

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
DIRETORIA DE PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SOBRE MARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA APÓS A
LESÃO MUSCULAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

LUCIANO ACORDI DA SILVA

**Dissertação apresentada à Diretoria de Pós-
Graduação da Universidade do Extremo Sul
Catarinense UNESC, para a obtenção do
título de mestre em Ciências da Saúde.**

Orientador: Prof. Dr Ricardo Aurino Pinho

Criciúma – SANTA CATARINA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SOBRE MARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA APÓS A
LESÃO MUSCULAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

LUCIANO ACORDI DA SILVA

**Dissertação apresentada à Diretoria de Pós-
Graduação da Universidade do Extremo Sul
Catarinense UNESC, para a obtenção do
título de mestre em Ciências da Saúde.**

Orientador: Prof. Dr Ricardo Aurino Pinho

Criciúma – SANTA CATARINA

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva, Luciano Acordi da.
Efeitos da suplementação de antioxidantes sobre
marcadores de estresse oxidativo e resposta inflamatória
aguda após a lesão muscular induzida pelo exercício
excêntrico / Luciano Acordi da Silva ; orientador: Ricardo
Aurino Pinho . -- Criciúma: Ed. do autor, 2006.

79 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, 2006.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos. 2. Estresse
oxidativo. 3. Antioxidantes – Efeitos fisiológicos. 4.

Bibliotecária: Flávia Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Diretoria de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

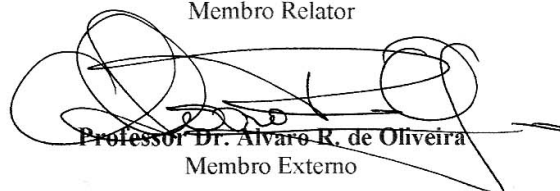
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **LUCIANO ACORDI DA SILVA**, sob o título: “**Efeitos da suplementação de antioxidantes sobre marcadores de estresse oxidativo e resposta inflamatória aguda após a lesão muscular induzida pelo exercício excêntrico**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Criciúma, SC, 22 de fevereiro de 2007.


Professora Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Membro Relator


Professor Dr. Alvaro R. de Oliveira
Membro Externo


Professor Dr. Ricardo Augusto de Pinho
Presidente da Banca e Orientador

Dedicatória

Aos meus pais Luciano e Sonia por sempre acreditarem em mim., e aos meus irmãos Gabriela e Rodrigo, pelo apoio nos momentos difíceis

AGRADECIMENTOS

Em memória, (Tiniéu e Clebinho) amigos de infância, a toda rapaziada da Santa Bárbara (Julio, Marcos, Geovane, Fernando, Luciano, Igor, Jamaica, Tiago, André.....), aos meus professores do tempo de criança e ginásio (Tia Nara e Tio Amâncio, Jorge e Beti), aos de faculdade (Elaine e Valmir) e tantos outros que contribuíram para o meu crescimento. Aos amigos Juninho e Marcelinho (que tempos bons, que não voltam nunca mais, Campestre-), aos primos, Alfredo e Carol, à avó Olga, mulher humilde e batalhadora, à família de Fernando de Noronha (avó Severina, tios Dito e Jaciara, primo Macinho, ao amigo Toni-(sangue bom), à toda a comunidade do LaFiBe, especialmente Paulo, Cleber, Talita e Luiz, ao professor Felipe, uma pessoa bacana com muito a ensinar, e, em especial, ao meu orientador Ricardo Pinho que me oportunizou este sonho (sem palavras), à Cássia e Michele (inesquecíveis).

A todos aqueles que acreditaram em mim e compartilharam comigo esta caminhada. Valeu a força, torcida, o sorriso, a cobrança, as alegrias e tristezas, o choro, a paciência, a compreensão, a todos vocês, meu sincero obrigado.

Resumo

A associação entre exercício físico, marcadores de estresse oxidativo e suplementação de antioxidantes tem sido alvo de muitos estudos. A vitamina E (alfa-tocoferol) pode servir como um potente “scavenger” de radicais livres (RL) sugerindo sua utilização após o exercício intenso na proteção celular contra o estresse oxidativo. A N-acetilcisteína (NAC) é muito usada na prática clínica e pode exercer um importante efeito antioxidante por facilitar a biossíntese da glutatona (GSH). O objetivo geral dessa dissertação foi verificar os efeitos da suplementação da vitamina E e NAC sobre os marcadores de estresse oxidativo e resposta inflamatória em soro humano após a lesão muscular aguda induzida pelo exercício físico excêntrico. Foram selecionados 46 jovens universitários, do sexo masculino, não atletas, com idades entre 20 e 25 anos. No primeiro estudo os sujeitos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: Placebo (21 dias de placebo (amido) n=6), vitamina E (21 dias de vitamina E (800 UI de acetato α -Tocopherol) n= 8), vitamina E e placebo (14 dias de vitamina E +7dias de placebo n=7), no segundo estudo foram mais 3 grupos: Placebo (21 dias de placebo n= 8), N-acetilcisteína (21 dias de NAC (10mg/kg massa corporal) n=9), N-acetilcisteína + placebo (14 dias de NAC + 7dias placebo n=8). Após o 14^o dia, os sujeitos foram submetidos a ao exercício excêntrico intenso: 3 séries até a fadiga muscular excêntrica, com 80% de 1RM. Foram verificados o desenvolvimento de dores musculares tardias, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), os níveis de lipoperoxidação, carbonilação, fator de necrose tumoral, e interleocinas-10. Antes e no segundo, quarto e sétimo dia após o exercício foram coletados amostras sanguíneas da artéria cubital. O sangue foi imediatamente processado e o soro foi alíquotado e armazenado – 80°C para posterior análise. Os resultados demonstraram que a vitamina E apresentou um fator importante contra os danos oxidativos, entretanto a NAC não alterou estes marcadores, sendo que ambos os suplementos apresentaram respostas diferenciadas nos parâmetros de dano oxidativo, respostas inflamatórias e dores musculares.

Palavras-chave: Exercício Excêntrico; Estresse Oxidativo; Vitamina E; N-acetilcisteína.

Abstract

The association among physical exercise, oxidative stress marker and the antioxidants supplementation has been the target of many studies. The vitamin E (alpha-tocopherol) may serve as a potent “scavenger” of free radicals (FR) suggesting its utilization after eccentric exercise in the cellular protection against the oxidative stress. The N-acetylcysteine (NAC) is greatly used in the clinical practice and may have an important antioxidant effect because it facilitates the biosynthesis of the glutathione (GSH). The general objective of this dissertation was to verify the effects of the supplementation of the vitamin E and NAC on the oxidative stress markers and the inflammatory response on the human serum after an acute muscular lesion induced by the eccentric physical exercise. 46 young undergraduates were selected, male, not athletes, age range between 20 and 25 years old. In the first study the subjects were divided randomly in 3 groups: Placebo (21 days of placebo (amido) n=6), vitamin E (21 days of vitamin E (800 UI of acetate α -Tocopherol) n= 8), vitamin E and placebo (14 days of vitamin E + placebo n=7), in the second study there were 3 more groups: Placebo (21 days of placebo n= 8), N-acetylcysteine (21 days of NAC (10mg/kg body mass) n=9), N-acetylcysteine + placebo (14 days of NAC + 7 placebo n=8). After the 14th day, the subjects were submitted to intense eccentric exercise: 3 series until an eccentric muscular fatigue, with 80% of 1RM. It was verified the development of late muscular soreness, the activity of the lactate dehydrogenase (LDH), the levels of lipoperoxidation, carbonylation, factor of tumor necrosis, and interleukins-10. Blood samples of the cubital artery were collected before and on the second, fourth and seventh day after the exercise. The blood was immediately processed and the serum were aliquot and stored – 80°C for further analysis. The results demonstrate that the vitamin E presents an important factor against the oxidative damages; however the NAC did not change these markers. The two supplementations present different responses in the oxidative damage parameters, inflammatory responses and muscle soreness.

Key words: Eccentric Exercise; Oxidative Stress; Vitamin E; N-acetylcysteine.

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

RL: Radical Livre

H₂O: água

NAD: nicotinamina adenina

dinucleotídeo

LPO: Peroxidação Lípidica

CAT: catalase

SOD: superóxido dismutase

GPX: glutaciona peroxidase

GSSH: Glutaciona oxidada

GSH: Glutaciona reduzida

GSH- Rd: Glutaciona reductase

TBARS: substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico

e⁻: elétron

H⁺: hidrogênio

O : oxigênio molecular

O₂⁻ : ânion superóxido

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

OH[•]: radical hidroxil

NO: óxido nítrico

FAD: flavina adenina

dinucleotídeo

XO: xantina oxidase

AMP: monofosfato de adenosina

ADP: difosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

MDA: malondealdeído

LDH: lactato desidrogenase

TBA: ácido tiobarbitúrico

Cu: cobre

VO₂max: volume máximo de oxigênio

O₂ : oxigênio

Sumário

Resumo	iv
Abstract.....	v
Abreviaturas	vi

Capítulo I – Introdução

1.1 Organização da dissertação.....	01
1.2. Justificativa.....	01
1.3. Fundamentação teórica.....	04
1.4. Perguntas Científicas	19
1.5. Objetivos.....	19

Capítulo II – Artigo 1

VITAMIM E ON INFLAMMATORY AND OXIDATIVE MARKERS INDUCED BY ECCENTRIC EXERCISE	21
--	----

Capítulo III – Artigo 2

N-ACETYLCYSTEINE SUPPLEMENTATION ON THE OXIDATIVE DAMAGE AND INFLAMMATORY RESPONSE AFTER ECCENTRIC PHYSICAL EXERCISE OF HIGH INTENSITY	41
--	----

Capítulo IV – Discussão Geral.....	59
Capítulo V - Conclusões.....	65
Perspectivas.....	66
Referências Bibliográficas.....	67
Anexos.....	79

Lista de Tabelas

CAPITULO II

Table 1: Soreness Muscle (MS) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activity of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in vitamin E supplementation.....	38
---	----

CAPITULO III

Table 1: Soreness Muscle (MS) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activity of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in NAC supplementation	56
--	----

Lista de Figuras

CAPITULO II

Figure 1: Lipoperoxidation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in vitamin E supplementation	38
Figure 2: Carbonylation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in vitamin E supplementation.....	39
Figure 3a: Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in vitamin E supplementation.....	39
Figure 3b: Interleukin 10 (IL-10): in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in vitamin E supplementation.....	40

CAPITULO III

Figure 1: Lipoperoxidation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in NAC supplementation.....	56
Figure 2: Carbonylation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise in NAC supplementation.....	57
Figure 3a: Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. in NAC supplementation.....	57
Figure 3b: Interleukin 10 (IL-10): in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. in NAC supplementation.....	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está organizada em capítulos, onde o Capítulo I, na forma de introdução, apresenta uma revisão de literatura referente ao tema. Os resultados estão distribuídos nos dois capítulos subseqüentes (II e III), apresentados na forma de artigos, os quais foram submetidos à publicação. O capítulo II apresenta resultados referentes aos efeitos da vitamina E sobre os marcadores de estresse oxidativo e sobre as respostas inflamatórias induzidas pelo exercício excêntrico (submetido à *Medicine & Science in Sports & Exercise*). O capítulo III avalia o efeito da NAC sobre a resposta oxidativa e inflamatória após o exercício excêntrico (submetido à *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*) Uma discussão abrangendo todos os artigos e as conclusões gerais estão apresentadas respectivamente nos capítulos IV e V. As referências bibliográficas apresentadas nos itens que não àqueles referentes aos artigos estão presentes no final dessa dissertação.

1.2 JUSTIFICATIVA

A associação entre exercício físico, produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) e suplementação de antioxidantes têm sido alvo de muitos estudos (Evans et al., 2000; Banerjee et al., 2003; Chevion et al., 2003; Sacheck et al., 2003; Shafat et al., 2004). A elevada taxa metabólica durante e após o exercício

físico, de 10 a 20 vezes nos níveis sistêmicos (Astrand et. al, 1986), e de 100 a 200 nos níveis musculares em relação aos níveis de repouso (Halliwell e Gutteridge, 1999) , resulta no aumento do fluxo de elétrons na cadeia transportadora (Carmeli et al., 2000).

As ERO são capazes de causar danos oxidativos sobre a estrutura celular pela oxidação de lipídeos de membrana, carbonilação de proteínas e danos em DNA. Esses danos podem ser revertidos pela ação de defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas), restabelecendo o equilíbrio entre a produção de ERO e o sistema de defesa antioxidante.

O exercício físico associado com danos oxidativos depende do tipo e intensidade do exercício. O exercício excêntrico consiste numa concomitante ação de alongamento e contração muscular (Appel et al.,1992).

Durante sua realização, segundo Childs et al., (2001), existe um aumento na respiração mitocondrial seguido pelo aumento na produção de ERO pela incompleta redução do oxigênio. Em resposta aos danos musculares induzidos pelo exercício excêntrico, neutrófilos e macrófagos migram e infiltram no tecido muscular lesado, ativando citocinas pró-inflamatórias e produzindo ERO adicionais.

As vitaminas E (alfa-tocoferol), C (ácido ascórbico) e Beta-caroteno (pré-vitamina A) são consideradas como vitaminas antioxidantes por constituírem um importante mecanismo de proteção celular contra a ação de radicais livres.

Packer et al., (1989) sugere que o exercício intenso (crônico e agudo) diminui significativamente o conteúdo tecidual dessas vitaminas, o que poderá aumentar a possibilidade de danos celulares pelas ERO

Especificamente, a vitamina E apresenta elevada atividade antioxidante, principalmente em função de sua localização (membranas celulares e mitocôndrias),

permitindo reagir em até 200 vezes mais rápido com radicais livres (RL). Atua como doadora de elétrons, tendo o alfa-tocoferol, como o mais eficaz entre os tocoferóis (Mclaren et al., 1993; Burton et al.,1998).

Sua função biológica é bloquear a sucessão de reações que ocorre durante o processo de oxidação lípidica, preservando a integridade das membranas celulares e diminuindo a ação deletéria das ERO (Mclaren et al., 1993).

Além das vitaminas, outros elementos atuam no sistema de defesa contra os ataques de radicais livres, entre eles destaca-se a N-acetilcisteína (NAC). A NAC é um importante agente anti-mucolítico, comumente utilizado na prática clínica. Atua como antioxidante por fazer parte da síntese de cisteína, precursora da glutathiona.

De acordo com diversos estudos recentes (Sacheck et al., 2003; Shaft et al., 2004; Bloomer et al., 2004; Goldfarb et al., 2005; Bryer e Goldfarb, 2006), a suplementação de antioxidantes são importantes no combate contra os danos oxidativos induzidos pelo exercício excêntrico. Porém, ainda não se tem claro quais os mecanismos biológicos envolvidos nesse processo e quais os reais efeitos da suplementação de vitamina E e da NAC após a lesão muscular induzida por esse tipo de exercício.

