_2^-$ , pelo mecanismo (equação 5) descoberto por McCord e Fridovich, em 1969 (JI, 1995).

Nos mamíferos, foram descritas três isoformas da SOD que vão depender do íon metal de ligação e da localização celular: 1- a citosólica, que contém na sua estrutura cobre e zinco (Cu-Zn); 2- a mitocondrial, que contém manganês (Mn) e 3- a forma extracelular que também possui Cu-Zn (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1973; JI, 1995).

A SOD citosólica (SOD-CuZn) é homodimérica (FRIDOVICH, 1998) e decompõem o  $O_2^-$  por sucessivas oxidações e reduções do cobre (II) presente no sítio ativo, com velocidades de reação elevadas (LLESUY, 2002), (equações 10, 11):



A SOD mitocondrial (SOD-Mn) é homotetramérica, sendo encontrada na matriz da mitocôndria (FRIDOVICH, 1998). Ela é reduzida do estado de oxidação III para II e novamente oxidada a Mn (III) durante os passos de dismutação do  $O_2^-$ , semelhante às reações anteriores (LLESUY, 2002).

A SOD extracelular (SOD-EC) é uma glicoproteína secretora com estrutura homotetramérica (TIBELL; AASA; MARKLUND, 1993). Esta isoforma é a que dá conta da maior parte da atividade da SOD no plasma (LLESUY, 2002).

Recentemente foi estimado que as superóxidos dismutases da *Escherichia coli* oferecessem cerca de 95% de proteção à todos os alvos susceptíveis ao ataque do  $O_2^-$  nessa bactéria (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1997), confirmando sua eficiência catalítica absoluta.

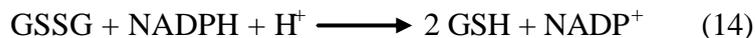
Além disso, a SOD não segue a constante de Michaelis ( $K_m$ ); é parcialmente ocupada pelo seu substrato ( $O_2^-$ ); sua atividade catalítica aumenta com a elevada concentração de  $O_2^-$  (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979); e diminui com altos níveis de  $H_2O_2$  (BLUM; FRIDOVICH, 1985). Portanto, os ensaios da SOD são usualmente baseados nos métodos indiretos, envolvendo a inibição da reação na qual o  $O_2^-$  é produzido, o que torna difícil a comparação entre os estudos, uma vez que utilizam métodos diferentes (JI, 1995).

### 2.4.2 GLUTATIONA PEROXIDASE

As peroxidases catalisam a redução dos hidroperóxidos ou dos  $H_2O_2$  com oxidação de um doador de hidrogênio (equação 13) (FRIDOVICH, 1998; JI, 1995). A principal peroxidase nos mamíferos é a GPX selênio dependente (FRIDOVICH, 1998), que é específica para a glutationa (GSH) como doadora de hidrogênio (JI, 1995).



A glutationa oxidada (GSSG) é reduzida pela glutationa redutase (GR) NADPH-dependente para regenerar a GSH (FRIDOVICH, 1998), (equação 14):



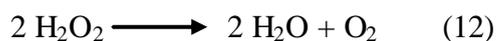
Foram encontradas cinco isoenzimas da GPX nos mamíferos, uma das quais é secretada e encontrada no espaço extracelular (PERRY *et al.*, 1992), e outra age especificamente nos hidroperóxidos lipídicos (URSINI; MAIORINO; GREGOLIN, 1985). Apesar da sua expressão generalizada, os níveis de cada isoforma variam dependendo do tipo de tecido (LLESUY, 2002).

Tanto a GPX citosólica como a mitocondrial reduzem os hidroperóxidos dos ácidos graxos e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  à custa da GSH (JI, 1995). Dois terços da atividade total dessa enzima se localiza no citosol, e um terço na fração mitocondrial (FLOHÉ; GUNZLER; SHOCK, 1973; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

É importante reconhecer que a GPX tem uma afinidade muito maior pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  em baixas concentrações, quando comparado com a CAT (JI, 1995).

### 2.4.3 CATALASE

A CAT é uma hemeproteína tetramérica com ampla distribuição tissular nos mamíferos e uma alta concentração nos peroxissomos (AEBI, 1984). Sua função primária é reagir de modo muito eficiente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar água e  $\text{O}_2$  (CHANCE; SARONIO; LEIGH, 1975), (equação 12):



O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar não apenas como hidroperóxido, mas também como doador de hidrogênio. Nos mamíferos, a catalase divide sua função no combate ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a glutationa peroxidase (LLESUY, 2002), embora a especificidade e afinidade ao substrato bem como a localização celular dessas duas enzimas sejam diferentes (JI, 1995).

A catalase requer a ligação do  $\text{Fe}^{3+}$  para sua função catalítica (JI, 1995), que por sua vez é mais eficiente quando lida com concentrações relativamente altas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (FRIDOVICH, 1998). Na presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a CAT é capaz de reduzir um limitado número de hidroperóxidos, mas não do *t*-butil hidroperóxido e nem dos seus respectivos aldeídos (CHANCE; SARONIO; LEIGH, 1975).

Os ensaios da CAT envolvem comumente a adição do seu substrato  $H_2O_2$  (AEBI, 1984). E, como nos ensaios da SOD, também é difícil a comparação entre os resultados dos estudos, pois a atividade da CAT é determinada não apenas pela presença da enzima como também pela concentração de  $H_2O_2$  utilizada (JI, 1995).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E EXERCÍCIO FÍSICO

O termo estresse oxidativo refere-se a uma situação em que há aumento na concentração das EROs acima dos seus níveis fisiológicos, associado ou não a uma diminuição dos níveis de defesas antioxidantes (LLESUY, 2002).

Uma condição que produz aumento das espécies reativas do oxigênio com conseqüente possibilidade de dano celular e tecidual é o exercício físico (JENKINS, 1993; JI, 1995; COOPER *et al.*, 2002).

Esse aumento das EROs, sem que o sistema de defesa antioxidante possa compensá-lo, seria decorrente de vários fatores desencadeados pelo exercício: aumento do consumo de  $O_2$  e conseqüente aumento na produção de  $O_2^-$  mitocondrial via reações do  $O_2$  com os radicais flavina e ubiquinona (COOPER *et al.*, 2002); aumento dos níveis de catecolaminas e suas auto-oxidações quando são metabolicamente inativadas (COHEN; HEIKKILA, 1974; CLARKSON; THOMPSON, 2000; COOPER *et al.*, 2002); produção de ácido láctico que pode converter-se em  $O_2^-$  e/ou  $OH^-$  (DEMOPULOS *et al.*, 1986; CLARKSON; THOMPSON, 2000); elevada taxa de auto-oxidação da hemoglobina (MISRA; FRIDOVICH, 1972; COOPER *et al.*, 2002); hipertermia (SALO; DONOVAN; DAVIES, 1991); lesão isquemia-reperfusão nas fibras musculares esqueléticas e outros tecidos (SJODIN; HELLSTEN WESTING; APPLE, 1990; JI, 1995; COOPER *et al.*, 2002); lesão da membrana do eritrócito (GILBERT, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; WILMORE; COSTILL, 2003); produção peroxissomal de  $H_2O_2$  através de uma grande quantidade de ácido graxo oxidado (GODIN; WOHAIEB, 1988) e liberação das EROs pelos polimorfonucleares ativados (MALECH; GALLIN, 1987; CLARKSON; THOMPSON, 2000).

Existem evidências de que há um aumento da atividade antioxidante durante o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (KRETZSCHMAR; MULLER, 1993).

A eficiência desses sistemas antioxidantes é de vital importância na determinação do nível de estresse oxidativo e logo do dano celular e tecidual.

A SOD, a CAT, a GPX e a GR compreendem a primeira linha de defesa do organismo contra as EROs produzidas durante o exercício. Desta forma espera-se que o exercício tenha um impacto direto sobre a atividade dessas enzimas (JI, 1995).

As diferentes respostas nos níveis de estresse oxidativo parecem depender de quatro fatores básicos: do tipo, da frequência, duração e intensidade do exercício físico (KIHLSSTROM, 1992), bem como a natureza e a magnitude das respostas adaptativas do treinamento, tanto centrais (melhora do desempenho cardíaco) quanto periféricas (melhora do desempenho muscular) (HOUSTON; BENTZEN; LARSEN, 1979).

### 2.5.1 TREINAMENTO AERÓBIO E SEUS FATORES

O treinamento aeróbio ou treinamento de resistência cardiorrespiratória e muscular (*endurance*) promove várias adaptações fisiológicas no organismo:

- 1- Hipertrofia seletiva das fibras do tipo I (COSTILL *et al.*, 1976);
- 2- Aumento da quantidade de capilares sanguíneos por fibra muscular (TESCH; THORSSON; KAISER, 1984);
- 3- Elevação do conteúdo de mioglobina (WILMORE; COSTILL, 2003);
- 4- Aumento do tamanho e da quantidade de mitocôndrias dos músculos (INGJER, 1979);
- 5- Aumento da capacidade oxidativa das mitocôndrias musculares quanto à produção de ATP (HOLLOSZY *et al.*, 1970);
- 6- Aumento do potencial oxidativo dos lipídios e dos carboidratos musculares (MOLE; OSCAI; HOLLOSZY, 1971; COSTILL *et al.*, 1979);
- 7- Aumento da utilização nos lipídios como fonte energética muscular (RENNIE; WINDER; HOLLOSZY, 1976);
- 8- Conteúdo elevado de triglicérides musculares (HURLEY *et al.*, 1986) e de glicogênio (MENDENHALL *et al.*, 1994);
- 9- Aumento da hemoglobina total (GREEN *et al.*, 1991) e do volume plasmático (YANG *et al.*, 1998) e;

10- Aumento do volume sistólico (VS) e conseqüentemente do débito cardíaco (DC) devido ao maior volume ventricular, acompanhado pelo aumento da força contrátil do miocárdio (MORRISON *et al.*, 1986; EHSANI *et al.*, 1991);

11- Frequência cardíaca (FC) diminuída em repouso e durante exercício submáximo; sem alteração da frequência cardíaca máxima (FC<sub>máx</sub>) (STROMME; KEREM; ELSNER, 1970);

12- Elevação do fluxo sangüíneo aos músculos (ARMSTRONG; LAUGHLIN, 1984);

13- Extração elevada de O<sub>2</sub> do sangue que flui através dos músculos em atividade e conseqüente aumento da diferença arteriovenosa de O<sub>2</sub> (SEXTON; KORTHUIS; LAUGHLIN, 1988);

14- Maior taxa ventilatória pulmonar máxima devido aos aumentos do volume corrente e da frequência respiratória; taxas ventilatórias menores durante exercício submáximo (WILMORE; COSTILL, 2003);

15- Diminuição do índice de troca respiratória e menor quociente respiratório muscular (WILMORE; COSTILL, 2003) e;

16- Redução do acúmulo de lactato muscular (MacRAE *et al.*, 1992).

As adaptações ao treinamento dependem de fatores como frequência, duração e intensidade do exercício (EVANGELISTA; BRUM; KRIEGER, 2003).

Essas adaptações ao treinamento são mais substanciais quando é praticada uma quantidade ideal de trabalho em cada sessão e ao longo de determinado período de tempo. Embora essa carga ideal possa diferir de um indivíduo para outro, estudos mostram que uma frequência ideal é de 3-5 dias/semana e que 20-30 minutos/dia representam uma duração ideal (WILMORE; COSTILL, 2003).

Talvez a intensidade do treinamento seja o fator crítico na melhora do desempenho. Para o desenvolvimento e manutenção da capacidade aeróbia, o American College of Sports and Medicine recomenda uma intensidade de treinamento de 60% a 90% da FC<sub>máx</sub> do indivíduo ou 50% a 85% do VO<sub>2</sub><sub>máx</sub> (ACSM, 1990).

A determinação da intensidade difere de pessoa para pessoa devendo, portanto ser individualizada. Porém, para a maioria que visa melhorar a capacidade aeróbia, a intensidade adequada parece ser de no mínimo 60% do VO<sub>2</sub><sub>máx</sub> (WILMORE; COSTILL, 2003).

O monitoramento da intensidade do exercício pode ser baseado na FC de treinamento (FCT), no equivalente metabólico ou na classificação do esforço percebido (WILMORE; COSTILL, 2003).

A FCT pode ser estabelecida pela utilização da FC equivalente a certa porcentagem do  $VO_2$  máx, ou pelo método de Karvonen sobre a reserva da FC máx (isto é, sobre a FC máx subtraída pela FC de repouso) (KARVONEN; KENTALA; MUSTALA, 1957).

O equivalente metabólico (MET) igual a 1,0 equivale ao consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ) de repouso de aproximadamente de  $3,5\text{mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , ou seja, a quantidade de  $O_2$  consumido reflete a quantidade de energia gasta durante uma atividade. Dessa forma, as intensidades das atividades podem ser determinadas pelas suas necessidades de  $O_2$  como múltiplos da taxa do metabolismo de repouso (WILMORE; COSTILL, 2003).

O método de classificação do esforço percebido exige que um indivíduo qualifique de forma subjetiva quão difícil o trabalho é, através de uma escala numérica padrão que é relacionada à intensidade do exercício (BORG, 1998).

A Tabela 1 mostra uma comparação entre os diferentes métodos de classificação da intensidade do exercício.

Tabela 1 – Classificação da intensidade do exercício baseada numa atividade de *endurance* com 20 a 60 minutos de duração comparando os três métodos

<b>Intensidade relativa (%)</b>			
<b>FC máxima</b>	<b><math>VO_2</math> máximo ou reserva da FC máxima</b>	<b>Classificação do esforço percebido</b>	<b>Classificação da intensidade</b>
<35%	<30%	<9	Muito leve
35-59%	30-49%	10-11	Leve
60-79%	50-74%	12-13	Moderada
80-89%	75-84%	14-16	Intensa
≥90%	≥85%	>16	Muito intensa

Nota: adaptado de POLLOCK; WILMORE (1990) *apud* WILMORE; COSTILL, 2003.

## 2.5.2 RESPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO PRODUZIDO PELO TREINAMENTO

Uma vez que uma sessão aguda de exercício físico extenuante pode aumentar muito o  $VO_2$  e o estresse oxidativo corporal (DAVIES *et al.*, 1982; JENKINS, 1988), e que certos sistemas antioxidantes parecem ser ativados frente ao estresse do exercício, espera-se que o treinamento induza alterações nos sistemas antioxidantes celulares para proteção contra o estresse oxidativo (JI, 1995).

