

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

EDUARDO BORGES

**CINÉTICA DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS EXERCÍCIO
AGUDO COM INTENSIDADE PROGRESSIVA EM RATOS SEDENTÁRIOS**

PIRACICABA

2007

**CINÉTICA DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS EXERCÍCIO
AGUDO COM INTENSIDADE PROGRESSIVA EM RATOS SEDENTÁRIOS**

EDUARDO BORGES

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física, na área de concentração em Performance Humana, sob orientação da Professora Dra. Rozangela Verlengia.

Orientadora Profa. Dra. ROZANGELA VERLENGIA

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais Orivaldo Borges e Marilene Navarro Borges, por me proporcionar oportunidade de concluir este curso em busca do mundo da Ciência me guiando por um caminho de Fé.

À minha esposa, Márcia, por me incentivar e colaborar nos momentos difíceis encontrados nesta busca.

Às minhas filhas, Daniele e Larissa, maravilhosas e compreensivas, que com muita humildade estão galgando os degraus do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Rozangela Verlengia, pelo exemplo de professora e pesquisadora, por todos os ensinamentos ao longo destes dois anos de convivência, e sobretudo, pelo exemplo de conduta ética, profissional e de vida.

A Profa. Dra. Claudia Cavagliéri, por me guiar na busca de orientação, quando tudo parecia perdido, e pelo conhecimento transmitido nas disciplinas ministradas durante o curso, desde a pós-graduação Lato Sensu.

A Profa. Dra. Mariza Pires de Melo, por me orientar e disponibilizar o Laboratório de Química e Biologia, no Departamento de Ciências Básicas. USP de Pirassununga.

A Mestranda e Técnica. Silvana Marina Pugine, do Laboratório de Química e Biologia, no Departamento de Ciências Básicas, do campus da USP de Pirassununga, por me orientar durante as análises laboratoriais.

A profa. Dra. Adrienne Palanch, por toda ajuda e conhecimento transmitido sempre que necessitei.

As técnicas de laboratório Patrícia Carla Paulino Lelotto e Melissa Victo, por sempre contribuírem para um ótimo andamento dos experimentos e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Silva, por sempre me auxiliar na busca por novos conhecimentos e por me oferecer oportunidades quando ainda em pré-ingresso no curso de Mestrado.

Aos Amigos Sérgio Paulo de Tarso, Luís Felipe Milano Teixeira, Wagner José da Silva, sem os quais não seria possível a conclusão desse trabalho.

As instituições: FAP- fundo de apoio a pesquisa da UNIMEP e FAPESP - Fundo de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	<i>iii</i>
AGRADECIMENTOS.....	<i>iv</i>
LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS	<i>viii</i>
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	<i>ix</i>
LISTA DE ANEXOS.....	<i>xi</i>
RESUMO.....	<i>xii</i>
ABSTRACT.....	<i>xiii</i>
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 O exercício físico	2
2.2 Tipos de fibras musculares	4
2.3 Radicais livres derivados do oxigênio	7
2.4 Produção de EAO no exercício aeróbio e anaeróbio	13
2.5 Exercício: lesão e reparo muscular	15
2.6 Defesa antioxidante	17
2.7 Glutationa (GSH)	19
2.8 Catalase (CAT)	22
2.9 Enzima superóxido dismutase (SOD)	23
2.9.1 Alterações nas enzimas frente ao exercício	24
3 – OBJETIVOS	28
4 – MATERIAL E MÉTODO	29
4.1 População e amostra	29

4.2 Delineamento Experimental	29
4.3 Acumulo de lactato no sangue e máxima fase estável	30
4.4 Padronização do protocolo de exaustão	31
4.5 Exercício agudo	31
4.6 Obtenção das amostras	32
4.7 Homogeneização das amostras	32
4.8 Determinação da atividade máxima da SOD	32
4.9 Determinação da atividade máxima da CAT	33
4.9.1 Determinação da atividade máxima da GSH-Rd	33
4.9.2 Quantificação da Proteína total	33
4.9.3 Análise estatística	33
5 – RESULTADOS	35
5.1 PROTOCOLO DE EXAUSTÃO	35
5.1.1 Determinação do acumulo do lactato e máxima fase estável	35
5.1.2 Padronização do protocolo de exaustão	36
5.2 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO MÚSCULO EDL	37
5.2.1 Glutationa redutase no músculo EDL	37
5.2.2 Superóxido dismutase no músculo EDL	38
5.2.3 Catalase no músculo EDL	39
5.3 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO MÚSCULO SÓLEO	40
5.3.1 Glutationa redutase no músculo sóleo	40
5.3.2 Superóxido dismutase no músculo sóleo	41
5.3.3 Catalase no músculo sóleo	42
5.3.4 Comparação de resultados obtidos das antioxidantes	43
6 – DISCUSSÃO	44
6.1 Protocolo de exaustão	44

6.2 Atividade das antioxidantes	47
7 – CONCLUSÃO	55
8 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO COM O ESTUDO	56
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
10 – ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Esquema 1	<u>Redução tetraeletrônica do oxigênio</u>	9
Esquema 2	<u>Reação de Fenton</u>	11
Esquema 3	<u>Reação de Haber Weiss</u>	11
Esquema 4	<u>Biogeração de EAO no evento anaeróbio</u>	15
Esquema 5	<u>Sistema glutaciona</u>	21
Esquema 6	<u>Reação de conversão do peróxido de hidrogênio por ação da GSH-Px</u>	22
Esquema 7	<u>Reação de conversão do peróxido de hidrogênio por ação da catalase</u>	23
Esquema 8	<u>Reação de dismutação do superóxido por ação da SOD</u>	24
Figura 1	<u>Relação de tempo de exercício e via metabólica ativada</u>	4
Figura 2	<u>Distribuição dos elétrons do oxigênio molecular e radical superóxido</u>	10
Figura 3	<u>Foto digital da esteira ergométrica para animais de laboratório</u>	31
Figura 4	<u>Determinação do início do acúmulo do lactato no sangue</u>	35
Figura 5	<u>Determinação de atividade da glutaciona redutase no EDL</u>	37
Figura 6	<u>Determinação da atividade da superóxido dismutase no EDL</u>	38
Figura 7	<u>Determinação da atividade da catalase no EDL</u>	39
Figura 8	<u>Determinação da atividade da glutaciona redutase no Sólido</u>	40
Figura 9	<u>Determinação da atividade da superóxido dismutase no Sólido</u>	41
Figura 10	<u>Determinação da atividade da catalase no Sólido</u>	42

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

<u>SIMBOLO</u>	<u>DESCRICAÇÃO</u>
ADP	<u>Adenosina trifosfato</u>
ATP	<u>Adenosina difosfato</u>
CAT	<u>Antioxidante catalase</u>
CH₃	<u>Radical metil</u>
CO₃²⁻	<u>Radical carbonato</u>
CuZn-SOD	<u>Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco</u>
DNA	<u>Ácido desoxirribonucleico</u>
DVL	<u>Músculo vasto lateral porção profunda</u>
EAO	<u>Espécies ativas do oxigênio</u>
EDL	<u>Músculo extensor longo dos dedos</u>
± EP	<u>Mais ou menos erro padrão</u>
GSH	<u>Molécula da glutatona</u>
GSH-Px	<u>Glutatona peroxidase</u>
GSH-Rd	<u>Glutatona redutase</u>
GSSG	<u>Molécula da glutatona oxidada</u>

G6PD	<u>Glicose 6 fosfato desidrogenase</u>
HO⁻	<u>Íon hidroxil</u>
H₂O₂	<u>Peróxido de hidrogênio</u>
Mn-SOD	<u>Enzima superóxido dismutase manganês dependente</u>
MLSS	<u>Máxima fase estável do lactato</u>
NADPH	<u>Hicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida</u>
NBT	<u>Nitro blue tetrazolium</u>
NO₂⁻	<u>Radical nitrito</u>
NO₃⁻	<u>Radical nitrato</u>
NO[•]	<u>Óxido nítrico</u>
O₂	<u>Molécula do oxigênio</u>
O₂^{•-}	<u>Radical supeóxido</u>
OH^{•-}	<u>Radical hidroxil</u>
OPLA	<u>Onset plasma lactate accumulation</u>
R^{•-}	<u>Radical alquil</u>
ROO^{•-}	<u>Radical peroxil</u>
SVL	<u>Músculo vasto lateral porção superficial</u>
SOD	<u>Superóxido dismutase</u>

LISTA DE ANEXOS**ANEXOS DESCRIÇÃO**

ANEXO 1	<u>Aprovação do comitê de ética</u>	71
ANEXO 2	<u>Padronização de protocolo de exaustão</u>	72
ANEXO 3	<u>Teste de múltiplo alcance para significância de Fisher</u>	73
ANEXO 4	<u>Congresso dos Países de Língua Portuguesa</u>	77
ANEXO 5	<u>XXII - Congresso Latinoamericano e 1 Ibero – Americano</u>	78

CINÉTICA DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS EXERCÍCIO AGUDO COM INTENSIDADE PROGRESSIVA EM RATOS SEDENTÁRIOS

RESUMO

Fisiologicamente o exercício físico aumenta o consumo de oxigênio. Associados a esse processo ocorre um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (EAO). Em resposta ao dano muscular, alguns mecanismos são desencadeados entre eles a modulação na concentração das enzimas antioxidantes frente a uma sessão aguda de exercício de resistência aeróbia. Contudo, a maioria dos trabalhos científicos tem avaliado esses mecanismos de proteção até o máximo de 48 horas após o término do exercício, e há um conflito de evidências sobre a resposta antioxidante após um turno agudo de exercício de resistência aeróbia. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a cinética de ativação das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Rd) quanto a sua atividade nos diferentes momentos (0-1-2-4-8-12-24-48-72 horas) após o término do exercício com intensidade progressiva até a exaustão. Foram utilizados ratos Wistars, com 90 dias de vida. A atividade máxima das enzimas foi determinada por espectrofotômetro, Na análise estatística a homocedasticidade foi checada pelo teste F (Levenes), e o teste ANOVA, foi considerado como significativo $P < 0,05$. Resultados: Limiar anaeróbio 26 m/min por 10° de inclinação sendo este a MLSS. O OPLA teve velocidade correspondente a 17 m/min. Padronização de exaustão: tempo de 60 min com 76,7% dos animais entraram em exaustão na velocidade de 25m/min x 10° e 23,3% em 21m/min x 10°. No músculo EDL a atividade da GSH-Rd aumentou 26,67% no grupo 72 horas, não foi significativa para a enzima SOD e diminuiu 25,54% para a enzima CAT. No músculo sóleo a atividade da GSH-Rd, não foi significativa, para a enzima SOD diminuiu em (-37,99; -28,30; -31,18; -55,72; -42,88; -30,83%) para os grupos (0; 1; 2; 4; 12; 48 horas) respectivamente e na enzima CAT diminuiu (-24,40%) para o grupo 4 horas. Concluímos que houve uma diminuição da capacidade antioxidante, em períodos de até 48 horas após o exercício e reestabelecendo-se 72 horas mais tarde. Mostrando uma necessidade de um maior período de recuperação (até 3 dias).

KINETICS OF ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT ENZYMES AFTER ACUTE EXERCISE WITH PROGRESSIVE INTENSITY IN SEDENTARY MICE

ABSTRACT

In physiology the physical exercise increases the consumption of oxygen. Associates to that process has increase in the production of active species of oxygen (EAO). in response to the muscular damage, some mechanisms are unchained among them the modulation in the concentration of the enzymes antioxidant front to a sharp session of exercise of aerobic resistance. However, most of the scientific works has been evaluating those protection mechanisms to the maximum of 48 hours after the end of the exercise, and there is a conflict of evidences on the antioxidant answer after a acute exercise of aerobic resistance. Like this, the present study had as objective evaluates the kinetics of activation of the antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Rd) as for his/her activity in the different moments (0-1-2-4-8-12-24-48-72 hours) after the end of the exercise with progressive intensity until the exhaustion. Methods: Mice were used. The maximum activity of the enzymes was determined by spectrofotometro, Statistical Analysis: The homocedasticidade was checked by the test F (Levenes), and the test ANOVA, was considered like significant $P < 0,05$. Results: Threshold anaerobic 26 m/min for 10th of inclination being this MLSS. OPLA had speed corresponding to 17 m/min. exhaustion Standardization: time of 60 min with 76,7% of the animals entered in exhaustion in the speed of 25m/min x 10o and 23,3% in 21m/min x 10o. ENZYMES: In the muscle EDL the activity of GSH-Rd increased 26,67% in the group 72 hours, it was not significant for the enzyme SOD and it decreased 25,54% to the enzyme CAT. In the muscle Sóleo the activity of GSH-Rd, was not significant, for the enzyme SOD decreased in (-37,99; -28,30; -31,18; -55,72; -42,88; -30,83%) for the groups (0; 1; 2; 4; 12; 48 hours) respectively and in the enzyme CAT decreased (-24,40%) for the group 4 hours. Conclusion: The results found by us, they show a decrease of the antioxidant capacity, in periods of until 48 hours after the exercise, and reestablished his value or they increased his activity later 72 hours. Showing a need of a larger recovery.

1. INTRODUÇÃO

Exercícios regulares e moderados exercem efeitos benéficos à saúde, incluindo redução de doença cardiovascular, osteoporose e obesidade. Diminuição no risco de morte prematura em humanos (antes dos sessenta anos de idade) tem sido observado após aumento na carga diária de exercícios. Fisiologicamente, o exercício aumenta o consumo relativo de oxigênio, particularmente no músculo esquelético e cardíaco. Associados a esse processo, há também um aumento na produção de espécies ativas do oxigênio (EAO), tais como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet-}$). Porém, se a produção de espécies ativas de oxigênio ultrapassam os mecanismos de reparo e proteção, o efeito é o estresse oxidativo, condição associada à indução de várias doenças, como câncer, arteriosclerose, diabetes, neurodegeneração e envelhecimento celular. Tal estado é primariamente adquirido por meio das alterações promovidas pelas espécies ativas do oxigênio sobre as macromoléculas, tais como: ácido desoxirribonucléico (DNA), lipídeos e proteínas. Todavia um mecanismo de defesa enzimático formado pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) podem atuar na remoção das EAO frente a uma produção fisiológica dos mesmos. Esse mecanismo parece não ser suficiente diante da produção aumentada das espécies ativas do oxigênio em situações de exercícios de resistência aeróbia intenso; e a resposta de atividade dessas enzimas antioxidantes, ao longo do tempo, após o término do exercício agudo de resistência aeróbia, ainda não está completamente esclarecida. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a cinética de ativação das enzimas antioxidantes quanto à sua atividade em diferentes momentos após o término do exercício físico de resistência aeróbia, agudo, de intensidade progressiva. A elucidação desses parâmetros abre a perspectiva de uma nova visão no treinamento de atletas em modalidades extenuantes e indivíduos não atletas engajados em treinamento de resistência em clubes e academias, auxiliando na periodização do treinamento e períodos de recuperação.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O exercício físico

Atividade física pode ser definida como a totalidade de movimentos executados no contexto do esporte, da aptidão física, da recreação, do jogo, da brincadeira; ou mesmo do exercício físico incluído nesse contexto de atividade física; ou exercício físico como uma seqüência planejada de movimentos repetidos sistematicamente com o objetivo de elevar o rendimento (BARBANTI, 2003). Portanto o gasto de energia pode ser proveniente de atividades ou exercícios físicos de diferente duração (volume), e intensidade (sobrecarga) (BARBANTI, 2004; WEINECK, 2003), exigem a ativação de sistemas energéticos específicos.

A energia presente nos alimentos não é transmitida diretamente as células para a realização de trabalho biológico. Em vez disso, “a energia dos nutrientes” liberada através da oxidação é recolhida e conduzida como uma forma acessível de energia química através do composto rico em energia adenosina trifosfato (ATP) (McARDLE, 1998). As células musculares, armazenam quantidades limitadas de ATP. Por essa razão, como o exercício muscular requer um suprimento constante de ATP, para fornecer a energia necessária à contração muscular, devem existir vias metabólicas celulares com capacidade de produção rápida de ATP.

De fato, as células musculares podem produzir ATP por qualquer uma ou pela combinação das três vias metabólicas: (1) formação de ATP pela degradação do fosfato de creatina (PC) (sistema ATP-PC), (2) formação de ATP por meio da degradação da glicose ou do glicogênio (denominada glicólise) e (3) formação oxidativa do ATP. A formação do ATP pela degradação do fosfato de creatina e da glicólise não envolve a utilização de oxigênio (O_2) e é denominada de via anaeróbica (POWERS, 2005) ou anaeróbia (BARBANTI, 2003; JUNQUEIRA, 2005), ambas significam sem a presença de O_2 . Por outro lado, a formação oxidativa de ATP, ocorre com o uso de O_2 é denominada metabolismo aeróbico ou metabolismo aeróbio (POWERS, 2005). Outro termo empregado é fosforilação oxidativa, que significa fosforilar o difosfato de adenosina (ADP) em ATP (BARBANTI, 2003; JUNQUEIRA, 2005).

Portanto, por um processo denominado hidrólise do composto de alta energia ATP, para formar ADP e fosfato inorgânico (Pi), são ativadas contrações do músculo esquelético. Essa reação é catalisada pela enzima miosina ATPase (mATPase), conforme a reação:



A transição do repouso para o exercício, como exemplo correr a 9,5 Km/h, requer que, os músculos aumentem a taxa de produção de ATP. Nessa transição para o exercício, o consumo de O₂ aumenta rapidamente e atinge um estado estável em um período de um a quatro minutos (MCARDLE, 1998) ou de dois a cinco minutos (BILLET, 2003). O fato de o consumo de O₂ não aumentar instantaneamente, até atingir um valor de estado estável sugere que as fontes anaeróbias de energia contribuem para a produção global de ATP no início do exercício (MCARDLE, 1998). De fato, existem muitas evidências que mostram que, no início do exercício, o sistema ATP-PC é a primeira via bioenergética ativa, seguida pela glicólise e, finalmente, pela produção aeróbia de energia.