1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

RADICAIS LIVRES

Os Radicais Livres (RL) são átomos ou moléculas que em virtude de seus elétrons desemparelhados, apresentam uma grande reatividade, que os faz reagir com outras moléculas, a fim de encontrar um estado químico estável. Cada radical livre possui pelo menos um elétron não pareado em seu orbital externo, o qual os torna altamente reativos (Powres e Homely, 2000).

São produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos para produção de energia. São em muitas vezes de extrema importância, como na ativação do sistema imunológico, na desintoxicação de drogas e na produção relaxante de fatores derivados do endotélio (Shneider e Oliveira, 2004). Por outro lado quando em excesso, podem reduzir os elétrons (oxidar) de compostos como proteínas, lipídeos e DNA provocando sérios efeitos deletérios aos sistemas biológicos (Halliwell e Gutteridge, 1999). Durante o exercício físico os RL podem contribuir para fadiga muscular, inativação de várias enzimas do ciclo de Krebs, e alteração no equilíbrio da redução do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons (Powres e Homely, 2000).

Depois de formados, os RL tendem a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado quimicamente mais estável, criando assim novas moléculas de RL (Halliwell e Gutteridge, 1999). Por exemplo, Matsuo e KaneKo (2000) reportam-se que um radical (A°) reage para aceitar um elétron de outras moléculas (B) e outro radical é produzido (B°): $A^\circ + B = A + B^\circ$. A formação deste outro radical constituído a partir do radical A° pode reagir com uma terceira molécula e produzir

um outro radical: $B^\circ + C = B + C^\circ$. Caso este terceiro radical reaja com o elétron doado da molécula que produziu o radical original, isto pode virar uma reação em cadeia: $C^\circ + A = C + A^\circ$.

A reação em cadeia continua até acontecer uma reação terminal. Todavia, se a reação em cadeia continuar sem uma regulação, é possível que ocorram prováveis danos nos sistemas biológicos. O término da reação ocorre quando os radicais reagem entre si produzindo não radicais: $R^\circ + R^\circ = RR$ ou pela ação de “scanvegeres” ou antioxidantes, que ao se ligarem ao RL constituem novos radicais menos reativos e estes ao se ligarem com antioxidantes se esgotam. (Pinho et al, 2005).

Alguns radicais livres são importantes para o organismo, agindo como sistema de defesa no corpo humano. Por exemplo, quando as células são agredidas por algum agente estressor (que também pode ser um RL) elas acabam produzindo RL para combater estes agentes (Polidori et al., 2000). O grande problema é quando o agente estressor (RL) agir mais eficientemente que a capacidade de defesa. Este processo pode ocasionar danos celulares irreversíveis por reagir com componentes celulares como lipídeos de membrana, proteínas e DNA.

Espécies Reativas de Oxigênio

Dois a 5% do oxigênio utilizado na fosforilação oxidativa é desviado para a formação de RL. Durante esse processo podem ser formados outros elementos químicos que ao reagirem com metais de transição formam radicais livres altamente reativos. O conjunto dessas substâncias são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Matsuo e Kaneko, 2000).

O oxigênio que respiramos é metabolizado em nosso organismo onde aproximadamente 85 a 90% são utilizados na mitocôndria em processos oxidativos dentro da cadeia de transporte de elétrons, e os 10 a 15% que restaram são recrutados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação diretas. (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada vez das quatro moléculas reduzidas de citocromo c oxidando-as, e adicionando os quatro elétrons O_2 para formar água (em torno dos 95 a 98% dos 85 a 90 citados acima). A existência desta enzima é capaz de neutralizar a tendência monoelétrica do oxigênio, forçando a reação a ocorrer numa única etapa, sem a formação de intermediários, os restantes cerca de 2 a 5% são diminuídos univalentemente, em compostos denominados RL (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O complexo I e III da cadeia respiratória são locais conhecidos para a produção de superóxido e H_2O_2 . Isso é causado pela transição de 1 elétron da NADH e FADH para ubiquinona formando a semiquinona (QH^\bullet), e outro e^- forma o superóxido. O superóxido é rapidamente reduzido pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD-mg) à H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Quando formado o peróxido de hidrogênio assim como o ânion superóxido se não for eliminado ou convertido em um outro radical menos potente pode causar estragos a sistemas biológicos. Ao receber mais um elétron ou um íon de hidrogênio o H_2O_2 forma então o radical hidroxil ($\cdot OH$), que é a ERO mais reativa dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próximo a ele influenciando enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (Schneider e Oliveira, 2004).

O radical hidroxil pode ser formado por mais duas reações conhecidas como reação de Fenton e Haber-Weiss. A primeira o $\cdot\text{OH}$ é formado quando o H_2O_2 reage com íons de ferro ou cobre, a segunda quando os íons de ferro e cobre catalisam a reação entre o superóxido e o peróxido de hidrogênio. Como características comuns, estas espécies apresentam grandes reatividades e possuem uma meia vida muito curta, o radical hidroxila, por exemplo, tem 10^{-9} segundos de vida, já o ânion superóxido decai a peróxido de hidrogênio em $4,5 \times 10^5$ milisegundos (Sies e Cadenas, 1989).

Defesas Antioxidantes

O corpo humano apresenta sistemas naturais de defesa contra as ERO, que mais do que defender, mantêm suas concentrações em níveis compatíveis com a atividade biológica (Lancha-Jr, 2004). Entretanto os antioxidantes também podem ser acrescentados no organismo via alimentação, suplementação ou, ainda como recurso terapêutico.

Segundo Pinho (2005) as defesas antioxidantes podem atuar de forma associada ou independente por duas vias: 1) enzimáticas: este sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX). Essas enzimas são ativadas normalmente durante o metabolismo celular, porém suas atividades podem aumentar em função da presença de ERO. 2) não enzimáticas, que incluem as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathione (GSH) e N-acetilcisteína (NAC) entre outros. Grande partes desses antioxidantes são encontrados na alimentação e podem ser suplementados por uma dieta alimentar.

a) Sistema enzimático

a.1 Superóxido Dismutase (SOD)

É a enzima responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença de próton H^+ . Sua composição apresenta diferentes grupos protéicos. Nos sistemas eucariontes, atualmente se conhecem duas formas: a) SOD-CuZn que está presente principalmente no citosol; b) SOD-Mh está localizada primariamente na mitocôndria (MATSUBARA e FERREIRA, 1997).

a.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática e sua função é converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Nos seres humanos é encontrada na maioria dos órgãos, tais como: fígado, cérebro, coração e músculo esquelético, medula óssea e mucosas e sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT et al., 1991).

a.3 Glutathione Peroxidase (GPX)

A GPX age sobre H_2O_2 , convertendo-o em água, podendo agir também sobre os lipídeos peroxidados tornando-os hidroxilados e reverter a oxidação das proteínas. Após reagir com ERO, a GPX é convertida a glutathione oxidada (GSSH), podendo ser reconvertida a glutathione reduzida GSH, pela ação da enzima glutathione redutase (Halliwell e Gutteridge, 1999).

b) Sistema Não enzimático

O sistema não-enzimático inclui as vitaminas E, C e betacaroteno, glutathione (GSH), e N-acetilcisteína (NAC) entre outros. A maioria desses oxidantes são encontrados na alimentação e podem ser suplementados por uma dieta alimentar. A Vitamina E e betacaroteno são antioxidantes lipossolúveis e protegem as membranas celulares dos ataques por RL. A vitamina C e a glutathione são hidrossolúveis e fundamentais na regeneração da Vitamina E e proteção dos constituintes lipídicos e protéicos celulares (Urso e Clakson, 2003).

Conforme Robergs e Roberts (2002) existe uma elevada incidência declarada pelos atletas do uso da suplementação de antioxidantes, especialmente vitaminas. Os estudos realizados para comprovar os efeitos da suplementação com antioxidantes apresentam resultados controversos (Childs et al., 2001; Beaton et al., 2002; Avery et al., 2003; Sachck et al., 2003; Goldfarb et al., 2005).

b.1 vitamina E

A vitamina E vem sendo considerada como um dos mais potentes antioxidantes biológicos (Penteado, 2003), sendo que seus benefícios vão desde proporcionar o retardamento do envelhecimento precoce induzidos pelos RL ou por algumas doenças, à proteção contra danos no DNA, produzidos a partir do exercício físico extenuante, atentando inclusive para importância da suplementação em alguns casos.

A vitamina E é o termo mais usado para designar 8 compostos, sendo 4 derivados do tocol, chamados de tocoferóis, e quatro do tocotrienol chamados de tocotrienóis (Machiln, 1984). Estes oitos compostos possuem um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral que é de natureza isoprênica, constituída por 16 átomos de

carbono, sendo responsável pela lipossolubilidade da vitamina E (Machiln, 1984, Coulate, 1996). Entretanto sua absorção é ineficiente, apenas 20 a 40% do tocoferóis ingeridos são absorvidos, porém este percentual pode ser aumentado pelo concomitante consumo de gordura na dieta (Penteado, 2003).

Segundo Bacurau et al., (2001) o consumo de vitamina E, mesmo que em megadoses de até 200 vezes a recomendação diária, não apresenta risco a saúde.

De acordo com a National Academy of Sciences (2000) citado por Rique et al.(2002), as recomendações diárias de vitamina E aumentaram para 15mg por dia (equivalente a 22UI de fontes naturais e 33UI de fontes sintéticas) e a quantidade máxima diária tolerável (absorvida) pelo organismo é de 1.000mg, o equivalente a 2.200UI de fonte sintética.

Apesar dos efeitos da suplementação da vitamina E sobre a performance não ser comprovado, a suplementação pode ter supostamente um papel importante em alguns indivíduos em determinadas situações. Packer et al., (1989) sugere que humanos fisicamente ativos devem aumentar a ingestão de vitamina E diariamente, devido a depleção causada pelo exercício físico.

Alguns estudos realizados em humanos demonstram que a suplementação é capaz de promover aumento nos níveis séricos e musculares de vitamina E (Bacurau et al., 2001), porém no que se refere a proteção contra o estresse oxidativo e aumento de performance os dados são controversos.

b.2 N-acetilcisteína

Outro antioxidante que vem despertando interesse é a N-acetilcisteína, um doador de tiois, que atua como precursor da cisteína intracelular, aumentando a produção de glutathione (GSH) (Pinho et al., 2005). Por sua vez, a GSH, em sua forma reduzida, tem um importante papel no mecanismo de defesa contra ataques de radicais livres (Smith et al., 1994; Zhang et al., 1999), por diminuir o conteúdo de H_2O_2 e alterar o equilíbrio da capacidade oxidante-antioxidante pulmonar (Repine et al., 1997). Sugere-se que o potencial efeito da NAC é diminuir os níveis de H_2O_2 , alterando o equilíbrio da capacidade oxidante-antioxidante.

A resposta positiva ao uso da NAC pode estar associada a dois mecanismos propostos por Heunks e Dekhuijzen (2000): 1 - a suplementação da NAC pode atuar como scavenger de radicais livres resultando na formação de NAC dissulfida; 2 - a NAC pode exercer um importante efeito antioxidante por facilitar a biossíntese da glutathione (GSH).

A GSH, em sua forma reduzida, tem um importante papel no mecanismo de defesa contra ataques de radicais livres (Smith et al., 1994) por diminuir o conteúdo de H_2O_2 e alterar o equilíbrio da capacidade oxidante-antioxidante pulmonar (Repine et al., 1997). Dependendo do nível na célula, pode ser uma fonte importante contra respostas inflamatórias (Pinho et al., 2005).

Exercício Físico e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo está relacionado a situações onde os mecanismos celulares pró-oxidantes superam os mecanismos de defesas incluindo os sistemas enzimáticos e outros antioxidantes. É um estado em que há uma elevada produção

de espécies reativas. Este estado está comumente ligado a danos celulares como, por exemplo, peroxidação de lipídios, fragmentação de proteínas e danos em ácidos nucléicos.

O estresse oxidativo tem sido associado com diminuição da performance, fadiga, dano muscular e “overtraining” (Carmeli et al., 2000). Por essa razão, alguns pesquisadores sugerem que reduzir o estresse oxidativo pode melhorar a tolerância ao exercício e a performance (Alessio, 1999).

Embora os benefícios do aumento no consumo máximo de oxigênio ($VO_2^{\text{máx}}$) sejam bem estabelecidos, um paradoxo bioquímico é verificado. O aumento no consumo de O_2 é essencial para aptidão cardiovascular e performance, porém o aumento no consumo durante ou após o exercício pode ser prejudicial, quando é excedida a capacidade normal do indivíduo (Pinho, 2005).

O grau de estresse oxidativo e dano muscular associado com o exercício, não dependem somente do tipo e intensidade do exercício, mas também do grau de exaustão da pessoa que realiza o exercício (Schneider e Oliveira, 2004).

Por exemplo, o exercício físico intenso provoca um aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio do organismo e um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular, favorecendo o aumento na produção de ERO (Kory e Donangelo, 2003). Entretanto, estudos têm demonstrado que o treinamento de endurance aumenta as defesas antioxidantes, assim como a capacidade oxidativa do músculo (Radak et al., 1999; Terblanche, 2000; Pinho et al., 2006).

De acordo com König e Berg (2002) evidências sugerem que o exercício físico aumenta a geração de ERO. Dependendo do tipo de exercício, têm sido propostos vários mecanismos na geração destas espécies:

a) Aumento na produção de $O_2^{\cdot -}$ na cadeia respiratória.

Interrupções temporárias das bombas de ATP dependentes de cálcio (Ca^{++}) levam ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio, o que durante o exercício pode ativar a via da xantina oxidase. Concentrações aumentadas de cálcio intramusculares durante períodos de exercício de alta intensidade podem ativar as proteases dependentes de cálcio, as quais convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase. A xantina oxidase usa o oxigênio molecular ao invés do NAD^+ como aceitante de elétrons e assim gera o radical superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1999).

b) Isquemia muscular

Exercícios intensos podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio devido à hipóxia e reoxigenação temporárias que ocorrem no músculo exercitado em função de contrações e relaxamentos estabelecidos ciclicamente. Durante a contração a compressão vascular estabelece um quadro de isquemia gerando uma hipóxia. Entretanto no relaxamento, acontece a reperfusão, e, conseqüentemente, a reoxigenação. Em condições de hipóxia, os equivalentes reduzidos podem se acumular dentro da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, resultando no fenômeno conhecido como estresse redutivo. Na reoxigenação, uma explosão (burst) de reduções monoeletrônicas pode converter o oxigênio molecular em radicais superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1999).

c) Ativação células polimorfos nucleares (PNM)

Danos musculares provocados por exercícios levam a migração de várias células do sistema de defesa como leucócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos que são capazes de produzir ERO. A ativação de leucócitos, por exemplo, após o dano muscular induzido pelo exercício físico, pode estimular a produção de RL para melhorar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Em particular os neutrófilos são as maiores fontes de produção de $O_2^{\cdot -}$ pela reação NADPH – oxidase. Na presença de H_2O_2 e íon clorido os neutrófilos geram um potente ácido-hipocloroso via reação atividade da enzima mieloperoxidase. As ERO produzidas por neutrófilos são geradas para destruir bactérias invasoras e remover tecidos danificados. A netrofilia induzida pelo exercício ocorre como resultado da demarginação de neutrófilos de tecidos endoteliais (mediados por catecolaminas) e medula óssea (mediado pelo cortisol) (Trevor e Sandy, 2001).