Há evidências de que o treinamento resulta em *up-regulation* das enzimas antioxidantes nos tecidos envolvidos ativamente no exercício (KRETZSCHMAR; MULLER, 1993; BELLÓ-KLEIN, 2002), mas ainda há controvérsias (JI, 1995; NAKAO *et al.*, 2000).

Ji *et al.* (1988), mostraram que após 10 semanas de treinamento (1 h/dia, 5 dias/semana a 27 m/min e 15% de inclinação da esteira) as atividades da SOD mitocondrial hepática e da GPX mitocondrial muscular estavam aumentadas nos ratos. Isso indica que as enzimas antioxidantes hepáticas e musculares tiveram aumento das suas atividades pelo efeito protetor do treinamento.

Mena *et al.* (1991), avaliaram as atividades antioxidantes da SOD, CAT e GPX nos eritrócitos de indivíduos sedentários, ciclistas amadores e profissionais. Em repouso, a atividade da SOD estava aumentada nos ciclistas, mas as da CAT e da GPX estavam aumentadas apenas nos ciclistas profissionais. E após um evento de 2800 km em 20 dias, os ciclistas profissionais mostraram um aumento na atividade da SOD e diminuição na atividade da CAT.

Após 12 semanas de treinamento contínuo, em esteira, de moderada intensidade (MI; 35 minutos a 70% do  $VO_{2máx}$ , 5 dias/semana) ou intervalado de alta intensidade (AI; 6 vezes com aproximadamente 5 minutos de intervalo a cerca de 80-95% do  $VO_{2máx}$ , com tempo total de 55 minutos e 5 dias/semana), Criswell *et al.* (1993), observaram que o treinamento de AI foi superior em promover a atividade da GPX na fibra tipo I de ratos em relação ao de MI. Houve aumento da atividade da SOD na fibra tipo I com ambos os treinamentos, porém sem diferenças significativas entre eles.

Powers *et al.* (1994), investigaram a influência da duração (30, 60 e 90 min/dia) e intensidade (35, 65 e 75% do  $VO_{2máx}$ ) de 10 semanas de corrida em esteira na

atividade das enzimas antioxidantes dos diferentes tipos de fibras musculares de ratos. Observaram que, na fibra muscular do tipo I houve aumento significativo da atividade da SOD, mais em função da duração do que da intensidade do exercício e o mesmo comportamento foi observado em relação à GPX, mas apenas nas fibras do tipo IIa. Para a CAT não foram observadas mudanças em qualquer tipo de fibra muscular.

Child *et al.* (1998), observaram que logo após uma simulação de meia-maratona (intensidade média de  $77.1 \pm 1.0\%$  do  $VO_2$  de pico), corredores treinados tiveram um aumento na capacidade antioxidante total (TAC – *total antioxidant capacity*), porém a concentração de malondialdeído plasmático, e a atividade da creatina quinase, também estavam elevadas após o esforço físico, sugerindo que o aumento na TAC não preveniu a lipoperoxidação e a lesão muscular, respectivamente.

Através da realização de diversos protocolos de ratos submetidos à corrida em esteira (exaustão: 30 m/min com 15% de inclinação; treinamento curto: 8 semanas, 5 dias/semana, 20 m/min com 15% de inclinação, 1 h/dia; treinamento longo: idem ao curto, porém realizado em 1 ano), Navarro-Arévalo e Sánchez-del-Pino (1998), examinaram o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, e a atividade da SOD no músculo e fígado de ratos *Wistar* machos jovens e velhos. Através dos seus achados, foi sugerido que as EROs exercem papéis distintos em relação à idade, e aos diferentes tipos de intensidade e duração do exercício, através da modificação observada nos níveis de lipoperoxidação e da atividade da enzima antioxidante.

Nakao *et al.* (2000), avaliaram os efeitos de 6 semanas de treinamento com natação (1h/dia, 5 dias/semana) nas mudanças das três isoenzimas da SOD em camundongos. Os resultados obtidos sugeriram que as respostas das isoenzimas da SOD são diferentes em diversos tecidos, exceto para o rim que parece ser o órgão mais sensível à adaptação do estresse oxidativo induzido pelo treinamento, uma vez que a quantidade das SOD-EC, SOD-CuZn e SOD-Mn estava aumentada.

Sentürk *et al.* (2001), analisaram os efeitos agudos do exercício exaustivo em ratos treinados (treinamento: 4 semanas, 25 m/min com 5% de inclinação, 1 h/dia; exaustão: 25 m/min com 15% de inclinação). Comparando com os ratos sedentários e treinados controles, a lipoperoxidação dos eritrócitos estava aumentada nos ratos treinados submetidos ao protocolo de exaustão, porém seus parâmetros funcionais e estruturais dos eritrócitos não estavam diferentes dos ratos treinados controles. Esses

dados sugerem que o estresse oxidativo induzido pelo exercício contribui para a deterioração do eritrócito em ratos sedentários, mas não em ratos treinados.

No decurso do treinamento com natação a 80% da carga máxima por 30 minutos, em diferentes temperaturas e durante a prenhez, Osorio *et al.* (2003a), observaram em ratas que o treinamento parece ter uma ativação mais eficiente dos mecanismos antioxidantes atenuando o estresse oxidativo térmico nesses animais, apesar da prenhez por si só causar aumento das EROs.

Oztasan *et al.* (2004), compararam os níveis das enzimas antioxidantes e de malondialdeído dos eritrócitos, no repouso e após episódio exaustivo agudo em ratos treinados por 8 semanas (1.5 h/dia, 5 dias/semana a 2.1 Km/h) e ratos sedentários. Após exercício exaustivo agudo não houve aumentos significativos nos níveis de malondialdeído dos ratos treinados em relação aos níveis, em repouso, dos sedentários e treinados controles. Houve aumento da atividade da SOD, mas não da GPX nos ratos treinados após exaustão. Os resultados sugerem que o treinamento pode ser benéfico no combate ao estresse oxidativo induzido por episódios agudos de exercício exaustivo através da *up-regulation* das atividades das enzimas antioxidantes.

Por fim, pudemos observar que cada tecido possui sua própria capacidade antioxidante de acordo com a carga oxidativa mais provavelmente encontrada nas diferentes situações de treinamento. Portanto, devemos esperar que os tecidos respondam diferentemente aos agentes pró-oxidantes. E, com o melhor conhecimento da eficiência antioxidante dos tecidos nós devemos ser capazes de prognosticar a probabilidade do tecido de passar pelo estresse oxidativo induzido pelo treinamento (MOLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Exercício Experimental do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap), na cidade de São José dos Campos/São Paulo.

#### 3.2 ANIMAIS

A amostra experimental foi composta por 36 ratos *Wistar* machos ( $180\pm 20$  gramas) provenientes do Biotério Central do IP&D da UniVap.

Os animais tiveram duas semanas de adaptação no biotério local, do Laboratório de Fisiologia do Exercício Experimental, onde nos primeiros três dias foi realizado o procedimento de vermifugação (15mL de vermífugo – ricobendazole composto, marca *Orurofino* – diluídos em 5L de água).

Os ratos foram mantidos numa condição padrão de temperatura (22-25°C), umidade relativa (40-60%), ciclo de 12 horas claro-escuro (08h00min-20h00min claro, 20h00min-08h00min escuro) e alimentados com ração da marca *Labcil* e água *ad libitum*. Após o período de adaptação à natação, os animais foram randomizados e divididos em grupos de três animais por caixa de contenção.

O tratamento dos animais nesses experimentos estava de acordo com a Lei nº6.638, de 8 de maio de 1979 e com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (ANDERSEN *et al.*, 2004).

#### 3.3 ADAPTAÇÃO À NATAÇÃO

Após a adaptação ao biotério local, todos os ratos foram submetidos a um período de adaptação à natação para reduzir o estresse sem promover adaptações do treinamento (VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2002). Essa adequação foi

realizada em um tanque (80cm x 60cm x 60cm) com capacidade para 250L de água, mantidos a temperatura de  $34\pm 1^{\circ}\text{C}$  controlada por um termostato.

A adaptação consistiu em nado livre de um grupo de 6 animais sem carga durante 10 minutos/dia por cinco dias, sempre entre as 08h00min e 12h00min. A natação em grupo foi utilizada, pois promove um exercício mais vigoroso do que o nado individual (UENO *et al.*, 1997; NAKAO *et al.*, 2000).

Após a adaptação, os animais já se encontravam com um tempo de vida de 60-65 dias e com o peso adequado ( $237\pm 4$  gramas) para a iniciação do protocolo de treinamento.

### **3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Após o período de adaptação à natação, os ratos foram distribuídos em seis grupos experimentais:

1. Grupo Controle (SED):

Constituído por seis ratos machos sedentários.

2. Grupo Treinado a 50% do teste de carga máxima (CIN):

Constituído por seis ratos machos.

3. Grupo Treinado a 60% do teste de carga máxima (SES):

Constituído por seis ratos machos.

4. Grupo Treinado a 70% do teste de carga máxima (SET):

Constituído por seis ratos machos.

5. Grupo Treinado a 80% do teste de carga máxima (OIT):

Constituído por seis ratos machos.

6. Grupo Treinado a 90% do teste de carga máxima (NOV):

Constituído por seis ratos machos.

### **3.5 DETERMINAÇÃO DA CARGA MÁXIMA**

Após a delimitação dos grupos experimentais, todos os animais foram submetidos ao teste de carga máxima segundo Osorio *et al.* (2003a,b), em uma piscina

cilíndrica (50cm x 45cm), construída em acrílico transparente com a temperatura da água a  $34\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

O teste de carga máxima foi realizado individualmente, ou seja, um animal por vez. Foram utilizadas placas de alumínio como carga, as quais eram colocadas em um clipe fixado a um elástico posicionado junto ao tórax do animal (VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2002), de modo confortável.

Inicialmente os animais eram pesados para que pudéssemos calcular os percentuais da carga de trabalho, que foi aumentada a cada três minutos através da colocação das placas no clipe fixado ao elástico, correspondendo a 1%, 2%, 3%, etc. do peso corporal total, até que o rato entrasse em exaustão, atingindo a carga máxima. A exaustão foi determinada pela manutenção do animal abaixo da superfície da água (LEEUWENBURGH; JI, 1998), por aproximadamente 8 – 10 segundos (DAWSON; HORVATH, 1970; OSORIO *et al.*, 2003a,b).

A determinação da carga máxima suportada pelos animais durante o teste nos permitiu o ajuste da carga relativa de trabalho para o treinamento físico a 50, 60, 70, 80 e 90% dessa carga.

O teste de carga máxima foi repetido periodicamente para o reajuste das cargas, com intervalo entre 5 semanas do primeiro para o segundo, 7 semanas do segundo para o terceiro e 5 semanas do terceiro para o último teste, realizado no final do treinamento, ou seja, 2 dias antes do sacrifício.

### **3.6 TREINAMENTO FÍSICO**

O treinamento dos cinco grupos foi realizado durante 5 dias/semana por 17 semanas, sempre entre as 08h00min e 12h00min, conforme o processo de adaptação, totalizando 18 semanas de natação. Cada sessão teve duração de 30 minutos.

A carga que os animais carregaram durante o treinamento consistia do peso total de pesos de chumbo para pesca envolvidos em uma tira de fita crepe fixa em um elástico posicionado junto ao tórax do animal (VOLTARELLI; GOBATTO; MELLO, 2002), de modo confortável.

Devido às altas cargas carregadas pelos grupos experimentais OIT e NOV, esses passaram por um processo de adaptação à carga que consistiu de 10 minutos na primeira

semana de treinamento, 20 minutos na segunda semana e 30 minutos até a finalização das 17 semanas do treinamento físico.

Após o término de cada sessão de natação, os elásticos com pesos dos seis animais eram retirados e em seguida, os ratos eram colocados em uma caixa de contenção por 30 minutos. No fundo dessa caixa existia uma grade de ferro que impedia o contato dos animais com a água que escoava dos seus pêlos, permitindo dessa forma a secagem dos mesmos.

Durante o experimento todos os animais permaneceram no mesmo laboratório, sofrendo as mesmas influências ambientais. Todos os animais, independentemente do grupo a qual pertenciam, passaram pelos mesmos procedimentos prévios, ou seja, pelo período de adaptação e pelo teste de carga máxima.

### **3.7 CONTROLE DO PESO CORPORAL**

Para obtenção do peso corporal dos animais durante o experimento foi utilizada uma balança digital (marca *Bel Engineering*). As mensurações do peso eram realizadas sempre de 7 em 7 dias, antes do treinamento, entre as 07h00min e 08h00min.

### **3.8 OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS**

Diariamente, eram feitas observações e anotações do comportamento dos animais, principalmente quanto às condições da pele e dos pêlos.

### **3.9 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS**

O sacrifício foi realizada em uma manhã, após 2 dias da última sessão de treinamento, para atenuar os efeitos agudos do exercício (NAKAO *et al.*, 2000). O método utilizado foi a decapitação (OHKAWA; OH-ISHI; YAGI, 1979; ADAMO *et al.*, 1989; JI; DILLON; WU, 1990; JI; WU; THOMAS, 1991; VENDITTI *et al.*, 1996; OH-ISHI *et al.*, 1996; OH-ISHI *et al.*, 1997b; VENDITTI; DI MEO, 1997; MATAIX *et al.*, 1998; NAVARRO-ARÉVALO; SÁNCHEZ-DEL-PINO, 1998; BEJMA; JI, 1999; NAVARRO-ARÉVALO; CAÑAVATE; SÁNCHEZ-DEL-PINO, 1999; VENDITTI;

MASULLO; DI MEO, 1999; KOHNO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2003; OSORIO, *et al.*, 2003a,b; ANDERSEN *et al.*, 2004).

Em seguida, o sangue total (cerca de 4-5mL) foi coletado em um tubo de ensaio (marca *Vacutainer* - 10mL) contendo anticoagulante (heparina) e em outro tubo de ensaio (10mL) sem anticoagulante (seco), ambos mantidos sob refrigeração com gelo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (marca *Excelsa II-FANEM*) a 3000 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente, para obtenção do plasma e soro, respectivamente, que foram congelados a -40°C (RADAK *et al.*, 2000), no freezer localizado no Laboratório de Preparação de Amostras do IP&D da UniVap.

Além da coleta sanguínea, o coração também foi retirado e armazenado a -40°C, para posterior análise da possível hipertrofia cardíaca (procedimento descrito a seguir).

### **3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

Para análise da lipoperoxidação foi utilizado o plasma obtido do tubo contendo sangue heparinizado. Os eritrócitos desse mesmo tubo foram submetidos ao processo de lavagem, no mesmo dia da coleta, conforme Somani, Frank e Rybak (1995), para posterior análise das atividades das enzimas antioxidantes.