No entanto após o estado estável ter sido atingido, a necessidade orgânica de ATP é satisfeita por intermédio do metabolismo aeróbio. O Principal ponto a ser enfatizado no que concerne à bioenergética da transição do repouso ao exercício é que vários sistemas energéticos estão envolvidos, ou seja, a energia necessária para o exercício não é fornecida simplesmente ativando-se uma única via bioenergética, mas por uma cooperação de diversos sistemas metabólicos que operam com uma considerável sobreposição (POWERS, 2005).

Uma visão prática da utilização dos sistemas metabólicos aeróbios, ou anaeróbios é apresentado a seguir, onde pode se observar a relação entre o tempo de realização do exercício, a via metabólica ativada e as modalidades esportivas (Figura 1).

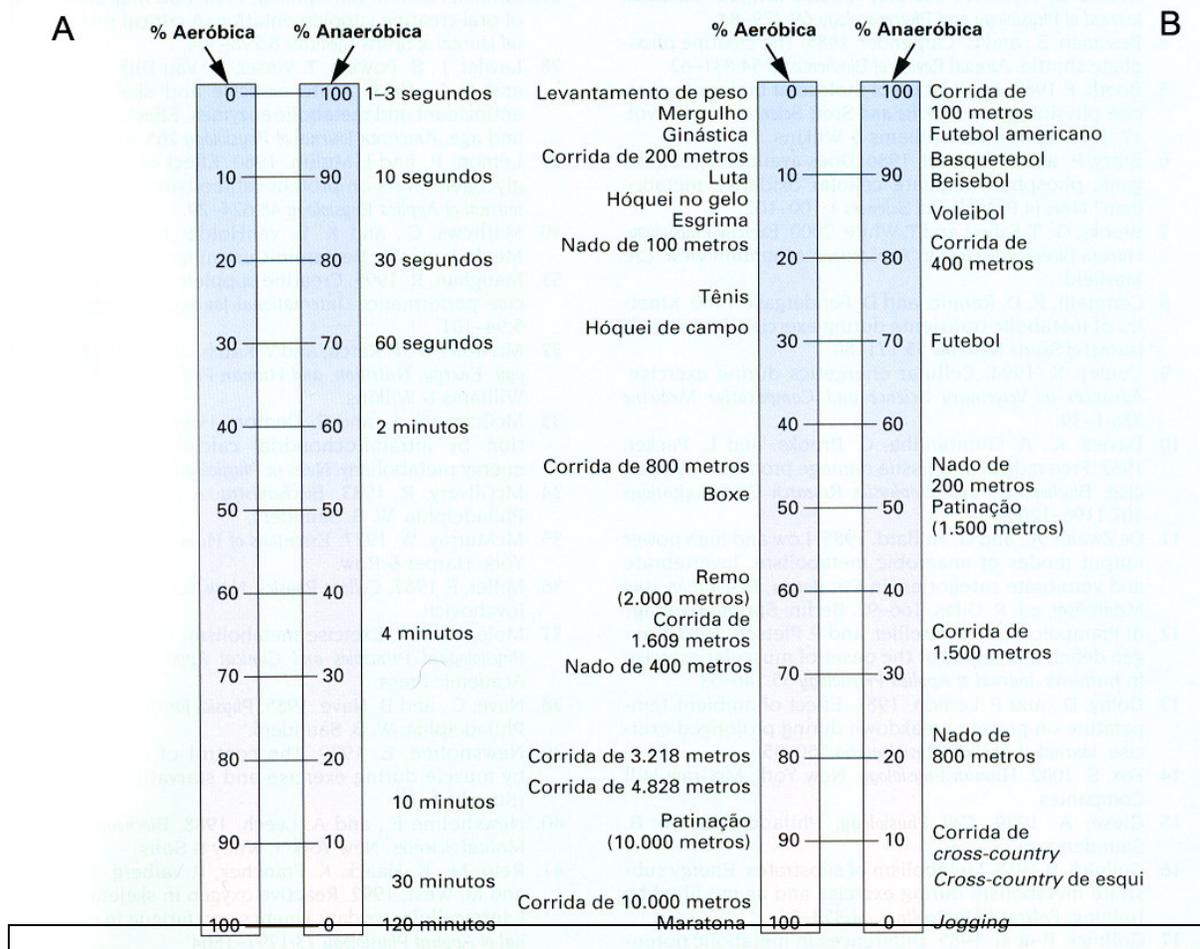


Figura 1. Relação entre o tempo de execução do exercício e as vias metabólicas ativadas em diversas modalidades esportivas. Painel A. Relação entre Percentual (%) de contribuição de cada via metabólica e o tempo de permanência na execução do exercício físico. Painel B. Relação entre o percentual de contribuição de cada via metabólica e as modalidades esportivas (POWERS, 2005).

2.2 Tipos de fibras musculares

Há um consenso sobre o fato de existirem três tipos de fibras musculares esqueléticas individuais nos seres humanos (dois subtipos de fibras rápidas – identificadas como Tipo IIx e IIa ; e uma fibra lenta – identificada como Tipo I). Observe que as fibras musculares rápidas em humanos são historicamente chamadas de fibras do Tipo IIb. Entretanto, novas evidências sugerem que as fibras rápidas em humanos deveriam ser renomeadas e chamadas de fibras Tipo IIx. Pesquisas recentes revelaram que o músculo esquelético humano provavelmente

não possui fibras do Tipo IIb e que a fibra muscular mais rápida no ser humano é do Tipo IIx. No final da década de 1980, cientistas alemães e italianos descobriram uma nova fibra muscular rápida no músculo esquelético dos roedores. Essa fibra foi denominada “fibra do Tipo IIx”, sua existência foi confirmada por muitos laboratórios. Desde a descoberta da fibra tipo IIx em roedores, foi determinado que o tipo de miosina contida na fibra muscular mais rápida nos seres humanos possuía uma estrutura similar à presente na fibra Tipo IIx dos roedores. Por conseguinte, cientistas atualmente acreditam que a fibra muscular esquelética mais rápida nos seres humanos é do Tipo IIx e não do Tipo IIb como se acreditava (POWERS, 2005).

Embora alguns grupos musculares sejam compostos predominantemente por fibras rápidas ou lentas, a maioria dos grupos musculares do corpo contém uma combinação igual de fibras lentas e rápidas. De forma geral, a maioria dos estudos tem adotado apenas a classificação clássica proposta por Brooke e Kaiser (1970), envolvendo fibras do Tipo I e II (OKANO, 2004).

A tensão específica das fibras Tipo IIx é similar à das fibras Tipo IIa, mas é maior do que a das fibras Tipo I. Além disso, a atividade da ATPase da miosina nas fibras Tipo IIx é maior do que nos outros tipos de fibras, resultando na maior $V_{m\acute{a}x}$ de todos os tipos de fibra. As fibras Tipo IIx são menos eficientes do que todos os outros tipos. Essa baixa eficiência se deve à alta atividade da ATPase, que acarreta maior consumo energético por unidade de trabalho realizado. Um segundo tipo de fibra rápida é a fibra do Tipo IIa (também denominada fibra intermediária ou fibra glicolítica oxidativa rápida). Essas fibras possuem características bioquímicas e de fadiga que se encontram entre as das fibras Tipo IIx e Tipo I. Por isso, conceitualmente, as fibras Tipo IIa podem ser vistas como uma mistura das características das fibras Tipo I e Tipo IIx. No entanto, as fibras Tipo IIa são extremamente adaptáveis. Isto é, com o treinamento de resistência, elas podem elevar sua capacidade oxidativa a níveis iguais aos das fibras Tipo I. (POWERS, 2005).

As técnicas mais utilizadas para a identificação de fibras são: método histoquímico através da análise da atividade da ATPase; imunohistoquímico com anticorpos específicos para a miosina de cadeia pesada (MHC) (PETTE, 1998).

Baseado no perfil protéico da MHC, existem fibras puras e híbridas. Assim, as fibras puras, são formadas por MHC específicas, são as dos tipos: A, D (também chamada de IIX) e IIB, e as fibras híbridas, tipos IC, IIC, IIAC, IIAD, IIDA, IIBD e IIDB, formadas pela expressão de duas ou mais isoformas da MHC (PETTE, 1998; STARON e PETTE, 1993; INGALLS, 1998).

As fibras híbridas resultam da co-expressão de pares específicos de isoformas da MHC. No músculo esquelético de mamíferos adultos foram identificadas onze isoformas, além destas, algumas só se expressam em músculos específicos como diafragma, masseter, tensor do tímpano, músculos oculares e da laringe; outras são distribuídas em vários músculos esqueléticos (PETTE, 1998).

A quantidade de fibras é variável para cada músculo, com a população de fibras puras e híbridas, juntas influenciando na dinâmica do tecido. Assim, ao avaliar músculos de ratos, Delp e Duan (1996) e Staron e Pette (1999), mostraram que o sóleo é um músculo com predomínio de fibras tipo I; e os músculos: tibial anterior, extensor longo dos dedos (EDL) e gastrocnêmio, tem predomínio de fibras tipo II, puras e híbridas. Sendo que o músculo EDL possui 38% do tipo IIB, 20% do tipo IIA e apenas 4% de fibras tipo I.

Pela técnica de coloração da mATPase, as fibras musculares são classificadas da mais lentas para a mais rápidas em: I, Ic, IIC, IIac, Ila, IIab e IIb (OKANO, 2004).

As fibras Tipo I apresentam menor atividade da mATPase, menor velocidade de degradação de ATP e são utilizadas em exercícios que exijam contração lenta, chamadas fibras tipo I ou vermelhas. São resistentes à fadiga e importantes na realização de atividades de longa duração, por exemplo, maratonas e ciclismo. Estas fibras, possuem maiores concentrações de oxigênio e mioglobina; elevado número de mitocôndrias e enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, além de baixa velocidade de condução de estímulo nervoso, devido ao reduzido número de placas mioneurais. (ROSSI e TIRAPEGUI, 1999).

As fibras tipo II apresentam maior atividade da enzima mATPase do que as do tipo I e maior velocidade de degradação de ATP, são consideradas fibras de contração rápida, brancas, e mais utilizadas durante o metabolismo anaeróbio, funcionalmente em atividades de saída rápida (explosão), parada brusca e em

exercícios intensos até exaustão, são menos resistentes à fadiga e apresentam reduzidas concentrações de mioglobina e mitocôndrias, porém apresentam numerosas placas mioneurais e alta velocidade de condução de estímulo quando comparadas às fibras tipo I. As fibras de contração rápida (tipo II) apresentam características como: alta condução do potencial de ação, rápida propagação de cálcio, alta velocidade de contração e relaxamento, grande capacidade de gerar força, pouca resistência e capilarização, baixo número de mitocôndrias e reduzida quantidade de mioglobina (CAMPOS, 2002; GREEN, 2000).

2.3 Radicais livres derivados do oxigênio

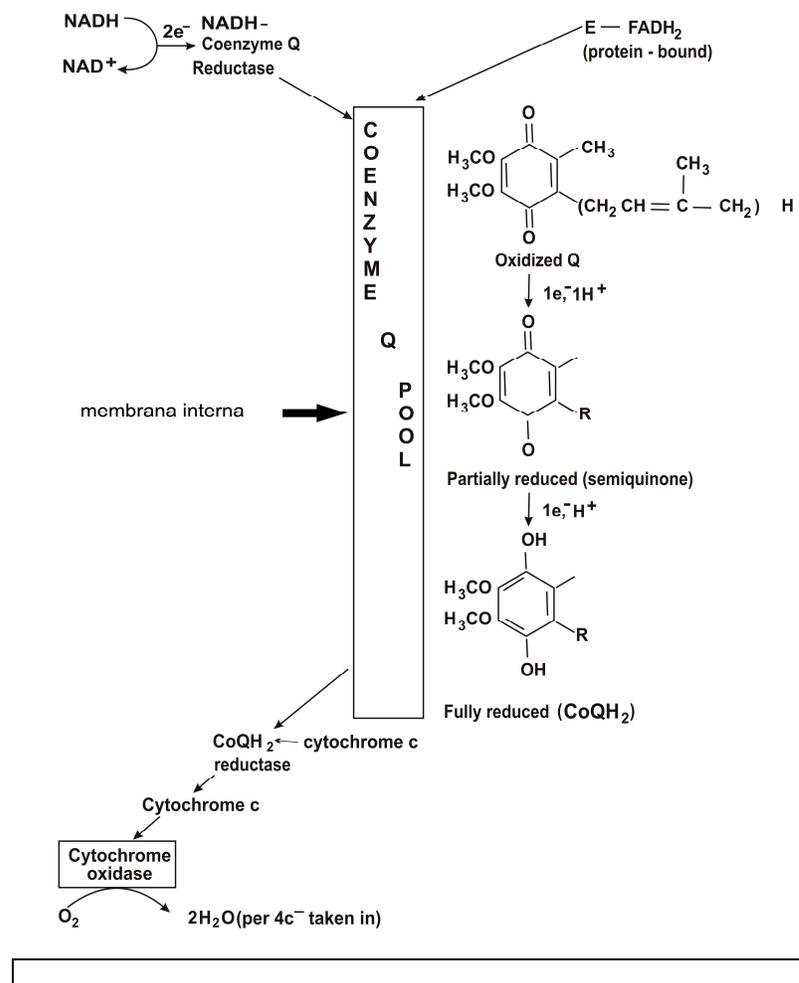
No início do século passado, investigadores descobriram que a rancidificação de gorduras estava relacionada a uma nova classe de espécies químicas, a qual chamaram de radicais livres (BABIOR, 1978). Esse importante achado marca o início da química dos radicais livres, componentes vitais na indústria moderna, utilizados nos processos de síntese de polímeros e resinas. Antigamente, acreditava-se que sua alta reatividade química e a irreversibilidade das reações em que estavam envolvidos inviabilizavam a sua existência nos seres vivos. Atualmente, sabe-se ser esta uma visão errada, devido ao crescente conhecimento acerca da participação destes elementos nos mecanismos de defesa na patogénia humana (FANTONE e WARD, 1982; KLEBANOFF, 1980).

Com exceção de algumas espécies particularmente adaptadas para condições anaeróbias, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia - esses são conhecidos como organismos aeróbios. Portanto, nas células dos organismos superiores, se obtém a maior parte da energia por via da respiração aeróbia cujo processo ocorre na mitocôndria, uma organela da célula que é ultra-especializada na respiração aeróbia. Na mitocôndria, ocorre um processo conhecido como cadeia de transporte de elétrons em sua membrana interna, onde elétrons provenientes de moléculas carreadoras NADH e FADH₂ “caminham” aos pares em cada unidade funcional da membrana, ou seja, Complexos protéicos existentes na membrana interna, garantem a fosforilação do ATP. São quatro complexos carreadores e um quinto complexo protéico que a partir

da utilização da força-motriz prótons libera o ATP a partir da enzima ATP sintase, mecanismo que envolve a ação da enzima ATP sintase e a presença de ADP e ortofosfato, conforme reação abaixo (STRYER, 1995):



A seguir uma descrição global do processo de síntese de ATP via cadeia respiratória é descrito (Figura 2). As reações se iniciam com pares de elétrons vindos do carreador NADH, que entram na cadeia de transporte no complexo I, e os elétrons provenientes do FADH_2 entram no complexo II. A coenzima Q (também denominada ubiquinona) é uma pequena molécula lipossolúvel que carrega os elétrons do complexo I (vindos do NADH) e II (vindos do FADH_2) para o Complexo III, formado por dez polipeptídeos. No complexo III os elétrons são transferidos do citocromo b para o citocromo c. O Citocromo c, uma proteína periférica de membrana ligada à face externa da membrana interna, transfere os elétrons para o complexo IV (citocromo oxidase), de onde finalmente eles são transferidos para o oxigênio molecular. O oxigênio atua no final de uma seqüência redox, recebendo elétrons em uma redução tetraeletrônica estável para formar água. A energia derivada do transporte de elétrons é acoplada a geração de um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. A energia potencial armazenada nesse gradiente é, então, coletada por um quinto complexo protéico, que acopla o fluxo retrógrado de prótons, energeticamente favorável, à síntese de ATP (COOPER, 2002).



Esquema 1. Esquema representativo de redução tetraeletrônica do oxigênio. Elétrons provenientes dos carreadores NADH e FADH₂ são transferidos através dos complexos da membrana interna. Por ação da coenzima Q, são transferidos dos complexos I e II (respectivamente), para o complexo III. Do complexo III são transferidos por ação do citocromo c para o complexo IV (citocromo oxidase), e desse para o oxigênio molecular. Adaptado, (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Essa redução ocorre com cerca de 95% do oxigênio molecular que faz parte das reações oxidativas intracelulares. Ferreira (1997) relatou que o oxigênio, em função de sua configuração eletrônica, possui na camada de valência dois orbitais ocupados cada um com apenas um elétron, somando oito elétrons na sua forma atômica, e a sua distribuição eletrônica é demonstrada na (Figura 2^A). Esse tipo de configuração o torna susceptível a sofrer redução monoelétrica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIGNORI e SIGNORI, 1995). Halliwell e Gutteridge (1989); Signori e Signori (1995) relatam que aproximadamente 5% do oxigênio no

metabolismo normal da célula formam as chamadas espécies ativas do oxigênio. Dessas EAO o radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ é o primeiro a ser evidenciado (Figura 2^B).