Isso faz com que migrem para outras células danificadas e removam proteínas danificadas e células mortas. Embora isso seja uma reação desejável, pode ser causa de inflamações agudas, devido à produção de mediadores pro-inflamatórios adicional (IL, 1,6,8 e TNF alfa) e prostaglandinas, levando a produção de processo inflamatório adicional e aumentando a produção de ERO (Mastaloudis et al, 2004).

d) Menor homeostase do cálcio

O acréscimo das concentrações de Ca^{++} pode ativar a enzima fosfolipase A_2 , a qual libera o ácido araquidônico a partir dos fosfolipídeos. A ciclooxigenase reage com o ácido araquidônico para gerar o radical hidroxil.

e) Atividade da óxido nítrico sintase.

Condições hipóxicas têm sido associadas com o aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), levando a formação de radicais do óxido nítrico. Estes podem exercer um efeito pró-oxidante fraco por eles próprios ou se combinarem com o superóxido para formar um oxidante mais potente, o peroxinitrito.

f) Ativação da xantina oxidase (XO)

De acordo com Chevion et al (2003) as reações catalisadas pela (XO) têm sido consideradas uma das mais importantes fontes de RL na isquemia/reperfusão do coração. Durante a isquemia o ATP é degradado em AMP devido à demanda de energia do miocárdio. Se o O₂ for insuficiente, o AMP é continuamente degradado para hipoxantina que pode ser convertido para xantina e AU pela XO, ligando-se a 1 e⁻ da redução do O₂ e formando superóxido. A XO também pode ser convertida da forma reduzida (xantina desidrogenase) para forma oxidada por proteases intracelulares que podem ser ativadas pelo Ca⁺². O O₂ também pode estar disponível como acceptor de elétrons.

Sob condições aeróbias, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado primeiramente via fosforilação oxidativa mitocondrial e que a hipoxantina/xantina sejam convertidas para AU pela xantina desidrogenase do que pela xantina oxidase. Além disso, o músculo esquelético tem baixa atividade da XO. Todavia a XO pode ser um importante caminho quando o músculo apresentar um déficit de adenina dinucleotídeo. Essa situação teoricamente pode acontecer em situação isquêmica, exercício isométrico, sprint, déficit de O₂ e exercícios com limitação vascular de fluxo sanguíneo (Ji, 1995, Chevion et al., 2003).

Vale destacar ainda que as reações catalizadas pela Xantina Oxidase (XO) favorecem a produção de ERO catalisando a degradação do AMP durante o trabalho muscular isquêmico levando ao aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$.

Outros fatores como o aumento de citocinas e ativação de NF-KB, auto-oxidação da catecolaminas, do sistema do citocromo p-450 microsossomal, o aumento do metabolismo peroxissomal, podem também contribuir para formação de ERO, mais ainda são poucos os indícios que comprovem esta relação com o exercício (JI, 1999).

Exercícios excêntricos

Estes tipos de exercícios referem-se a uma ação muscular no qual o agrupamento muscular solicitado por determinado exercício é alongado e contraído ao mesmo instante (Bacurau et al., 2001). Esta solicitação dupla (contração e alongamento), de acordo com Powers e Howley (2000) faz com que ocorra um aumento da tensão nas fibras musculares ocasionando uma série de eventos bioquímicos na estrutura, integridade, tamanho e talvez até no número de células.

De acordo com Bompa (2001), Fleck e Wramer (1999) as lesões musculares mais intensas ocorrem durante as contrações excêntricas, pois é neste tipo de ação que se realiza trabalho de força e de alongamento ao mesmo tempo, aumentando assim o estresse sobre os tecidos. Dependendo da intensidade do alongamento isto pode provocar uma extensão além do normal de alguns sarcômeros, aumentando assim danos musculares.

No exercício excêntrico, o custo energético é menor, porém a tensão por fibra é maior, uma vez que menos fibras são recrutadas, 1/3 a 1/5 do número de

sarcômeros são ativados durante a fase excêntrica do movimento comparado com a concêntrica (Barucau et al., 2001).

Na ação excêntrica, segundo Bacurau et al. (2001), duas teorias foram propostas para explicar como a contração excêntrica promove sua ação. A primeira enfatiza que, para a realização de um mesmo esforço, há uma menor ativação de fibras durante a contração excêntrica em relação à concêntrica. Isso causaria uma maior produção de força por fibra muscular. Na segunda teoria alguns sarcômeros seriam obrigados a se alongar mais que outros. Esse alongamento excessivo provocaria a lesão.

Segundo Faulker (1993), a quantidade de força desenvolvida neste tipo de contração é aproximadamente 2 vezes superior a força desenvolvida nas contrações isométricas. No entanto, o número total de pontes cruzadas ativas é somente 10% maior, resultando numa tensão elevada na estrutura da fibra muscular.

O estresse oxidativo produzido durante a realização do exercício excêntrico de alta intensidade, tem sido atribuído a ativação da Xantina Oxidase, a produção de NADPH oxidase, isquemia-reperfusão, rompimento nas proteínas que contém ferro e o desequilíbrio na homeostase de Ca^{++} (Mchugh, 1999; Childs et al., 2001; Goldfarb et al., 2005).

Dores musculares

A dor muscular tardia (DMT) caracterizada pela sensibilidade local ou generalizada nos músculos estressados, manifesta-se após 8h ao término do exercício e progride de intensidade nas primeiras 24h, alcançando seu pico entre 48 e 72 horas (Tricoli, 2001). Smith (1991) sugere que a DMT decorre do processo

inflamatório no músculo exercitado. Células PMN migram para o tecido lesionado e liberam prostaglandinas (PG2), que ativam receptores locais de dor, intensificando a sensação dolorosa (Crosier et al., 1996).

As prostaglandinas aumentam a sensibilidade dos receptores de dor tipo III e IV. Os receptores do tipo III identificam primeiramente estímulos mecânicos, enquanto que os do tipo IV são responsáveis pela transmissão da dor causada por agentes químicos. O tempo para que estes eventos ocorram, explicam em parte a demora entre o dano na estrutura do tecido muscular e a percepção de dor (MILES et al., 1994).

1.4 PERGUNTAS CIENTÍFICAS

- ◆ A suplementação de vitamina E ou NAC apresentam resultados diferenciados nos biomarcadores de estresse oxidativo, inflamação e dores musculares após o exercício excêntrico?
- ◆ Quais os efeitos da suplementação da vitamina E ou NAC sobre os marcadores de estresse oxidativo e inflamação muscular induzidos pelo exercício excêntrico?
- ◆ Existe diferença entre os dois modelos de suplementação com vitamina E ou NAC nos marcadores de estresse oxidativo e inflamação em soro humano, após a lesão muscular induzida pelo exercício excêntrico?

1.5 OBJETIVOS

Diante das evidências de que a o exercício físico excêntrico provoca lesões musculares e altera a resposta oxidativa e inflamatória em soro, pressupõe-se que a suplementação de vitamina E e NAC possam amenizar esses efeitos. A partir de tais pressupostos foram elaborados os seguintes objetivos:

Geral:

- Verificar os efeitos da suplementação de vitamina E e NAC em soro humano, sobre, marcadores de estresse oxidativo, inflamação e desenvolvimento de dores musculares em resposta a lesão muscular aguda induzida pelo exercício físico excêntrico.

Objetivos Específicos:

- Verificar se os marcadores de estresse oxidativo no soro são atenuados com a suplementação de vitamina E ou NAC;
- Verificar se a resposta inflamatória induzida pelo exercício excêntrico é atenuada com a suplementação de vitamina E ou NAC;
- Verificar se a suplementação de vitamina E ou NAC diminui o desenvolvimento de dores musculares tardias;
- Verificar se a resposta dos dois modelos de suplementação apresentam resultados diferentes nos marcadores de estresse oxidativo e inflamação em soro humano, após a lesão muscular induzida pelo exercício excêntrico.

CAPITULO II

VITAMIN E ON INFLAMMATORY AND OXIDATIVE MARKERS INDUCED BY ECCENTRIC EXERCISE

Luciano A. Silva, MSc¹; Paulo C. L. Silveira, MSc¹; Cléber A. Pinho, BSc¹; Talita Tuon, BSc¹, Emilio L. Streck, PhD²; Felipe Dal Pizzol, PhD²; Ricardo A. Pinho, PhD¹

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

²Laboratório de Fisiopatologia Experimental/UNESC

Artigo submetido à revista *Medicine & Science in Sports & Exercise*

Address:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC/Brasil

e-mail: pinho@unesc.net

Abstract

The objective of this study was to verify the effects of vitamin E supplementation on the oxidative damage and inflammatory response induced by eccentric exercise (EE). 27 subjects (male, 22.3 ± 3 yr, weight of 68.2 ± 4.9 kg and height of 173 ± 4.3 cm) were divided randomly into 3 groups: placebo; 21 days of vitamin E; 14 days of Vitamin E + 7 days of placebo. Fourteen days after starting supplementation, the subjects performed EE: 3 series until exhaustion (elbow flexion and extension on the Scott bench, 80%-1RM). Blood samples were collected before and on the 2nd, 4th and 7th day after EE. Muscle soreness (MS), LDH activity, lipoperoxidation, protein carbonylation, TNF- α , and IL-10 were determined. Results showed a significant increase in MS in all the groups on the 2nd day after EE and that LDH activity was significantly higher on the 4th and 7th day after the lesion in all the groups and a decrease in LDH level in the group supplemented for 21 days; a significant increase in MDA levels on the 2nd, 4th and 7th day after EE in the placebo group, and a decrease after 21 days for supplementation. Protein damage increased after 4 days and 7 days, in groups not supplemented with vitamin E and a decrease in carbonylation, 4 days after EE in the supplemented group. All the groups significantly increased the TNF- α on the 2nd day after EE and concentration of IL-10 increased significantly on the 4th and 7th day after EE. Results suggest that vitamin E supplementation represents an important factor in the defense against free radicals, but not against inflammatory response.

Key-words: vitamin E, eccentric physical exercise, interleukins, supplementation, free radical

Introduction

Studies have associated eccentric physical exercise, reactive oxygen species (ROS) markers, antioxidant supplementation and inflammation (10, 32, 33). After conclusion of the eccentric physical exercise, neutrophils and macrophages migrate to and infiltrate the lesioned muscular tissue, activating proinflammatory cytokines and producing Reactive Oxygen Species (ROS) which make recovery of the damaged tissue difficult (11, 14).

It is possible that the inflammatory response by intense eccentric exercise provokes additional ROS, causing oxidative damage to cellular structures, by membrane lipid oxidation, protein carbonylation and DNA damage. However, such damage can be reversed by stimulating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses, restoring the balance between production of ROS and the antioxidant defense system.

Vitamins E (α -tocopherol) are considered antioxidant vitamins because they constitute an important cellular protection mechanism against the action of ROS. They serve as potent scavengers of the peroxy radical and may be an important defense agent against oxidative damage after intense physical exercise (13, 5, 4, 32).

Previous studies have shown that a 14-day period of vitamin E supplementation prior to eccentric exercise elevates vitamin E levels and improves plasmatic oxidative response (14, 29, 23, 6). However, the effects of vitamin E on inflammation still remain contradictory. Also unclear is which biological mechanisms are involved in this process and what is the appropriate time of supplementation.

Thus, the objective of this study was to examine the effect of vitamin E on oxidative damage and inflammatory response induced by intense eccentric exercise. We had hypothesized that it is necessary to continue with vitamin E supplementation after the eccentric exercise to reduce the oxidative and inflammatory response.

Materials and Methods

Subjects: 27 male volunteers - students of UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina state, Brazil) with a mean age of 22.3 ± 3 yr (range 19-25yr), weight of 68.2 ± 4.9 kg and height of 173 ± 4.3 cm - were selected. They were nonsmokers, did not take vitamin E or any other antioxidant or related supplements, had not participated in resistance training or any other form of structured exercise for at least 6 months, who did not have a history of muscular lesion or were not carriers of any disease that might compromise the results or aggravated by physical exercise. All the subjects were informed about the purpose of the study and the associated risks, and all of them gave written informed consent. All the procedures were approved by the local ethics committee.

Supplementation: Subjects were randomly selected in a single-blind manner to receive either a placebo (capsule containing starch or vitamin E supplementation (capsule containing 800IU of acetate d- α -Tocopherol) according to Meydani et al. (24). Volunteers received one capsule per day for a total of 14 days before the eccentric protocol and for 7 days post-exercise, and were randomly allocated in three groups: placebo (21 days of placebo; n=6), vitamin E (21 days of vitamin E; n=8); vitamin E plus placebo (14 days of Vitamin E + 7 days of placebo; n=7). During the study, six subjects withdrew from the groups due to personal reasons. Subjects were

instructed to maintain their normal diet throughout the duration of the study. Fourteen days after starting supplementation, the subjects performed eccentric exercise.

Eccentric Exercise protocol: Eccentric exercise (EE) of short duration and high intensity was performed with elbow flexion and extension on the Scott bench at an intensity of 80% of maximum repetition - 1RM according to Bompa (7). The concentric phase of the exercise was performed with manual assistance from the instructor. The eccentric phase was performed for a duration of 6 to 8 seconds. Three sets of the exercises were performed, with 2 minute intervals, until exhaustion.

Blood Collection: Blood samples were collected prior to the exercise and on the 2nd, 4th and 7th day after the exercise. Blood (10 mL) was obtained from the cubital vein of the right arm and collected in vacutainer tubes without additives. It was then processed and the serum separated, aliquoted and immediately stored in a freezer at -80°C for later analysis.

Muscle Soreness (MS): MS levels were measured by a visual analogue scale. Subjects marked their subjective rating of MS between 0 (without pain) and 10 (extreme pain) (31).

Lactate Dehydrogenase (LDH): LDH enzyme activity was used as a marker of cellular damage. A specific kit, supplied by Labtest Diagnóstica SA, was used. The dosage was made from an enzymatic system with final point reaction in serum samples, following the technical instructions that accompanied the kit.

Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS): as indicator of lipid peroxidation, the formation of substances that react to the heating of thiobarbituric acid (malondialdehyde – MDA) measured spectrophotometrically (532nm) and expressed as malondialdehyde equivalents (12).

Protein Carbonylation: oxidative damage in proteins was measured by determining the carbonyl grouping based on the reaction with dinitrophenylhydrazine. Carbonyl content was determined spectrophotometrically (370nm) using a coefficient of 22.000 M (20).