O procedimento de lavagem foi realizado no Laboratório de Cultura de Células do IP&D da UniVap e a análise das enzimas antioxidantes nos eritrócitos foi feita pelo Laboratório VITAE situado em São Paulo/São Paulo.

O soro obtido do tubo seco foi utilizado para análise da enzima creatina quinase.

O espectrofotômetro da marca *SHIMADZU UV-1650PC* foi utilizado para as análises bioquímicas da lipoperoxidação e creatina quinase.

#### **3.10.1 LIPOPEROXIDAÇÃO**

Para a medida da peroxidação de lipídios em plasma foi utilizada a técnica de Ohkawa, Oh-Ishi e Yagi (1979), baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica (rosa), que foi medida no

espectrofotômetro com 535nm. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS/mL de plasma.

### **3.10.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE**

Segundo o método de McCord e Fridovich (1969), a transformação da xantina em ácido úrico, catalisada pela xantina oxidase, ativa o  $O_2$  a  $O_2^-$ . A reação é acoplada à redução do citocromo c pelo  $O_2^-$ , que pode ser acompanhada através da absorvância em 550nm, a 25°C. Os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina (U/mg hb), onde uma unidade (1U) é definida como a quantidade de enzima na amostra requerida para inibir 50% da redução do citocromo c por minuto, a 25°C, num pH de 7,8.

### **3.10.3 GLUTATIONA PEROXIDASE**

A GPX catalisa a redução de  $H_2O_2$  e de outros hidroperóxidos orgânicos, ao mesmo tempo em que oxida a GSH.

O método de Sies *et al.* (1979), mede a velocidade de oxidação de NADPH catalisada pela GR, que é proporcional à produção de GSSG, catalisada pela GPX em presença de peróxido de terc-butila, que pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorvância em 340 nm, a 30°C. Os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina (U/mg hb), onde 1U é a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1mmol de NADPH/minuto, a 30°C, num pH de 7,0.

### **3.10.4 CATALASE**

A catalase promove a oxidação de  $H_2O_2$  a água e  $O_2$ . A técnica foi descrita por Beutler (1975), e quantifica a velocidade de decomposição do  $H_2O_2$  pela enzima, através do decréscimo de absorvância em 230nm, a 30°C. Os resultados foram expressos em U/mg de hemoglobina (U/mg hb), onde 1U de catalase corresponde à atividade de enzima que hidrolisa 1mmol de  $H_2O_2$  por minuto, a 30°C, num pH de 8,0.

### 3.10.5 CREATINA QUINASE

A atividade da enzima creatina quinase (CK) foi avaliada através de um kit diagnóstico da marca *Laborlab* (Guarulhos/São Paulo), através do método cinético ultravioleta (340nm; a 37°C). Os resultados foram expressos em U/L.

### 3.11 ANÁLISE DA ESTRUTURA CARDÍACA

Após o sacrifício, foi realizada rapidamente uma toracotomia para retirada do coração que foi lavado em solução salina (0,9%) para a remoção de coágulos e congelado em freezer a – 40° C até o momento da análise. Após o descongelamento, o mesmo indivíduo realizou a pesagem (balança digital da marca *Bel Engineering*) e a dissecação dos corações, sendo os átrios removidos através de um corte feito com auxílio de uma tesoura no sulco que separa as câmaras cardíacas, e os ventrículos pesados. Desta forma obtivemos o peso cardíaco total (PCT) e o peso dos ventrículos, dados em mg.

Em seguida, foi retirado o ventrículo direito através de um corte feito com auxílio de uma tesoura nos sulcos interventriculares direito e esquerdo, e o tecido remanescente foi pesado, obtendo-se assim o peso ventricular esquerdo (PVE), em mg. Através da diferença entre o peso cardíaco total e o peso ventricular esquerdo obtivemos o peso ventricular direito (PVD), em mg.

Estes valores foram corrigidos em função do peso corpóreo obtido no dia do sacrifício, e assim foram finalmente expressos como peso cardíaco relativo (PCR = PCT/peso corpóreo); índice do peso ventricular esquerdo (IPVE = PVE/peso corpóreo); e o índice do peso ventricular direito (IPVD = PVD/peso corpóreo), todos os valores dado em mg/g (SANTOS *et al.*, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2000).

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) seguido do teste de *Tukey*, quando necessário. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa de informática GraphPad InStat®. Os resultados

foram expressos com a média  $\pm$  erro padrão da média (média $\pm$ E.P.M.), sendo que os valores de  $p < 0,05$  (5%) foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

Os dados obtidos foram processados de forma a permitir que os resultados fossem expressos em tabelas e gráficos.

### 4.1 EVOLUÇÃO DAS PORCENTAGENS ATINGIDAS NOS TESTES DE CARGA MÁXIMA

A Tabela 2 demonstra a comparação dos dados obtidos em cada teste de carga máxima por cada grupo experimental. Observamos aumentos significativos das porcentagens atingidas no primeiro teste dos grupos SET e OIT em relação ao SED. No segundo teste não foram observadas diferenças significativas. Observamos aumentos significativos das porcentagens atingidas no terceiro teste dos grupos CIN, SES, SET, OIT e NOV em relação ao SED; dos grupos SET e NOV em relação ao CIN e SES; e do grupo NOV em relação ao OIT. E, foram observados aumentos significativos das porcentagens atingidas no quarto e último teste de carga máxima dos grupos CIN, SES, SET, OIT e NOV em relação ao SED.

Tabela 2 – Porcentagens atingidas nos quatros testes de carga máxima pelos grupos sedentário e treinados.

	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
<b>Início do treinamento (1º teste)</b>	4,8±0,17	5,8±0,75	5,8±0,41	6±0,63*	6±0,21*	5,7±0,52
<b>5 semanas de treinamento (2º teste)</b>	4,5±0,34	5,7±0,21	5,7±0,33	5,7±0,33	5,7±0,33	5,2±0,17
<b>12 semanas de treinamento (3º teste)</b>	5±0,26	6,7±0,33*	7±0,36*	8,8±0,48* # □	8±0,48*	9,8±0,31* # □♦
<b>17 semanas de treinamento (4º teste)</b>	5,3±0,21	8,8±1,60*	8,5±1,22*	8,5±1,05*	9±0,26*	9,3±1,55*

Média±E.P.M.; n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao SED; #p<0,05 em relação ao CIN; □p<0,05 em relação ao SES e ♦p<0,05 em relação ao OIT.

As Figuras 2, 3 e 4 demonstram os dados significativos obtidos nos primeiro, terceiro e quarto testes de carga máxima.

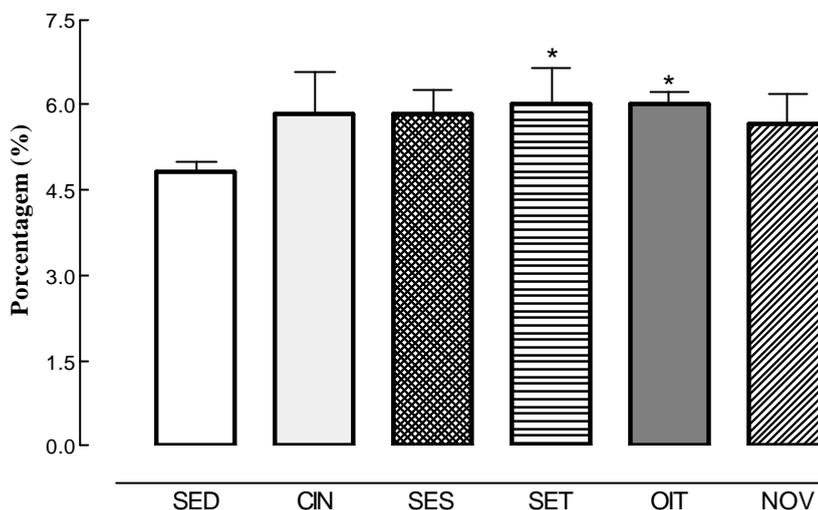


Figura 2 – Porcentagens atingidas no primeiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED.

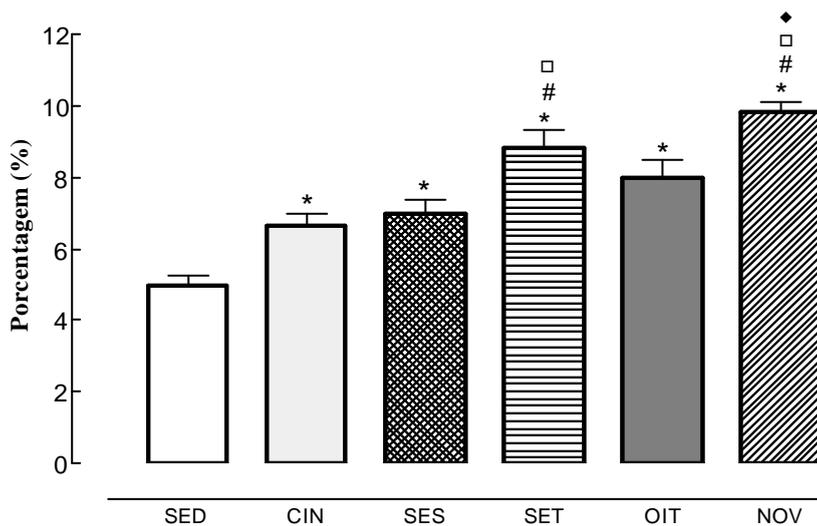


Figura 3 – Porcentagens atingidas no terceiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED; #p<0,05 em relação ao CIN; □p<0,05 em relação ao SES e ◆p<0,05 em relação ao OIT.

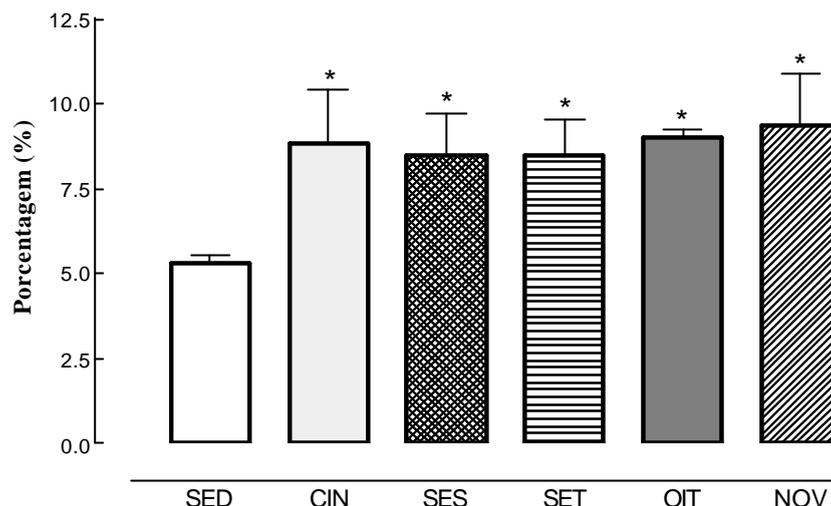


Figura 4 – Porcentagens atingidas no quarto teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED.

A Tabela 3 indica a comparação dos dados obtidos por cada grupo experimental nos quatro testes de carga máxima. Não observamos diferenças significativas das porcentagens atingidas nos testes pelo grupo SED. Verificamos aumento significativo da porcentagem do 4º teste em relação aos 1º, 2º e 3º testes dos grupos CIN e SES. E, observamos aumento significativo das porcentagens dos 3º e 4º testes em relação aos 1º e 2º testes dos grupos SET, OIT e NOV.

Tabela 3 – Porcentagens atingidas por cada grupo experimental nos quatros testes de carga máxima.

	Início do treinamento (1º teste)	5 semanas de treinamento (2º teste)	12 semanas de treinamento (3º teste)	17 semanas de treinamento (4º teste)
SED	4,8±0,17	4,5±0,34	5±0,26	5,3±0,21
CIN	5,8±0,75#	5,7±0,21#	6,7±0,33#	8,8±1,60
SES	5,8±0,41#	5,7±0,33#	7±0,36#	8,5±1,22
SET	6±0,63*#	5,7±0,33*#	8,8±0,48	8,5±1,05
OIT	6±0,21*#	5,7±0,33*#	8±0,48	9±0,26
NOV	5,7±0,52*#	5,2±0,17*#	9,8±0,31	9,3±1,55

Média±E.P.M.; n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao 3º teste; #p<0,05 em relação ao 4º teste.

## 4.2 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

A Tabela 4 evidencia a comparação dos pesos corpóreos obtidos nos quatro testes de carga máxima. No primeiro teste, observamos diminuições significativas dos pesos corporais dos grupos SES e SET em relação ao SED e aumentos significativos dos pesos corporais dos grupos SED, OIT e NOV em relação ao CIN. Verificamos no segundo teste, diminuições significativas dos pesos corporais de todos os grupos treinados em relação ao SED. Já no terceiro teste, observamos uma diminuição significativa do peso corporal do grupo CIN em relação ao SED. E, no quarto e último teste de carga máxima, verificamos diminuições significativas dos pesos corporais dos grupos CIN, OIT e NOV em relação ao SED.

Tabela 4 – Pesos corporais dos grupos sedentário e treinados obtidos nos quatros testes de carga máxima.

	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
<b>Início do treinamento (1° teste)</b>	273±10#	204±7	231±9*	226±6*	245±5#	248±8#
<b>5 semanas de treinamento (2° teste)</b>	361±8	271±25*	295±10*	294±9*	301±6*	310±8*
<b>12 semanas de treinamento (3° teste)</b>	428±10	333±18*	379±14	380±7	377±7	377±12
<b>17 semanas de treinamento (4° teste)</b>	453±9	364±20*	414±17	406±7	385±9*	387±14*

Média±E.P.M.; n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao SED; #p<0,05 em relação ao CIN.

As Figuras 5, 6, 7 e 8 demonstram os pesos corpóreos significativos obtidos nos primeiro, segundo, terceiro e quarto testes de carga máxima, respectivamente.