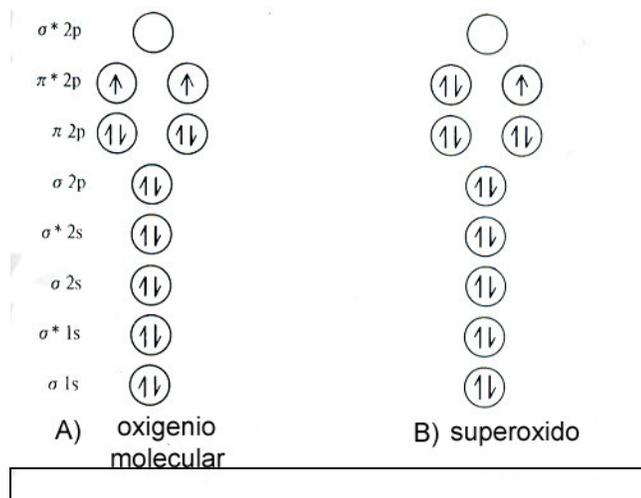


Figura 2. Representação dos elétrons em seus respectivos orbitais na molécula de oxigênio (A) e radical superóxido (B). Na figura acima, em (A), observa-se as duas últimas orbitais com apenas um elétron e spin no mesmo sentido. Isso torna a molécula de oxigênio suscetível a sofrer redução monoeletrônica e formar o radical superóxido; Em (B) o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é um ânion de 17 elétrons, tendo esse um elétron desemparelhado na camada de valência ($L 2p^5$). Tornando esse uma espécie ativa do oxigênio. Adaptado de (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

Em química, o termo, radical refere-se a vários grupos de átomos que atuam como uma unidade, e que, geralmente, não existe no estado livre, como por exemplo: radical carbonato (CO_3^{2-}), radical nitrato (NO_3^-) e radical metil (CH_3^-). (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Na definição de radical livre, este representa um átomo ou a um grupo de átomos que contém um ou mais elétrons desemparelhado na sua camada de valência, isto é, no orbital mais externo, podendo este ocupar um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIGNORI e SIGNORI, 1995) Esses radicais livres possuem uma meia vida de frações de segundo. Uma molécula pode tornar-se um radical livre tanto ganhando como perdendo elétron. Normalmente, o rompimento de uma ligação química ocorre de maneira heterogênea, na qual um dos átomos da ligação química, retém ambos os elétrons compartilhados, tornando-se um íon negativamente carregado (ou ânion), enquanto o outro átomo perde ambos os elétrons, tornando-se um íon positivamente carregado (ou cátion). É também facilmente formado quando uma ligação covalente é quebrada e um elétron

de cada par compartilhado permanece com cada átomo, processo conhecido como fissão homogênea. Esse fenômeno pode ser um mecanismo importante na peroxidação lipídica, fenômeno associado à lesão celular (CLARKSON e SAYERS, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Embora numerosas moléculas não se encaixem na definição química de radical livre, as EAO e seus subprodutos, são consideradas as principais espécies químicas relacionadas a mecanismos patogênicos. As principais espécies ativas do oxigênio são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^{\bullet}). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre (não possui um elétron solitário na camada de valência), mas é fundamental para a produção do radical hidroxil OH^{\bullet} , seja por uma das reações de Fenton (Esquema 2), ou seja por reação de Haber Weiss (Esquema 3) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIGNORI e SIGNORI, 1995).



Esquema 2. Reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio é ionizado em presença de íons ferrosos, levando a produção de radicais hidroxil (OH^{\bullet}), e íon hidroxil (HO^-). O ferro sofre oxidação, sendo liberado na forma férrica. Ferreira, 1997.



Esquema 3. Reação de Haber Weiss. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em presença de metais de transição, para produzir radicais hidroxil (OH^{\bullet}), íons hidroxil (HO^-) e oxigênio. Ferreira, 1997.

Em adição aos radicais livres já descritos, o óxido nítrico (NO^{\bullet}) por apresentar uma orbital, com elétron de valência não pareado, também é considerado um radical livre. O óxido nítrico (oficialmente chamado de monóxido de hidrogênio), é um gás colorido moderadamente solúvel em água. Associado a uma série de

funções, como regular processos intracelulares e interações celulares. A meia vida de $1 \mu\text{M}$ de NO^\bullet é em torno de 12 minutos em solução saturada com oxigênio. É sintetizado no organismo vivo, principalmente por um grupo de enzimas chamadas de óxido nítrico sintetase (NOSs), a qual converte o aminoácido arginina em NO^\bullet . O óxido nítrico vai se tornar um radical livre extremamente reativo quando reage com o oxigênio, formando dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; ROSENBERG, 2003).

Dentre os vários processos biológicos envolvidos o NO^\bullet desempenha importante papel na modulação do tônus vascular sendo denominado fator derivado do endotélio para relaxamento. Contudo sua produção aumentada, que ocorre no exercício, pode reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$ e formar peroxinitrito, uma espécie não radicalar, porém, tóxica e podendo esta reagir de forma sistêmica (REID, 2001). O óxido nítrico que é produzido no endotélio das arteríolas, promove o relaxamento da musculatura lisa destes, resultando na vasodilatação e, conseqüentemente, provoca um aumento do fluxo sanguíneo. Evidências sugerem que o óxido nítrico trabalha em conjunto com outros fatores locais de auto-regulação do fluxo sanguíneo. No momento não existem evidências definitivas, o quão o óxido nítrico é importante na auto-regulação do fluxo sanguíneo durante o exercício (POWERS, 2005).

A manifestação do estresse oxidativo sobre os lipídeos celulares é um dos fenômenos mais importantes mediado por espécies ativas do oxigênio nos processos patológicos e de lesão celular. É aceito que o desencadeamento da oxidação lipídica nas membranas celulares pode ser descrita como:

- ✓ Fase de indução tem o radical OH^\bullet o seu agente iniciador. Uma vez desencadeado o processo é possível que o radical OH^\bullet não seja mais necessário nas reações, onde os próprios subprodutos da oxidação promoveriam a autocatálise oxidativa. Nessa fase, haveria, então, a extração de um próton H^+ apenas a uma ligação dupla de uma cadeia alquílica do ácido graxo polinsaturado (RH); nesse ponto ocorre a formação do radical alquílico (R^\bullet).

- ✓ E ainda a possibilidade de uma fase de propagação do radical R^\bullet reagindo com uma molécula de O_2 , originando, assim, o radical peroxil ($\text{ROO}^{\bullet-}$), esse

radical peróxido tem a capacidade de extrair prótons de outras ligações insaturadas de ácidos graxos vizinhos, caracterizando o processo de lipoperoxidação em cadeia. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; LEFFLER, 1993; SIGNORI e SIGNORI, 1995).

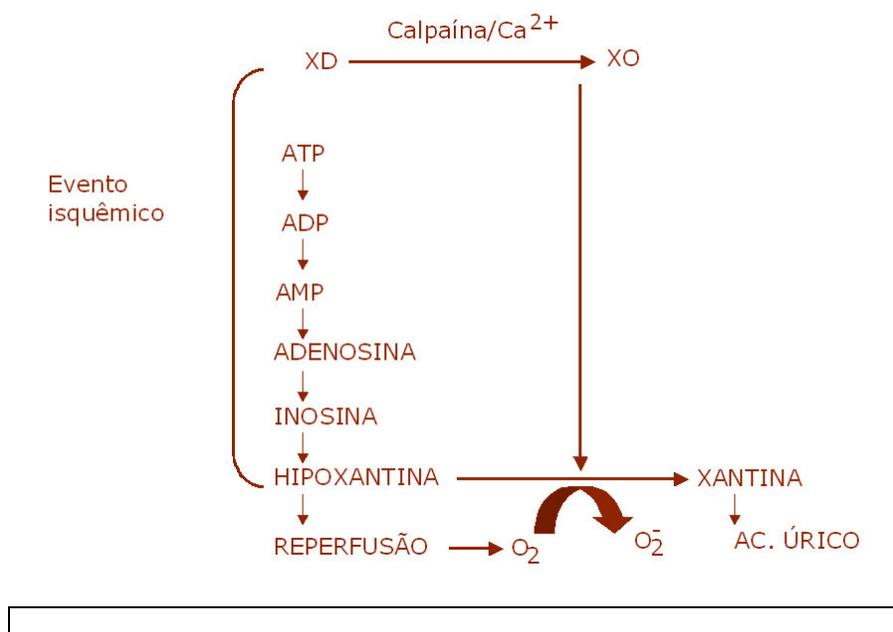
2.4 Produção de EAO no exercício aeróbio e anaeróbio

O exercício físico, tanto aeróbio (metabolismo aeróbio) quanto anaeróbio (sistema ATP-PC e glicólise), pode promover importantes adaptações morfofuncionais e metabólicas no organismo, embora sua prática esteja relacionada, também, à produção excessiva de espécies ativas do oxigênio (SOUZA, 2006).

O sistema muscular pode ser considerado um local de transformação de energia livre em energia cinética. Durante o repouso, 10 a 20% do sangue normalmente flui para o músculo esquelético. Entretanto este volume aumenta para 85 a 90% durante o exercício, seguido pelo conseqüente aumento da oferta de glicose e oxigênio (AGUILAR-SILVA, 2002). No início da década de 1980, evidenciou-se, através de ressonância magnética, a formação de radicais livres de oxigênio no músculo durante o exercício físico intenso. Isto demandou uma série de trabalhos, que tentaram verificar se os EAO poderiam ser responsáveis pelo dano muscular que se observa depois do exercício físico intenso (DAVIES et al., 1992). Considerando que cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido no processo respiratório formam EAO (BOVERIS, 1972) e que durante o exercício físico ocorre um aumento do consumo de oxigênio, podemos dizer que, quanto mais prolongado for o exercício aeróbio, maior será a formação de EAO (ABUD e DIDIO, 1999), como por exemplo maratona, ultramaratona; ou ainda o *Ironman* que consiste de 3800 metros de natação, 180 quilômetros de ciclismo e 42 quilômetros de corrida (POWERS, 2005).

Por outro lado, apesar do exercício anaeróbio ser executado independente do aporte de oxigênio, a produção excessiva de EAO tem sido verificada durante esse tipo de esforço, provavelmente por outros mecanismos. Vale destacar que nesse tipo de esforço, o estresse metabólico aumenta a degradação de adenosina trifosfato (ATP), ativando o mecanismo da xantina oxidase (XO), com produção adicional de ânions superóxido (SOUZA, 2006). O mecanismo pode ser descrito

como isquemia-reperfusão, onde as causas do processo lesivo não residem na hipóxia, mas sim na reperfusão do oxigênio, formando então espécies ativas do oxigênio. O mecanismo compreende como conseqüências da alta depleção do ATP, há uma redistribuição dos íons cálcio no citossol, originando uma alta concentração citossólica de cálcio, que promove a ativação de uma protease (calpaína), que enzimaticamente converte outra enzima do citoplasma, a xantina-desidrogenase (XD) em xantina-oxidase. A não formação de ATP na cadeia respiratória, frente uma baixa perfusão sanguínea de oxigênio, passa a haver uma seqüência de reações catabólicas do ADP, originando sucessivamente o AMP (monofosfato de adenosina) e em seqüência adenosina – inosina e hipoxantina, havendo um grande acúmulo desta última. Ao ocorrer a reoxigenação, a xantina-oxidase atuará sobre o seu substrato, a hipoxantina, para transforma-la em xantina. Nesse processo, devido à formação de uma grande concentração de XO e com oferta abrupta de oxigênio, formar-se á, em excesso, o radical superóxido e também a partir da xantina, forma-se ácido úrico (Esquema 4). (MAUGHAN, 2000; SIGNORI e SIGNORI, 1995). Exercícios como musculação, 100 metros rasos no atletismo, realizado em tempo médio de dez segundos, corrida de 1000 metros realizada em tempo aproximado de dois minutos e dezesseis segundos; todos com predomínio do metabolismo anaeróbio (vias ATP-PC e glicólise). Esses tipos de exercícios citados, podem ativar a via metabólica xantina – xantina oxidase, citada anteriormente (Esquema 4), contudo, é muito escasso o número de estudos sobre a produção de EAO, frente ao exercício anaeróbio (WEINECK, 2003; POWERS 2005; MCARDLE, 1998). A título de exemplificação em ambos tipos de exercícios: aeróbio ou anaeróbio, parece ser conflitante a resposta das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (SOUZA, 2006; ROBERTSON, 1991; SOMANI, 1995; PEREIRA, 1994).



Esquema 4. Representação esquemática da biogeração de espécies ativas do oxigênio (EAO) no evento anaeróbico. No exercício anaeróbico intenso é possível de ocorrer um evento isquêmico causando a transformação da xantina-desidrogenase (XD) em xantina-oxidase (XO). A seqüência de quebras do ATP, frente a presença da XO e na reperfusão abrupta de oxigênio, forma radical superóxido e ácido úrico. Adaptado de (SIGNORI e SIGNORI,1995; MAUGHAN, 2000).

2.5 Exercício: lesão e reparo muscular

O exercício extenuante e ou agudo danifica a estrutura celular do músculo, como, por exemplo, perda da distribuição da linha Z. Este dano é acompanhado pela perda da força e função muscular (STUPKA, 2001; ARMSTRONG, 1984; EBBELING, 1989; CLARKSON, 1992). A desordem do citoesqueleto e miofibrilar foi investigada, após uma sessão de exercícios em indivíduos não treinados; três dias após o termino do exercício; a biopsia muscular mostrou desordem do filamento desmina e incremento da atividade dos lisossomos (FRIDEN, 1984). A lesão muscular acentua-se nos dias que seguem imediatamente após o exercício físico e, então, é gradualmente reparada dentro de duas ou três semanas pós-exercício (JONES, 1986; NEWHAM, 1983).

Entre os fatores propostos como responsáveis pela lesão muscular, estão: o estresse mecânico, o estresse oxidativo, o distúrbio da homeostase do cálcio intracelular e a resposta inflamatória. Os fatores mecânicos e oxidativos iniciam a

lesão, e alguns mediadores inflamatórios o exacerbam mesmo nos dias que se seguem o exercício (CLARKSON e SAYERS, 1999). O processo inflamatório é aparentemente desencadeado pelas espécies ativas do oxigênio (AOI, 2004).

Inflamação é a resposta dos tecidos corporais à infecção ou à lesão. A inflamação é caracterizada pela movimentação de fluidos, de proteínas plasmáticas e de leucócitos, em direção ao tecido afetado. A presença de sinais de inflamação (inchaço local, elevação na contagem de glóbulos brancos e acúmulo de monócitos e linfócitos) vem sugerir que uma resposta inflamatória aguda, poderia ser a explicação para a sensação de dor muscular, 24-48 horas após o exercício. No tecido danificado, os monócitos se tornam macrófagos e são responsáveis pela remoção de tecido necrótico. Os macrófagos liberam prostaglandinas (PGE_2) que, por sua vez, sensibilizam os receptores locais de dor, intensificando a estimulação dolorosa. O tempo necessário para que todos esses eventos ocorram, é a hipótese que explicaria a demora entre o dano na estrutura do tecido muscular e a percepção da dor (TRICOLI, 2001).

As interleucinas compõem um grande grupo de citocinas denominadas por IL-1 a IL-15, produzidas principalmente por células T, embora algumas também são sintetizadas por macrófagos e células teciduais. As interleucinas possuem uma variedade de funções, mas a maioria delas está envolvida na indução da divisão de outras células. A IL-6, por exemplo atua na ativação do ciclo celular das células tronco, crescimento e diferenciação de linfócitos T e B e produção de proteínas de fase aguda (NAOUM, 2001). Em adição, a interleucina 6 regula a concentração do fator de necrose tumoral – α (TNF- α) que por sua vez estimula inflamação no músculo esquelético durante exercícios intensos e que provoquem dano celular.

Assim, o que se observa, é que exercícios intensos promovem aumentos na concentração de IL-6 na circulação; na taxa transcricional de RNA mensageiro nas fibras; e a redução de glicogênio intramuscular, pois, afirma-se que IL-6 também é capaz de mobilizar substrato (carboidratos) ao músculo em contração durante o exercício, além de exercer efeito anti-inflamatório por estimular o aparecimento de interleucinas anti-inflamatórias, tais como: IL-1ra e IL-10 (PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

A lesão muscular decorrente do estresse oxidativo tem sido relacionada, por um lado, com a presença de espécies ativas de oxigênio produzidas em resposta ao consumo elevado de oxigênio pela mitocôndria durante os exercícios de alta resistência ou excêntricos (SEN, 2001; TIIDUS, 1998). Por outro lado, a ativação da xantina oxidase também tem sido proposta como um importante sítio gerador de radicais livres (VIÑA et al., 2000). O desencadeamento da lesão pode ainda estar relacionado com a presença de espécies ativas de oxigênio gerados no metabolismo aeróbio, elevação da temperatura e a diminuição do pH resultante do acúmulo do ácido láctico gerado pelo metabolismo anaeróbio durante o exercício (SMOLKA et al., 2000; KREGEL, 2002).

Embora não haja demarcação evidente entre os períodos de degeneração e regeneração, tem-se observado que entre quatro e seis dias após o evento inicial (lesão) ocorrem evidências de recuperação de miofibrilas e tecido lesado, e, por volta de 14 a 21 dias o tecido muscular parece normal (JONES, 1986; NEWHAM, 1983). Hwang e colaboradores (2006) realizaram experimento com ratos *Sprague-Dawley* submetidos a dilaceração do músculo gastrocnêmio de ambas as patas traseira, onde a pata direita foi submetida a exercícios de alongamento (estudo) e a esquerda foi mantida em repouso (controle do estudo). Observou-se que o pata para estudo demonstrou significativo aumento na regeneração da força após 14 dias da dilaceração, quando compara com a pata em repouso.