Interleukins: Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and IL-10 were determined by ELISA with commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Protein Determination: The quantity of proteins in TBARS and carbonyl assays was measured using the technique of Lowry et al (21).

Statistical Treatment: Data was expressed in mean and standard error of the mean (SEM), and statistically analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the SNK post hoc test. The level of significance established for the test was $p < 0.05$. SAEG version 9.0 was used.

RESULTS

Muscle Soreness (MS): The results showed a significant increase in MS in all the groups on the 2nd day after EE and a significant decrease in those values in all the groups on the 4th and 7th day after EE (table 1). We also observed a significant decrease in MS in the vitamin E groups after 4 days and 7 days of EE, compared to the placebo group.

Lactate dehydrogenase (LDH): LDH activity was defined as the indicator of cellular membrane integrity. The results show a significant increase in LDH activity after 4 days and 7 days of EE (table 1). We also observed a significant decrease in the LDH level in the group supplemented for 21 days with vitamin E, compared to the placebo group.

Lipoperoxidation: Oxidative damage to membrane lipids was evaluated by the formation of MDA, a sub-product of lipoperoxidation. According to figure 1, the results show a significant increase in MDA levels on the 2nd, 4th and 7th day after the eccentric exercise, in the placebo group. We also observed that the group supplemented for 21 days did not alter the level of lipoperoxidation on the 2nd and 4th days and decreased on the 7th day. The group supplemented for 14 days also decreased the level of lipoperoxidation on the 7th day.

Protein Carbonylation (PC): To verify the oxidative damage in proteins, we evaluated the carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine. The results (figure 2) show a significant increase in protein damage on the 2nd, 4th and 7th day after EE in the placebo group and the group supplemented for 14 days. We also observed a decrease in carbonylation after 4 and 7 days of EE in the group supplemented for 21 days, when compared to the placebo group.

Interleukins: To quantify the inflammatory response, we measured the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 10 (IL-10). all the groups significantly increased the TNF- α on the 2nd day after eccentric exercise (figure 3a) and serum concentration of IL-10 increased significantly on the 4th and 7th day after eccentric exercise in all the groups (figure 3b).

DISCUSSION

The purpose of the study was to investigate the effects of vitamin e supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammatory response after eccentric physical exercise.

Several indicators have been used to determine the level of muscular lesion induced by eccentric exercise (5, 19, 2). We used LDH enzyme activity and MS as

markers of cellular damage. Results showed that MS increased after 48 hours of the eccentric exercise and decreased over the following days, principally in the supplemented groups. LDH levels increased significantly from the 4th day after the eccentric exercise (table 1). The mechanisms that may possibly contribute to skeletal muscle damage include ROS-mediated processes (1, 3) and inflammatory factors while those that liberate prostaglandins and activate local pain receptors are the main factors in the increase in MS 48 hours after intense exercise (28). It is possible that the vitamin E supplementation can accelerate the decreased those effects.

We also observed a significant decrease in LDH level in the group supplemented for 21 days (table 1). Few studies have reported that supplementation with vitamin E had, in fact, attenuated LDH increases following eccentric exercise (2, 15, 27). It is possible that ROS has an important role in those processes. Specifically, ROS may play a central role in the etiology of skeletal muscle damage via oxidation of ion transport systems, leading to disruption of Ca⁺² -ion homeostasis, impaired mitochondrial respiratory control, distortions in signal transduction pathways, and ultimately, cell dysfunction (18). Therefore, we believed that quenching of ROS by vitamin E could protect against muscle damage caused by eccentric exercise.

To assess the oxidative damage in lipid membranes, we measured malondialdehyde (MDA) levels. According to figure 1, we observed a significant increase in the levels of lipoperoxidation in the placebo group on the 2nd, 4th and 7th day after eccentric exercise. It is possible that eccentric exercise causes an immediate inflammatory response and consequently increases the levels of lipoperoxidation, probably as a result of the activation of macrophages and neutrophils on the tissue. The alterations in lipoperoxidation levels following physical exercise are directly related to the type, intensity and duration of the exercise (30).

Thus, it seems that different forms of exercise result in different levels of oxidative damage, although the results that point to the influence of exercise on levels of oxidative stress remain controversial.

We observed that 14 and 21 days for supplementation reduced MDA levels significantly (figure 1). These results suggested an antioxidant effect of vitamin E supplementation against lipoperoxidation and indicate that vitamin E supplementation suppressed oxidative damage induced by eccentric exercise. It is possible that the protection mechanism of vitamin E is for protecting cellular membranes and other fatty cellular components by donating electrons to free radicals (37, 25).

Similarly to lipoperoxidation, PC increased after eccentric exercise and was inhibited by 21 days of supplementation (figure 2). Jackson (16) has suggested that the rise in PC after eccentric exercise, where muscle damage is often produced, may be attributed to invasion of mononuclear cells and neutrophils infiltrating the damaged tissue, which typically occurs several hours after exercise and can generate a substantial amount of ROS. The catabolic breakdown of protein and anabolic utilization of amino acids for remodeling and the generation of new fibers is a continuous process that may last several weeks after initial muscle injury (24). Additionally, the disruption of iron-containing proteins such as erythrocytes can lead to an increase in free iron, which is known to catalyze radical reactions (16). Therefore, eccentric exercise that creates a significant degree of trauma can lead to destruction of these heme proteins, potentially increasing free iron to aid in the production of ROS (14). Thus, ROS production could lead to oxidation of amino acid side chains and fragmentation of polypeptides, as all amino acids are susceptible to metal-catalyzed oxidation (14).

It is still possible that the PC results are related, in part, with the signaling process leading to induction of transcription factor of HSPs (heat-shock proteins) in other cell types (8). The increased expression of HSPs following contractile activity is associated with an increase in the generation of oxidants by skeletal muscle and transient oxidation of protein thiols (22).

These factors could help to explain the elevation in protein oxidation observed after eccentric exercise.

Additionally, vitamin E supplementation attenuated the increase of carbonyl protein as evidenced by the marked reduction in PC in subjects pretreated for 21 days with supplementation. Oxidized proteins are catabolized to reform amino acids but carbonyl by-products cannot enter this process. Consequently, protein turnover, genetic transcription and cell integrity are reduced under ROS actions. ROS also have the ability to alter the lysosomal system and the proteasomes, two major pathways by which proteins are degraded (35). The molecular structure of vitamin E enables ROS inactivation (17).

Previous studies show the role of antioxidants in eccentric exercise-induced cytokine production (29, 36). These studies show that proinflammatory interleukins increase progressively after eccentric exercise. The cytokine response to exercise represented a reaction to exercise-induced muscle injury and inflammation (38).

TNF- α are the early-response, proinflammatory cytokines that are most likely synthesized by resident macrophages and local post-capillary vascular endothelium, with synthesis occurring rapidly after the onset of injury or infection (9). Changes in serum TNF- α have been reported after a bout of strenuous exercise. Here, we demonstrate that serum concentrations TNF- α (figure 3a) increase significantly on

the 2nd day after eccentric exercise, decreasing in the following days, irrespective of the supplementation.

The increase in TNF- α could be related to muscle damage; LDH levels observed were markedly elevated after eccentric exercise (figure 1). TNF- α may accumulate in the cell or be released, suggesting a dissociation between intracellular TNF- α production and release (34). It is possible that the decreases on the 4th and 7th day after eccentric exercise were due to rapid clearance or an undetectable accumulation at the site of injury (9). Nedzvesky and colleagues (25) suggested that the reduction in TNF- α levels with vitamin E supplementation may be ascribed to the inhibition of activation and translocation of NF- κ B by antioxidants. Increase in the production of ROS leads to the activation of NF- κ B, causing the release of inhibitory subunits and increase in the synthesis of TNF- α .

We also observed that serum concentration of IL-10 increases significantly on the 4th and 7th day after eccentric exercise in all the groups (figure 3b). IL-10 is a primary anti-inflammatory cytokine that acts by inhibiting proinflammatory cytokine production by activated monocytes and macrophages. Studies have shown significant increase immediately after intense exercise (34, 26) although it is not clear why elevations were observed at different times. However, in the present study, this time period would fit well with the period of resolution of an acute inflammatory response (27) and may, in part, be responsible for the reduction in proinflammatory TNF- α that was significantly reduced during those periods.

Although studies have shown that oral supplementation with antioxidants can attenuate the exercise-induced increase in proinflammatory interleukins (38), our

results do not confirm these studies. We did not find differences in TNF- α and IL-10 levels between the placebo group and the groups supplemented with vitamin E.

Conclusion

The results presented in this study offer strong evidence to suggest that supplementation with vitamin E represents an important factor in the defense against free radicals, acting in different forms on the lipoperoxidation and protein carbonylation process, but those effects were not observed on the inflammatory response. It is possible that the contradictory results found in the literature may be due to the differences among the protocols in relation to the type and time of supplementation, type, intensity and duration of the exercise and variation in the methods used to assess the levels of oxidative damage and inflammatory responses.

References

1. Armstrong, R.B., G.L. Warren, and J.A. Warren. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med.* 12:184-207, 1991.
2. Avery, N.G., J.L. Kaiser, M.J. Sharman, T.P. Scheett, D.M. Barnes, A.L. Gomez, W.J. Kraemer, and J.S. Volek. Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. *J Strength Cond Res*; 17:801-809, 2003.
3. Balnave, C.D., and M.W. Thompson. Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol.* 75:1545-1551, 1993.
4. Banerjee, A.K., A. Mandal, D. Chanda, and S. Chakraborti. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cel Bioch.* 253:307-312, 2003.
5. Beaton, L.J., D.A. Allan, M.A. Tarnopolsky, P.M. Tiidus, and S.M. Phillips. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 34:798-805, 2002.
6. Bloomer, R.J., A.H. Goldfarb, M.J. McKenize, T. You, and L. Nguyen. Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int J Sport Nutr. Exerc. Metab.* 14:377-388, 2004.
7. Bompa, T. *Periodização no Treinamento Esportivo: Planejamento do Programa.* São Paulo: *Manole*; 2001.
8. Calabrese, V., G. Scapagnini, C. Colombrita, A. Ravagna, G. Pennisi, S.A.M. Giuffrida, F. Galli, and D.A. Butterfield. Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. *Amino Acids* 25:437-444, 2003.

9. Cavaillon. JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother.* 48:445-453, 1994.
10. Child, R., S. Brown, S. Day, A. Donnelly, H. Roper and J. Saxton. Changes in indices of antioxidant status lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci* 96:105-115, 1999.
11. Childs, A., C. Jacobs, T. Kaminski, B. Halliwell, and C. Leeuwenburgh. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med.* 31:745-753, 2001.
12. Draper, H.H., and M. Hadley. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 186:421-431, 1990.
13. Evans, J.W. Vitamin E vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr.* 72:647-652, 2000.
14. Goldfarb, A.H., R.J. Bloomer, and M.J Mckenzie. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 37:234-239, 2005.
15. Itoh, H., T. Ohkuwa, Y. Yamazaki, T. Shimoda, A. Wakayama, S. Tamura, T. Yamamoto, Y. Sato, and M. Miyamura. Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training. *Int J Sports Med.* 21:369-374, 2000.
16. Jackson, M.J. Exercise and oxygen radical production by muscle. In: Sen CK, Packer L, Hanninen L., editors. Handbook of Oxidants and Antioxidants. Amsterdam: *Elsevier Science*; pp. 57-68, 2000.
17. Jackson, M.J., M. Khassaf, A. Vasilaki, F. McArdle, and A. McArdle . Vitamin E and the oxidative stress of exercise. *Ann N Y Acad Sci.* 1031:158-168, 2004.

18. Kourie, J.I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol.* 275:C1-24, 1998.
19. Lee, J.A.H., M.H. Goldfarb, S. Rescino, S. Hegde, S. Patrick, and K. Apperson. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med. Sci Sports Exerc.* 34:443-448, 2002.
20. Levine, R.L., D. Garland, C.N Oliver, A. Amici, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shajtiel, and E.R. Stadtman. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 189:464-478, 1990.
21. Lowry, O.H., N.G. Rosebough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 193: 265-275, 1951.
22. McArdle, A., D. Pattwell, A. Vasilaki, R.D. Griffiths, and M.J. Jackson. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:621-627, 2001.
23. McClure, E.K., K.E. Belk, J.A. Scanga, and G.C. Smith. Determination of appropriate vitamin E supplementation levels and administration times to ensure adequate muscle tissue alpha-tocopherol concentrations in cattle destined for the Nolan Ryan Tender- Aged Beef (NRTAB) Program. Animal Science Research Report, Dept. Animal Science, Colorado: State University; 2002.
24. Meydani, S.N., M. Meydani, J.B. Blumberg, L.S. Leka, G. Siber, R. Loszewski, C. Thompson, M.C. Pedrosa, R.D. Diamond, and B.D. Stollar. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *JAMA.* 277:1380-1386, 1997.
25. Nedzvetsky, V.S., M. Tuzcu, A. Yasar, A.A. Tikhomirov, and G. Baydas. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. *Biochemistry;* 71: 239-244, 2006.

26. Ostrowski, K., T. Rohde, S. Asp, P. Schjerling, and B.K. Pedersen. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 515:287-291, 1999.
27. Palazzetti, S., A.S. Rousseau, M.J. Richard, A. Favier, and I. Margaritis. Antioxidant supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake. *Br J Nutr.*; 91:91-100, 2004.
28. Paschalis, V., G. Giakas, V. Baltzopoulos, A.Z. Jamurtas, V. Theoharis, C. Kotzamanidis, and Y. Koutedakis . The effects of muscle damage following eccentric exercise on gait biomechanics. *Gait Posture* 19:1-7, 2006.
29. Petersen, E.W., K. Ostrowski, T. Ibfelt, M. Richelle, E. Offord, J. Halkjaer-Kristensen, and B.K. Pedersen. Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:1570-1575, 2001.
30. Pinho, R.A., M.E. Andrades, M.R. Oliveira, A.C. Pirola, M.S. Zago, P.C.L. Silveira, F.D. Pizzol, and J.C.F. Moreira. Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int.* 30:848-853, 2006.
31. Revill, S.I., J.O. Robinson, M. Rosen, and M.I. Hogg. The reliability of a linear analogue for evaluating pain. *Anaesthesia* 31:1191-1198, 1976.
32. Satchek, J.M., P.E. Milbury, G.J. Cannon, R. Roubenoff, J.B. Blumberg. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med.* 34:1575-1588, 2003.
33. Shafat, A., P. Butter, R.L. Jensen, and A.E. Donnelly. Effects of dietary supplementation with vitamins C and E on muscle function during and after eccentric contractions in human. *Eur J Appl Physiol.* 93:196-202, 2004.