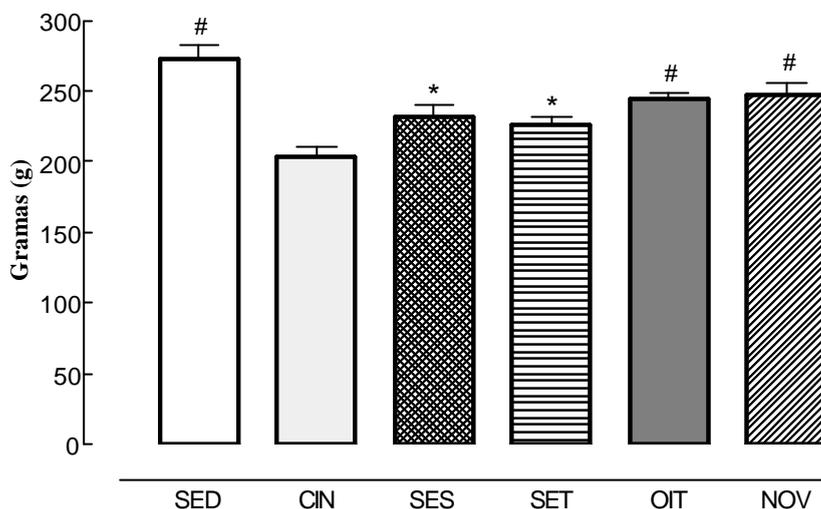


Figura 5 – Pesos corporais obtidos no primeiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED e #p<0,05 em relação ao CIN.

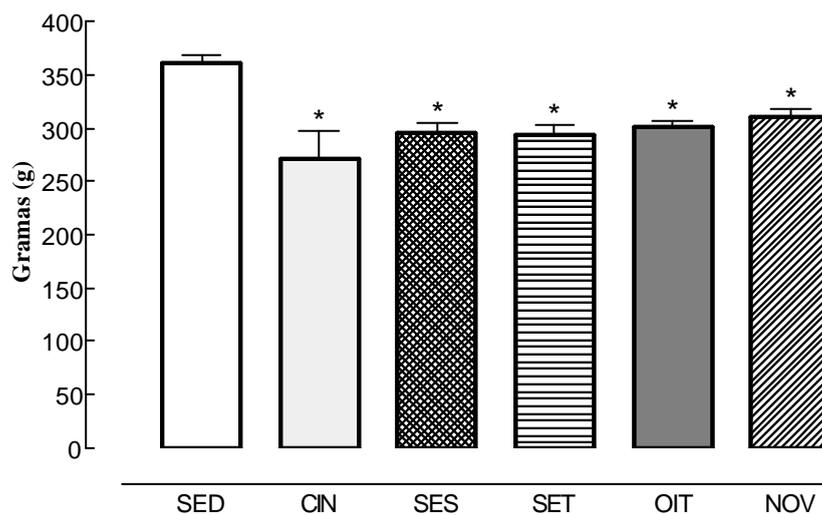


Figura 6 – Pesos corporais obtidos no segundo teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED.

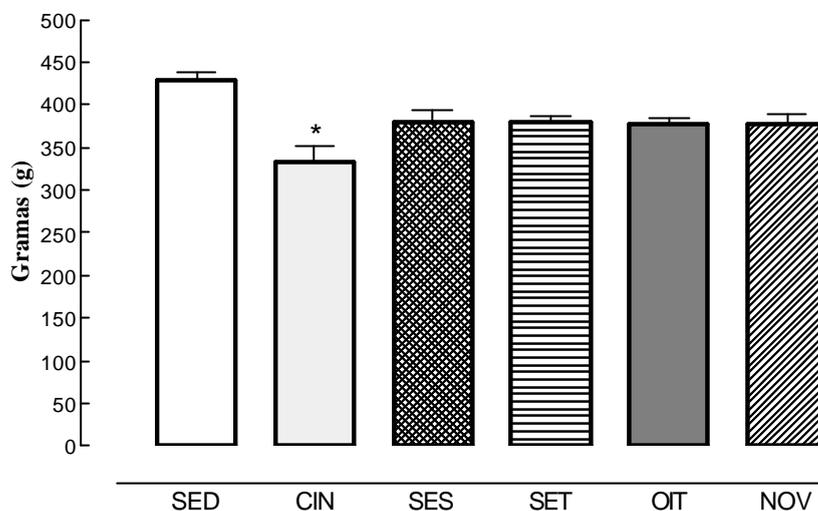


Figura 7 – Pesos corporais obtidos no terceiro teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED.

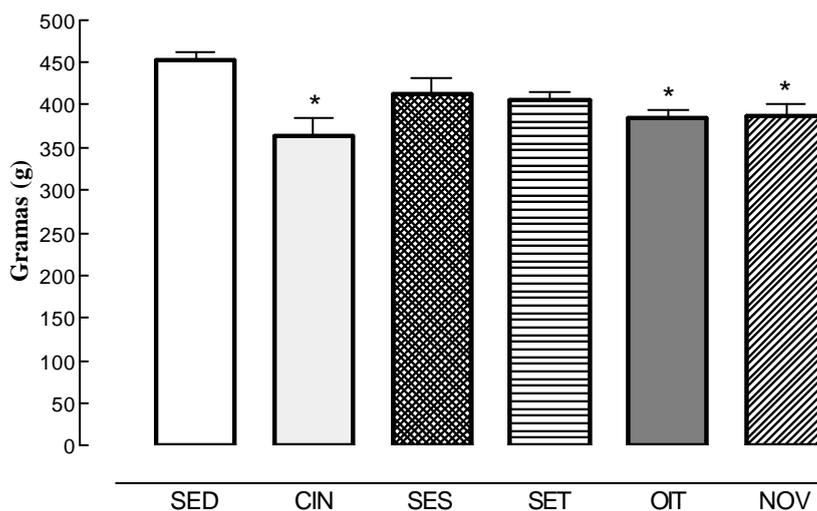


Figura 8 – Pesos corporais obtidos no quarto teste de carga máxima pelos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO SISTÊMICA

A Tabela 5 e a Figura 9 apontam os níveis plasmáticos das TBARS obtidos após dois dias da última sessão de treinamento. Não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 5 – Níveis das TBARS plasmáticas dos grupos sedentário e treinados obtidos após 48h da última sessão de natação.

TBARS plasmáticas (nmoles/mL)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	3,32±0,39	5,8±0,83	3,58±0,53	3,99±0,76	3,46±0,80	5,64±0,72

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima.

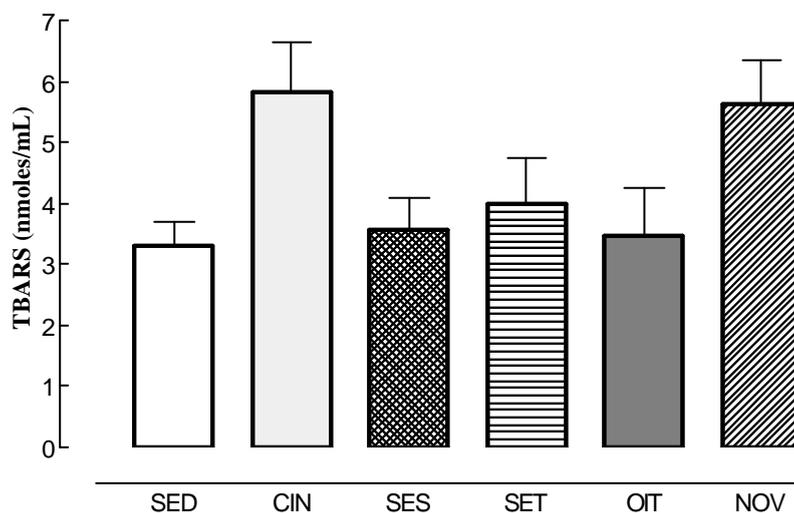


Figura 9 – Níveis plasmáticos das TBARS obtidos após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6.

#### 4.4 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A Tabela 6 e a Figura 10 evidenciam as atividades da SOD nos eritrócitos obtidas após dois dias da última sessão de treinamento. Observamos aumentos significativos das atividades dessa enzima nos grupos SES, SET, OIT e NOV em relação ao SED e nos grupos OIT e NOV em relação ao CIN.

Tabela 6 – Atividades da SOD nos eritrócitos dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.

Atividade da SOD no eritrócito (U/mg hb)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	29,2±7,2	167,7±29,8	224,4±29,2*	215,6±13,4*	349,7±31,8* #	367,0±80,5* #

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao SED e #p<0,05 em relação ao CIN.

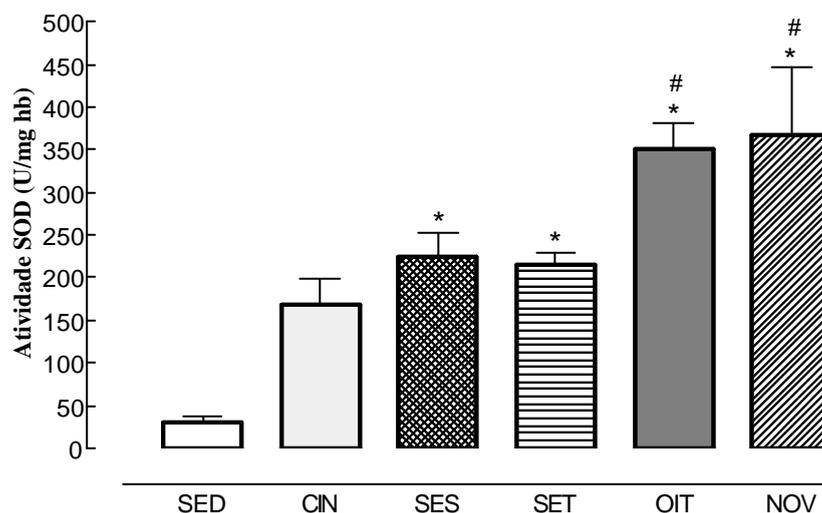


Figura 10 – Atividades da SOD nos eritrócitos obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED e #p<0,05 em relação ao CIN.

## 4.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A Tabela 7 e a Figura 11 mostram as atividades da GPX nos eritrócitos obtidas após dois dias da última sessão de treinamento. Foram observadas diminuições significativas das atividades dessa enzima nos grupos SED, SES, SET, OIT e NOV em relação ao CIN.

Tabela 7 – Atividades da GPX nos eritrócitos dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.

Atividade da GPX no eritrócito (U/mg hb)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	59,8± 6,4*	381,1±64,7	178,7±58,9*	96,3±17,8*	76,6±8,7*	167,3±15,0*

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao CIN.

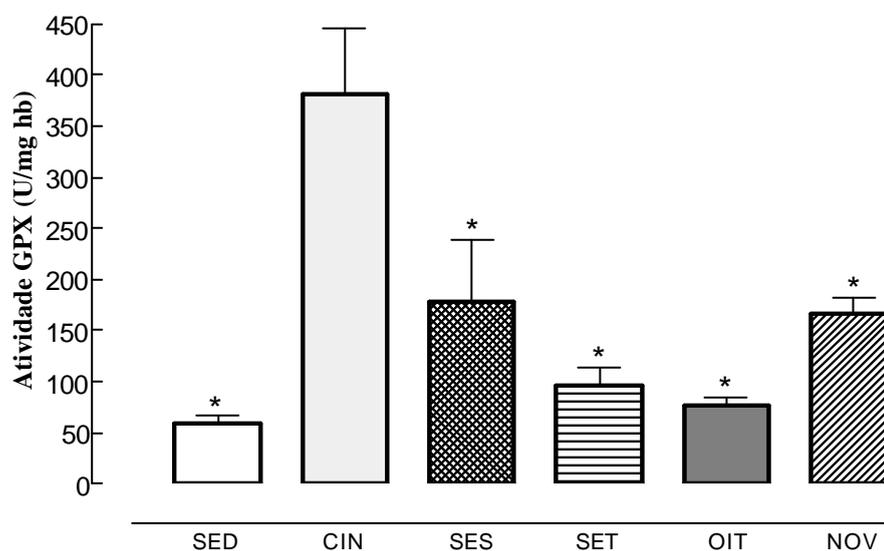


Figura 11 – Atividades da GPX nos eritrócitos obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao CIN.

## 4.6 ATIVIDADE DA CATALASE

A Tabela 8 e a Figura 12 indicam as atividades da CAT nos eritrócitos obtidas após dois dias da última sessão de treinamento. Observamos diminuições significativas das atividades dessa enzima nos grupos SED, CIN e OIT em relação ao NOV.

Tabela 8 – Atividades da CAT nos eritrócitos dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.

Atividade da CAT no eritrócito (U/mg hb)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	122,5±15,9*	125,4±21,8*	129,9±23,3	152,1±20,4	117,0±13,9*	204,8±10,1

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao NOV.

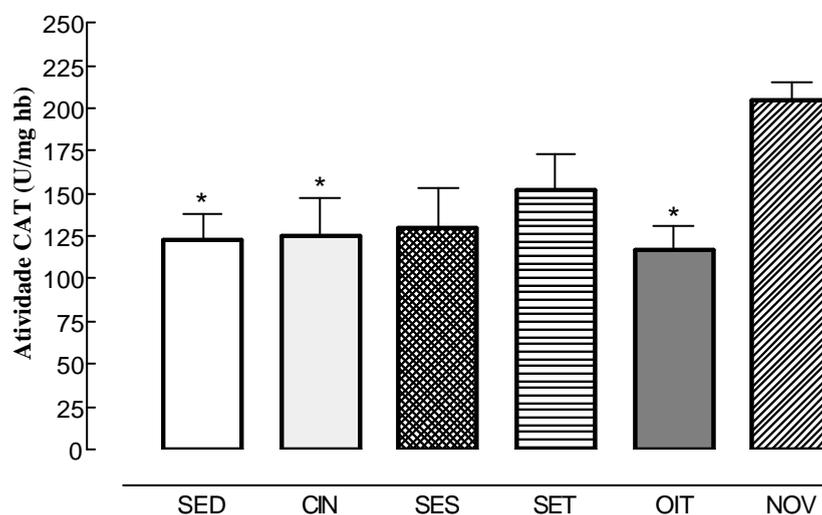


Figura 12 – Atividades da CAT nos eritrócitos obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao NOV.

## 4.7 ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE

A Tabela 9 e a Figura 13 apontam as atividades da CK sérica obtidas após o sacrifício dos animais. Foi observado um aumento significativo da atividade dessa enzima no grupo NOV em relação ao SED.

Tabela 9 – Atividades da CK sérica dos grupos sedentário e treinados obtidas após 48h da última sessão de natação.

Atividade da CK sérica (U/L)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	1269,1± 283,7	1743,1±1149,2	1959,9±440,9	1870,4±343,6	2448,7±240,5	3042,8±93,2*

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima. \*p<0,05 em relação ao SED.