Outro fator importante na fase de regeneração, de acordo com alguns relatos da literatura como Kami e Senba (2002) é a ativação de células satélites. Aproximadamente três horas após a injúria muscular, a proliferação e a sobrevivência de mioblastos da morte celular por apoptose é um estágio regenerativo primário, essencial para a regeneração muscular completa. As células satélites que estão localizadas entre o sarcolema e a membrana basal de miofibrilas exercem papel-chave neste processo, e é pela sinalização do ativador de transcrição 3 (STAT3) que estas são ativadas.

2.6 Defesa antioxidante

Várias pesquisas têm demonstrado a presença de mecanismos de defesa e reparo do músculo esquelético frente às alterações causadas pelo exercício, entre eles: alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Isso ocorre em resposta à presença de espécies ativas de oxigênio (JI, 1995; POWERS e LENON, 1999; TIIDUS, 1998; CLARKSON e SAYERS, 1999; SMOLKA, 2000). Os resultados das pesquisas mostram que treinamento de resistência em corredores de 16 a 147 quilômetros percorridos semanalmente, geralmente aumenta a atividade e a expressão gênica de várias enzimas antioxidantes (JI, 1995; POWERS, 1999; ROBERTSON, 1991).

Halliwell e Gutteridge (1989) relatam que, fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelos EAO e evitar o agravo da lesão muscular, utilizando-se das reservas de enzimas antioxidantes. Porém, também a defesa antioxidante pode ser feita por moléculas pertencentes a um sistema não enzimático, que incluem vitaminas A, E, C; beta-caroteno e glutathiona. O sistema antioxidante enzimático é formado por três tipos de enzimas: o primeiro corresponde às enzimas superóxido dismutase (SOD), que são representadas pela Mn-SOD mitocondrial, manganês dependente e a CuZn-SOD citoplasmática, dependente de cobre e zinco, essas atuam sobre o radical ($O_2^{\bullet-}$). Fazem parte do sistema antioxidante enzimático, ainda, as enzimas glutathiona peroxidase, “selênio dependente” (GSH-PX) e a Catalase, dependente de ferro (CAT). Essas duas últimas atuam sobre o H_2O_2 , transformando-o em água (POWERS e HAMILTON, 1999). No entanto, o organismo não dispõe de enzimas que atuem sobre o radical hidroxila ($OH^{\bullet-}$), potente causador do estresse oxidativo. Felizmente, para este fim, nosso organismo pode utilizar pequenas moléculas, que diminuem a reatividade do radical hidroxila, tais como as vitaminas A, E e C, o beta caroteno, o ácido úrico e a molécula de glutathiona reduzida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; SIGNORI e SIGNORI, 1995).

A produção de EAO realiza-se através de uma reação em cadeia que, partindo de espécies ativas relativamente pouco tóxicas ($O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), leva à formação de substâncias altamente lesivas, como os radicais hidroxil e peroxil (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O organismo, porém, é capaz de desativar EAO antes destes exercerem seu efeito danoso, utilizando substâncias

antioxidantes. Todas as substâncias, naturais ou sintéticas, que agem desta forma em relação à EAO são denominadas “*scavengers*” ou varredores de oxidantes (HEFFNER e REPINE, 1989). Os antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação do substrato. Podem agir bloqueando a formação de EAO ou interagindo com eles, tornando-os inativos. Antioxidante, pode ser assim definido: qualquer substância capaz de doar elétrons para o radical livre, inativando-o e tornando-o um composto eletricamente estável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Não existe possibilidade de parar a redução do oxigênio ou a produção de EAO, porém a defesa natural e sofisticada contra seus efeitos nocivos ocorre dentro do citosol, da mitocôndria da célula e outras organelas, assim como em seu espaço extracelular circundante (McARDLE e KATCH, 1998).

Segundo Heffner e Repine (1989), pode ser considerado antioxidante qualquer processo que:

- ✓ previne a formação de EAO: esta primeira prevenção se realiza nas mitocôndrias, com a redução dos metabólicos tóxicos à água, sem formação significativa de radicais livres intermediários.
- ✓ Converte os oxidantes em espécies menos tóxicas: são os varredores de EAO, estando presentes nos espaços intracelular e extracelular, e funcionam eliminando os oxidantes ou prevenindo sua conversão em espécies menos tóxicas.

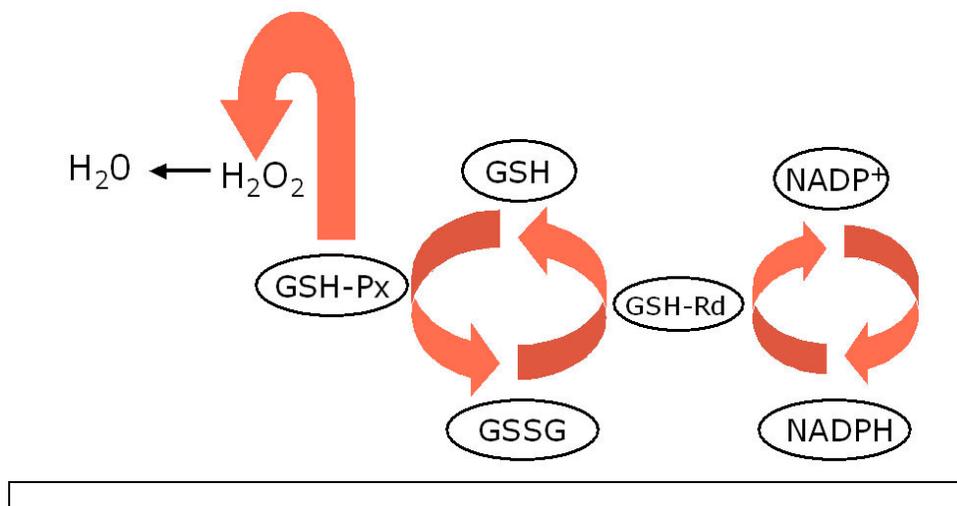
A superóxido dismutase, juntamente com a glutaciona peroxidase e a catalase, constitui o principal sistema enzimático contra a agressão dos EAO, agindo de acordo com a magnitude de geração de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (HEFFNER e REPINE, 1989). Segundo Abud e Didio (1999), o exercício extenuante agudo e o treino de exercício crônico aumentam o consumo de vários antioxidantes.

2.7 Glutaciona (GSH)

A glutathiona (GSH) constitui um importante sistema de proteção endógena das células contra os prejuízos provocados por substâncias tóxicas e oxidantes endógenos produzidos pelo metabolismo. Ela está presente, em elevadas concentrações nas células dos mamíferos e demais vertebrados sob forma reduzida (~99%) junto a menores quantidades, aproximadamente 1% na forma de glutathiona oxidada (GSSG) (WILHELM et al., 2000). Uma queda nos níveis de GSH de 20 a 30% pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais oxidantes, levando ao dano celular e à morte (HEFFNER e REPINE, 1989).

Segundo Ferreira (1997), sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza igualmente o estresse oxidativo. Considera-se que, para esse caminho de oxidação e redução, quem garante uma nova redução da GSSG à GSH é a enzima glutathiona redutase (GSH-Rd). Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH.

A glutathiona, é um tripeptídeo formado a partir dos resíduos dos aminoácidos glicina, glutamato e cisteína. GSH na forma reduzida contém um átomo de selênio ligado covalentemente. A GSH é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos à água através da ação da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), oxidando a GSH à glutathiona oxidada (GSSG), esse sistema é chamado de sistema da glutathiona (Esquema 5). A GSH está presente na maioria das células e é o tiol mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da desintoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIGNORI e SIGNORI, 1995).



Esquema 5. Representação do sistema glutatônico (GSH). A GSH é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio à água através da ação da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px), oxidando a GSH à glutatona oxidada (GSSG). A glutatona redutase (GSH-Rd), é a enzima responsável pela nova redução da GSH. Sendo que, a GSH-Rd é dependente da oxidação das vias das pentoses, onde os hidrogênios provenientes dessa via são carregados na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH). Adaptado (NELSON, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE 1999).

A glutatona redutase, é a enzima responsável pela nova redução da GSH, sendo essa dependente da oxidação das vias das pentoses, ou seja, vias metabólicas que fazem oxidação de carboidratos com cinco carbonos, onde os hidrogênios provenientes dessa via são carregados na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd. Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; FERREIRA, 1997).

Na inativação de um agente oxidante, ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. O excesso de GSSG, resultado de um ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH), podem

promover oxidação de proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível à custa da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIGNORI e SIGNORI, 1995).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é a enzima responsável por agir sobre a GSH, para que esta faça a redução do peróxido de hidrogênio (Esquema 6) ou hidroperóxidos orgânicos a água. A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH a GSSG. No músculo esquelético com fibras mistas, aproximadamente 45% da atividade da GSH-Px é encontrada no citosol, sendo o restante (55%) localizado na mitocôndria (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).



Esquema 6. Reação de conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a água (H₂O) por ação da Glutathiona peroxidase. Na reação, 1 molécula de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mais 2 moléculas de glutathiona (GSH) por ação da glutathiona peroxidase (GSH-Px), converte o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 1 molécula de água (H₂O) mais 2 moléculas de glutathiona oxidada (GSSG) (FERREIRA, 1997).

2.8 Enzima catalase (CAT)

A Catalase CAT consiste de quatro subunidades protéicas, cada uma com um grupo ferro Fe(III). Esta promove a remoção do peróxido de hidrogênio H₂O₂ a água e oxigênio, (Esquema 7). Embora exista uma sobreposição entre a função da CAT e da GSH-Px, as duas enzimas diferem na afinidade para peróxido de hidrogênio a baixas concentrações. Deste modo, quando o nível de peróxido de hidrogênio é baixo, a GSH-Px é mais ativa do que a CAT em removê-los das células (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; POWERS e LENNON, 1999).



Esquema 7. Reação de conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a água (H₂O) por ação da catalase . Na reação, 2 moléculas de peróxido de hidrogênio (2H₂O₂), sob a ação da catalase, são convertidas em 1 molécula de água (H₂O) mais 1 oxigênio molecular (FERREIRA, 1997).

2.9 Superóxido dismutase (SOD)

Uma das defesas contra o radical superóxido é promovida pela superóxido dismutase (Esquema 8). No músculo esquelético, existem duas isoformas, a manganês dependente SOD (Mn-SOD) encontrada na mitocôndria e a cobre zinco SOD (CuZn-SOD) localizada no citosol; essas atuam sobre o radical ânion superóxido, transformando-o em H₂O₂ e O₂. A enzima antioxidante CuZn-SOD, tem um peso molecular de 32.000 daltons, contendo duas unidades protéicas cada qual com um local ativo para o cobre e para o zinco; O zinco não tem função no ciclo catalítico, mas ajuda a estabilizar a enzima. A seqüência completa de aminoácidos estruturais da CuZn-SOD é semelhante entre vários tipos de plantas e animais. A superóxido dismutase manganês dependente Mn-SOD, foi primeiramente isolada da bactéria E coli, tem uma massa molecular de 40.000 daltons, contendo um local protéico ativo para o manganês. Em um pH 7.0 a taxa de dismutação do ânion superóxido por ambas as enzimas é bem similar. A Mn-SOD também é mais facilmente desnaturada por calor químico quando comparada com a CuZn-SOD. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).



Esquema 8. Reação primária de dismutação do radical livre ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por ação da SOD. Na reação, 2 moléculas de ânion superóxido ($2O_2^{\bullet -}$), mais 2 átomos (cátions) de hidrogênio (H^+) por ação da superóxido dismutase (SOD) são dismutados em 1 molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mais 1 oxigênio molecular (FERREIRA,1997).

2.9.1 Alterações nas enzimas antioxidantes frente ao exercício

Khassef (2001) e Suzuki (2000) verificaram que a resposta das enzimas antioxidantes é altamente dependente de vários fatores, incluindo: tipo de exercício e de programa de treinamento, duração, intensidade, exposição prévia ao exercício, idade do indivíduo, estado nutricional, tecido e tipo de fibra analisada (Tipo I ou Tipo II e intermediária), tempo de obtenção das amostras para análise e a técnica utilizada. Assim, observa-se uma variedade de dados na literatura se o exercício agudo aumenta o nível de antioxidantes endógenos.

Alessio (1988) estudou as antioxidantes CAT e SOD em ratos *Sprague Dawley*, que foram decapitados ou no repouso ou após uma corrida na esteira de 20m/min, em grupos treinados ou sedentários. SOD atividade permaneceu inalterada no agudo (sessão única de exercício que promove a quebra da homeostase em indivíduos sedentários ou treinados) ou crônico (sessões consecutivas e periodizadas de exercícios que promovem adaptações fisiológicas) exercício. A atividade da CAT foi maior em ambos os tipos de fibras, branca e vermelha, após o exercício agudo nos animais não treinados. Ji (1988) investigou o efeito de um treinamento crônico (27 m/min x 15° de inclinação) em uma sessão de treino agudo de exercício (20 m/min x 0°) em ratos treinados e não treinados respectivamente, e esses com e sem deficiência de selênio, imediatamente após o exercício. A deficiência de selênio não afetou a atividade da SOD e CAT no fígado ou no músculo. No fígado, foi elevada a atividade da SOD e CAT nos grupos com deficiência de selênio ou não treinados, porém no músculo foi muito pouco alterada.

A peroxidação lipídica pela formação de malondealdeído (MDA), foi incrementada após a sessão de exercício agudo, no fígado de animais não treinados

e no músculo dos ratos com deficiência de selênio. O autor sugere que os tecidos se adaptam para a deficiência de selênio e o treinamento minimiza os efeitos da peroxidação lipídica.

Laughlin (1990) investigou se o treinamento de resistência aeróbia de longa duração, ou seja, acima de trinta minutos de duração, incrementa a capacidade antioxidante das enzimas CAT, SOD e GSH-Px, em alguns tipos de fibras musculares, após um período de 12 semanas de treinamento em ratos sprague dawley. Este não encontrou diferenças para a atividade da SOD, porém encontrou aumento na atividade da GSH-Px; a atividade da enzima CAT, por sua vez, foi menor quando comparada ao controle sedentário.

Ji (1992) observou ainda que a concentração da GSH-Px, GSH-Rd e CAT são significativamente maior no sóleo (tipo I), do que no vasto lateral porção superficial (SVL) ou profundo (DVL), ambos do tipo II, mas constatou que não há diferenças na concentração da SOD para esses três tipos de músculos. Na realização de um turno agudo de exercício moderado para ratos sedentários, não houve alteração da atividade de nenhum dos antioxidantes para o músculo soleo, todavia, para o músculo vasto lateral DVL, houve um significativo incremento na atividade de GSH-Px, GSH-Rd e CAT.

Pereira (1994) investigou um modelo de treinamento de natação para ratos Wistar machos adultos, treinados por 8 semanas, uma hora por dia, cinco vezes por semana, com 5% de peso preso à calda. Esse pesquisador encontrou diminuição de 43% da CuZn-SOD no músculo gastrocnêmio, porção branca, porém, para o músculo sóleo (vermelho), encontrou um aumento de 54% para a Mn-SOD, ambos 24 horas após a última sessão de exercício. Segundo Powers (1994), muitos pesquisadores têm observado incremento na atividade da SOD em diferentes tipos de fibras musculares em resposta ao treinamento de resistência. Porém, outros investigadores têm observado pouco ou nenhuma mudança, sendo essas alterações específicas para o tipo de fibra analisada (tipo I ou II).

Somani (1995) investigou o efeito do exercício agudo (100% do $VO_{2\text{ MAX}}$) em ratos sedentários e treinados sobre os antioxidantes GSH e GSSH no músculo cardíaco. Estes foram mensurados por cromatografia líquida de alta pressão. O treinamento incrementou GSH no citosol em 131% quando comparado ao grupo

sedentário controle. O exercício agudo, no grupo sedentário, incrementou Mn-SOD, CAT e GSH-Px (mitocondrial) em 167%, 358%, e 129% respectivamente. Considerando o grupo treinado, houve incremento em 133%, 166%, e 128% respectivamente quando comparados com o controle sedentário. Esse autor também verificou que o exercício agudo em ratos sedentários possui maior estresse oxidativo do que os treinados.

Powers e Lennon (1999) encontraram que a maioria dos estudos indica que o exercício de resistência, bem como os excêntricos, aumenta a atividade da SOD total, contra outros, os quais mostraram que a atividade dessa enzima não é alterada durante o exercício. Com relação à atividade da GSH-Px, existe uma concordância na literatura de que o exercício de resistência aumenta a atividade da mesma no músculo esquelético. No caso da CAT, existem poucas evidências sugerindo que o exercício promova modulação na atividade enzimática. De fato, a maioria dos estudos mostra que o exercício reduz a atividade da catalase. Smolka (2000) investigaram a atividade das enzimas antioxidantes no músculo sóleo, de ratos sedentários e treinados continuamente e de modo intermitente por oito semanas. Durante o exercício crônico, por um lado, foi observado um aumento na atividade das enzimas: citrato sintase, catalase e glutatona redutase. Por outro lado, no exercício agudo, a atividade máxima da catalase e glutatona redutase apresentou-se significativamente diminuída no músculo do grupo sedentário, sugerindo a condição do estresse oxidativo como responsável para exaustão neste grupo.

Semin (2001) determinou o efeito de um exercício submáximo agudo de corrida (60 min. 18m/min x 5°), sobre o sistema antioxidante em diferentes períodos após o término do exercício (0h, 3h e 24h), no intestino e rim de ratos. SOD e GSH-Px não foram incrementados no rim, mas a SOD intestinal diminuiu após o exercício 0h e 3h respectivamente e após retornou ao valor do controle. GSH-Px incrementou imediatamente após o exercício e, depois, retornou ao valor de controle.