34. Smith, L.L., A. Anwar, M. Fragen, C. Rananto, R. Johnson, and D, Holbert. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.* 82:61-67, 2000.
35. Szweda, P.A., B. Friguet, and L.I. Szweda. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med.* 33: 29-36, 2002.
36. Toft, A.D., L.B. Jensen, H. Bruunsgaard, T. Ibfelt, J. Halkjaer-Kristensen, M. Febbraio, and B.K. Pedersen. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:289-295, 2002.
37. Urso, M.L., and P.M. Clarkson. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189:41-54, 2003.
38. Vassilakopoulos, T., M.H. Karatza, P. Katsaounou, A. Kollintza, S. Zakyntinos, and C. Roussos. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol.* 94:1025-1032, 2003.(35)

Figure legends

Groups	Soreness Muscle				LDH (U/dl serum)			
	Pre-EE	2 day	4 day	7 day	Pre-EE	2 day	4 day	7 day
placebo	0	6.2±0.8 ^a	2.3±0.7 ^b	1.2±0.3 ^b	224±29	248±52	1292±161 ^a	1221±77 ^a
14 days vitE	0	5.1±1.0 ^a	1.7±0.8 ^b	0.00 ^{bc}	155±11	200±22	1172±116 ^a	1349±130 ^a
21 days vitE	0	3.8±0.7 ^{ac}	1.2±0.5 ^{bc}	0.00 ^{bc}	203±17	224±27	981±76 ^{ac}	1001±45 ^{ac}

Table 1: Soreness Muscle (MS) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activity of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. Subjects marked their subjective rating of MS on a 0= without pain; 10=extreme pain. The values are presented as Mean±SD and the significant difference used in relation to pre-EE (^a), placebo (^c) and in relation to 2 day (^b) was from p<0.05.

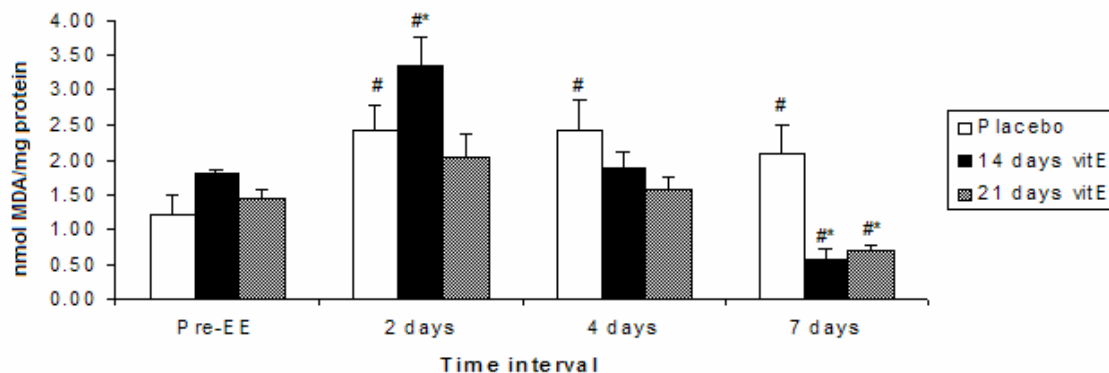


Figure 1: Lipoperoxidation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean±SEM and the results expressed in nmol of MDA/mg of proteins. The significant difference used in relation to pre-EE ([#]) and in relation to placebo (^{*}) was from p<0.05.

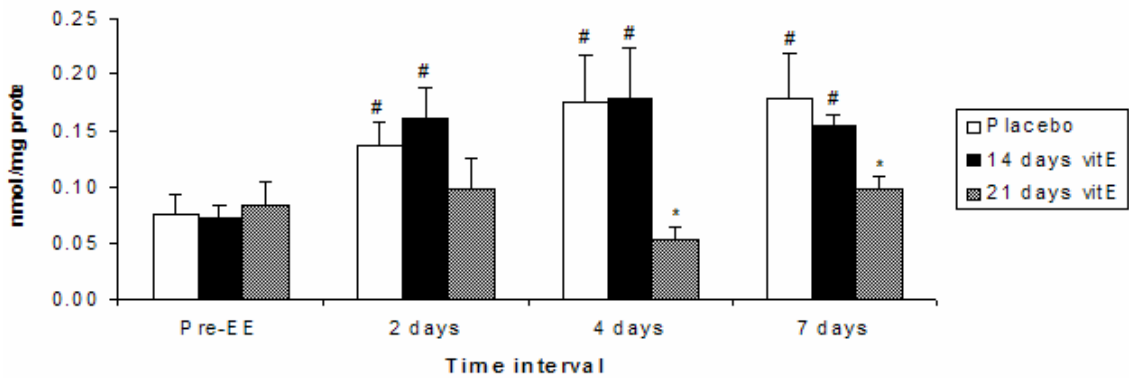


Figure 2: Carbonylation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean±SEM and the results expressed in nmol/mg of proteins. The significant difference used within in relation to pre-EE (#) and in relation to placebo (*) was from $p < 0.05$.

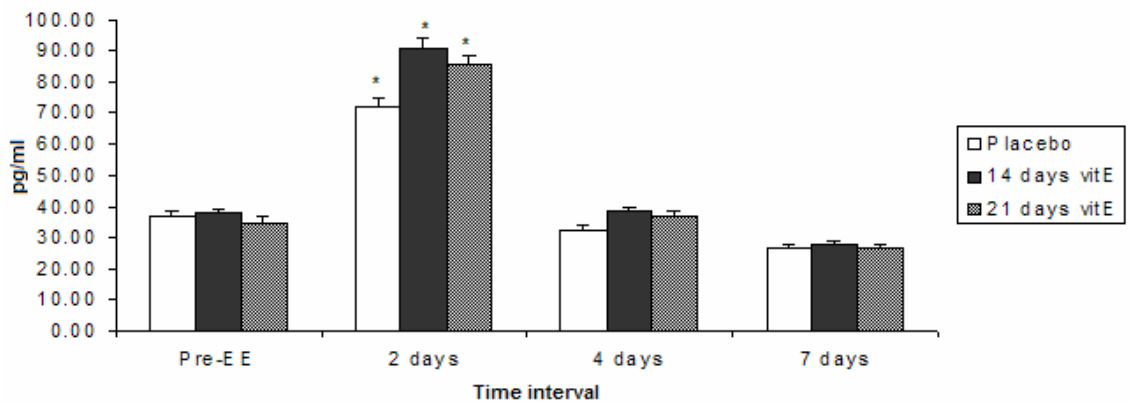


Figure 3a: Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean±SEM and the results expressed in pg/ml of serum. The significant difference used within in relation to pre-EE (*) was from $p < 0.05$.

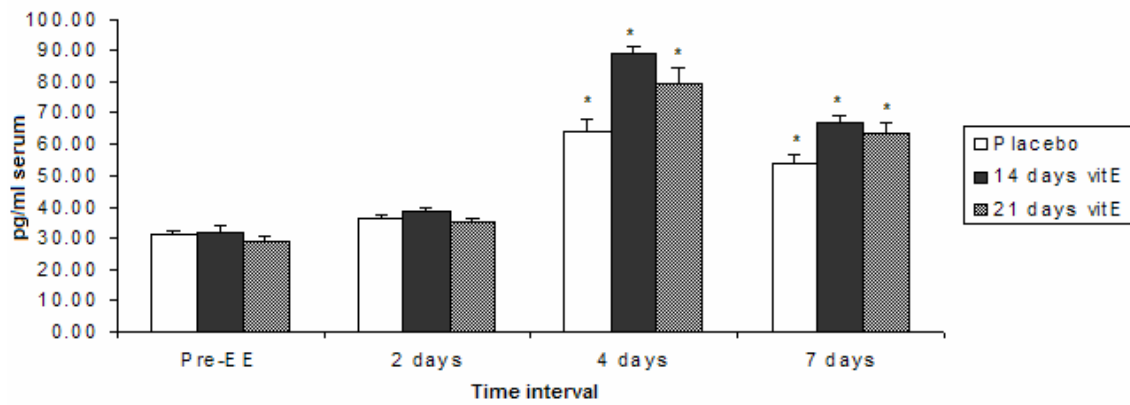


Figure 3b: Interleukin 10 (IL-10): in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean \pm SEM and the results expressed in pg/ml of serum. The significant difference used within in relation to pre-EE (*) was from $p < 0.05$.

CAPITULO III
N-ACETYLCYSTEINE SUPPLEMENTATION ON THE OXIDATIVE DAMAGE AN
INFLAMMATORY RESPONSE AFTER ECCENTRIC PHYSICAL EXERCISE OF
HIGH INTENSITY

Luciano A. Silva, MSc¹; Paulo C. L. Silveira, MSc¹; Cléber A. Pinho, BSc¹; Talita
Tuon, BSc¹; Felipe Dal Pizzol, PhD²; Ricardo A. Pinho, PhD¹

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

²Laboratório de Fisiopatologia Experimental/UNESC

Submetido a *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*

Address:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC/Brasil

e-mail: pinho@unesc.net

Abstract

The objective of the study was to verify the effect of NAC supplementation on the development of muscle soreness, parameters of oxidative damages and inflammatory response after high-intensity eccentric exercise (EE). 29 subjects with a mean age of 21.3 ± 4 yr, weight of 74.5 ± 7.7 kg and height of 177.2 ± 6.9 cm were selected and divided randomly into 3 groups (n=6): Placebo (21 days of placebo; n=8), NAC (21 days of NAC; n=9); NAC plus placebo (14 days of NAC + 7 days of placebo; n=8). During the study, four subjects withdrew from the groups for personal reasons. Fourteen days after starting supplementation, the subjects performed EE: three series until exhaustion (elbow flexion and extension on the Scott bench, 80%-1RM). Blood samples were collected before and on the 2nd, 4th and 7th day after EE. Muscle soreness (MS), LDH activity, lipoperoxidation, protein carbonylation, TNF- α , and IL-10 were determined. Results showed a significant increase in MS in all the groups on the 2nd day after EE and a decrease in the following days; LDH activity was significantly higher on the 4th and 7th day only in the placebo group, while in the supplemented groups this increase occurred on the 2nd day, decreasing in the following days. A significant increase was observed in MDA and carbonyl levels on the 4th and 7th days after EE in all groups. TNF- α increased significantly on the 2nd day after eccentric exercise and decreased in the following days irrespective of NAC supplementation; concentration of IL-10 increased significantly on the 4th in all groups. Only the supplemented groups maintained high levels of IL-10 on the 7th day after EE. In summary, the results suggest that treatment with NAC represents an important factor in the defense against muscle soreness and presents different effects on oxidative damage and pro and anti-inflammatory cytokine.

Introduction

High intensity eccentric exercise increases the production of Reactive Oxygen Species (ROS) altering the antioxidant defense system (1-2). This can lead to oxidative stress and contribute to a decrease in performance, fatigue, muscle damage and muscle soreness (MS) (3,4,5).

During the performance of eccentric physical exercise, neutrophils and macrophages migrate to and infiltrate the lesioned muscular tissue, activating pro-inflammatory cytokines and producing additional ROS (1). However, ROS is also produced in other ways such as activation of xanthine oxidase, production of NAPH oxidase, ischemia-reperfusion, increase of phagocyte activity, protein breakdown and excessive accumulation of calcium (2).

Several studies have suggested antioxidants supplementation to decrease ROS production during physical exercise, as well as to improve the body's defense systems against the attack of free radicals (4,5,6). Therefore, while many studies have pointed to antioxidant supplementation as essential in fighting oxidative damage induced by eccentric physical exercise, it remains unclear which biological mechanisms are involved in this process, and which supplementation model can improve the response of oxidative defense (7).

N-acetylcysteine (NAC) is a donor of antioxidant thiols used in clinical practice to facilitate glutathione biosynthesis, improving the enzymatic defense system, as well as decreasing the harmful effects of ROS (8). NAC acts as scavenger of ROS including hypochlorous acid, hydroxyl radical and hydrogen peroxide (9,10). However, in high doses, in case of homeostasis breakdown or after reacting with transition metals, it can cause a cytotoxic effect and produce additional ROS such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical (11-12).

Thus, it is possible that antioxidants supplementation can reduce the oxidative responses and muscle soreness induced by eccentric exercise. The objective of the study was to verify the effect of NAC supplementation on the development of muscle soreness, parameters of oxidative damages and inflammatory response after high-intensity eccentric exercise.

Materials and Methods

Subjects: 29 male volunteers - students of UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina state, Brazil) with a mean age of 21.3 ± 4 yr, weight of 74.5 ± 7.7 kg and height of 177.2 ± 6.9 cm - were selected. They were nonsmokers, did not take NAC or related supplements, had not participated in resistance training or any other form of structured exercise for at least 6 months, who did not have a history of muscular lesion or were not carriers of any disease that might compromise the results or aggravated by physical exercise. All the subjects were informed about the purpose of the study and the associated risks, and all of them gave written informed consent. All the procedures were approved by the local ethics committee.

Supplementation: Subjects were randomly selected in a single-blind manner to receive either a placebo (capsule containing starch or NAC supplementation (capsule containing 10mg/kg body mass), without previous control of the diet. Volunteers received one capsule per day for a total of 14 days before the eccentric protocol and for 7 days post-exercise, and were randomly allocated in three groups: placebo (21 days of placebo; n=8), NAC (21 days of NAC; n=9); NAC plus placebo (14 days of

NAC+ 7 days of placebo; n=8). During the study, four subjects withdrew from the groups due to personal reasons. Subjects were instructed to maintain their normal diet throughout the duration of the study. Fourteen days after starting supplementation, the subjects performed eccentric exercise.

Eccentric Exercise protocol: Eccentric exercise (EE) of short duration and high intensity was performed with elbow flexion and extension on the Scott bench at an intensity of 80% of maximum repetition - 1RM (13). The concentric phase of the exercise was performed with manual assistance from the instructor. The eccentric phase was performed for duration of 6 to 8 seconds. Three sets of the exercises were performed, with 2 minute intervals, until exhaustion.

Blood Collection: Blood samples were collected prior to the exercise and on the 2nd, 4th and 7th day after the exercise. Blood (10 mL) was obtained from the cubital vein of the right arm and collected in vacutainer tubes without additives. It was then processed and the serum separated, aliquoted and immediately stored in a freezer at -80°C for later analysis.

Muscle Soreness (MS): MS levels were measured by a visual analogue scale. Subjects marked their subjective rating of MS between 0 (without pain) and 10 (extreme pain) (14).

Lactate Dehydrogenase (LDH): LDH enzyme activity was used as a marker of cellular damage. A specific kit, supplied by Labtest Diagnóstica SA, was used. The dosage was made from an enzymatic system with final point reaction in serum samples, following the technical instructions that accompanied the kit.

Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS): as indicator of lipid peroxidation, the formation of substances that react to the heating of thiobarbituric acid

(malondialdehyde – MDA) measured spectrophotometrically (532nm) and expressed as malondialdehyde equivalents (15).

Protein Carbonylation: oxidative damage in proteins was measured by determining the carbonyl grouping based on the reaction with dinitrophenylhydrazine. Carbonyl content was determined spectrophotometrically (370nm) using a coefficient of 22.000 M (16).