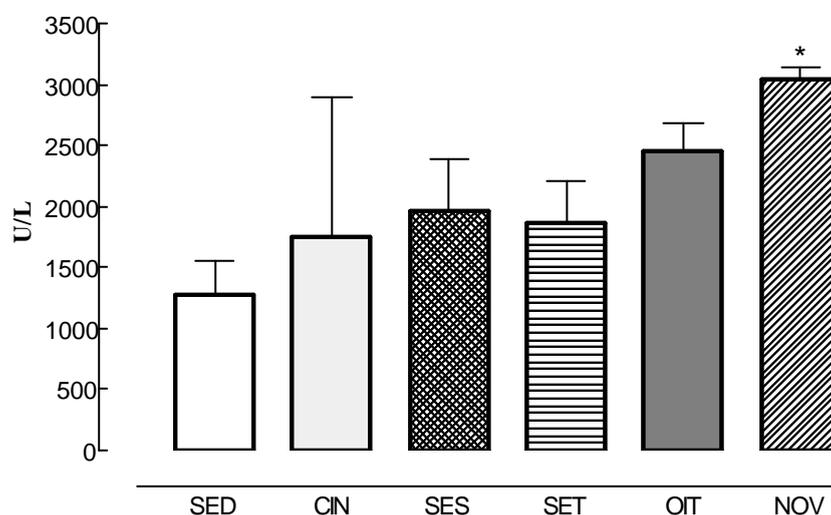


Figura 13 – Atividades da CK sérica obtidas após 48h da última sessão de natação dos grupos sedentário (SED) e treinados (CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima). Valores médios±E.P.M., n=6. \*p<0,05 em relação ao SED.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA CARDÍACA

As Tabelas 10,11 e12 demonstram os dados obtidos do peso cardíaco relativo, índice do peso ventricular esquerdo e índice do peso ventricular direito, respectivamente, após o sacrifício dos animais. Não observamos diferenças significativas. Contudo, notamos, no PCR, um aumento de 6,6% para os grupos CIN e OIT, 7,87% para os grupos SES e SET e de 11,77% para o grupo NOV em relação ao SED, e no IPVE, observamos um aumento de 3,28% para o CIN, 6,34% para o SES, 5,63% para o SET, 10,8% para o OIT e 12,68% para o NOV em relação ao SED.

Tabela 10 – Peso cardíaco relativo dos grupos sedentário e treinados obtido após 48h da última sessão de natação.

PCR (mg/g)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	3,3±0,1	3,6±0,2	3,6±0,1	3,6±0,1	3,6±0,1	3,8±0,1

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima.

Tabela 11 – Índice do peso ventricular esquerdo dos grupos sedentário e treinados obtido após 48h da última sessão de natação.

IPVE (mg/g)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	2,1±0,05	2,2±0,1	2,3±0,04	2,3±0,1	2,4±0,06	2,4±0,1

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima.

Tabela 12 – Índice do peso ventricular direito dos grupos sedentário e treinados obtido após 48h da última sessão de natação.

IPVD (mg/g)						
	SED	CIN	SES	SET	OIT	NOV
Média± E.P.M.	0,7±0,04	0,7±0,1	0,7±0,05	0,7±0,05	0,6±0,04	0,7±0,1

n=6. SED, sedentário; CIN, treinado a 50% da carga máxima; SES, treinado a 60% da carga máxima; SET, treinado a 70% da carga máxima; OIT, treinado a 80% da carga máxima; NOV, treinado a 90% da carga máxima.

## 5. DISCUSSÃO

Os mecanismos complexos que contribuem para os efeitos benéficos promovidos pelo treinamento incluem o menor tecido adiposo, melhora do perfil hormonal e lipídico, aumento da densidade óssea, adaptações das proteínas de transporte e receptores, melhora do acoplamento mitocondrial e alterações nas defesas antioxidantes (VIÑA *et al.*, 2000; LEEUWENBURGH; HEINECKE, 2001), como também o treinamento auxilia na perda de peso corpóreo (VIÑA *et al.*, 2000).

Sendo assim, no final das 17 semanas de treinamento, foi observado que todos os pesos corporais dos grupos treinados apresentavam menores pesos do que o grupo controle, contudo apenas os grupos CIN, OIT e NOV tiveram pesos significativos quando comparados com o grupo SED. Nota-se que as intensidades mais altas e a mais baixa apresentaram os menores pesos.

E, o principal efeito do treinamento de *endurance* de baixa intensidade decorre do aumento da oxidação provavelmente pelo aumento da densidade mitocondrial (COYLE, 2000). Já, o característico aumento da oxidação de lipídios decorrente do treinamento de *endurance* de moderada a alta intensidade ocorre devido a oxidação dos triglicérides intramusculares e do aumento da densidade mitocondrial (HURLEY *et al.*, 1986; COYLE, 2000).

Quanto ao teste de carga máxima é válido ressaltar que esse teste permitiu a individualização da carga metabólica do animal, evitando que animais distintos sofressem diferentes impactos devido à intensidade imposta por uma mesma carga absoluta de treinamento. Além disso, é relevante lembrar que a intensidade tem influência direta nas adaptações ao treinamento (EVANGELISTA; BRUM; KRIEGER, 2003) e nos níveis do estresse oxidativo (KIHLSSTROM, 1992).

No primeiro teste de carga máxima nós obtivemos diferenças significativas entre o grupo SED, com menor porcentagem, em relação aos grupos SET e OIT, provavelmente devido às diferenças individuais desses animais que com o treinamento apresentaram adaptações relevantes que serão discutidas a seguir.

Após 5 semanas de treinamento, não houve diferenças significativas entre o grupo sedentário em relação aos grupos treinados. Esses resultados sugerem que através do teste de carga máxima não foi possível detectarmos adaptações significativas ao

treinamento, embora as médias da porcentagem atingida no segundo teste de carga máxima dos ratos treinados terem sido maiores do que a média dos ratos controles.

Depois de 12 semanas de treinamento, o grupo SED foi estatisticamente significativo em relação a todos os outros grupos, ou seja, CIN, SES, SET, OIT e NOV, indicando que os animais treinados já apresentaram adaptações ao treinamento com natação, por apresentarem maiores porcentagens de carga atingidas no teste. Além disso, houve diferenças significativas entre os grupos treinados tais como, os grupos SET e NOV que atingiram porcentagens de carga maiores nesse terceiro teste de carga máxima em relação aos grupos CIN e SES, e o grupo NOV também atingiu porcentagem maior do que o grupo OIT. No geral, quanto maior foi a intensidade do treinamento maior foi a porcentagem atingida no teste de carga máxima.

No último teste de carga máxima, após 17 semanas de treinamento, obtivemos diferenças significativas de todos os grupos treinados que atingiram maiores porcentagens em relação ao grupo sedentário, porém não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos treinados.

Ao comparar as porcentagens atingidas por cada grupo entre os quatro testes, observamos que os grupos SET, OIT e NOV tiveram aumentos significativos dos terceiros e quartos testes em relação aos primeiros e segundos testes. Já os grupos CIN e SES apresentaram aumentos significativos dos quartos testes em relação aos primeiros, segundos e terceiros testes.

Esses resultados sugerem que as maiores intensidades mostraram maiores adaptações fisiológicas ao treinamento de *endurance* em relação às menores intensidades, tanto pelo fato da exibição significativa das porcentagens atingidas logo do segundo para o terceiro teste de carga máxima quanto por manifestarem de um modo geral as maiores médias das porcentagens obtidas nos terceiros e quartos testes.

Sabe-se que o peso e o volume do coração aumentam em decorrência do aumento da intensidade do treinamento de *endurance*. Dentre as câmaras cardíacas, o ventrículo esquerdo é o que mais sofre alterações (WILMORE; COSTILL, 2003).

E, quando comparamos os achados dos grupos treinados em relação ao grupo SED, não observamos resultados significativos no PCR e no IPVE. O estudo de Santos *et al.* (1999), também não encontrou resultados significativos no PCR de ratos

treinados, e Machida *et al.* (2000) e Wisloff *et al.* (2001), verificaram aumentos significativos nos IPVE de ratos submetidos ao treinamento.

Apesar dos benefícios do treinamento, este também representa uma forma de estresse oxidativo aos organismos e, portanto pode alterar o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes (JI, 1999).

No presente estudo, os níveis de malondialdeído (MDA), um produto estável da lipoperoxidação, foram medidos para indicação da produção das EROs. O material escolhido foi o plasma, pois contém quantidade suficiente de ácidos graxos poliinsaturados, além de refletir o estado sistêmico da peroxidação lipídica (NISHIYAMA *et al.*, 1998).

Além disso, o MDA é o marcador de lipoperoxidação mais amplamente utilizado e é freqüentemente avaliado pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) (ZWART *et al.*, 1999). Entretanto, outros compostos podem reagir com o TBA, tais como, a bilirrubina (KNIGHT; PIEPER; McCLELLAN, 1988), aldeídos saturados e não saturados não funcionais, carboidratos e prostaglandinas (ALESSIO, 2000 *apud* URSO; CLARKSON, 2003). Essa é a principal razão para os níveis de lipoperoxidação serem usualmente expressos como TBARS, ou seja, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (DRAPER *et al.*, 1993).

Como a medida das TBARS sozinha não reflete o aumento do estresse oxidativo, nós também avaliamos as mudanças dos sistemas antioxidantes nos eritrócitos.

E, como sabemos os eritrócitos são importantes durante o exercício, pois contêm milhões de moléculas de hemoglobina capazes de transportarem as moléculas de O<sub>2</sub> necessárias para o suprimento constante de energia aos músculos ativos (WILMORE; COSTILL, 2003). Além disso, devemos lembrar que a hemoglobina está sujeita à auto-oxidação com a produção das EROs (COOPER *et al.*, 2002).

Em nossos resultados, os níveis, em repouso, de MDA plasmático expressos como TBARS não tiveram dados significativos entre as diferentes intensidades e o grupo controle. Entretanto, foi possível observar que o grupo NOV, ou seja, de intensidade muito alta apresentou níveis elevados de lipoperoxidação.

Provavelmente, essa elevação deveu-se ao aumento do VO<sub>2</sub> que ocorre na mitocôndria; a auto-oxidação das catecolaminas; à lesão isquemia reperfusão dos

tecidos musculares, hepático, renal e endotelial dos vasos sangüíneos; à lesão das membranas dos eritrócitos; à ativação de PMN; à auto-oxidação da hemoglobina; à conversão do ácido láctico em EROs e à produção peroxissomal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Quanto à lipoperoxidação do grupo OIT que representa uma intensidade alta, não houve elevação dos níveis plasmáticos de TBARS, em repouso, pois provavelmente essa intensidade estimulou de modo eficiente as adaptações ocorridas com as 17 semanas de treinamento, como por exemplo, deve ter elevado os níveis de antioxidantes que combateram as EROs e possivelmente deve ter aumentado o número e conteúdo das mitocôndrias reduzindo a formação dessas espécies (SEN, 1995; JI, 1996; MOLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996; ALESSIO; BLASSI, 1997; LAWLER; POWERS, 1998).

Estudos que também avaliaram os níveis, em repouso, de MDA plasmático de indivíduos submetidos ao treinamento de alta intensidade, acharam aumentos significativos (MARZATICO *et al.*, 1997; McBRIDE *et al.*, 1998; SANTOS-SILVA *et al.*, 2001), ou diminuições (SELAMOGLU *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2001; CAZZOLA *et al.*, 2003; METIN *et al.*, 2003a,b), ou não acharam diferenças estatísticas (EVELSON *et al.*, 2002) ao compararem os resultados com grupos controles.

Quanto aos grupos SES e SET, ambos de intensidade moderada, também apresentaram níveis, em repouso, de MDA plasmático semelhantes ao grupo SED, provavelmente pelos mesmos motivos do grupo OIT, ou seja, tiveram adaptações mais eficientes com o treinamento físico.

Estudos com treinamento de moderada intensidade, na literatura, também não encontraram diferenças significativas nos níveis, em repouso, de MDA em diferentes tecidos (DERNBACH *et al.*, 1993; RADAK *et al.*, 1999; SENTÜRK *et al.*, 2001), alguns observaram baixos níveis em repouso (SOMANI; FRANK; RYBAK, 1995) e outros, níveis elevados, também em uma condição de repouso (EYDOUX *et al.*, 2000), ao compararem com seus respectivos controles.

O grupo CIN, ou seja, o grupo de intensidade mais baixa apresentou aumento nos níveis de lipoperoxidação, embora não significativo. Talvez essa intensidade não tenha sido suficiente para estimular eficientemente as adaptações que ocorrem no organismo com o treinamento e /ou a produção das EROs.

Entre as adaptações, podemos citar o aumento do conteúdo da cadeia transportadora de elétrons e do número de mitocôndrias e o aumento na atividade e

conteúdo das enzimas antioxidantes presente em vários tecidos (MOLLER; WALLIN; KNUDSEN, 1996). Com isso, há uma diminuição relativa da carga oxidativa de cada mitocôndria, o que deve reduzir a produção das EROs, além de fornecer maior proteção contra essas espécies por aumento da defesa antioxidante endógena.

Não encontramos estudos na literatura científica que utilizassem intensidades baixas de treinamento e avaliassem os níveis de lipoperoxidação, apenas verificamos que alguns estudos com treinamento obtiveram elevados níveis antioxidativos nos músculos (POWERS *et al.*, 1994; OH-ISHI *et al.*, 1996) e rins (NAKAO *et al.*, 2000), sugerindo um aumento na produção das EROs durante o treinamento de baixa intensidade.

Portanto, com a realização do nosso estudo, podemos verificar que os níveis de lipoperoxidação, em repouso, após várias semanas de treinamento não se apresentaram da forma como esperávamos, ou seja, que com o aumento da intensidade esses níveis se elevariam progressivamente, sugerindo que uma série de elementos devem atuar na produção das EROs e na defesa contra essas espécies.

No presente estudo, também avaliamos os níveis séricos da atividade da CK que podem servir como indicadores mais diretos da possível lesão promovida pelo exercício e seu efeito nos tecidos, ou seja, podem refletir a intensidade do programa de treinamento e caracterizarem o estresse oxidativo exercido nas células e tecidos (CHEVION *et al.*, 2003).

E, como sabemos, à medida que a intensidade do treinamento aumenta, além das fibras de contração lenta, as fibras de contração rápida do tipo I são recrutadas e nas intensidades mais elevadas as do tipo II são ativadas (COYLE, 2000). Portanto, quanto mais alta a intensidade, maiores são as chances de um grande número de fibras musculares esqueléticas serem lesionadas e liberarem a CK, além de apresentarem uma extensa lesão muscular, que atrai polimorfonucleares para o sítio da lesão, os quais são importantes produtores das EROs (JI, 1999).

Nossos dados mostraram um aumento significativo dos níveis séricos da atividade da CK, em repouso, do grupo NOV em relação ao grupo SED. Além disso, verificamos que com o aumento da intensidade do treinamento houve o aumento dos níveis da atividade da CK sérica, em repouso, embora as intensidades dos grupos CIN, SES, SET e OIT não apresentaram resultados significativos.