Miyazaki (2001) investigou se o treinamento de resistência pode aliviar o estresse oxidativo aplicando um treinamento agudo antes e após um treinamento, durante 12 semanas, em um ergômetro com intensidade de 80% de frequência cardíaca máxima prevista para indivíduos de 19 a 21 anos. Amostras de sangue

foram coletadas imediatamente após o término do exercício de exaustão para mensurar a atividade das enzimas antioxidantes SOD; CAT e GSH-Px em eritrócitos. SOD e GSH-Px foram incrementadas após o treinamento, mas não houve evidência de que o exercício exaustivo alterou o nível de alguma enzima antioxidante. CAT atividade não apresentou mudanças quer pelo treinamento quer pelo exercício exaustivo.

Gregorevic (2001), através de administração por inalação de oxigênio (hiperbárico), de forma aguda ou duas vezes por dia durante 28 dias, estimulou a produção de EAO e analisou, no músculo sóleo e extensor longo dos dedos de ratos Sprague Dawley, a atividade das enzimas superóxido dismutase manganês dependente (Mn-SOD) e cobre zinco dependente (CuZn-SOD) e a enzima CAT; A inalação aguda diminuiu a atividade da enzima CAT em aproximadamente 51% no músculo sóleo. Entretanto, para o músculo extensor longo dos dedos, a administração crônica por 28 dias aumentou a atividade da Mn-SOD em 241% nesse tipo de fibra rápida. Já na administração aguda de 60 minutos não houve alterações significantes para ambas isoformas da enzima SOD.

Voces (2004) observou que, após um exercício agudo, o conteúdo da glutathiona não se alterou no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos sedentários, independente de o grupo ser tratado ou não com ginseng. A literatura aponta tanto aumento quanto diminuição na atividade das enzimas da defesa antioxidante, dependendo do protocolo de exercício utilizado (GANDRA, 2004).

Portanto, frente a uma variedade de dados, com diferentes resultados sobre as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, em relação a prática de exercício aeróbio agudo; o presente estudo tem por objetivo analisar a atividade dessas enzimas a partir de um protocolo de exercício aeróbio exaustivo a ser padronizado, bem como observar o tempo de recuperação do sistema enzimático de defesa antioxidante, podendo assim prever e sugerir o tempo ideal para se aplicar uma nova sessão de treino.

3 – OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar e padronizar um protocolo de exercício aeróbio de longa duração até a exaustão. a ser aplicado em animais ratos Wistars machos em esteira ergométrica. Determinar a resposta de atividade das enzimas antioxidantes glutathiona redutase (GSH-Rd), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), após um exercício aeróbio até a exaustão nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de ratos Wistars

Objetivos específicos

Determinar a resposta de atividade das enzimas antioxidantes glutathiona redutase (GSH-Rd), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), após um exercício aeróbio até a exaustão em uma cinética de tempo nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de ratos *Wistars*.

Verificar o tempo de recuperação do sistema enzimático de defesa antioxidante.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4.1 População e amostra

Foram utilizado para o presente estudo ratos *Wistars* machos, fornecidos pelo biotério da Universidade de Campinas (UNICAMP), os quais foram mantidos em gaiolas coletivas (6 em cada), ambiente com temperatura de 23°C e ciclo claro/escuro controlado de 12 horas. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. A dieta contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios (NUVILAB CR1, NUVTAL Nutrientes LTDA, Curitiba, PR). Os recebimentos dos animais ocorreu em duas fases a saber: i) Inicialmente trabalhou-se com 50 roedores *Wistars* machos, com 90 dias de vida e peso entre 250 e 350 gramas, os quais foram submetidos a um estudo de padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica, com intensidade progressiva (BORGES, 2006). ii) Na seqüência foram utilizados 100 roedores *Wistars* machos, com 30 dias de vida, peso entre 120 e 150g, os quais triados para a realização do protocolo aeróbio exaustivo. Receberam tratamento de acordo com as recomendações do colégio americano de medicina esportiva (ACSM), para estudo com animais de laboratório (GOBATTO, 2001).

O presente estudo faz parte do projeto: Caracterização da lesão muscular (apoptose ou necrose) no músculo de ratos, frente ao exercício físico intenso e a resposta de defesa e repar, financiado pela FAPESP e aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas 1 da Universidade de São Paulo (USP), sob o nº de 49/05 (Anexo 1).

4.2 Delineamento Experimental

Esse foi dividido em duas fases:

1ª fase: Foi realizado um estudo experimental, com variável dependente, o exercício em esteira rolante, estudo com um desenho longitudinal, no qual um grupo de 10 animais foram submetidos ao exercício para dosagem bioquímica de lactato sanguíneo e, logo após, um outro grupo de 40 animais foram submetidos a um

protocolo de exaustão em esteira ergométrica para padronização do mesmo e posterior aplicação nos animais da 2ª fase.

2ª fase: Foi realizado um estudo experimental, com variável dependente, o exercício aeróbio em esteira rolante até a exaustão, aplicado em animais sedentários (protocolo padronizado na 1ª fase); estudo com um desenho transversal, no qual os animais foram divididos em dois grupos, sendo um deles o grupo controle (C) e todos com 6 animais (N = 6), nomeados como grupos (0), (1), (2), (4), (8), (12), (24), (48) e (72) horas após o término do exercício agudo, sendo esses decapitados nos respectivos períodos de tempo após a exaustão para coleta das amostras.

4.3 Acúmulo de lactato no sangue e máxima fase estável

Com os animais da 1ª fase do experimento, 10 foram randomicamente selecionados para participar, com o objetivo de encontrar a máxima fase estável do lactato no sangue (MLSS) por determinação do limiar anaeróbio (LAN), para ratos *Wistars*, bem como o OPLA (onset lactate plasma accumulation), que corresponde ao início do acúmulo do lactato no sangue (DENADAI, 1999). O experimento foi realizado em esteira rolante construída pela empresa New Primer, com 8 raias, marcação de velocidade em metros por minuto (m/min) e com inclinação automática (Figura 3). Foi mensurado o lactato em repouso e então os animais realizaram um protocolo de determinação do Lan adaptado de Pillis (1993), no qual esses iniciavam a corrida a 13m/min por 10º de inclinação durante 3 minutos. Então, retiravam-se esses animais da esteira para uma imediata dosagem e, em um período de 3 minutos, eram recolocados na esteira com um incremento de 4 m/min até atingirem 33m/min ou exaustão. Oito animais concluíram o experimento e a coleta do sangue foi feita por uma pequena incisura na calda dos animais, a qual era protegida a cada coleta, sendo colhida em um tubo capilar de 50 microlitros; a mensuração foi feita imediatamente, por meio do aparelho lactímetro da marca (ACCUSPORT).



Figura 3. Foto digital da esteira ergométrica para treinamento de corrida para animais de laboratório. (Modelo ERL, Marca New Primer, 110 Volts). Observa-se o painel com marcador digital de velocidade e uma das oito raias existentes com a presença de um animal experimental.

4.4 Padronização do protocolo de exaustão

Com base nos resultados do MLSS e OPLA e nos valores encontrados por Pillis (1993), foi elaborado um protocolo de exercício de resistência aeróbia de longa duração, segundo Barbanti (2004) e Borges (2006), com intensidade progressiva até a exaustão em esteira ergométrica. Foi considerado que os animais realmente atingiram a exaustão quando nesses era aplicado uma pressão manual em sua calda. E ainda, para uma confirmação eram colocados na bancada e observado suas reações de movimento de fuga, caso esse permanece praticamente imóvel, era considerado exaurido. Quarenta animais foram submetidos a este protocolo (Anexo 2) sendo que trinta completaram o exercício de exaustão. Os dados foram tratados estatisticamente para confirmar a eficácia do exercício.

4.5 Exercício agudo

Os animais da 2ª fase foram adaptados a esteira ergométrica, durante 7 semanas, 3 vezes por semana e velocidade entre 8 e 15 metros por minuto sem nenhuma inclinação por 5 minutos cada dia de adaptação, e ao completarem 90 dias de vida com peso entre 250 e 350 gramas foram submetidos ao protocolo de

exercício agudo aeróbio de longa duração até a exaustão em esteira ergométrica previamente descrita, para posterior coleta de amostras.

4.6 Obtenção das amostras

Os animais foram decapitados conforme cinética de tempo já citada. Foi realizada uma incisura; e com posterior remoção da pele das patas traseiras com utilização de material cirúrgico. Somente então, foram retirados os músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL). As alíquotas foram feitas e levadas imediatamente para nitrogênio líquido e, após, congeladas, em freezer (-70°) para posterior análise das enzimas antioxidantes.

4.7 Homogeneização das amostras

Os tecidos (músculos SÓLEO e EDL) foram pesados e colocados em tubos de vidro (15 cm de comprimento x 15 mm de diâmetro) previamente gelados. Posteriormente, foi acrescido com o mesmo volume correspondente ao peso de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7.5). Os tecidos foram homogeneizados no agitador mecânico (Mod. MA 099, Marca: Marconi-equipamentos para laboratórios-Piracicaba-SP). Em seguida, o homogenato foi transferido para tubos de microcentrífuga previamente gelado e centrifugados por 10 minutos a 8.500 rpm (Micro-centrífuga CT-14000, MOD. 14000-D, Marca Cientec – equipamentos para laboratórios). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e mantido em gelo para utilização nos ensaios enzimáticos e determinação da concentração da proteína total.

4.8 Determinação da atividade máxima da SOD

A atividade máxima da SOD foi determinada de acordo com a taxa de redução do *Nitro blue tetrazolium* (NBT) pelo ânion superóxido a 25°C acompanhada espectrofotometricamente a 550nm (MARKLUND e MARKLUND, 1974). O sistema xantina-xantina oxidase foi utilizado como fonte de ânion superóxido. A SOD da

amostra compete pelo ânion superóxido, inibindo a taxa de redução do NBT. A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 3 minutos a 25°C, conforme procedimentos.

4.9 Determinação da atividade máxima da CAT

A atividade máxima da CAT foi avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio acompanhada espectrofotometricamente a 240nm, utilizando tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 10 mM (BEERS e SIZER, 1952). A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 4 minutos a 25°C, conforme procedimentos.

4.9.1 Determinação da atividade máxima da GSH-Rd

A atividade da glutatona redutase foi determinada espectrofotometricamente com base no decréscimo da concentração de NADPH a 340nm (CARLBERG e MANNERVIK, 1985). A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 3 minutos a 25°C, conforme protocolo de procedimentos para reações.

4.9.2 Quantificação da Proteína total

A quantificação das proteínas foi realizada segundo o método de (BRADFORD, 1976). Os resultado serão expresso em mg/mL. Para a quantificação de proteínas foram utilizadas alíquotas das mesmas amostras usadas para determinação da atividade das enzimas.

4.9.3 Análise estatística

Foi utilizado o *Software Microsoft Excel* para realizar os cálculos da atividade enzimática e tabulação dos dados. Com o software *Statgraphics Plus*, checkou-se a homocedasticidade das variáveis através do teste “F” de *Levenes*, seguido da análise de variância ANOVA para dados paramétricos com checagem de

significância entre os grupos (*Fisher*) método LSD (Anexo 3), sendo considerado como significativo $p < 0,05$. Os dados foram apresentados em média e mais ou menos erro padrão ($\pm EP$) na forma de Gráficos e Tabelas.

5 - RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO DE EXAUSTÃO

5.1.1 Determinação do acúmulo do lactato e máxima fase estável.

O início do acúmulo do lactato no sangue (OPLA) teve velocidade correspondente a 17 m/min. O limiar anaeróbio encontrado do valor fixo (4 mmol) teve velocidade correspondente a aproximadamente 26 m/min, sendo este a máxima fase estável do lactato no sangue (MLSS). A inclinação utilizada durante todo o teste foi de 10°. (Figura 5)

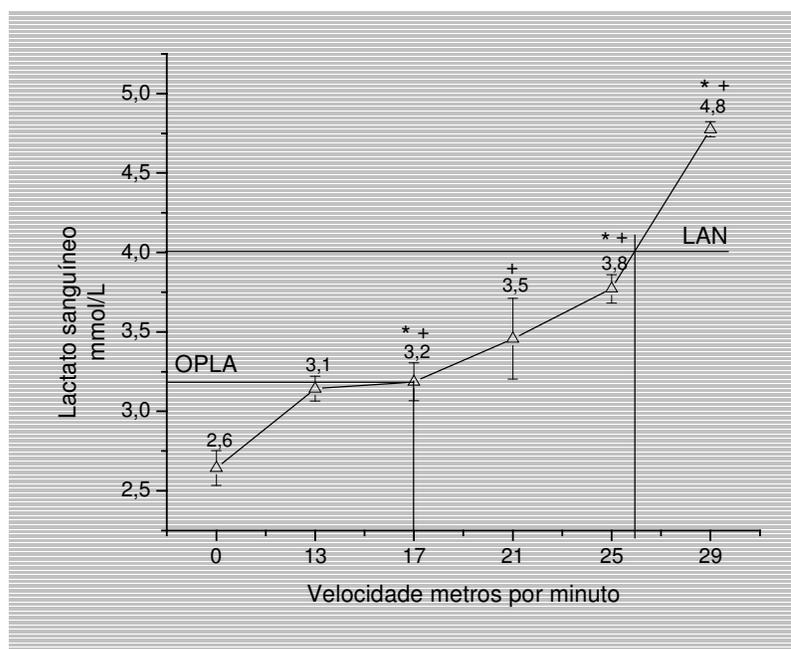


Figura 4. Determinação do início do acúmulo do lactato no sangue (OPLA) que ocorreu na velocidade de 17 metros por minuto (m/min) e sua máxima fase estável (MLSS) que ocorreu na velocidade de 26 m/min. em ratos *Wistars* machos. Valores da velocidade de esteira em metros por minuto (m/min) com 10° de inclinação. Lactato sangüíneo, em milimoles por litro por minuto (mmol/L). Valores expressos em média mais ou menos erro padrão (\pm EP). Símbolos, foram usados para identificar significância estatística. (* $P < 0,03$): comparado entre eles (3,2 - 3,8 - 4,8), e (+ $P < 0,04$): comparado com o repouso (2,6mmol/L). $n = 8$.

5.1.2 Padronização do protocolo de exaustão

A aplicação do protocolo de exaustão conduziu 30 animais à exaustão em um tempo médio de 60 minutos, com erro padrão $\pm 1,3$ minutos; mediana 60 min e valores mínimo e máximo de exaustão entre 48 e 73 minutos respectivamente. Na Tabela 1, são mostrados os animais com seus respectivos números e tempo de exaustão, bem como a distribuição percentual que os mesmos atingiram a exaustão.

Tabela 1. Tempo de corrida em minutos até a exaustão de cada animal (ratos *Wistars*) conforme sua numeração na esteira ergométrica; Conforme protocolo de exaustão (Anexo 2). Observa-se também que 76,7% dos animais entraram em exaustão na velocidade de 25 metros por minuto, enquanto que 23,3% exauriram na velocidade de 21 metros por minuto, ambos com 10 graus de inclinação.

% dos animais		Velocidade de exaustão c/ 10 graus de inclinação	
76,7		25m/min	
23,3		21m/min	

ANIMAL	TEMPO min	ANIMAL	TEMPO min	ANIMAL	TEMPO min
1	55	11	58	21	50
2	58	12	62	22	60
3	65	13	73	23	64
4	57	14	65	24	66
5	64	15	62	25	50
6	60	16	57	26	50
7	48	17	62	27	72
8	57	18	73	28	72
9	52	19	63	29	57
10	59	20	60	30	53

N = 30

5.2 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS

5.2.1 Glutationa redutase no músculo EDL

A atividade da glutatona redutase (GSH-Rd) no músculo extensor longo dos dedos (EDL) um aumento de 26,67% para o período de 72h após o exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão quando comparada com o controle. Os demais períodos não foram significantes, quando comparados com o controle. Os respectivos valores são apresentados (Figura 5).

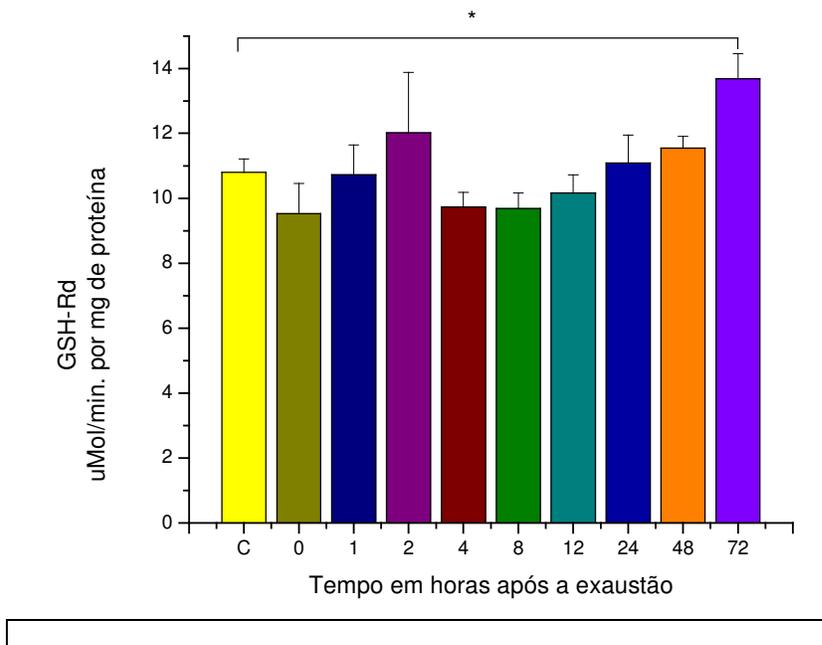


Figura 5. Determinação de atividade da glutatona redutase (GSH-Rd) no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos *Wistars*, analisada ao longo de um período de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão. Valores são expressos em micromol por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{Mol}/\text{min}$ por mg de proteína) apresentados em média, mais ou menos erro padrão da média ($\pm\text{EP}$). * $P=0,0462$ quando comparado com o grupo controle.