Interleukins: Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and IL-10 were determined by ELISA with commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Protein Determination: The quantity of proteins in TBARS and carbonyl assays was measured using the technique of Lowry et al (17).

Statistical Treatment: Data was expressed in mean and standard error of the mean (SEM), and statistically analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the SNK post hoc test. The level of significance established for the test was $p < 0.05$. SAEG version 9.0 was used.

Results

Muscle Soreness (MS): The results showed a significant increase in MS in all the groups in the second day after EE and a significant decrease in those values in all the groups from the fourth day after EE onwards (Table 1).

Lactate dehydrogenase (LDH): LDH activity was defined as the indicator of cellular membrane integrity. The results show a significant increase in LDH activity on the 4th and 7th days after EE only in the placebo group, while in the supplemented groups this increase occurred on the 2nd day, decreasing in the following days (Table 1).

Lipoperoxidation: Oxidative damage to membrane lipids was evaluated by the formation of MDA, a sub-product of lipoperoxidation. The results show (Figure 1) a significant increase in MDA levels on the 4th and 7th days after the eccentric exercise, in all groups.

Protein Carbonylation (PC): To verify the oxidative damage in proteins, we evaluated the carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine. Similarly to lipoperoxidation, the results (figure 2) also show a significant increase in PC on the 4th and 7th days after eccentric exercise in all groups, and NAC supplementation did not alter these results.

Interleukins: To quantify the inflammatory response, we measured the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 10 (IL-10). All the groups significantly increased the tnf- α on the 2nd day after eccentric exercise. The supplemented groups maintained high levels of tnf- α until the 4th day after ee when compared to pre-ee and the placebo group, with levels decreasing in the following days (figure 3a). Serum concentration of IL-10 increased significantly on the 4th day in all the groups. Only the supplemented groups maintained high levels of IL-10 on the 7th day after ee (figure 3b).

Discussion

The purpose of the study was to verify the effect of NAC supplementation on the development of muscle soreness, parameters of oxidative damages and inflammatory response after high-intensity eccentric exercise.

Initially, we verified the markers of muscular lesion. Several indicators have been used to determine the level of the muscular lesion induced by eccentric exercise (4,7,18). We used MS and LDH activity as markers of cellular damage.

Exercise may damage fibers in the active muscles, especially when exercise is relatively intense, of long duration, and includes eccentric contractions. Clinically, this presents itself as muscular discomfort and pain in the stressed muscles, reaching a peak 24 to 48 hours after exercise (19,20). Our results show a significant increase in MS on the second day after the EE in all the groups and that these values decrease in the following days irrespective of NAC supplementation (table 1). Our results are in accordance with other studies that do not suggest a protecting effect of antioxidants against muscle soreness (1, 7,21).

We also used the LDH enzyme activity as marker of cellular damage. Results showed that LDH activity increased on the 4th and 7th days after EE only in the placebo group. On the other hand, the supplemented groups had a smaller increased on the 2nd day and a decrease over the following days. The increased LDH activity may be related with the fluidity of the lipid membranes, which leads to increased permeability of the cellular membrane. However, those markers of muscular damage tend to decrease with time.

Our results are similar to the results presented in other studies (1,20,22). However, we show that NAC supplementation alters the response of LDH activity. Few studies have reported that supplementation with NAC had, in fact, attenuated LDH increases following eccentric exercise. It is possible that ROS has an important role in those processes. Specifically, ROS may play a central role in the etiology of skeletal muscle damage via oxidation of ion transport systems, leading to disruption of Ca⁺²-ion homeostasis, impaired mitochondrial respiratory control, distortions in

signal transduction pathways, and ultimately, cell dysfunction (23). Therefore, we believed that quenching of ROS by NAC could protect against muscle damage caused by eccentric exercise.

To assess the oxidative damage we measured malondialdehyde (MDA) levels (figure 2) and protein carbonilation (figure 3). Unlike what we believed, the results show significant increase in the level of lipoperoxidation and protein carbonilation on the 4th and 7th days after eccentric exercise in all supplemented groups. It is possible that those results are related with the presence of iron in the serum. The eccentric exercise increased the inflammation and the level of the free iron (1). According to Pinho et al. (8), the use of NAC alone may have limitations and present pro-oxidant effects, due to the facility with which it interacts with iron. This mechanism can lead to the formation of additional ROS and to an increase in oxidative damage.

We have also observed that NAC supplementation did not decrease protein carbonilation after eccentric exercise. These results can be related with phagocytic cells migrating to the tissue after muscular injury (2,24).

Previous studies show the role of antioxidants in eccentric exercise-induced cytokine production (25,26). These studies show that proinflammatory interleukins increase progressively after eccentric exercise. The cytokine response to exercise represented a reaction to exercise-induced muscle injury and inflammation (27).

TNF- α are the early-response, proinflammatory cytokines that are most likely synthesized by resident macrophages and local post-capillary vascular endothelium, with synthesis occurring rapidly after the onset of injury or infection (28). Changes in serum TNF- α have been reported after a bout of strenuous exercise (20-30). Here, we demonstrate that TNF- α serum concentrations (figure 3a) increase significantly

on the 2nd day after eccentric exercise, decreasing in the following days irrespective of NAC supplementation.

The increase in TNF- α could be related to muscle damage; LDH levels observed were markedly elevated after eccentric exercise (figure 1). TNF- α may accumulate in the cell or be released, suggesting a dissociation between intracellular TNF- α production and release (29). It is possible that the decreases on the 4th and 7th day after eccentric exercise were due to rapid clearance or an undetectable accumulation at the site of injury (28).

We also observed that serum concentration of il-10 increases significantly on the 4th day after eccentric exercise in all groups and on the 7th day only in the groups supplemented with nac (figure 3b).

IL-10 is a primary anti-inflammatory cytokine that acts by inhibiting proinflammatory cytokine production by activated monocytes and macrophages. Studies have shown significant increase immediately after intense exercise (29,30,31) although it is not clear why elevations were observed at different times. However, in the present study, this time period would fit well with the period of resolution of an acute inflammatory response (29), and may, in part, be responsible for the reduction in pro-inflammatory TNF- α that was significantly reduced during those periods.

It is possible that the mechanism by which NAC stimulates the production of anti-inflammatory cytokines can be related with the inhibition of ROS production with a concomitant decrease in NF- κ B activation and expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (32). In models of pre-existing inflammation, it has been shown that NAC can also modulate phagocytic activity by suppressing PMN oxidative burst, and by potentiating host defense (33,34).

In conclusion, the results presented in this study suggest that treatment with NAC don't alter oxidative damage caused by eccentric exercise (lipoperoxidation and protein carbonylation). It seems that NAC has some anti-inflammatory effects and acts on the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. These results indicate that NAC presents different effects on oxidative damage and pro-inflammatory cytokines. Thus, we suggest further studies in order to clarify the effects of NAC supplementation on oxidative damage after eccentric physical exercise.

References

- 1- Childs, A.C., T. Jacobs, T. Kaminski, B. Halliwell, and C. Leeuwenburgh. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free. Radic. Biol. Med.* 31: 745-753, 2001.
- 2- Goldfarb, A.H., R.J. Bloomer, and M.J Mckenzie. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 37: 234-239, 2005.
- 3- McBride, J.M., W.J. Kraemer, T.M. Triplett, and W. Sebastianelli. Effect of resistance exercise on free radical production. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 30: 67-72, 1998.
- 4- Avery, N.G., J.L. Kaiser, M.L. Sharman, T.P. Scheett, D.M. Barnes, A.L. Gomez, W.J. Kraemer, and J.S. Volek . Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. *J. Strength. Cond. Res.* 17:801-809, 2003.

- 5- JL, L.L. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am. J. Sports. Med.* 24:20-24, 1996.
- 6- Bloomer, R.J., A.H. Goldfarb, M.J. McKenize, T. You, and L. Nguyen. Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 14:377-388, 2004.
- 7- Beaton, L.J., D.A. Allan, M.A. Tarnopolsky, P.M. Tiidus, and S.M. Phillips. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 34:798-805, 2002.
- 8- Pinho R.A., P.C. Silveira, L.A. Silva, E.L. Streck, F. Dal-Pizzol, J.C.F. Moreira. N-acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res.* 99:355-360, 2005.
- 9- Aruoma, O.I., B. Halliwell, B.M. Hoey, and J. Butler. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 6:593-597, 1989.
- 10- Medved, I.M.J., A.R. Brown, K.T. Bjorksten, A.C. Murphy, S. Petersen, X. Sostaric, and J.M. Mckenna. N- acetylcysteine enhances muscle and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J. Appl. Physiol.* 97:1477-1485, 2004.
- 11- Neal, R., K. Cooper, H. Gurer, and N. Ercal. Effects of N-acetylcysteine and 2,3-dimercaptosuccinic acid on lead induced oxidative stress in rat lenses (periódico) 130:167-174, 1998.
- 12- Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine.* 3.ed. New York: Clarendon Press; Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.
- 13- Bompa, T. *Periodização no Treinamento Esportivo: Planejamento do Programa.* São Paulo: Manole, 2001.

- 14- Reville, S.I, J.O. Robinson, M. Rosen, and M.I. Hogg. The reliability of a linear analogue for evaluating pain. *Anaesthesia* 31:1191-1198, 1976.
- 15- Draper, H.H., and M. Hadley. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 186:421-431, 1990.
- 16- Levine, R.L., D. Garland, C.N Oliver, A. Amici, A.G Lenz, B.W. Ahn, S. Shajtiel, and Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 189:464-478, 1990.
- 17- Lowry, O.H., N.G. Rosebough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 18- Lee, J.A.H., H.M, Goldfarb, S. Rescino, S. Hegde, S. Patrick , and K. Apperson. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc.* 34:443-448, 2002.
- 19- Armstrong, R.B., G.L. Warren, and J.A. Warren. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med.* 12:184-207, 1991.
- 20- Paschalis, V., G. Giakas, V. Baltzopoulos, A.Z. Jamurtas, V. Theoharis, C. Kotzamanidis, and Y. Koutedakis. The effects of muscle damage following eccentric exercise on gait biomechanics. *Gait Posture.* 19:1-7, 2006.
- 21- Shafat, A., P. Butter, R.L, Jensen, and A.E Donnelly. Effects of dietary supplementation with vitamins C and E on muscle function during and after eccentric contractions in human. *Eur J Appl Physiol.* 93:196-202, 2004.
- 22- Jamurtas A.Z., V. Theocharis, T. Tofas, A.Tsiokanos, C. Yfanti, V. Pachalis, Y. Koutedakis, and K. Nosaka. Comparison between leg and arm eccentric exercises of the same relative intensity on indices of muscle damage. *Eur. J. Appl Physiol.* 95:179-185, 2005.

- 23- Kourie, J.I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol.* 275:12 -24, 1998.
- 24- Stupka, N.S., K. Lowther, J.M Chorneyko, C, Bourgeois, C. Hogben, and M.A. Tarnopolsky. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J. Appl. Physiol.* 89:2325-2332, 2000.
- 25-Petersen, E.W., K. Ostrowski, T. Ibfelt, M. Richelle, E. Offord, K.J. Halkjaer, and B.T Pederson. Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol.* 280:1570-1575, 2001.
- 26- Toft, A.D., L.B. Jensen, H. Bruunsgaard, T. Ibfelt, J.K. Halkjaer, M. Febbraio, and B.K. Pedersen. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283:289-295, 2002.
- 27-Vassilakopoulos, T., M.H. Karatza, P. Katsaounou, A. Kollintza, S. Zakyntinos, and C. Roussos. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol.* 94:1025-1032, 2003.
- 28- Cavallion, J.M. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother.* 48:445-453, 1994.
- 29- Smith, L.L., A. Anwar, M. Fragen, C. Rananto, R. Johnson, and D. Holbert. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.*; 82:61-67, 2000.
- 30- Ostrowski, K., T. Rohde, S. Asp, P. Schjerling, and B.K. Pedersen. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 515:287-91, 1999.
- 31- Macintyre, D.I., S. Sorichter, J. Mair, A. Berg, and D.C. McKenzie. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol.* 84: 180-186, 2001.

- 32- Blackwell, T.S., T.R. Blackwell, E.P. Holden, B.W. Christman, and J.W. Christman. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol.* 15:1630-1637, 1996.
- 33- Villagrasa, V., J. Cortijo, M. Marti-Cabrera, J.L. Ortiz, L. Berto, A. Esteras, L. Bruseghini, and E.J. Morcillo. Inhibitory effects of N-acetylcysteine on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Pharm Pharmacol.* ;49:525-529, 1997.
- 34- Stolarek, R., P. Bialasiewicz, and D. Nowak. N-acetylcysteine effect on the luminol-dependent chemiluminescence pattern of reactive oxygen species generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Pulm Pharmacol Ther.* 15: 385-392, 2002.
- 37- Villa, P., A. Saccani, A. Sica, and P. Ghezzi. Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J Infect Dis.* 15:1115-1120, 2002.

Legends

Groups	Soreness Muscle				LDH (U/dl serum)			
	Pre-EE	2 day	4 day	7 day	Pré-EE	2 day	4 day	7 day
placebo	0	5.43±0.8 ^a	1.84±0.7 ^b	0.87±0.3 ^b	241±9	248±17	1459±79 ^a	1188±25 ^a
14 days NAC	0	5.83±1.0 ^a	1.67±0.8 ^b	0.00 ^b	155±15	631±37 ^{ac}	245±11 ^c	239±9 ^c
21 days NAC	0	3.86±0.7 ^a	1.29±0.5 ^b	0.00 ^b	239±4	918±69 ^{ac}	202±12 ^c	198±5 ^{ac}

Table 1: Soreness Muscle (MS) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activity of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. Subjects marked their subjective rating of MS on a 0= without pain; 10=extreme pain. The values are presented as Mean±SD and the significant difference used in relation to pre-EE (^a), placebo (^c) and in relation to 2 day (^b) was from p<0.05.