Os níveis plasmáticos elevados da atividade da CK, em repouso, de jogadores de rugby e triatletas dos estudos de Evelson *et al.* (2002), e Palazzetti *et al.* (2003), respectivamente, estão de acordo com o nosso achado significativo.

Contudo, essas comparações devem ser cautelosas, já que sabemos do fato das características dos grupos experimentais possuírem uma variedade marcante (CHEVION *et al.*, 2003).

Esses aumentos presumivelmente refletem a lesão persistente aos músculos, resultando em uma perda da integridade da membrana celular, e conseqüente liberação das proteínas citosólicas para o sangue, entre elas a CK. Logo, há uma possibilidade de interação direta entre o estado antioxidante e lesão muscular. Tal impacto direto ou secundário na função celular de outros órgãos seguido de exercício de alta intensidade precisa de futuras explicações (CHEVION *et al.*, 2003).

Por conseguinte, os resultados do presente estudo sugerem que há um aumento progressivo da lesão muscular com o aumento da intensidade do treinamento, avaliado através dos níveis séricos da atividade da CK, em repouso.

Sabemos que a SOD é a primeira enzima antioxidante a atuar contra a produção das EROs induzida pelo exercício. Sua função é dismutar o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (JI, 1995).

No presente estudo, observamos o aumento da atividade da SOD no eritrócito, em repouso, conforme a intensidade do treinamento aumentava. Este fato condiz com o esperado, uma vez que, com o aumento progressivo da intensidade, provavelmente ocorra a ativação de um maior número de mecanismos que produzem o  $O_2^-$ . Estudos mostram que a ativação da SOD resulta de uma produção elevada de  $O_2^-$  (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; JI, 1993).

Entre esses mecanismos, a auto-oxidação da hemoglobina, além da lesão do eritrócito causada pelas EROs produzidas por outros mecanismos, devem ter sido os mais relevantes para o nosso estudo, já que avaliamos as atividades de enzimas antioxidantes nos eritrócitos.

Desta forma, os nossos achados apresentaram diferenças significativas dos baixos níveis da atividade da SOD no eritrócito, em repouso, do grupo SED em relação aos grupos SES, SET, OIT e NOV, além da baixa atividade da SOD no eritrócito, em repouso, do grupo CIN em comparação com os grupos OIT e NOV.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura é com treinamento de alta intensidade (LUKASKI *et al.*, 1990; MARZATICO *et al.*, 1997; BRITES *et al.*, 1999; SELAMOGLU *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2001; EVELSON *et al.*, 2002; VARRASO *et al.*, 2002; CAZZOLA *et al.*, 2003; METIN *et al.*, 2003a) e praticamente todos, exceto o do Selamoglu *et al.* (2000), encontraram elevados níveis da SOD, em repouso, corroborando com nossos resultados.

Quanto aos estudos com treinamento de intensidade moderada, Somani, Frank e Rybak (1995) e Oh-Ishi *et al.* (1997a), apresentaram em seus resultados aumentos da atividade da SOD, em repouso, e Sentürk *et al.* (2001), não mostraram diferenças significativas dessa atividade. Apenas os trabalhos de Somani, Frank e Rybak (1995) e Oh-Ishi *et al.* (1997a), estão de acordo com nossos achados.

Oh-Ishi *et al.* (1996), observaram um aumento na atividade da CuZnSOD, em repouso, no diafragma de camundongos treinados com baixa intensidade em relação aos sedentários. Embora, o nosso grupo de intensidade mais baixa (CIN) não tenha obtido resultados significativos em relação ao grupo SED, houve um aumento da atividade da SOD no eritrócito, em repouso. Além disso, os grupos OIT e NOV apresentaram aumentos significativos da atividade dessa enzima em relação ao CIN.

Logo, após a comparação dos resultados do nosso estudo observamos que a atividade da SOD parece ser suficientemente alta e relativamente uniforme nos eritrócitos e em outros locais do organismo, sugerindo que a remoção do  $O_2^-$  não deve ser um passo limitante para atuação das outras enzimas antioxidantes.

Já temos o conhecimento de que a GPX é eficiente no sistema de seqüestro dos  $H_2O_2$  e hidroperóxidos reduzindo-os à custa da GSH (JI, 1995; MARZATICO *et al.*, 1997; LLESUY, 2002).

Os resultados presentes foram significativos do grupo CIN em relação a todos os outros cinco grupos, devido ao acentuado aumento da atividade da GPX no eritrócito, em repouso, do grupo de menor intensidade de treinamento.

Possivelmente, esse fato ocorreu graças à afinidade da GPX muito maior pelo  $H_2O_2$  em baixas concentrações (JI, 1995), ou seja, a GPX é facilmente saturável em relação à alta capacidade da CAT (MARZATICO *et al.*, 1997).

E como o gasto energético não é tão grande em relação às intensidades mais elevadas de treinamento, a quantidade de  $O_2$  transportada pelos eritrócitos também não

é (WILMORE; COSTILL, 2003), e, portanto como a taxa de auto-oxidação da hemoglobina e dos outros mecanismos que produzem EROs que lesionam o eritrócito não são tão relevantes, nós podemos esperar que ocorra baixos níveis de produção de  $O_2^-$  com intensidades menores de treinamento, subseqüentemente de  $H_2O_2$ .

O estudo de Oh-Ishi *et al.* (1996), com treinamento de baixa intensidade também apresentou um aumento da atividade da GPX, em repouso, no diafragma de camundongos treinados em relação aos sedentários.

Embora os grupos treinados com intensidades moderadas e altas não apresentaram resultados significativos em relação ao grupo SED, nós podemos notar um aumento de todas as atividades da GPX nos eritrócitos, em repouso, desses grupos. Além disso, sabe-se que o aumento da atividade da SOD leva a produção do  $H_2O_2$ , seguido do aumento da atividade da GPX (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os trabalhos encontrados na literatura científica tanto com treinamento de alta ou moderada intensidade obtiveram o aumento da atividade da GPX, em repouso, (SOMANI *et al.*, 1995; MARZATICO *et al.*, 1997; OH-ISHI *et al.*, 1997 (a); EYDOUX *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2001; SENTÜRK *et al.*, 2001; VARRASO *et al.*, 2002; OZTASAN *et al.*, 2004).

De um modo geral, observarmos que no presente estudo, as atividades da GPX nos eritrócitos, em repouso, estão elevadas com o treinamento, especialmente nos grupos de intensidades menores (CIN e SES), bem como os estudos mostram o aumento significativo da GPX, em repouso, em eritrócitos e músculo após treinamento, independente da intensidade.

Como já vimos a CAT é responsável pela redução do  $H_2O_2$  em água e  $O_2$ . Além disso, na presença de  $H_2O_2$ , a CAT é capaz de reduzir um número limitado de hidroperóxidos (CHANCE; SARONIO; LEIGH, 1975).

De acordo com nossos achados, a atividade da CAT no eritrócito, em repouso, do grupo NOV foi estatisticamente significativo em relação aos grupos SED, CIN e OIT, possivelmente devido a maior eficácia da CAT quando lida com concentrações relativamente altas de  $H_2O_2$  (FRIDOVICH, 1998).

Os estudos de Marzatico *et al.* (1997) e Evelson *et al.* (2002), corroboraram com nossos achados. Ambos verificaram nos indivíduos treinados com alta intensidade, um

aumento da atividade da CAT, em repouso, em relação aos grupos controles, porém no estudo de Evelson *et al.* (2002), esse aumento não foi significativo.

Já os estudos de treinamento com alta intensidade realizados por Miyazaki *et al.* (2001) e Varraso *et al.* (2002), não demonstraram alterações significativas na atividade da CAT no eritrócito, em repouso, em relação aos grupos controles.

Estudos envolvendo treinamento de moderada intensidade mostraram aumento nos níveis da atividade da CAT no eritrócito, em repouso (SOMANI *et al.*, 1995) ou não demonstraram diferenças significativas (SENTÜRK *et al.*, 2001). Oh-Ishi *et al.* (1997a), também observaram um aumento na atividade da CAT, em repouso, no diafragma de ratos submetidos ao treinamento.

Já em treinamento com baixa intensidade, o trabalho de Oh-Ishi *et al.* (1996), não obteve efeito significativo na atividade da CAT, em repouso, no diafragma de camundogos em relação ao controle sedentário, corroborando com nossos achados.

Por fim, através dos dados que obtivemos, podemos verificar o aumento da atividade da CAT no eritrócito, em repouso, apenas no treinamento com intensidade mais alta e podemos verificar que os estudos mostram diversos resultados em relação à atividade da CAT plasmática, no eritrócito e no diafragma nas diferentes intensidades de treinamento.

Após análise e comparação dos resultados obtidos no presente estudo, podemos constatar que de fato as respostas frente à produção das EROs causada pelo exercício físico parecem ser altamente específicas ao tecido (JI, 1993; KRETZSCHMAR; MULLER, 1993), dependendo da sua capacidade de eliminar as EROs (LIU *et al.*, 2000), além de fatores como duração, frequência e intensidade do exercício, nível de condicionamento, estado nutricional e idade do indivíduo, como também da técnica empregada para avaliação (JI, 1993; FENTEM, 1994; CHILD *et al.*, 1998; LEEUWENBURGH *et al.*, 1997; HOLLANDER *et al.*, 1999; CHEVION *et al.*, 2003). Todos estes fatores dificultam uma comparação adequada dos nossos achados com os da literatura científica.

Contudo, de modo geral, é aceito que a prática do exercício regular pode ativar o aumento das atividades das enzimas antioxidantes e facilitar o transporte de elétrons da mitocôndria, o que deve reduzir o estresse oxidativo durante e depois do exercício (SEN, 1995; JI, 1996; ALESSIO; BLASSI, 1997; LAWLER; POWERS, 1998;

POWERS; JI; LEEUWENBURGH, 1999). Além disso, a melhora da atividade antioxidante talvez decorra do aumento da regulação dos genes (SOMANI; FRANK; RYBAK, 1995; JI, 1999).

Tal melhora adaptativa almeja atenuar a elevação típica da oxidação de lipídeos, proteínas, ADN e glutatona seguido de um período de exercício, o qual parece ser verdadeiro para ambos os exercícios aeróbio e anaeróbio (RADAK *et al.*, 2001). Como também, almejar a eliminação dessas oxidações parece ser fisiologicamente favorável (BLOOMER; GOLDFARB, 2004).

Entretanto, evidências recentes mostram que as EROs nos sistemas biológicos regulam uma variedade de mecanismos moleculares-chaves que devem estar ligados com a transdução de sinais, imunidade, adesão célula-célula, proliferação celular, inflamação, metabolismo e apoptose (SEN, 2001; HENSLEY; FLOYD, 2002). Devido essas observações parece importante manter uma homeostase entre a produção e remoção das EROs. E, esse fato nos mostra a importância e o interesse na detecção da (s) intensidade (s) do treinamento que mais favorece (m) essa homeostase.

Portanto, através do conhecimento das respostas e dos mecanismos regulatórios de vários antioxidantes em diferentes locais do organismo, nos permitirá o desenvolvimento de estratégias apropriadas para intensificar a capacidade antioxidante celular através dos meios fisiológicos e nutricionais, mas, sempre lembrando da necessidade da manutenção da homeostase entre a produção e remoção das EROs.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos após treinamento com natação em diferentes intensidades relativas de exercício determinadas como um percentual do teste de carga máxima realizado em ratos *Wistar*, nos sugeriram:

- Que os animais treinados apresentaram adaptações ao treinamento verificadas através do aumento das porcentagens atingidas no teste de carga máxima;
- Que o grupo treinado com a intensidade mais alta (NOV) apresentou lesão muscular determinado pelo aumento da atividade da creatina quinase sérica;
- Que a intensidade mais baixa, isto é, a do grupo treinado a 50% da carga máxima, não conservou a homeostase entre a lipoperoxidação sistêmica causada pelas EROs e as defesas antioxidantes enzimáticas nos eritrócitos;
- Que intensidades moderadas, como as dos grupos treinados a 60% e 70% da carga máxima, mantiveram baixos níveis da lipoperoxidação sistêmica causada pelas EROs e níveis elevados da atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos, ambos em repouso, e, portanto, mostrando maior eficácia na manutenção do equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes;
- E que intensidades altas, como as dos grupos treinados a 80% e 90% da carga máxima, levaram a um desequilíbrio na lipoperoxidação sistêmica causada pelas EROs e na estimulação das defesas antioxidantes enzimáticas nos eritrócitos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(ACSM) AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness in healthy adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.22, n.2, p.265-274, 1990.

ADAMO, A.M.; LLESUY, S.F.; PASQUINI, J.M.; BOVERIS, A. Brain Chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. **Biochemical Journal**, v.263, n.1, p.273-277, 1989.

AEBI, H. Catalase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

ALESSIO, H.M.; BLASSI, E.R. Physical activity as a natural antioxidant booster an its effect on a healthy life span. **Research Quartely for Exercise and Sport**, v.68, n.4, p.292-302, 1997.

ANDERSEN, M. L.; D´ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004. Apoio: AFIP, FAPESP-CEPID e COBEA.

ARMSTRONG, R.B.; LAUGHLIN, M.H. Exercise blood flow patterns within and among rat muscles after training. **American Journal of Physiology**, v.246, n.1/2, p.H59-H68, 1984.

BALAGOPALAKRISHNA, C.; MANOHARAN, P.T.; ABUGO, O.O.; RIFKIND, J.M. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. **Biochemistry**, v.35, n.20, p.6393-6398, 1996.

BANERJEE, A.K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, n.1/2, p.307-312, 2003.

BASU, A.K.; MARNETT, L.J. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. **Carcinogenesis**, v.4, n.3, p.331-333, 1983.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.317, n.1, p.50-64, 1973.

BEJMA, J.; JI, L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.87, n.1, p.465-470, 1999.

BELLÓ-KLEIN, A. Estresse oxidativo no coração adaptado. In: MARRONI, N.P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas:Ulbra, 2002. p.49-61.

BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.29, n.3, p.245-263, 2004.

BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.240, n.2, p.500-508, 1985.

BORG, G.A.V. **Borg's perceived exertion and pain scales**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1998.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; FILIPPKOWSKI, M.; NAKASE, Y.; CHANCE, B. Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77, n.1, p.347-351, 1980.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v.134, n.3, p.707-716, 1973.

BRITES, FD.; EVELSON, P.A.; CRISTIENSEN, M.G.; NICOL, M.F.; BASILICO, M.J.; WIKINSKI, R.W.; LLESUY, S.F. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. **Clinical Science (London)**, v.96, n.4, p.318-385, 1999.