5.2.2 Superóxido dismutase no músculo EDL

A Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), no músculo EDL, não apresentou significância estatística comparada com o controle e entre eles ao longo de um período de tempo 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão (Figura 6).

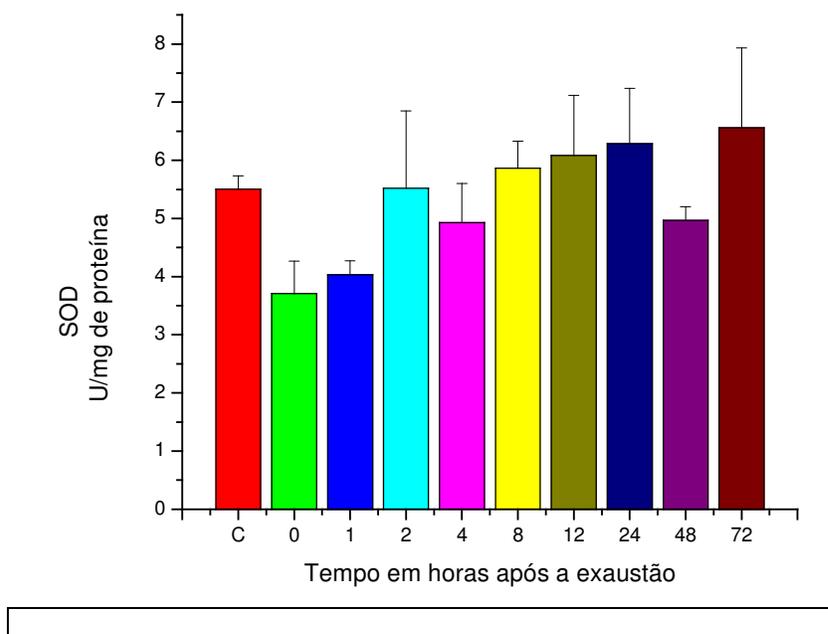


Figura 6. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) no músculo extensor longo dos dedos (EDL), de ratos *Wistars*, analisada ao longo de um período de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão. Valores expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg proteína), apresentados em média mais ou menos erro padrão da média (\pm EP). Os valores não apresentaram significância estatística.

5.2.3 Catalase no músculo EDL

A atividade da enzima catalase no músculo EDL apresentou uma diminuição significativa de 25,54% 24h após o exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão quando comparada com o grupo controle. Os demais períodos dos grupos analisados não apresentaram significância estatística (Figura 7).

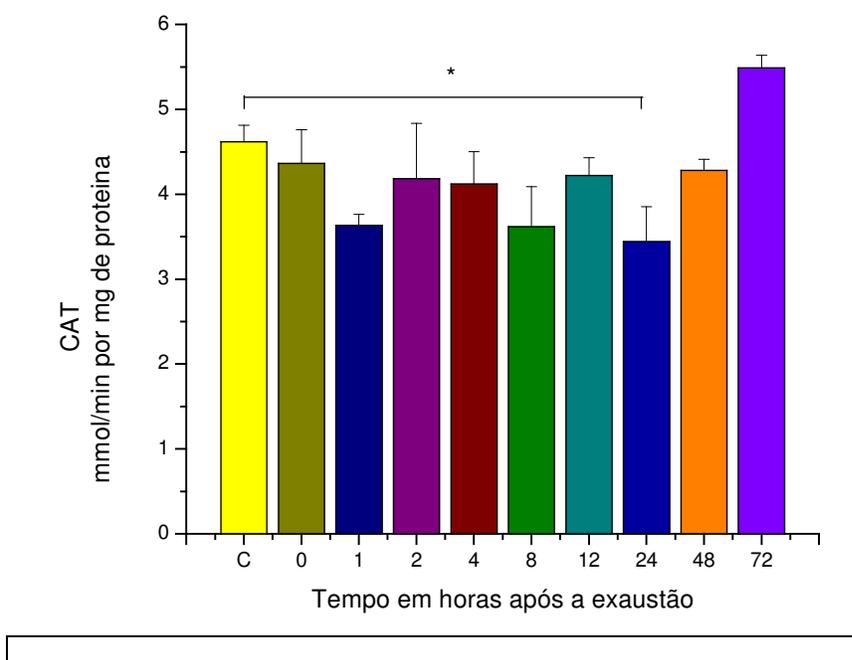


Figura 7. Determinação da atividade da catalase (CAT) no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos *Wistars*, analisada ao longo de um período de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão. Valores expressos em milimol por minuto por miligrama de proteína (mmol/min por mg de proteína), apresentados em média mais ou menos erro padrão da média (\pm EP). * $P=0,0140$ indica significância estatística quando comparado com o controle.

5.3 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO MÚSCULO SÓLEO

5.3.1 Glutationa redutase no músculo sóleo

A Atividade da enzima glutaciona redutase (GSH-Rd), no músculo sóleo, não apresentou significância estatística comparada com o controle ao longo de um período de tempo 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão (Figura 8).

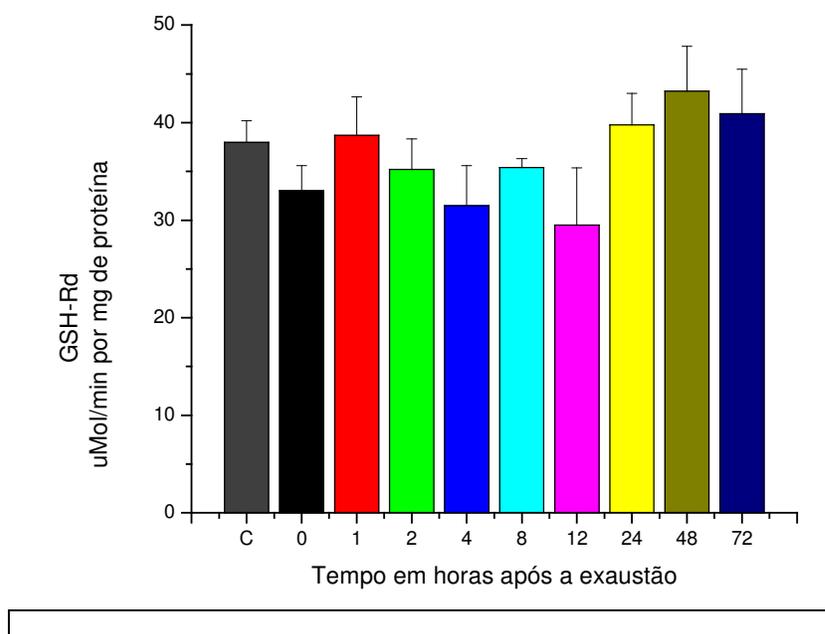


Figura 8. Determinação da atividade da glutaciona redutase (GSH-Rd), no músculo sóleo, de ratos *Wistars*, analisada ao longo de um período de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão. Valores expressos em micromol por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{Mol}/\text{min}$ por mg de proteína), apresentados em média mais ou menos erro padrão da média ($\pm\text{EP}$). Os valores não apresentaram significância estatística.

5.3.2 Superóxido dismutase no músculo sóleo

A enzima SOD analisada no músculo sóleo apresentou alterações em sua atividade com reduções significativas para os períodos de 0, 1, 2, 4, 12, 48 horas após o exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão (-37,99%; -28,30%; -31,18%; -55,72%; -42,88%; -30,83% respectivamente) quando comparados com o controle (Figura 9).

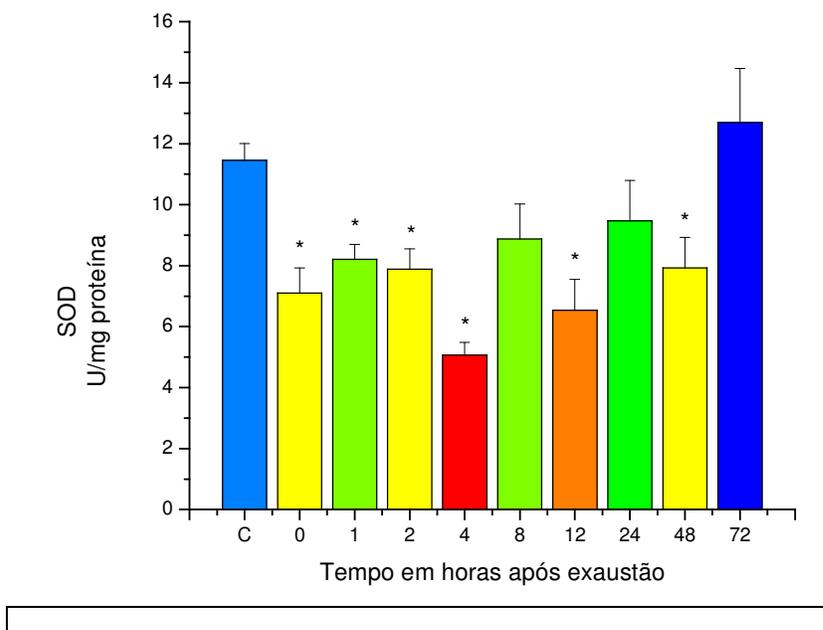


Figura 9. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), no músculo sóleo de ratos *Wistars*, analisada ao longo de um período de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão. Valores expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg proteína), apresentados em média mais ou menos erro padrão da média (\pm EP). *P=0,0001 indica significância estatística quando comparado com o controle.

5.3.3 Catalase no músculo sóleo

A enzima catalase (CAT) analisada no músculo sóleo apresentou uma diminuição de sua atividade 24,40%, 4 horas após o término do exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão, quando comparado com o controle, os demais períodos de 0, 1, 2, 8, 12, 24, 48 e 72 horas não apresentaram significância estatística. (Figura 10).

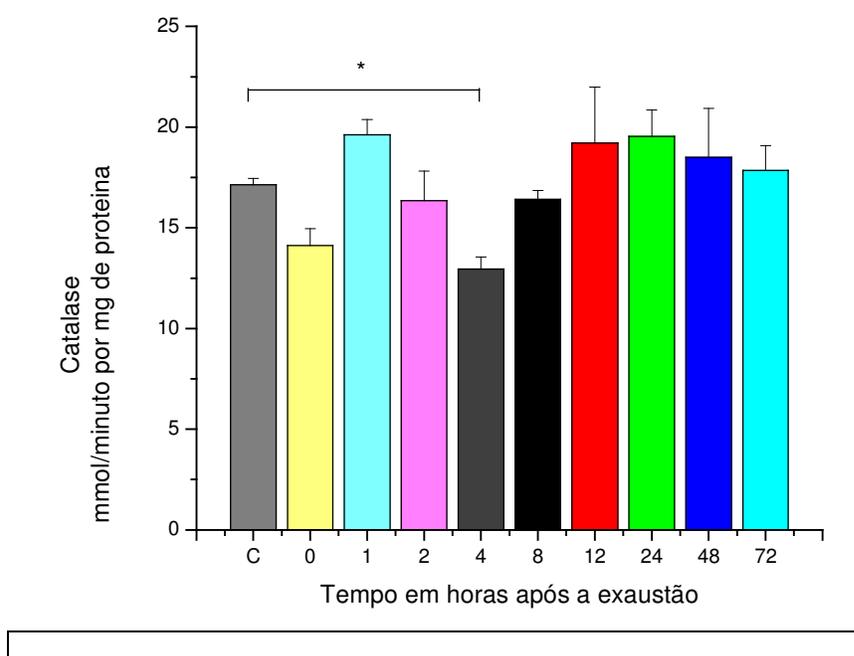


Figura 10. Determinação da atividade da catalase (CAT), no músculo sóleo de ratos *Wistars*, analisada ao longo de um período de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o término de um exercício aeróbio de intensidade progressiva até exaustão. Valores expressos em milimol por minuto por miligrama de proteína (mmol/min por mg de proteína), apresentados em média mais ou menos erro padrão da média (\pm EP). * $P=0,0266$ indica significância estatística quando comparado com o controle.

5.3.4 Comparação de resultados obtidos das antioxidantes

Na Tabela 2, é apresentada uma síntese comparatória dos resultados obtidos para a atividade das enzimas antioxidantes GSH-Rd, CAT e SOD, analisadas nos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo. Para o músculo EDL, a enzima GSH-Rd aumentou sua atividade 72 horas após o exercício agudo aeróbio, portanto, para a enzima catalase, houve uma diminuição de atividade e, na enzima SOD, não houve alterações. Para o músculo sóleo, a enzima GSH-Rd não apresentou alterações, porém houve diminuição de atividade das enzimas SOD e CAT nesse músculo.

Tabela 2 – Síntese dos dados obtidos para as diferentes antioxidantes (GSH-Rd; SOD total; CAT) analisadas nos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo, após o protocolo de exercício aeróbio até exaustão. Os valores foram expressos em percentual (%).

ENZIMA / MÚSCULO	% DE ALTERAÇÃO	PERÍODO DE TEMPO horas após a exaustão
Glutationa Redutase EDL	+26,67%	72
Superóxido Dismutase EDL	--	--
Catalase EDL	-25,54%	24
Glutationa Redutase Sóleo	--	--
Superóxido Dismutase Sóleo	-37,99% -28,30% -31,18% -55,72% -48,88% -30,83%	0 – 1 – 2 – 4 – 12 – 48
Catalase Sóleo	-24,40%	4

Legenda: GSH-rd – Glutationa redutase; SOD total- Superóxido dismutase; CAT- catalase. (+) = aumento, (-) = diminuição, (--) = sem alteração. $P < 0,0462$ comparado com o controle

6 - DISCUSSÃO

6.1 Protocolo de exaustão

Pillis (1993) encontrou, em seus estudos com ratos *Wistar*, a MLSS com uma velocidade de 25 metros por minuto por 10 graus de inclinação. Em nosso laboratório, encontramos a MLSS semelhante, com uma velocidade de 26 metros por minuto por 10 graus de inclinação. Isso apesar de nossa metodologia para analisar o lactato coletado ter diferido do estudo de Pillis (1993), que utilizou análise enzimática com um kit comercial (*Boehringer Diagnostica F.R.G.*); consideramos o uso de dosagem imediato ao aparelho lactímetro utilizado por nós, como sendo fidedigno para os resultados. Porém, nos estudos de Manchado (2005), a MLSS encontrada para uma concentração de 3,9 (± 1.1 mmol/L) foi de 20 m/min, o que conduziu os animais à exaustão entre o décimo e o vigésimo quinto minuto de exercício. Talvez a diferença de velocidade encontrada entre nossos estudos e os estudos de Manchado (2005) é que este analisou o lactato coletado com o aparelho (YSI 1500 SPORT), considerado excelente para esse tipo de análise, mas que apresenta pequenas diferenças de valores quando comparado com o aparelho lactímetro, que foi demonstrado recentemente por Buckley (2003).

Portanto, a velocidade inicial encontrada em nossos estudos em que ocorreu o OPLA, ou seja, o início do acúmulo do lactato no sangue ocorreu a partir de 17 m/min. Manchado (2005) encontrou uma estabilização na concentração mínima de 3.2 (± 1.1 mmol/L) na velocidade de 15m/min. Pillis (1993), após a aplicação de seis corridas consecutivas em um grupo com os mesmos animais em dias diferentes, não encontrou alterações na concentração de lactato (aproximadamente 2.0 mmol/L) sanguíneo para uma velocidade de 17m/min. por 10° de inclinação. Logo acreditamos que, quando se deseja criar um efeito de treinamento nesses tipos de animais *Wistars*, uma intensidade mínima seria algo em torno de 15 e 17m/min por 10° de inclinação. Isso justifica também o fato de, no período em que submetemos os animais a um período de adaptação à esteira, não produzirem efeitos de treinamento quando submetidos 3 vezes por semana a uma velocidade entre 8 e 15 m/min sem nenhuma inclinação durante 5 minutos.

A aplicação do protocolo de exercício (Anexo 2) conduziu 30 animais *Wistars* à exaustão, de forma que 76,7% atingiram exaustão a 25 m/min.x10º de inclinação e 23,3% a 21 m/min.x10º. Por isso, sugerimos que, para submeter grupos de animais sedentários à exaustão, deve-se considerar que estes possuem Lan diferente de 4.0 mmol/L e intensidades distintas das encontradas nos estudos de (MANCHADO, 2005; PILLIS, 1993). Desta forma, iniciar um protocolo que vise conduzir à exaustão, a uma velocidade inferior a 21 m/min por 10º de inclinação, seria recomendável, pois um protocolo que tem por objetivo avaliar os efeitos do exercício extenuante deve assegurar que esse gere lesão tecidual através de estresse mecânico e metabólico.