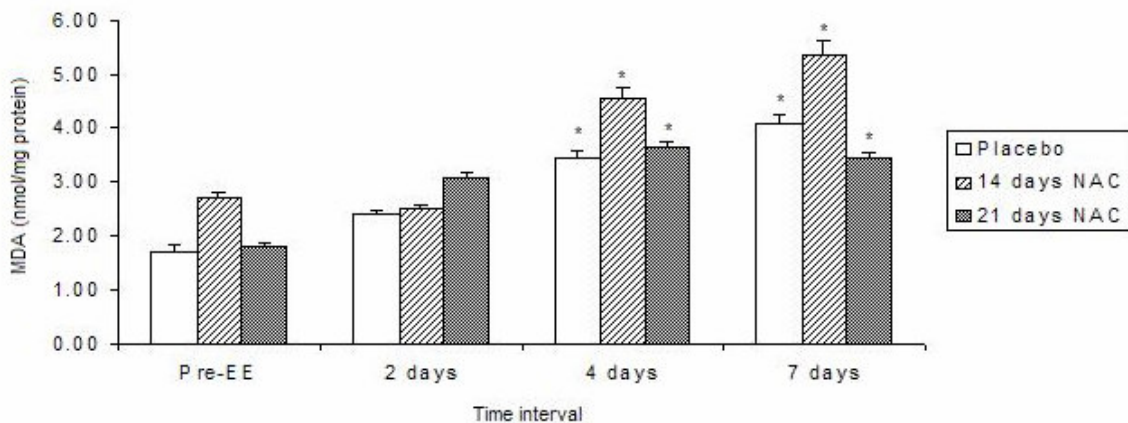


Figure 1: Lipoperoxidation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean±SEM and the results expressed in nmol of MDA/mg of proteins. The significant difference used in relation to pre-EE (^{*}) and in relation to placebo ([#]) was from p<0.05.

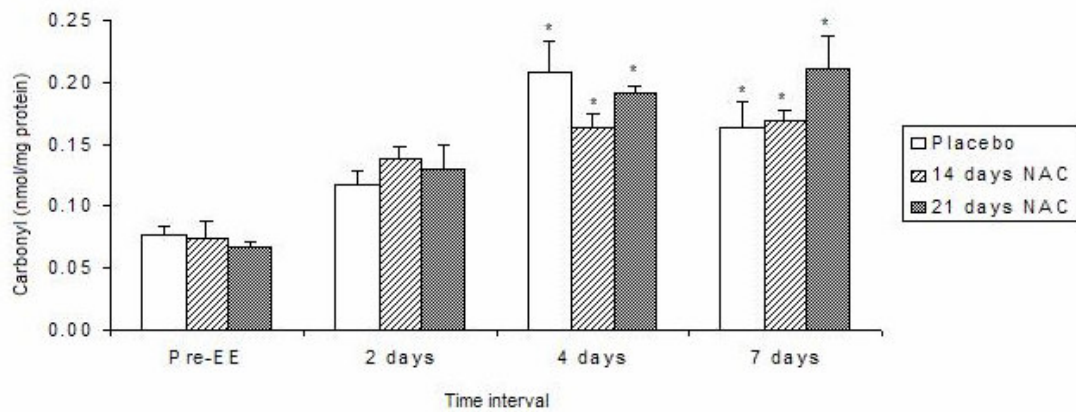


Figure 2: Carbonylation levels in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean±SEM and the results expressed in nmol/mg of proteins. The significant difference used within in relation to pre-EE (*) and in relation to placebo (#) was from p<0.05.

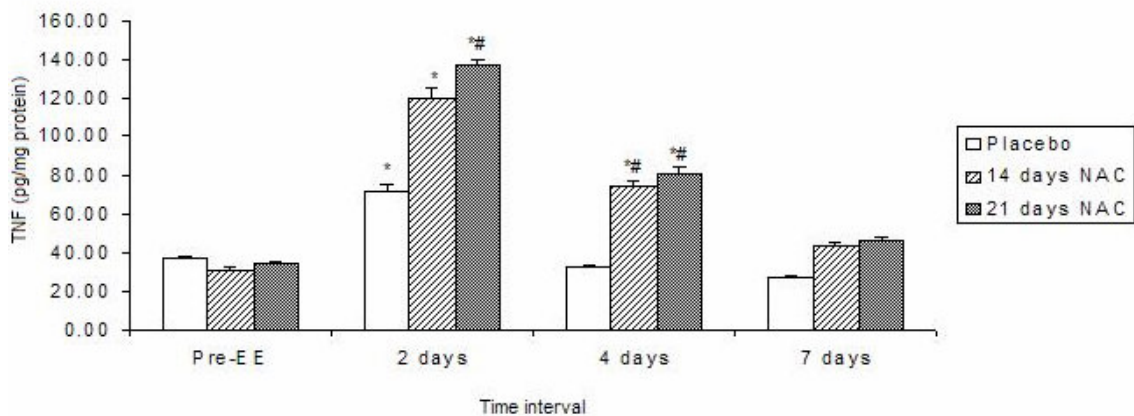


Figure 3a: Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean±SEM and the results expressed in pg/ml of serum. The significant difference used within in relation to pre-EE (*) and in relation to placebo (#) was from p<0.05.

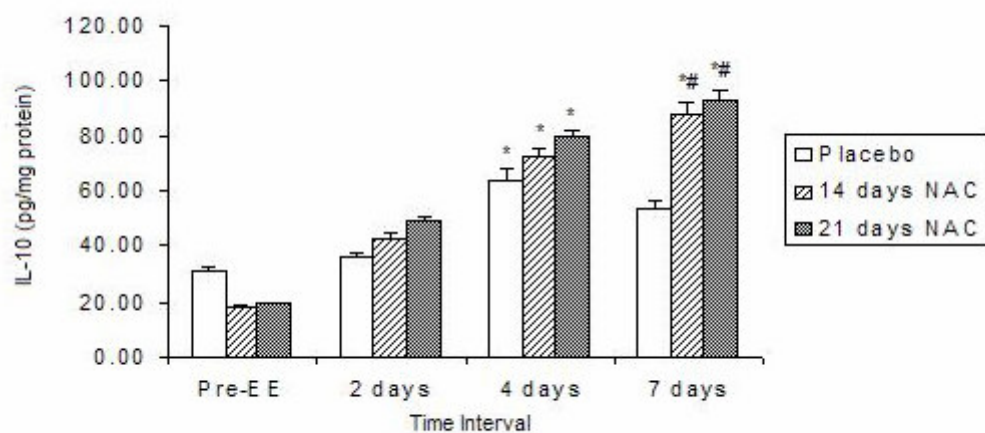


Figure 3b: Interleukin 10 (IL-10): in the serum of young university students after muscular lesion induced by eccentric exercise. The values are presented as Mean \pm SEM and the results expressed in pg/ml of serum. The significant difference used within in relation to pre-EE (*) and in relation to placebo (#) was from $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO GERAL

Os objetivos desta dissertação foram pautados na possível relação entre a suplementação de antioxidantes e as alterações nos parâmetros de dano oxidativo, resposta inflamatória e dores musculares após a lesão muscular aguda induzida por exercício excêntrico em soro humano. Para tanto, partimos das seguintes evidências científicas previamente descritas na literatura:

a) O exercício excêntrico altera os marcadores de dano oxidativo, a resposta inflamatória e provoca o desenvolvimento de dores musculares tardias em indivíduos treinados e destreinados (Smith et al., 2000; Walsh et al., 2001; MacIntyre et al., 2001; Lee et al., 2002; Nosaka e Newton, 2002; Lee e Clarkson 2003; Athanasios et al., 2005;). Segundo Childs et al. (2001) durante o exercício excêntrico existe um aumento na respiração mitocondrial seguido pelo aumento na produção das ERO pela redução incompleta do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons. Respondendo ao dano induzido pelo exercício excêntrico neutrófilos e macrófagos migram e infiltram no tecido muscular lesado, ativando citocinas pró-inflamatórias e produzindo ERO adicionais (Stupka et al., 2000; McIntyre et al., 2001).

Especificadamente sobre a produção de ERO durante e após o exercício excêntrico, várias rotas metabólicas têm sido sugeridas como a ativação da Xantina Oxidase, produção de NADPH oxidase, isquemia-reperfusão, rompimento nas proteínas que contém ferro e o desequilíbrio nas concentrações de Ca^{++} , resultando da alta performance do exercício (Goldfarb et al., 2005).

b) A suplementação de antioxidantes pode melhorar os parâmetros de dano oxidativo, resposta inflamatória e a dores musculares tardias induzidas pelos

exercícios excêntrico (EE) (Sacheck et al., 2003; Phillips et al., 2003; Goldfarb et al., 2005 Bryer and Goldfarb, 2006). Entretanto outros trabalhos demonstram resultados contraditórios (Warren et al., 1992; Child et al., 2001; Beaton et al., 2002; Thompson et al., 2004). Os antioxidantes exógenos podem agir de três maneiras: Primeiro, doando elétrons aos radicais desemparelhados; segundo, aumentando a atividade antioxidante de enzimas; terceiro, regenerando outras vitaminas que ajudam no processo de defesa contra os RL. A vitamina E atua como um potente “scavenger” de radicais peróxil e recentes pesquisas tem demonstrado sua utilização depois do exercício intenso (Sacheck et al, 2003). A N-acetilcisteína (NAC) é um tiol que atua como antioxidante por ser precursor da cisteína intracelular, aumentando a síntese de glutathiona (Sprong et al., 1998) e está relacionada diretamente no processo de scavenger de ácido hipocloroso, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (Aruoma et al., 1989).

c) A associação entre exercício excêntrico marcadores oxidativos, resposta inflamatória e desenvolvimento de dores musculares tardias tem sido alvo de muitos estudos (Smith et al., 2000; Childs et al., 2001; Beaton et al., 2002; Sacheck et al., 2003; Bloomer et al., 2004; Goldfarb et al., 2005 Bryer e Goldfarb, 2006). Esta crescente preocupação dos pesquisadores se deve a dois fatos: Primeiro porque este tipo de contração parece produzir danos nos sistemas biológicos mais severos e prolongados do que em outros modelos de exercício; segundo porque a suplementação com antioxidantes parece interferir no processo de recuperação após a lesão diminuindo os efeitos deletérios induzidos pelos exercícios excêntricos. Embora esses achados tenham sido evidenciados nos estudos, os resultados se contradizem quanto ao tipo, duração e intensidade do exercício e tipo e dosagem do antioxidante utilizado.

Com base nessas evidências, hipotetizamos que a suplementação de vitamina E e N-acetilcisteína apresentam efeitos protetores contra a ação das ERO induzida pelo exercício excêntrico.

Desta forma, para avaliar o efeito da suplementação destes antioxidantes sobre parâmetros de dano oxidativo, resposta inflamatória e nível de lesão muscular, foi elaborado um modelo de exercício excêntrico de alta intensidade. Os resultados desse estudo estão apresentados no capítulo II e III dessa dissertação.

No segundo capítulo "*Changes in inflammatory and oxidative markers in human serum induced by intense eccentric exercise after vitamin e supplementation*" nós demonstramos que a suplementação de vitamina E foi eficiente na proteção contra o dano oxidativo e no nível de lesão muscular induzida pelo exercício excêntrico. O mesmo não foi observado em relação às respostas inflamatórias.

Sobre a lesão muscular, vários marcadores têm sido utilizados (Beaton et al., 2001; Lee et al., 2002; Avery et al., 2003). Nós utilizamos a atividade da enzima LDH e o desenvolvimento de dores musculares tardias.

Nossos resultados demonstraram que a suplementação de vitamina E diminui o desenvolvimento das dores musculares e a atividade de LDH após o exercício excêntrico. É provável que essa resposta à vitamina E esteja diretamente relacionada aos mecanismos envolvidos na lesão muscular, que de acordo com Armstrong et al. (1991) e Balnave et al. (1993), são mediados por ERO. A ativação de macrófagos no tecido lesionado liberam prostaglandinas (PG2) que ativam os receptores locais de dor, intensificando a estimulação dolorosa (Crosier et al., 1996). O tempo para que estes eventos ocorram, explica em partes a demora entre o dano na estrutura do tecido muscular e a percepção de dor tardia.

Acredita-se que as ERO têm uma função específica nesse processo de dano muscular por oxidar íons de ferro e interromper temporariamente a homeostase do cálcio. Isso prejudica o controle da respiração mitocondrial e a comunicação de sinalizadores celulares e por fim provoca a disfunção celular (Kourie et al., 1998). Por tanto, nós acreditamos que a suplementação de vitamina E neutraliza as ERO e protege o tecido contra o dano muscular e o desenvolvimento de dores tardias.

Sobre os marcadores de danos oxidativos nós observamos que a vitamina E diminuiu os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. No processo de lipoperoxidação, isso se justifica, pois o depósito de vitamina E nas camadas das membranas celulares e a sua facilidade de doar elétrons aos peróxidos e hidroperóxidos, faz com a vitamina E tenha alta afinidade na proteção dos lipídeos de membrana contra ação dos RL (Burton et al., 1999; Penteadó, 2003; Jackson et al., 2004). Quanto a diminuição dos níveis de carbonilação de proteínas o possível mecanismo da proteção da vitamina E pode estar relacionado com o metabolismo protéico, uma vez que a degradação protéica durante o exercício e nos dias seguintes torna-se necessário para a produção de novas fibras musculares. Adicionalmente, a destruição de proteínas contendo ferro pode levar a um aumento no ferro livre o que favorece a produção de radicais livres.

Diversos estudos têm mostrado o efeito de antioxidantes na produção de citocinas inflamatórias (Cannon et al., 1990; Nieman et al., 2000; Petersen et al., 2001; Vassilakopoulos et al., 2003). A presença de citocinas representa uma resposta à lesão muscular e a inflamação induzida pelo exercício. Nossos resultados mostraram que a suplementação não alterou os marcadores inflamatórios (TNF-alfa e IL10).

Assim, sugerimos que a suplementação de vitamina E representa um fator importante apenas na defesa contra os radicais livres.

No terceiro capítulo "*N-acetylcysteine supplementation on the oxidative damage an inflammatory response after eccentric physical exercise of high intensity*" nós hipotetizamos que a suplementação de N-acetilcisteína (NAC) poderia diminuir o efeito deletério das ERO induzidas pelo EE.

A NAC é um antioxidante exógeno, usado comumente na prática clínica, que possui propriedades antioxidantes capazes de alterar o sistema enzimático (Pinho et al., 2005). Atua como doadora de tióis, precursores da síntese de glutathiona (Gohil, 1988; Holdiness, 1991). Ela pode atuar contra a formação de ERO, agindo sobre o ácido hipocloroso, radical hidroxil e peróxidos de hidrogênio (Aruoma, 1989).

Os resultados desse estudo não confirmaram nossa hipótese. Os achados demonstraram que a suplementação não alterou o dano oxidativo, resposta inflamatória e o desenvolvimento de dores musculares após a lesão.

É possível que a NAC possa apresentar limitações como antioxidante, e ainda, apresentar possíveis efeitos pró-oxidantes pela sua fácil interação com ferro. Esse processo poderia ser potencializado, pois o processo inflamatório induzido pelo exercício excêntrico aumenta a disponibilidade de metais de transição, como ferro e cobre, no tecido lesionado.

Neal et al. (1998), sugerem que os íons de ferro livre liberados na inflamação, em contato a NAC levam a formação de peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e radicais sulfidrilas como $RS^{\cdot-}$, $RSO^{\cdot-}$. Têm sido demonstrado que a produção de $O^{\cdot-}$ derivada de leucócitos polimorfonucleares potencializam a liberação catalítica de ferro, potencializando o efeito pró-oxidante da NAC (Biemond et al., 1984; Bolann e Ulvik, 1990). Segundo Childs et al., (2001) o ferro é um metal de transição que

tende a seqüestrar os sítios ativos de antioxidantes hidrossolúveis desestabilizando-os quimicamente.