BROOKS, G.A.; MERCIER, J. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: The "crossover" concept. **Journal of Applied Physiology**, v.76, n.6, p.2253-2261, 1994.

CADENAS, E.; BOVERIS, A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. **Biochemical Journal**, v.188, n.1, p.31-37, 1980.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v.29, n.3/4, p.222-230, 2000.

CALDARERA, C.M.; GUARNIERI, C.; LAZZARI, F. Catalase and peroxidase activity in cardiac muscle. **Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale**, v.49, n.1, p.72-77, 1973.

CATALASE IN RED CELL METABOLISM. In: BEUTLER, E. **A manual of biochemical methods**. 2 ed. New York: Grune and Stratton, 1975. p.89-90.

CAZZOLA, R.; RUSSO-VOLPE, S.; CERVATO, G.; CESTARO, B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **European Journal of Clinical Investigation**, v.33, n.10, p.924-930, 2003.

CHAKRABORTI, T.; GHOSH, S.K.; MICHAEL, J.R.; BATABYAL, S.K.; CHAKRABORTI, S. Targets of oxidative stress in cardiovascular system. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.187, n.1/2, p.1-10, 1998.

CHANCE, B.; SARONIO, C.; LEIGH Jr, J.S. Functional intermediates in the reaction of membrane bound cytochrome oxidase with oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, n.24, p.9226-9237, 1975.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues. **Physiological Reviews**, v.59, n.3, p.527-605, 1979.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, v.49, n.3, p.481-493, 1993.

CHEVION, S.; MORAN, D.S.; HELED, H.; SHANI, Y.; REGEV, G.; ABBOU, B.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E.R.; EPSTEIN, Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.9, p.5119-5123, 2003.

CHILD, R.B.; WILKINSON, D.M.; FALLOWFIELD, J.L., DONNELLY, A.E. Elevated serum antioxidant and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, n.11, p.1603-1607, 1998.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidant: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72 (2 suppl.), p.637S-646S, 2000. Suplemento.

COHEN, G.; HEIKKILA, H. The generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine dialuric acid and related cytotoxic agents. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, n.8, p.2447-2450, 1974.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annal of Internal Medicine**, v.111, n.11, p.918-931, 1989.

COOPER, C.E.; VOLLAARD, N.B.; CHOUERI, T.; WILSON, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v.30, n.2, p.280-285, 2002.

COSTILL, D.L.; DANIELS, J.; EVANS, W.; FINK, W.; KRAHENBUHL, G.; SALTIN, B. Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. **Journal of Applied Physiology**, v.40, n.2, p.149-154, 1976.

COSTILL, D.L.; FINK, W.J.; IVY, J.L.; GETCHELL, L.H.; WITZMANN, F.A. Lipid metabolism in skeletal muscle of endurance-trained males and females. **Journal of Applied Physiology**, v.47, n.4, p.787-791, 1979.

COYLE, E.F. Physical activity as a metabolic stressor. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72 (2 suppl.), p.512S-520S, 2000. Suplemento.

\_\_\_\_\_. Substrate utilization during exercise in active people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61 (4 suppl.), p.968S-979S, 1995. Suplemento.

CRISWELL, D.; POWERS, S.K.; DODD, S.; LAWLER, J.; EDWARDS, W.; RENSHLER, K.; GRINTON, S.. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, n.10, p.1135-1140, 1993.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.107, n.4, p.1198-1205, 1982.

DAWSON, C.A.; HORVATH, S.M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.2, n.2, p.51-78, 1970.

DEMOPULOS, H.B.; SANTOMIER, J.P.; SELIGMAN, M.L., PIETRONIGRO, D.D. Free radical pathology: rationale and toxicology of antioxidant and other supplement in

sports medicine and exercise science. In: KATCH, F.I. **Sports, Health and Nutrition**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1986. p.139-189.

DERNBACH, A.R.; SHERMAN, W.M.; SIMONSEN, J.C.; FLOWERS, K.M.; LAMB, D.R. No evidence of oxidant stress during high intensity rowing training. **Journal of Applied Physiology**, v.74, n.5, p.2140-2145, 1993.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOOCH, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid method for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, n.4, p.353-363, 1993.

EBBELING, C.B.; CLARKSON, P.M. Muscle adaptation prior to recovery following eccentric exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.60, n.1, p.26-31, 1990.

EHSANI, A.A.; OGAWA, T.; MILLER, T.R.; SPINA, R.J.; JILKA, S.M. Exercise training improves left ventricular systolic function in older men. **Circulation**, v.83, n.1, p.96-103, 1991.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.12, p.1751-1759, 2003.

EVELSON, P.; GAMBINO, G.; TRAVACIO, M.; JAITA, G.; VERONA, J.; MARONCELLI, C.; WIKINSKI, W.; LLESUY, S.; BRITES, F. Higher antioxidant defenses in plasma and low density lipoproteins from rugby players. **European Journal of Clinical Investigation**, v.32, n.11, p.818-825, 2002.

EYDOUX, N.; PY, G.; LAMBERT, K.; DUBOCHAUD, H.; PREFAUT, C.; MERCIER, J. Training does not protect against exhaustive exercise-induced lactate transport capacity alterations. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.278, n.6, p.E1045-E1052, 2000.

FENTEM, P.H. ABC of Sports Medicine. Benefits of exercise in health and disease. **British Medical Journal**, v.308, p.1291-1295, 1994.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, A.; SHOCK, H. Glutathione peroxidase: a seleno-enzyme. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.32, n.1, p.132-134, 1973.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Laboratory Investigation**, v.47, n.5, p.412-426, 1982.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, n.8, p.1203-1209, 1998.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horizons in Biochemistry and Biophysics**, v.1, p.1-37, 1974.

GILBERT, HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology Related Areas of Molecular Biology**, v.63, p.69-172, 1990.

GODIN, D.V.; WOHAIEB, S.A. Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status. **Free Radical Biology and Medicine**, v.5, n.3, p.165-176, 1988.

GOEPTAR, A.R.; SCHEERENS, H.; VERMEULEN, N.P. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. **Critical Reviews in Toxicology**, v.25, n.1, p.25-65, 1995.

GOHIL, K.; PACKER, L.; DE LUMEN, B.; BROOKS, G.A.; TERBLANCHE, S.E. Vitamin E deficiency and vitamin C supplements: exercise and mitochondrial oxidation. **Journal of Applied Physiology**, v.60, n.6, p.1986-1991, 1986.

GREEN, H.J.; SUTTON, J.R.; COATES, G.; ALI, M.; JONES, S. Response of red cell and plasma volume to prolonged training in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.70, n.4, p.1810-1815, 1991.

GREEN, M.; HILL, H. Chemistry of dioxygen. **Methods in Enzymology**, v.105, p.3-9, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HENSLEY, K.; FLOYD, R.A. Reactives oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.397, n.2, p.377-383, 2002.

HILL, K.E.; BURK, R.F.; LANE, J.M. Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. **Journal of Nutrition**, v.117, n.1, p.99-104, 1987.

HOLLANDER, J.; FIEBIG, R.; GORE, M.; BEJMA, J.; OHNO, H.; JI, L.L. Superoxide dismutase gene expression: fiber-specific adaptation to endurance training. **American Journal of Physiology**, v.277, n.3/2, p.R856-R862, 1999.

HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **Journal of Applied Physiology**, v.56, n.4, p.831-838, 1984.

HOLLOSZY, J.O.; OSCAI, L.B.; DON, L.J.; MOLE, P.A. Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptative response to exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.40, n.6, p.1368-1373, 1970.

HOUSTON, ME.; BENTZEN, H.; LARSEN, H. Interrelationships between skeletal muscle adaptations and performance as studied by detraining and retraining. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.105, n.2, p.163-170, 1979.

HURLEY, B.F.; NEMETH, P.M.; MARTIN, W.H. 3rd; HAGBERG, J.M.; DALSKY, G.P.; HOLLOSZY, J.O. Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. **Journal of Applied Physiology**, v.60, n.2, p.562-567, 1986.

INGJER, F. Capillary supply and mitochondrial content of different skeletal muscle fiber types in untrained and endurance trained men: a histochemical and ultra structural study. **European Journal of Applied Physiology**, v.40, n.3, p.197-209, 1979.

JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress and antioxidant: a review. **International Journal of Sports Nutrition**, v.3, n.4, p.356-375, 1993.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry: relationship to exercise. **Sports Medicine**, v.5, n.3, p.156-170, 1988.

JL, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, n.2, p.225-231, 1993.

JL, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, n.3, p.283-292, 1999.

JL, L.L. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. In: HOLLOSZY, J.O. **Exercise Sport Science Review**. Baltimore,MD: Williams & Wilkins, 1995. p.135-166.

JL, L.L. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. **The American Journal of Sports Medicine**, v.24 (6 suppl.), p.20S-24S, 1996. Suplemento.

JI, L.L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. **American Journal of Physiology**, v.258, n.4/2, p.R918-R923, 1990.

JI, L.L.; STRATMAN, F.W.; LARDY, H.A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.263, n.1, p.150-160, 1988.

JI, L.L.; WU, E; THOMAS, D.P. Effect of exercise training on antioxidant and metabolic functions in senescent rat skeletal muscle. **Gerontology**, v.37, n.6, p.549-554, 1991.

KAJIURA, J.S.; MacDOUGALL, J.D.; ERNST, P.B.; YOUNGLAI, E.V. Immune response to changes in training intensity and volume in runners. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.27, n.8, p.1111-1117, 1995.

KANTER, M.M.; LESMES, G.R.; KAMINSKY, A.; LA-HAMSAEGER, J.; NEQUIN, N.C. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eight kilometer race. **European Journal of Applied Physiology**, v.57, n.1, p.60-63, 1988.

KANTER, M.M.; NOLTE, L.A.; HOLLOSZY. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and post-exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.74, n.2, p.965-969, 1993.

KARVONEN, M.J.; KENTALA, E.; MUSTALA, O. The effects of training heart rate: a longitudinal study. **Annales Medicine Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v.35, n.3, p.307-315, 1957.

KIHLSTROM, M.T. Lipid peroxidation capacities in the myocardium of endurance-trained rats and mice in vitro. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.146, n.2, p.177-183, 1992.

KLEIN, S.; COYLE, E.F.; WOLFE, R.R. Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. **American Journal of Physiology**, v.267, n.6/1, p.E934-E940, 1994.

KNIGHT, J.A.; PIEPER, R.K.; McCLELLAN, L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. **Clinical Chemistry**, v.34, n.12, p.2433-2438, 1988.

KOHNO, H.; FURUKAWA, S.; NAITO, H.; MINAMITANI, K.; OHMORI, D.; YAMAKURA, F. Contribution of nitric oxide, angiotensin II and superoxide dismutase to exercise-induced attenuation of blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats. **Japanese Heart Journal**, v.43, n.1, p.25-34, 2002.

KOKKINOS, P.F.; FERNHALL, B. Physical activity and high density lipoprotein cholesterol levels: what is the relationship? **Sports Medicine**, v.28, n.5, p.307- 314, 1999.

KOYAMA, K.; KAYA, M; ISHIGAKI, T.; TSUJITA, J.; HORI, S.; SEINO, T.; KASUGAI, A. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v.80, n.1, p.28-33, 1999.

KRAMER, J.H.; MAK, T.; WEGLIKI, W.B. Differential sensitivity of canine cardiac sarcolemmal and microsomal enzymes to inhibition by free radical induced lipid peroxidation. **Circulation Research**, v.55, n.1, p.120-124, 1984.

KRAMER, K.; DIJKSTRA, H.; BAST, A. Control of physical exercise of rats in a swimming basin. **Physiology and Behavior**, v.53, n.2, p.271-276, 1993.

KRETZSCHMAR, M.; MULLER, D. Aging, training and exercise: a review of effects of plasma glutathione and lipid peroxidation. **Sports Medicine**, v.15, n.3, p.196-209, 1993.

LAMBOTTE, L.; D'UDEKEM, Y.; AMRANI, M.; TAPER, H. Free radicals and liver ischemia-reperfusion injury. **Transplantation Proceedings**, v.20, n.5, p.977, 1988.

LAWLER, J.M.; POWERS, S.K. Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.23, n.1, p.23-55, 1998.

LEEUEWENBURGH, C.; HEINECKE, J.W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, n.7, p.829-838, 2001.

LEEUEWENBURGH, C.; HOLANDER, J.; FIEBIG, R.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFITHS, M.; JI, L.L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **American Journal of Physiology**, v.272, n.1/2, p.363-369, 1997.

LEEUEWENBURGH, C.; JI, L.L. Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. **Journal of Nutrition**, v.128, n.12, p.2420-2426, 1998.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.7, p.2891-2896, 1997.

LITTLE, R.E.; GLADEN, B.C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v.13, n.5, p.347-352, 1999.

LIU, J.; YEO, H.C.; OVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S.J.; CHYU, D.W.; BROOKS, G.A.; AMES, B.N.; CHU, D.W. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Applied Physiology**, v.89, n.1, p.21-28, 2000.

LLESUY, S.F. Introduccin y especies activas de oxigeno. In: MARRONI, N.P. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas:Ulbra, 2002. p.21-32.

LOVLIN, R.; COTTLE, W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, A.N. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? **European Journal of Applied Physiology**, v.56, n.3, p.313-316, 1987.

LUKASKI, H.C.; HOVERSON, B.S.; GALLAGHER, S.K.; BOLONCHUK, W.W. Physical training and cooper, iron, and zinc status of swimmers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.51, n.6, p.1093-1099, 1990.

MACHIDA, S.; KARIYA, F.; KOBAYASHI, K.; NARUSAWA, M. Lack of effect of running training at two intensities on cardiac myosin isozyme composition in rats. **Japanese Journal of Physiology**, v.50, n.6, p.577-583, 2000.

MacRAE, H.S.-H.; DENNIS, S.C.; BOSCH, A.N.; NOAKES, T.D. Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.72, n.5, p.1649-1656, 1992.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **New England Journal of Medicine**, v.317, n.11, p.687-694, 1987.

MARTIN, W.H. 3rd; DALSKY, G.P.; HURLEY, B.F.; MATTHEWS, D.E.; BIER, D.M.; HAGBERG, J.M.; ROGERS, M.A.; KING, D.S.; HOLLOSZY, J.O. Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. **American Journal of Physiology**, v.265, n.5/1, p.E708-E714, 1993.

MARZATICO, F.; PANSARASA, O.; BERTORELLI, L.; SOMENZINI, L.; DELLA VALLE, G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.37, n.4, p.235-239, 1997.

MATAIX, J.; QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MAÑAS, M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, n.4, p.511-521, 1998.

McBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J.; TRIPLETT-McBRIDE, T.; SEBASTIANELLI, W. Effect of resistance exercise on free radical production. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, n.1, p.67-72, 1998.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.22, p.6049-6055, 1969.

MEDEIROS, A.; GIANOLLA, R.M.; KALIL, L.M.P.; BACURAU, R.F.P.; ROSA, L.F.B.C.; NEGRÃO, C.E.; BRUM, P.C. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. **Revista Paulista de Educação Física**, v.14, n.1, p.7-15, 2000.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p.711-760, 1983.

MENA, P.; MAYNAR, M.; GUTIERREZ, J.M.; MAYNAR, J.; TIMON, J.; CAMPILLO, J.E. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers: adaptations to training. **International Journal of Sports Medicine**, v.12, n.6, p.563-566, 1991.

MENDENHALL, L.A.; SWANSON, S.C.; HABASH, D.L.; COGGAN, A.R. Ten days of exercise training reduces glucose production and utilizations during moderate-intensity exercise. **American Journal of Physiology**, v.266, n.1/1, p.E136-E143, 1994.

METIN, G.; ATUKEREN, P.; ALTURFAN, A.A.; GÜLYASAR, T.; KAYA, M.; GÜMÜSTAS, M.K. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and

trace metals in young male footballers. **Yonsei Medical Journal**, v.44, n.6, p.979-986, 2003a.

METIN, G.; GÜMÜSTAS, M.K; USLU, E.; BELCE, A.; KAYSERILIOGLU, A. Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. **Chinese Journal of Physiology**, v.46, n.1, p.35-39, 2003b.

MISRA, H.L.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **Journal of Applied Physiology**, v.247, n.21, p.6960-6964, 1972.

MIYAZAKI, H.; OH-ISHI, S.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; TOSHINAI, K.; HA, S.; HAGA, S.; JI, L.L.; OHNO, H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.84, n.1/2, p.1-6, 2001.

MOLE, P.A.; OSCAI, L.B.; HOLLOSZY, J.O. Adaptation of muscle to exercise: increase in levels of palmitoyl CoA synthetase, carnitine palmytil transferase, and palmitoyl CoA dehydrogenase, and the capacity to oxidize fatty acids. **Journal of Clinical Investigation**, v.50, n.11, p.2323-2330, 1971.

MOLLER, P.; WALLIN, H.; KNUDSEN, L.E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. **Chemico-Biological Interactions**, v.102, n.1, p.17-36, 1996.

MORRISON, D.A.; BOYDEN, T.W.; PAMENTER, R.W.; FREUND, B.J.; STINI, W.A.; HARRINGTON, R.; WILMORE, J.H. Effects of aerobic training on exercise tolerance and echocardiographic dimensions in untrained postmenopausal women. **American Heart Journal**, v.112, n.3, p.288-308, 1986.

NAIR, V.; TURNER, G.A.; OFFEREMAN, R.J. Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde. **Journal of the American Chemical Society**, v.106, p.3370-3371, 1984.

NAKAO, C.; OOKAWARA, T.; TOMOMI, O.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; MIYAZAKI, H.; HAGA, S.; SATO, Y.; JI, L.L.; OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **Journal of Applied Physiology**, v.88, n.2, p.649-654, 2000.

NAVARRO-ARÉVALO, A.; CAÑAVATE, C.; SÁNCHEZ-DEL-PINO, P.M.J. Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.108, n.3, p.207-217, 1999.

NAVARRO-ARÉVALO, A.; SÁNCHEZ-DEL-PINO, P.M.J. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.104, n.1, p.91-102, 1998.

NISHIYAMA, Y.; IKEDA, H.; HARAMAKI, N.; YOSHIDA, N.; IMAIZUMI, T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. **American Heart Journal**, v.135, n.1, p.115-120, 1998.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P.M.; McGUIGUIN, M.E.; BYRNE, J.M. Time course of muscle adaptation after high force eccentric exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.63, n.1, p.70-76, 1991.

OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; NAGASAWA J.; IZAWA, T.; KOMABAYASHI, T.; NAGATA, N.; SUZUKI, N.; TANIGUCHI, N.; OHNO, H. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.24, n.5, p.326-332, 1997b.

OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; OOKAWARA, T.; SAKURAI, T.; IZAWA, T.; NAGATA, N.; OHNO, H. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.156, n.5, p.1579-1585, 1997a.

OH-ISHI, S.; TOSHINAI, K.; KIZAKI, T.; HAGA, S.; FUKUDA, K.; NAGATA, N.; OHNO, H. Effects of aging and/or training on antioxidant system in diaphragm of mice. **Respiration Physiology**, v.105, n.3, p.195-202, 1996.

OHKAWA, H.; OH-ISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

OSORIO, R.A.L.; CHRISTOFANI, J.S.; D'ALMEIDA, V.;RUSSO, A.K.; PIÇARRO, I.C. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. **Comparative Biochemistry and Physiology C - Toxicology and Pharmacology**, v.135, n.1, p.89-95, 2003a.

OSORIO, R.A.L.; SILVEIRA, V.L.F.; MALDJIAN, S.; MORALES JR, A.; CHRISTOFANI, J.S.; RUSSO, A.K.; PIÇARRO, I.C. Swimming of pregnant rats at different water temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and Integrative Physiology**, v.135, n.4, p.605-611, 2003b.

OZTASAN, N.; TAYSI, S.; GUMUSTEKIN, K.; ALTINKAYNAK, K.; AKTAS, O.; TIMUR, H.; SIKTAR, E.; KELES, S.; AKAR, S.; AKCAY, F.; DANE, S.; GUL, M. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. **European Journal of Applied Physiology**, v.91, n.5/6, p.622-627, 2004.

PALAZZETTI, S.; RICHARD, M-J.; FAVIER, A.; MARGARITIS, I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.28, n.4, p.588-604, 2003.

PERRY, A.C.F.; JONES, R.; NIANG, L.S.P.; JACKSON, R.M.; HALL, L. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. **Biochemical Journal**, v.285, n.3, p.863-870, 1992.

PETRONE, W.F.; ENGLISH, D.K.; WONG, K.; McCORD, J.M. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77, n.2, p.1159-1163, 1980.

POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A.; DUDLEY, G. Influence of exercise intensity and fiber type on antioxidant enzyme activity in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v.266, n.2/2, p.R375-R380, 1994.

POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; MARTIN, D.; LIEU, F.K.; JI, L.L.; HERB, R.A. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v.265, n.6/2, p.H2094-H2098, 1993.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.31, n.7, p.987-997, 1999.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, n.4, p.1025-1033, 1999.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v.48, p.657-667, 1986.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n.1/2, p.69-74, 1999.

RADAK, Z.; PUCSUK, J.; BOROS, S.; JOSFAI, L.; TAYLOR, A.W. Changes in urine 8-hydroxideoxiguanosina levels of super-marathon runners during a four day race period. **Life Sciences**, v.66, n.18, p.1763-1767, 2000.

RADAK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exercise Immunology Review**, v.7, p.90-107, 2001.

RAJGURU, S.U.; YEARGANS, G.S.; SEIDLER, N.W. Exercise causes oxidative damage to rat skeletal muscle microsomes while increasing cellular sulphhydryls. **Life Science**, v.54, n.3, p.149-157, 1994.

REEDER, B.J.; WILSON, M.T. The effects of pH on the mechanism of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide consumption by myoglobin: a role for the protonated ferryl species. **Free Radical Biology and Medicine**, v.30, n.11, p.1311-1318, 1996.

RENNIE, M.J.; WINDER, W.W.; HOLLOSZY, J.O. A sparing effect of increased plasma fatty acids on muscle and liver glycogen content in exercising rat. **Biochemistry Journal**, v.156, n.3, p.647-655, 1976.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.16, n.3, p.315-320, 2003.

ROMIJN, J.A.; COYLE, E.F.; SIDOSSIS, L.; GASTALDELLI, A.; HOROWITZ, J.F.; ENDERT, E.; WOLFE, R.R. Regulation of endogenous fat and carbohydrate

metabolism in relation to exercise intensity and duration. **American Journal of Physiology**, v.265, n.3/1, p.E380-E391, 1993.

ROTH, E. Oxygen free radicals and their clinical implications. **Acta Chirurgica Hungarica**, v.36, n.1/4, p.302-305, 1997.

SAHLIN, K.; CIZINSKY, S.; WARHOLM, M.; HOBERG, J. Repetitive static muscle contractions in humans: a trigger of metabolic and oxidative stress. **European Journal of Applied Physiology**, v.64, n.3, p.228-236, 1992.

SAHLIN, K.; EKBERG, K.; CIZINSKY, S. Changes in plasma hypoxanthine and free radicals markers during exercise in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.142, n.2, p.275-281, 1991.

SALO, D.C.C.; DONOVAN, M.; DAVIES, K.J.A. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver, during exercise. **Free Radical Biology and Medicine**, v.11, n.3, p.239-246, 1991.

SANTOS, B.M.R.; GONÇALVES, R.M.; SILVA, A.A.; PETROIANU, A. Influence of physical exercise and sodium intake on arterial pressure and cardiac hypertrophy in rats. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.54, n.4, p.111-114, 1999.

SANTOS-SILVA, A.; REBELO, MI.; CASTRO, E.M.; BELO, L.; GUERRA, A.; REGO, C.; QUINTANILHA, A. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. **Clinica Chimica Acta**, v.306, n.1/2, p.119-126, 2001.

SAXTON, J.M.; DONNELLY, A.E.; ROPER, H.P. Indices of free radical-mediated damage following maximal voluntary eccentric and concentric muscular work. **European Journal of Applied Physiology**, v.68, n.3, p.189-193, 1994.

SELAMOGLU, S.; TURGAY, F.; KAYATEKIN, B.M.; GONENC, S.; YSLEGEN, C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. **Acta Physiologica Hungarica**, v.87, n.3, p.267-273, 2000.

SEN, C.K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.33, n.3, p.368-370, 2001.

SEN, C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.79, n.3, p.675-686, 1995.

SENTÜRK, U.K.; GÜNGÜZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M.R.; KIPMEN, D.; YALÇIN, O.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; YESILKAYA, A.; BASKURT, O.K. Exercise- induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v.91, n.5, p.1999-2004, 2001.

SEXTON, W.L.; KORTHUIS, R.J.; LAUGHLIN, M.H. High-intensity exercise training increases vascular transport capacity of rat hindquarters. **American Journal of Physiology**, v.254, n.2/2, p.H274-H278, 1988.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.103, n.2, p.287-290, 1979.

SIMPSON, P.J.; LUCCHESI, B.R. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.110, n.1, p.13-30, 1987.

SJODIN, B.; HELLSTEN WESTING, Y.; APPLE, F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**, v.10, n.4, p.236-254, 1990.

SMITH, J.A.; KOLBUCH-BRADDON, M.; GILLAM, I.; TELDFORD, R.D.; WEIDEMANN, M.J. Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.70, n.5, p.427-436, 1995.

SOMANI, S.M.; FRANK, S.; RYBAK, L.P. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.51, n.4, p.627-634, 1995.

STARNES, J.W.; CANTU, G.; FARRAR, R.P.; KEHRER, J.P. Skeletal muscle lipid peroxidation exercise and food-restricted rats during aging. **Journal of Applied Physiology**, v.67, n.1, p.69-75, 1989.

STROMME, S.B.; KEREM, D.; ELSNER, R. Diving bradycardia during rest and exercise and its relation to physical fitness. **Journal of Applied Physiology**, v.28, n.5, p.614-621, 1970.

TESCH, P.A.; THORSSON, A.; KAISER, P. Muscle capillary supply and fiber type characteristics in weight and power lifters. **Journal of Applied Physiology**, v.56, n.1, p.35-38, 1984.

TIBELL, L.; AASA, R.; MARKLUND, S.L. Spectral and physical properties of human extracellular superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.304, n.4, p.429-433, 1993.

TOYOKUNI, S.; UCHIDA, K.; OKAMOTO, K.; HATTORI-NAKAKUKI, Y.; HIAI, H.; STADTMAN, E.R. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.7, p.2616-2620, 1994.

TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH-dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, v.191, n.2, p.421-427, 1980.

UENO, N.; OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; NISHIDA, M.; OHNO, H. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice:GDP binding and UCP m-RNA expression. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.95, n.1, p.92-104, 1997.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.839, n.1, p.62-70, 1985.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, n.1/2, p.41-54, 2003.

VARRASO, R.; MASSIN, N.; HERY, M.; FRADIER-DUSCH, M.; MICHAELY, J-P.; FOURNIER, M.; HUBERT, G.; BIETTE, P.; RIEGER, B.; BERTHELIN, A.; HECHT, G.; NADIF, R. Not only training but also exposure to chlorinated compounds generates a response to oxidative stimuli in swimmers. **Toxicology and Industrial Health**, v.18, n.6, p.269-178, 2002.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Effect of training of antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **International Journal of Sports Medicine**, v.18, n.7, p.497-502, 1997.

VENDITTI, P.; MASULLO, P.; DI MEO, S. Effect of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.368, n.1, p.112-120, 1999.

VENDITTI, P.; PIRO, M.C.; ARTIACO, G.; DI MEO, S. Effect of exercise on tissue antioxidant capacity and heart electrical properties in male and female rats. **Journal of Applied Physiology**, v.74, n.4, p.322-329, 1996.

VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M-C.; LLORET, A.; MARQUEZ, R.; MIÑANA, J.B.; PALLARDÓ, F.V.; SASTRE, J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v.50, n.4/5, p.271-277, 2000.

VOCK, R.; HOPPELER, H.; CLAASSEN, H.; WU, D.X.; BILLETER, R.; WEBER, J.M.; TAYLOR, C.R.; WEIBEL, E.R. Design of the oxygen and substrate pathways, VI: structural basis of intracellular substrate supply to mitochondria in muscle cells. **Journal of Experimental Biology**, v.199, n.8, p.1689-1697, 1996.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.11, p.1389-1394, 2002.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003. p.184-195; 274-303; 616-624.

WISLOFF, U.; HELGERUD, J.; KEMI, O.J.; ELLINGSEN, O. Intensity-controlled treadmill running in rats:  $\dot{V}O_2$  (2 max) and cardiac hypertrophy. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v.280, n.3, p.H1301-1310, 2001.

YANG, R.C.; MACK, G.W.; WOLFE, R.R.; NADEL, E.R. Albumin synthesis after intense intermittent exercise in human subjects. **Journal of Applied Physiology**, v.84, n.2, p.584-592, 1998.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.75, n.1, p.139-162, 1995.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.1/2, p.202-226, 1999.