Entre os fatores propostos como responsáveis pela lesão muscular, estão: os estresses mecânico e oxidativo, o distúrbio da homeostasia do cálcio intracelular e a resposta inflamatória. Os fatores mecânicos e oxidativo iniciam a lesão, e alguns mediadores inflamatórios exacerbam a mesma nos dias que se seguem ao término do exercício (CLARKSON e SAYERS, 1999). Aoi (2004) investigou a contribuição das espécies ativas do oxigênio para gerar dano muscular após o exercício e se a injúria estava relacionada indireta ou diretamente com as espécies ativas do oxigênio, por meio da análise da translocação do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$) e citocinas (*in vitro* e *in vivo*), no músculo esquelético, investigando se o atraso no dano muscular causado por exercício agudo prolongado estava relacionado com ativação da cascata inflamatória devido a contração muscular. Nas células da linhagem L6 (linfócitos T e macrófagos), o peróxido de hidrogênio estimulou e induziu a translocação do fator nuclear p65 (*in vitro*). No músculo gastrocnêmio (*in vivo*) o resultado foi semelhante. O exercício também induziu a migração de neutrófilos e dano muscular. Portanto, o autor concluiu que os resultados indicam que o atraso no dano muscular após exercício prolongado é aparentemente associado a infiltração de células fagocíticas causando inflamação secundária por espécies ativas de oxigênio.

A desordem de citoesqueleto e miofibrilar foi investigada, após uma sessão de exercícios em indivíduos não treinados; três dias após o término do exercício; a análise histológica da biópsia muscular indicou desordem do filamento desmina e incremento da atividade dos lisossomos. Isso sugere que um longo período de recuperação seria necessário após uma sessão de exercícios em indivíduos não

treinados, para estabelecer o processo de regeneração (FRIDEN, 1984). O desencadeamento da lesão pode ainda estar relacionado com a presença de espécies ativas de oxigênio, elevação da temperatura e a diminuição do pH resultante do acúmulo do ácido láctico gerado durante o exercício (KREGEL, 2002; SMOLKA, 2000). Eydoux (2000) submeteu um grupo sedentário de animais *Wistars* à exaustão utilizando protocolo de exercício agudo, com intensidade constante de 25m/min x 10° de inclinação. Paralelamente, um grupo de animais treinados, treinou, durante cinco semanas, na mesma intensidade e também foram exercitados até a exaustão. O tempo de exaustão para o grupo sedentário foi de 80 ± 9 minutos e, para o grupo treinado de 204 ± 11 minutos. Portanto, isso vem dar suporte para a individualidade entre os diferentes grupos avaliados, quando comparado com nossos estudos que, em intensidade progressiva, os animais de mesma espécie atingiram exaustão no tempo de 60 ± 7 minutos. Logo sugerimos, que nosso protocolo de intensidade progressiva tenha um maior número de animais completando o exercício de exaustão.

Milne (2002), submeteu ratos a exercício de corrida em diferentes intensidades (15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 m/min x 2% de inclinação). Esse autor observou diferentes respostas nas proteínas de choque térmico nas diversas intensidades, com um incremento da proteína de proteção (HSP70) quando o exercício era executado dentro ou próximo do limiar anaeróbio dos animais. Isso vem reforçar a necessidade da predição individual da intensidade do treinamento para estudos experimentais. Billat (2003) em seu estudo de revisão relata que o tempo de exercício de resistência, ou seja, exercícios de resistência aeróbia de longa duração, que pode ser realizado na máxima fase estável do lactato no sangue é especulado em aproximadamente uma hora. Porém, esse encontrou que indivíduos moderadamente treinados se exercitando no limiar anaeróbio de 4,0 mmol/L, o tempo de exaustão para esses indivíduos era em média de 38 minutos. Outrossim, doze estudantes de educação física se exercitando no limiar anaeróbio individual que variou de 2,7 a 6,0 mmol/L tiveram um tempo de exaustão em média de 50 minutos, portanto, na relação de performance para modalidades de corridas, corredores de maratona por exemplo (duração superior a 2 horas), necessitam realizar a prova abaixo de seu limiar anaeróbio individual. No presente estudo, o

tempo médio de exaustão foi de 60 minutos (Tabela 1), e com velocidade correspondente ao limiar anaeróbio previamente determinado, então, sugerimos que esses entraram em exaustão por fatores como: estresse oxidativo, temperatura corporal ou estoques de glicogênio muscular, mas não por diminuição do PH sanguíneo. Assim, sugerimos que o presente protocolo possui uma intensidade moderada à alta. Segundo Powers (2005) é submáximo.

6.2 Atividade das enzimas antioxidantes

No presente estudo a atividade da enzima GSH-Rd no músculo EDL apresentou um aumento de 26,67% em sua atividade no grupo 72h quando comparada com o controle (Figura 5). Já nos estudos de Somani (1995), um exercício agudo em ratos sedentários (*Fisher-344*), com peso entre 290g e 315g, incrementou a atividade da GSH-Px em 129% no músculo cardíaco, imediatamente após o exercício. Sugerimos, que isso se deva a diferente resposta antioxidante dessa enzima para o músculo esquelético e o cardíaco, pois, segundo Halliwell e Gutteridge (1989), a atividade dessas enzimas são $38 \text{ mg}^{-1}/\text{proteína}$ x $69 \text{ mg}^{-1}/\text{proteína}$ para o músculo esquelético e cardíaco, respectivamente. E isso também para as diferentes intensidades do exercício, pois estes tiveram um tempo total de 35 minutos de exercício agudo, com apenas 5 minutos a 100% da capacidade ventilatória máxima. Essa intensidade é menor que o exercício executado no limiar anaeróbio, contudo, nos estudos de Eydoux (2000), o treinamento de 5 semanas em ratos *Wistars* machos adultos diminuiu a atividade da GSH-Px nos músculos sóleo e gastrocnêmio, porção vermelha, em 36% e 38% respectivamente, 24 horas após o término de um exercício agudo de exaustão em animais treinados por 5 semanas na intensidade de $25\text{m}/\text{min} \times 10^0$ o qual teve tempo de exaustão de aproximadamente 204 minutos. O exercício agudo, porém, no grupo não treinado, aumentou a atividade dessa enzima, sugerindo que a sua resposta é diferenciada para o tipo de músculo e também se diferencia após o treinamento. Por exemplo, em nosso estudo EDL (fibras brancas), apresentaram aumento somente 72 horas (Figura 5) após o final da sessão de exercício.

Foi observado ainda que a atividade da enzima Glutathione Redutase não foi alterada para o músculo sóleo ao longo de uma cinética de tempo, após um turno de exercício aeróbio de intensidade progressiva até a exaustão (Figura 8). Como a enzima GSH-Px participa de forma primária na seqüência de reações enzimáticas na redução da GSH, essa GSH-Px pode apresentar uma diferença de atividade quando comparada com a GSH-Rd. Fiamoncini (2002) encontrou essa proposta em seus estudos quando estudou os antioxidantes GSH, GSSG, GSH-Px e GSH-Rd em eritrócitos de jogadores juniores de futebol, antes e 1:30 h após um exercício aeróbio, encontrando uma diferença significativa com aumento da atividade da GSH-Px, porém sem alterações na atividade da GSH-Rd. Isso sugere que, provavelmente, enquanto a concentração da GSH for adequada, prevalece a atividade da GSH-Px. Nos estudos de Ji (1992), este autor, após aplicar um turno agudo moderado de exercícios para ratos, não encontrou alterações para nenhum antioxidante para o músculo sóleo, mas, para o músculo vasto lateral (tipo II), encontrou um significativo incremento na atividade da GSH-Px, GSH-Rd. Em nossos estudos, uma provável causa de a atividade da GSH-Rd no músculo sóleo não ter sido alterada de imediato, até 48 horas após a exaustão (Figura 8), seria um alto nível de EAO favorecendo nessa situação a atividade da CAT sobre a GSH-Px (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; POWERS e LENNON, 1999). Corroborando com nossos estudos, Hatao (2006) avaliou a atividade enzimática em pulmões de ratos *Wistars*, após um exercício agudo de 60 minutos com velocidade de 25m/min x 0°. Esse pesquisador não encontrou aumento de atividade na enzima GSH-Px, talvez devido a uma menor intensidade de exercício utilizado por esse autor, ou diferença de atividade, pois, em células de humanos, a atividade da GSH-Px é pouco maior nos pulmões do que no músculo esquelético 53 x 38 mg⁻¹ proteína respectivamente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Outros estudos têm demonstrado que o treinamento incrementa a atividade da GSH-Px e GSH-Rd (LEW e QUINTANILHA, 1991), porém, os resultados de Eydoux (2000) nos levam a sugerir que, mesmo após um período de treinamento, ao aplicar um turno agudo de exercícios até a exaustão, com alterações na homeostase, o sistema antioxidante pode não ser suficiente para combater o estresse oxidativo gerado. Também dando suporte aos nossos estudos de não encontrar significância para essa enzima no

músculo sóleo (Figura 8), há o estudo feito por Ji (1992), que observou que a concentração da GSH-Px, GSH-Rd é significativamente maior no sóleo (tipo I), do que no vasto lateral porção superficial (SVL) ou profunda (DVL), ambos do tipo II. Na realização de um turno agudo de exercício moderado para ratos sedentários, não houve alteração da atividade de nenhum dos antioxidantes para o músculo sóleo, mas, para o músculo vasto lateral DVL, houve um significativo incremento na atividade de GSH-Px, GSH-Rd.

A atividade da SOD no músculo EDL não foi significativa em nossos estudos (Figura 6). Gregorevic (2001) investigou a administração por inalação de oxigênio (hiperbárico), de forma aguda ou crônica, duas vezes por dia, durante 28 dias. Estimulou a produção de EAO e analisou, no músculo extensor longo dos dedos de ratos *Sprague Dawley*, os efeitos na resposta de atividade na enzima SOD. A administração crônica hiperbárica de oxigênio, por 28 dias, aumentou a atividade da superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD) em 241% nesse tipo de fibra rápida, todavia a aplicação aguda de 60 minutos de oxigênio hiperbárico não alterou a atividade da enzima SOD, em ambas isoformas: manganês e cobre/zinco no músculo EDL. Em nossos estudos, não encontramos no EDL nenhuma alteração para a atividade da enzima SOD (Figura 6), porém, no músculo sóleo, encontramos uma diminuição da atividade dessa enzima (Figura 9). Provavelmente o fato é que esse músculo possui resposta diferenciada ao estresse oxidativo (GREGOREVIC, 2001). Também ao contrário de nossos estudos, Hatao (2006) encontrou aumento na atividade da SOD, porém esse autor utilizou uma intensidade menor para o exercício agudo. Rinaldi (2006) estudou o efeito de treinamento na expressão gênica da enzima SOD no músculo cardíaco em ratos *Wistars* jovens (6 meses de vida), e envelhecidos (24 meses de vida). O treinamento consistiu de corrida em esteira ergométrica a uma intensidade de 30 m/min x 0° durante quarenta e cinco minutos e cinco dias por semana durante oito semanas. A expressão gênica da SOD, não diferiu entre os grupos de ratos sedentários jovens ou envelhecidos. MnSOD e CuZnSOD, foi significativamente maior nos grupos treinados e envelhecidos quando comparados com os grupos treinados ou sedentários e jovens. No presente estudo apesar de não ter investigado a expressão gênica de nenhuma enzima antioxidante; mesmo assim podemos contextualizar a possível ativação de genes para enzimas

antioxidantes por fatores de transcrição com incremento protéico, porém sem atividade enzimática como encontrado por Hollander (2001) após um turno agudo de exercício a 25 m/min x 5° de inclinação, esse pesquisador encontrou expressão para o gene da SOD com estímulo de mRNA para tradução de MnSOD e incremento de conteúdo protéico em músculo mais oxidativo, e um incremento de conteúdo protéico sem incremento de mRNA sem incremento protéico em músculos oxidativo e glicolíticos. Nosso estudo não encontrou significância para a enzima antioxidante SOD para o músculo EDL, porém com redução da atividade da catalase e incremento da atividade da glutathione reducase (Tabela 2). O presente estudo também encontrou uma queda abrupta da atividade da enzima antioxidante SOD no músculo EDL (fibras musculares rápidas Ila e I Ib) (POWERS 2005), essa queda ocorreu quarenta e oito horas após o exercício, bem no ponto onde a cinética de atividade dessa enzima era crescente (Figura 6), apesar de não significativo o resultado da enzima SOD para o músculo EDL, esse ocorrido nos levou a sugerir tempo diferenciado da locomoção de fatores de transcrição para o núcleo; como encontrado por Hollander (2001) onde o fator de transcrição NF- κ B ficou elevado por quarenta e oito horas pós um exercício agudo no músculo vasto lateral de rato (fibra rápida Ila), porém, levou duas horas para o maior estado de incremento, para o mesmo músculo o fator de transcrição AP1 se elevou apenas até uma hora pós exercício agudo. Outrossim, o mesmo fator de transcrição NF- κ B para o músculo vasto lateral (fibra rápida I Ib) a elevação do fator ocorreu dentro de dez horas e permaneceu até quarenta e oito horas. Ji (2004) aplicou um exercício agudo em animais sedentários à 25 m/min x 5° de inclinação durante uma hora até a exaustão e foram decapitados em uma cinética de 0, 1, 2, 4, 24, ou 48 horas após o exercício para análise do fator de transcrição NF- κ B no músculo vasto lateral e gastrocnêmio. Os dados encontrados sugerem que o caminho de sinalização do fator de transcrição NF- κ B pode ser ativado devido a contração muscular, presumivelmente devido ao incremento na produção de oxidantes EAO. Os eventos de cascata ocorrem para elevar a expressão do gene MnSOD. Portanto respostas de expressão gênica e de tradução podem ter influenciado a resposta da enzima SOD nesse estudo.

O presente estudo encontrou que a enzima SOD analisada no músculo sóleo apresentou alterações em sua atividade, com reduções significativas imediatamente após o exercício, até 48 horas, não sendo significativa para os grupos 8 e 24 horas (Figura 9). A menor atividade foi encontrada 4 horas após o exercício (-55,72%), quando comparada com o controle. Nos estudos de Hollander (2001), com fêmeas *Sprague Dawley* utilizando um exercício de exaustão em esteira (25 m/min, 5° de inclinação), onde foi observada a atividade da SOD no músculo vasto lateral (fibras IIa e IIb), em uma cinética ao longo do tempo entre 0 e 48 horas. Em ambos os tipos de fibras, não foram significantes mudanças na atividade dessa enzima, apesar deste ter encontrado incremento na quantidade de superóxido dismutase, manganês dependente (Mn-SOD) e de RNA mensageiro. Assim nos sugerimos que talvez Hollander (2002) não encontrou atividade dessa enzima devido à baixa intensidade do exercício. Oh-Ishi (1997) encontrou atividade dessa enzima após exercício agudo, no músculo sóleo de ratos, porém foi maior no grupo treinado. Recentemente Dekany (2006) estudou a resposta da SOD no sangue de diferentes atletas, frente a um exercício agudo aeróbio de intensidade progressiva. Esse autor também encontrou uma diminuição na atividade dessa enzima 5 minutos após o término do exercício agudo. Acikgoz (2006) investigou o efeito do exercício exaustivo agudo em esteira ergométrica nas enzimas antioxidantes SOD, GSH-Px e lipoperoxidação no tecido cerebral de ratos *Wistars* machos com vinte e quatro semanas de vida, em uma cinética de tempo de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas após o exercício de exaustão. A intensidade do exercício agudo de exaustão foi de 25 m/min x 5° de inclinação, essa intensidade foi atingida gradualmente. Os resultados não mostraram diferenças significantes para lipoperoxidação e atividade das enzimas SOD e GSH-Px para toda a cinética de tempo quando comparados com o grupo controle. O presente estudo encontrou significativa diminuição da atividade da enzima SOD, no músculo sóleo (Figura 9), talvez porque utilizamos uma maior intensidade (25 m/min x 10° de inclinação) e também devido a diferença de atividade para essa enzima (SOD) nos diferentes tecidos (cerebral e músculo esquelético) 408 x 282 U/mg de proteína respectivamente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Acikgoz (2006) também relata que a intensidade utilizada por ele 25 m/min x 5° de inclinação corresponde a 100% do VO₂ máximo, sendo que o mesmo não testou

isso por meio de testes nos animais; considerando também que o limiar anaeróbio encontrado por Pillis (1993) para essa espécie de animais é de 25 m/min x 10° de inclinação, sugerimos que Acikgoz (2006) não relacionou corretamente as variáveis limiar anaeróbio versus VO₂ máximo.

A atividade da enzima catalase no músculo EDL, entretanto, teve sua atividade reduzida em 25,54%, 24 horas após o término do exercício de exaustão quando comparado com o grupo controle (Figura 7). Pereira et al. (1994), em um modelo especial de treinamento de natação para ratos, encontrou elevada atividade da catalase aumentada em 100% em relação ao controle, 24 horas após a última sessão de treinamento no músculo gastrocnêmio, porção branca. Isso sugere diferentes respostas da enzima para o tipo de exercício, treinamento e fibra muscular, que pode envolver maior ou menor participação dos músculos ou a resposta diferenciada, conforme a carga de trabalho na via metabólica aeróbia, acarretando em uma maior ou menor produção de EAO por unidade de tempo. Esse ocorrido promove diferentes respostas dessa enzima nos diversos estudos e protocolos de exercício agudo. Segundo Clanton et al. (1999), uma elevada concentração mitocondrial de peróxido de hidrogênio via Mn-SOD, pela redução de ânion superóxido, pode agudamente reduzir a atividade da catalase.