Com base nos resultados apresentados nos dois capítulos podemos concluir que a vitamina E e a NAC apresentam respostas diferenciadas nos marcadores de dano oxidativo, respostas inflamatórias e dores musculares. Portanto, a suplementação de vitamina E apresenta um potencial antioxidante importante nas respostas deletérias induzidas pelo exercício físico excêntrico.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Atentos aos objetivos iniciais desse estudo, chegamos as seguintes conclusões:

- 1) A suplementação de vitamina E representa um fator importante na defesa contra os danos oxidativos induzidos pelo exercício excêntrico.
- 2) A suplementação de vitamina E atua de diferentes formas sobre os processos de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas.
- 3) O tratamento com NAC não altera os danos oxidativos induzidos pelo exercício excêntrico.
- 4) A NAC atua sobre os níveis de IL-10 e TNF.
- 5) A suplementação de vitamina E e NAC apresentam respostas diferenciadas nos marcadores de dano oxidativo, respostas inflamatórias e dores musculares.

PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesse estudo sugerem que o uso vitamina E atua de forma eficiente principalmente na diminuição dos danos oxidativos e nos níveis de lesão muscular induzidos pelo exercício físico excêntrico. Contudo, o mesmo não foi observado com a suplementação de NAC. Assim, pretende-se ainda:

- 1) Realizar novos estudos com grupos amostrais maiores;
- 2) Analisar outras variáveis relacionadas ao estresse oxidativo, como atividade de enzimas antioxidantes, e outras relacionadas ao processo anti e pró-inflamatório, como IL-1b, IL-6 e receptores de citocinas.
- 3) Realizar estudos com controle da dieta.
- 4) Correlacionar suplementação de antioxidantes, parâmetros de estresse oxidativo, respostas inflamatórias e performance muscular.

Referências:

ALESSIO, H.M.; HAGERMAN A.E.; FULKERSON B.K. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, v. 32, p.1576-81, 1999.

APPEL HJ, SOARES JMC, AND DUARTE JAR. Exercise muscle damage and fatigue. *Sports Medicine.* 13:108-115, 1992.

ARMSTRONG, R.B., G.L. WARREN, AND J.A. WARREN. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med.* 12:184-207, 1991.

ARUOMA, O.L., B. HALLIWELL, B.M. HOEY, AND J. BUTLER. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 6:593-597, 1989.

ASTRAND PO, RODAHL K. *Textbook of work physiology: physiological basis of exercise.*New York: McGraw – Hill Book; 1986.

AVERY, N.G., J.L. KAISER, M.J SHARMAN, T.P. SCHEETT, D.M. BARNES, A.L. GOMEZ, W.J. KRAEMER, AND J.S VOLEK. Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. *J Strength Cond Res;* 17:801-809, 2003.

BACURAU, F. R., NAVARRO. F.; UCHIDA, C. M.; ROSA, C. F. L. Hiperplasia – Hipertrofia: Fisiologia, Nutrição e Treinamento do Crescimento Muscular. São Paulo: Phorte, 2001.

BALNAVE, C.D., AND M.W. THOMPSON. Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol.* 75:1545-1551, 1993.

BANERJEE, A.K., A. MANDAL, D. CHANDA, AND S. CHAKRABORTI. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cel Bioch.* 253:307-312, 2003.

BEATON, L.J., D.A. ALLAN, M.A. TARNOPOLSKY, P.M. TIIDUS, AND S.M. PHILLIPS. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 34:798-805, 2002.

BIEMOND P, VAN EIJK HG, SWAAK AJ, KOSTER JF. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest.* 73:1576-9, 1984.

BLOOMER, R.J., A.H. GOLDFARB, M.J. MCKENIZE, T. YOU, AND L. NGUYEN. Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 14:377-88, 2004.

BOLANN BJ, ULVIK RJ. On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. *Eur J Biochem.* 1990 Nov 13;193(3):899-904.

BOMPA, T. Periodização no Treinamento Esportivo: Planejamento do Programa. São Paulo: Manole; 2001.

BURTON, G. W. et al. Human plasma and tissue α - tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. Am. J. Clin. Nutr. 67:669-84, 1998

BYER SC, and GOLDFARB AH. Effect of high dose vitamin C Supplementation on muscle Soreness, damage, function, and oxidative stress to eccentric exercise. Internation Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism. 16:270-280, 2006.

CANNON JG, ORENCOLE SF, and FIELDING RA, The acute phase response in exercise: interection of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. Am J Physiol. 259:1214-1219, 1990.

CARMELI, E.; LAVIAM, G.; REZNICK, A. Z. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z, editor. Free radicals in exercise and aging. Champaign: Human Kinetics. 73-115, 2000.

CHEVION S.; MORAN D.S.; HELED Y.; SHANI Y.; REGEV G.; ABBOU B.; BERENSHTEIN E.; STADTMAN E.R.; EPSTEIN Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:5119-23, 2003.

CHILDS, A., C. JACOBS, T. KAMINSKI, B. HALLIWELL, AND C. LEEUWENBURGH. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med.* 31:745-753, 2001.

COULTATE TP. Food chemistry of its components. 3ed Cambridge: Royal Society of Chemistry. 208-244, 1996.

CROISIER JL, CAMUS G, DEBY-DUPONT G, BERTRAND F, LHERMEROUT C, CRIELAARD JM, JUCHMES-FERIR A, DEBY C, ALBERT A, LAMY M. Myocellular enzyme leakage, polymorphonuclear neutrophil activation and delayed onset muscle soreness induced by isokinetic eccentric exercise. *Arch Physiol Biochem.* 104:322-9, 1996.

EVANS, J.W. Vitamin E vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr.* 72:647-652, 2000.

FAULKNER, J. A.; BROOKS, S. V.; e OPITECK, J. A.; Injury to skeletal muscle fibers during contractions: conditions of occurrence and prevention. *Physical Therapy.* 73:911-921, 1993.

FLECK STEVEN, J.; WILLIAN, J. KRAEMER. Fundamentos do Treinamento de Força Muscular. 2.ed. Rio de Janeiro: Artimed, 1999.

GOHIL K, VIGUIE C, STANLEY WC, BROOKS GA, PACKER L. Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol.* 64:115-9, 1988.

GOLDFARB, A.H., R.J. BLOOMER, AND M.J MCKENZIE. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 37:234-239, 2005.

HALLIWELL, B., AND J.M.C. GUTTERIDGE. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Clarendon Press; Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.

HEUNKS LMA, DEKNUIZEN PNR. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. *Thorax.* 55:704-716, 2000.

HOLDINESS MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet.* 20:123-34, 1991.

JACKSON, M.J., M. KHASSAF, A. VASILAKI, F. MCARDLE, AND A. MCARDLE . Vitamin E and the oxidative stress of exercise. *Ann N Y Acad Sci.* 1031:158-168, 2004.

JI LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222: 283-292, 1999.

JI, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Rad. Biol Med.*, v. 18, p. 1079 – 1086, 1995.

KÖNIG, D.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. *Österreichisches J. Für Sportmedizin.* 3:2002.

KOURIE, J.I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol.* 275:C1-24, 1998.

KOURY, C.J; DONANGELO M. C. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev.Nutr., Campinas.* 16:433-441, 2003.

LANCHA, JR. *Nutrição e Metabolismo Aplicado a Atividade Motora.* São Paulo: Atheneu, 2004.

LEE J AND CLARKSON PM.; Plasma creatine kinase activity and glutathione after
Lee, J.A.H., M.H. Goldfarb, S. Rescino, S. Hegde, S. Patrick, and K. Apperson.
Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of
muscle soreness. *Med. Sci Sports Exerc.* 34:443-448, 2002.

MACHLIN LJ. Vitamin E. In: Machlin, L. J., (ed) *Handbook of Vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects.* New York: Marcel Dekker. 99-146, 1994.

MASTALOUDIS A, MORROW JD, HOPKINS DW, DEVARAJ S, TRABER MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med.* 36:1329-41, 2004.

MATSUBARA, S.L.; FERREIRA, A.L.A.; Radicais Livres, Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass Med Brasil.* 43:61-68, 1994.

MATSUO, M.; KANEKO, T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. Free radicals in exercise and aging. Champaign: Human Kinetics, 73-115, 2000.

MCHUGH, MP, CONNOLLY DAJ, ESTON RG, AND GLEIM GW. Exercise induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. Sports Med. 27:157-170, 1999.

MCLAREN, D.S.; LOVERIDGE, N.; DUTHIE, G.; BOLTON- SMITH, D. Fat-soluble vitamins. In: GARROW, J.S & JAMES, W.P.T., (eds.) Human nutrition and dietetics. 9.ed. Singapore: Longman, p.208-238,1993.

MILES, M. P. E CLARKSON, P. M. Exercise-induced muscle pain, soreness, and cramps. Journal of Sports Medicine and Physical Fitness. 34:203-216, 1994.

NEAL, R., K. COOPER, H. GURER, AND N. ERCAL. Effects of N-acetylcysteine and 2,3-dimercaptosuccinic acid on lead induced oxidative stress in rat lenses (periódico) 130:167-174; 1998.

NIEMAN DC, PETERS EM, HENSON DA, NEVINES EI, AND THOMPSON MM. Influence of vitamin C supplementation on cytokine changes following an ultramarathon. J Interferon Cytokine Res 20: 1029- 1035, 2000.

NOSAKA K, NEWTON M. Difference in the magnitude of muscle damage between maximal and submaximal eccentric loading. J Strength Cond Res 16:202-208, 2002.

PACKER, L.; ALMADA, A. L.; ROTHFUSS, L. M.; WILSON, D. S. Modulation of tissue vitamin E levels by physical exercise. *Ann NY Acad Sci.* 570:311-21, 1989.

PENTEADO, V. C.; *Vitaminas : Aspectos nutricionais, bioquímicos , clínicos e analíticos.* São Paulo: Manole, 2003.

PETERSEN, E.W., K. OSTROWSKI, T. IBFELT, M. RICHELLE, E. OFFORD, J. HALKJAERKRISTENSEN, AND B.K. PEDERSEN. Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:1570-1575, 2001.

PHILIPS S, RABAEY K, VERSTRAETE W. Impact of iron salts on activated sludge and interaction with nitrite or nitrate. *Bioresour Technol.* 88:229-39, 2003.

PINHO, R.A., M.E. ANDRADES, M.R. OLIVEIRA, A.C. PIROLA, M.S. ZAGO, P.C.L. SILVEIRA, F.D. PIZZOL, AND J.C.F MOREIRA. Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int.* 30:848-853, 2006.

PINHO, RA. Efeito da suplementação de n-acetilcisteína e do exercício físicos sobre os marcadores de estresse oxidativo pulmonar induzido pela exposição aguda ao carvão mineral. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica-UFRGS, 2005.

POLIDORI, M. C MECOCCI, P. CHERUBINI A. SENIN, U. Physical activity and oxidative stress during aging. *Inter. J. Sports Med.*, v. 21, p. 154 – 157, 2000.

POWERS K.C. HOWELY T. E. Fisiologia do Exercício, Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho.3.ed. São Paulo: Manole, 2000.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and dna in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcome. Free Rad. Biol. Med. 27:69 – 74, 1999.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Am. Respir. Crit. Care Med. 156:341-357, 1997.

ROBERGS, R.; ROBERTS, S. O. Princípios Fundamentais de Fisiologia do Exercício para a Aptidão, Desempenho e Saúde. São Paulo: Phorte, 2002.

SACHECK, J.M., P.E. MILBURY, G.J. CANNON, R. ROUBENOFF, J.B. BLUMBERG. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. Free Radic Biol Med. 34:1575-1588, 2003.

SCHNEIDER C.D.; OLIVEIRA R.A.; Radicais livres de Oxigênio e Exercício: Mecanismos de Formação e Adaptação. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 10: 308-312, 2004.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H., ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. J. Lab .Clin. Med. 118: 7-16, 1991.

SHAFAT, A., P. BUTTER, R.L. JENSEN, AND A.E. DONNELLY. Effects of dietary supplementation with vitamins C and E on muscle function during and after eccentric contractions in human. *Eur J Appl Physiol.* 93:196-202, 2004.

SIES H, CADENAS E. Antioxidant activity of 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole, and DOPA against microsomal lipid peroxidation and its dependence on vitamin E. *Free Radic Res Commun.* 6:11-7, 1989.

SMITH CM, KELSEY KT, WIENCKE JK, LEYDEN K, LEVIN S, CRISTIANI DC. Inherited glutathione-s-transferase deficiency is a risk factor for pulmonary asbestosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3: 471-477, 1994.

SMITH, L.L. Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med. Sci. Sports Exerc.* 23:542-551, 1991.

SMITH, L.L., A. ANWAR, M. FRAGEN, C. RANANTO, R. JOHNSON, AND D, HOLBERT. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.* 82:61-67, 2000.

SPRONG RC, WINKELHUYZEN-JANSSEN AML, AARSMAN CJM, VAN OIRSCHOT JFLM, BRUGGEN T, VAN ASBECK BS. LOW-DOSE N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am.J.Respir>Crit.Care Med.* 157: 1283-1293, 1998.

STUPKA N, LOWTHER S, CHORNEYKO K, BOURGEOIS JM, HOGBEN C, TARNOPOLSY MA. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 89:2325-32, 2000.

TERBLANCHE SE, 2000. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. *Cell Biol Int.* 23: 749-753

THOMPSON D., D.M. BAILEY, J.HILL, T. HURST, J.R. POWEL, and C. WILLIAMS. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.* 92:133-138, 2004.

TREVOR C. C, and SANDY SH. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. *Med.Sci. Sports Exerc.* 33:1732-1738, 2001.

TRICOLI, A.; Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. *Rev. Bras. Ciên. e Mov. Brasília.* 9:39-44 ,2001.

URSO, M.L., AND P.M. CLARKSON. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189:41-54, 2003.

VASSILAKOPOULS, T.,M.H. KARATZA, P. KATSAUNOU, A.KOLLONTZA, S. ZAKYNTHINOS, AND C ROUSSOS. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol.* 94:1025-1032, 2003.

WARREN, G.L., R.R. JENKINS, L. PACKER, E.H. WRRR, AND R.B. Armstrong. Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. *J. Appl. Physiol.* 72:2168-2175, 1992.

WASH PL, RENSLO AR, REBEK JR J. Isolation of an Acid/Base Complex in Solution Puts the Brakes on Nitrogen Inversion We are grateful for financial support from the Skaggs Research Foundation and the National Institutes of Health. We are pleased to acknowledge advice from Professors Stephen Craig and Dmitry Rudkevich. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1221-1222, 2001.

ZHANG Z, SHEN H-M, ZHANG Q-F, ONG C-N. Critical role of GSH in silica-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in macrophages. *Am. J. Physiol.* 277: 743-748, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)