O atual estudo, também encontrou que, no músculo sóleo, houve uma diminuição da atividade da catalase em 24,40% quando comparado com o controle sedentário, 4 horas após o término do exercício de exaustão (Figura 10). Hatao (2006) estudou a atividade enzimática em pulmões de ratos Wistars, após um exercício agudo de 60 minutos com velocidade de 25m/min x 0°. Esse pesquisador não encontrou aumento de atividade na enzima catalase ou por diferenças de atividade dessa enzima comparada entre os diferentes tecidos, 36 mg⁻¹/proteína x 210 mg⁻¹/proteína no músculo esquelético e pulmão respectivamente, ou talvez devido a uma menor intensidade de exercício utilizado por esse autor. Pinho (2006) estudou a relação de equilíbrio entre as enzimas antioxidantes SOD e CAT no músculo esquelético de ratos *Wistars* submetidos a treinamento e um grupo de animais não treinados, em esteira ergométrica. O protocolo de treinamento consistiu de doze semanas a velocidade de 17 m/min x 10° de inclinação durante cinquenta minutos por dia. Essa intensidade em nossos estudos correspondeu ao início do

acúmulo do lactato no sangue OPLA, sendo considerada de baixa intensidade. Os músculos analisados por Pinho (2006) foram gastrocnêmio (fibras mistas) e quadríceps (porção vermelha) onde a atividade das enzimas antioxidantes foi analisada quarenta e oito horas após o final da última sessão de exercício nos animais treinados ou não treinados. A atividade da enzima antioxidante catalase foi significativamente diminuída no grupo treinado quando comparado com os não treinados para ambos os músculos gastrocnêmio (misto) e quadríceps (porção vermelha); porém, SOD atividade foi significativamente incrementada no grupo treinado também em ambos os músculos gastrocnêmio (misto) e quadríceps (porção vermelha), o autor sugere que esses resultados estão de acordo com alguns estudos da literatura, e na contramão de outros. Portanto, o presente estudo que foi realizado em animais não treinados (sedentários) encontrou para o músculo sóleo (fibras vermelhas) uma relação de diminuição de atividade para ambas as enzimas SOD e CAT (Tabela 2), sugerindo um efeito deletério para o músculo esquelético. Pois segundo Petersen (2005) após o exercício são incrementados os níveis de citosinas pró-inflamatórias, estando nesse momento o músculo com a capacidade antioxidante diminuída e a produção de espécies ativas de oxigênio aumentada, tornando esse susceptível à lesão tecidual e processo inflamatório.

Vários autores, então, verificaram que a resposta das enzimas antioxidantes é altamente dependente de inúmeros fatores, incluindo: tipo de exercício e de programa de treinamento, duração, intensidade, exposição prévia ao exercício, idade do indivíduo, estado nutricional, tecido e tipo de fibra analisada, tempo de obtenção das amostras para análise e a técnica utilizada (SUZUKI, 2000; KHASSEF, 2001). Assim, observa-se uma discordância dos dados da literatura se o exercício agudo aumenta o nível de antioxidantes endógenos. Nós sugerimos que alguns autores não se utilizam de ferramentas ideais para padronizar o protocolo de exercício aplicado. Souza (2006) fez uma revisão da literatura comparando os efeitos dos exercícios aeróbios versus anaeróbios na atividade das antioxidantes. O autor relata que nos exercícios aeróbios agudo (em sedentários): aumenta a atividade da catalase nas fibras rápidas oxidativas, enquanto que nas enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase, essas incrementam nos três principais tipos de fibras (Tipo I, IIa e IIx). Porém, para o exercício

predominantemente anaeróbio ocorre uma diminuição da superóxido dismutase e nenhuma alteração na atividade da enzima glutathiona peroxidase. Esses resultados encontrados por Souza (2006) vão na contramão dos nossos estudos (Tabela 2), portanto nos sugerimos que a revisão feita por esse autor se utilizou de poucas linhas de base para a pesquisa, bem como se ateve mais na revisão de biomarcadores de lesão celular como a creatina quinase e de lipoperoxidação lipídica, como o malondialdeído. Portanto:

- ✓ Em todos resultados das antioxidantes observamos uma tendência de que as enzimas aumentem sua atividade 72 horas após o término do exercício. Isso nos leva a sugerir uma possível adaptação do sistema antioxidante.
- ✓ Sugerimos que os protocolos de exercício elaborados para estudos experimentais com animais de laboratório devem utilizar o limiar anaeróbio individual.
- ✓ Existe na literatura uma carência de estudos sobre a atividade das enzimas antioxidantes durante o exercício anaeróbio.
- ✓ No músculo sóleo não houve alterações significantes para a enzima glutathiona redutase em função da atividade diminuída das enzimas superóxido dismutase, e da catalase
- ✓ O estudo proporcionou novos conhecimentos, porém novos estudos são necessários para melhores esclarecimentos.

7 – CONCLUSÃO

Esse estudo levou às seguintes conclusões:

1. O exercício agudo padronizado previamente levou os animais à exaustão, produzindo os efeitos de estresse oxidativo esperado, tendo como base as alterações na atividade dos antioxidantes quando comparados com o controle.

2. Não é recomendado iniciar um protocolo de exaustão acima da intensidade de $21 \text{ m/min} \times 10^0$, deve-se considerar o limiar anaeróbio individual, para não superestimar alguns animais do grupo que podem possuir esse limiar abaixo do que é preconizado para essa espécie.

3. Os músculos EDL e sóleo expressaram diferentes padrões de respostas antioxidantes frente ao protocolo exercício utilizado. Para o músculo EDL, composto por fibras rápidas (Tipo II), o mesmo possui uma variedade entre fibras (tipo IIa e IIb), modulando a resposta antioxidante.

4. Os resultados encontrados no presente estudo, indica que para indivíduos não treinados ou sedentários; estes devem iniciar um programa de treinamento de corrida com intensidade baixa. Ou seja, não começar um treinamento de corrida no limiar anaeróbio.

5. A Resposta de recuperação do sistema antioxidante foi tardia dentro do período analisado. Chegando a 3 dias para que o sistema antioxidante enzimático retornasse a valores próximos ao de repouso.

8 – Resultados de produção com o estudo

Resumos enviados

BORGES, E.; VERLENGIA, R.; DOMINGUES, S. P. T.; TEIXEIRA, L. F. M.; SILVA, W. J.; HORII, L.; PALANCH, A. C.; CAVAGLIERI, C. R.; LEME, I. A. G.; PUGNINE, S. M.; MELO, M. Efeito do exercício de alta intensidade na cinética de resposta da enzima antioxidante SOD In: XI Congresso Ciências do Desporto e Educação Física dos países de língua portuguesa, 2006, São Paulo. **XI Congresso Ciências do Desporto e Educação Física dos países de língua portuguesa**. São Paulo: Rev.Bras.Educação Física Esp., 2006. v.20. p.277 – 295. Suplemento n. 5 (Anexo 4).

BORGES, E.; ROBERTO, V.; DOMINGUES, S.P.DE T.; TEIXEIRA, L.F.M.; **VERLENGIA, R.** Padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica com intensidade progressiva para ratos Wistar. **XXII Congresso Latinoamericano e 1º Iberoamericano de Ciências Fisiológicas**. 2006. v. 2 (4), p. 223-224. ISSN 1669-5410. Buenos Aires. Argentina. 4 a 7 de novembro de 2006 (Anexo 5).

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ABUD, R. L.; ABUD, R. L. e DIDIO, L. J. **Radicais livres e oxidação na atividade física**. In: CHORAYEB, N. e BARROS NETO, T. L. O exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos especiais e preventivos. São Paulo: Atheneu, 1999.

ACIKGOZ, O.; AKSU, I.; TOPCU, A.; KAYATEKIN, B. M. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. **Neurosci. Lett.**, v. 406, n. 1-2, p. 148 - 51, 2006.

AGUILAR-SILVA, R. H.; CINTRA, B. B.; MILANI, S.; MORAES, T. P.; TSUJI, H. Estado antioxidante do sangue como indicador da eficiência do treinamento em nadadores. **Rev. Bras. Cien. e Mov.** Brasília, v.10, n. 3, p. 07 - 11, 2002.

AGUILO, A.; TAULER, P.; FUENTESPINA, E.; TUR, J. A.; CORDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiol. Behav.**, v. 31, n. 84.1, p. 1 - 7, 2005.

ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. **J. Appl. Physiol.**, v. 64, n. 4, p.1333 - 1336, 1988.

AOI, W.; NAITO, Y.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; SAKUMA, K.; ICHIKAWA, H.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 4, p. 480 - 487, 2004.

ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 16, n. 6, p. 529 - 538, 1984.

* Referências ABNT 6023/2002

_____. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 22, n. 4, p. 429 - 435, 1990.

BABIOR, B. M. Oxigen dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.**, v. 298, n. 3, p. 659 - 668, 1978.

BARBANTI, V. J. **Teoria e prática do treinamento esportivo**. 2 ed. São Paulo: Edgar Blucher LTDA., 2004.

_____. **Dicionário de educação física e esporte**. 2 ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2003.

BECKMAN, K. B. e AMES, B. N. The Free Radical Theory of Aging Matures. **Physiol. Rev.**, v. 78, n. 2, p. 547 - 581, 1998.

BEERS, R. F. e SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J. Biol. Chem.**, v. 195, n. 1, p. 133 - 140, 1952.

BERGSTROM, J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 35, n. 7, p. 609 - 616, 1975.

BORGES, E.; DOMINGUES, S. P. T.; MILANO, L. F.; VERLENGIA, R. Padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica com intensidade progressiva para ratos Wistar. In: **XX II Congresso Latinoamericano e 1 Ibero Americano**, 2006, Argentina.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **J. Biochem.**, v. 128, n. 3, p. 617 - 630, 1972.

_____. Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. **J. Free Rad. Biol. Med.**, v. 1, n. 2, p. 131 - 138, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, n. 2, p. 248 - 254, 1976.

BROOKE, M. H., KAISER, K. K., Three "myosin ATPase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. **J. Histochem. & Cytochem.** v. 18, n. 2, p. 670 - 672, 1970.

BUCKLEY, J. D.; BOURDON, P. C.; WOOLFORD, S. M. Effect of measuring blood lactate concentrations using different automated lactate analyzers on blood lactate transition thresholds. **J. Sci. Med. Sport.**, v. 6, n. 4, p. 408 - 421, 2003.

CAMPOS, G; LUECKE, T.; WENDELN, H.; TOMA, K; HAGERMAN, F.; MURRAY, T.; RAGG, K.; RATAMESS, N.; KRAEMER, W.; STARON, R. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 88, n. 2, p. 50 -60, 2002.

CARLBERG, I e MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484 - 490, 1985.

CLANTON, T. L.; ZUO, L.; KLAWITTER, P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 222, n. 1, p. 253 - 262, 1999.

CLARKSON, P. M. e SAYERS, S. P. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 24, n. 3, p. 234 - 248, 1999.

CLARKSON, P. M.; NOSAKA, K.; BRAUN, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 24, n. 5, p. 512 - 520, 1992.

_____. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 24, n. 5, p. 234 - 248, 1999.

CLOSE, R. I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. **Physiol. Reviews**, v. 52, n. 1, p. 129 - 197, 1972.

COGGAN, A. R.; KOHRT, W. M.; SPINA, R. J.; KIRWAN, J. P.; BIER, D. M.; HOLLOSZY, J. O. Plasma glucose kinetics during exercise in subjects with high and low lactate thresholds. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, n. 5, p. 1873 - 1880, 1992.

COOPER, G. M. **A célula uma abordagem molecular**. 2 ed. Porto Alegre: Artemed, 2002.

DAVIES, K. J.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 107, n. 4, p. 1198 - 1205, 1982.

DELP, M. D. e DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 80, n. 4, p. 261 - 270, 1996.

DENADAI, B. S. **índices fisiológicos de avaliação aeróbia: Conceitos e aplicações**. Ribeirão Preto: BSD, 1999.

EBBELING, C. B. e CLARKSON, P. M. Exercise-induced muscle damage and adaptation. **Sports Med.**, v. 4, n. 3, p. 207 - 334, 1989.

EYDOUX, N.; PY, G.; LAMBERT, K.; DUBOCHAUD, H.; PREFAUT, C.; MERCIER, J. Training does not protect against exhaustive exercise-induced lactate transport capacity alterations. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.**, v. 278, n. 6, p. E1045 - 1052, Jun, 2000.

FANTONE, J. C. e WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radical and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Phatol.**, v. 107, n. 3, p. 397 - 418, 1982.

FEASSON, L.; STOCKHOLM, D.; FREYSSNET, D.; RICHARD, I.; DUGUEZ, S.; BECKMANN, J. S.; DENIS, C. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. **J. Physiol.**, v. 543, n. 1, p. 297 - 306, 2002.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61 - 68. 1997.

FIAMONCINI, R. L. **Análise do estresse oxidativo em jogadores juniores de futebol:** comparação entre pré e pós-exercício aeróbio e anaeróbio. 2002. 86p. Trabalho de conclusão de curso Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FRIDEN, J. Muscular pain after physical training *Lakartidningen*. **Swedish** v. 81, n. 18, p. 1825 - 1826. 1984.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, A. D. V.; KUBOTA, L. T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Quím. Nova.**, v. 27, n. 6, p. 980 - 985, 2004.

GREGOREVIC, P.; LYNCH, G. S.; WILLIAMS, D. A. Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 86, n. 1, p. 24 - 27, 2001.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R.; SANTOS, L. A.; KOKOBUM, E. Maximal lactate steady state in rats submitted in swimming exercise. **Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, v. 130, n. 1, p. 21 - 27, 2001.

GREEN, H; TUPLING, R; ROY, B; O'TOOLE, D; BURNETT, M; GRANT, S. Adaptations in skeletal muscle exercise metabolism to a sustained session of heavy intermittent exercise. **Am. J. Endocrinol. Metabolic.**, v. 278, n. 8, p. E118 - E126, 2000.

GUTH, L., SAMAHA, F. J., Qualitative differences between actomiosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. **Exp. Neurology**, v. 25, p. 138-152, 1969.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2 ed. Oxford, Clarendon Press, 1989.

_____. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford, Clarendon Press, 1999.

HATAO, H.; OH-ISHI, S.; ITOH, M.; LEEUWENBURGH, C.; OHNO, H.; OOKAWARA, T.; KISHI, K.; YAGYU, H.; NAKAMURA, H.; MATSUOKA, T. Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 127, n. 4, p. 384 - 390, 2006.

HWANG, J. H.; RA, Y. J.; LEE, K. M.; GHIL, S. H. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. **Archiv. Physiol. Med. Rehabilitation**. v. 87, n. 1, p. 20 - 26, 2006.

HEFFNER, J. E.; REPINE, J. E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **Amer. Rev. Resp. Dis.**, v.140, p. 531 - 554, 1989.

HERRERO, A.; BARJA, G. ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I-or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. **J. Bioenerg. Biomembr.**, V. 29, n. 3, p. 241 - 249, 1997.

HOLLANDER, J.; FIEBIG, R.; GORE, M.; OOKAWARA, T.; OHNO, H.; JI, L. L. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. **Pflugers Arch.**, v. 442, n. 3, p. 426 - 434, 2001.

INGALLS, C. P.; WARREN, G. L.; ARMSTRONG, R. B. Dissociation of force production from MHC and actin contents in muscles injured by eccentric contractions. **J. Muscle Res. Cell. Motility**, v. 19, n. 2, p. 215 - 224, 1998.

IVY, J. L., WITHERS, R. T., VAN HANDEL, P. J., ELGER, D. H., COSTILL, D. L. Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold. **J Appl. Physiol.**, v. 48, n. 3, p. 523 - 527, 1980.

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

_____. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, n. 5, p. 1854 -1859, 1992.

_____. Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 23, n. 2, p. 135 - 166, 1995.

_____. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappa β signaling pathway in rat skeletal muscle. **FASEB J.** v. 18, n. 13, p. 1499 - 506, 2004.

JONES D. A., NEWHAM D. J., ROUND J. M., TOLFREE, S. E. Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. **J. Physiol.**, v. 375, n. 3, p. 435 - 448, 1986.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2005.

KAMI, K.; SENBA, E. In vivo Activation of STAT3 Signaling in Satellite Cells and Myofibers in Regenerating Rat Skeletal Muscles. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 50, n. 12, p. 1579 - 1589, 2002.

KHASSAF, M. ; CHILD, R. B. , MCARDLE, A., ; BRODIE, D. A. ; ESANU, C. ; JACKSON, M. J. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. **J. Appl. Physiol.**, V. 90, n. 3, p. 1031 - 1035, 2001.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Ann. Intern. Med.**, v. 93, n. 3, p. 480 - 489, 1980.

KREGEL, K. C. Molecular Biology of thermoregulation invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, p. 2177 - 2186, 2002.

LAUGHLIN, M. H.; SIMPSON, T.; SEXTON, W. L.; BROWN, O. R.; SMITH, J. K.; KORTHUIS, R. J. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. **J. Appl. Physiol.**; v. 68, n. 6, p. 2337 -2343,1990.

LEEUWENBURGH, C.; HANSEN, P. A.; HOLLOSZY, J. O.; HEINECKE, J. W. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, n. 3, p. 186 - 192, 1999.

LEW, H.; QUINTANILHA, A. Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 16, n. 1, p. 59 - 68, 1991.

LOWE, D. A., WARREN, G. L., INGALLS, C. P., BOORSTEIN, D. B., ARMSTRONG, R. B. Muscle function and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury. **J. Appl. Physiol.**, v. 79, n. 4, p. 1260 - 1270, 1995.

MANCHADO, F. B.; GOBATTO, G. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R. Maximal Lactate Steady State In Running Rats. **Jep. online.**, v. 8, n. 5, p. 29 - 35, 2005

MARKLUND, S. e MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, n. 3, p. 469 - 474, 1974.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P. L.; **Bioquímica do exercício e do treinamento.** São Paulo: Manole. 2000.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I. & KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício. energia, nutrição e desempenho humano.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

MIYAZAKI, H.; OH-ISHI, S.; OOKAWARA, T.; KIZAKI, T.; TOSHINAI, K.; HA, S.; HAGA, S.; JI, L. L.; OHNO, H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 84, n. 12, p. 1 - 6, 2001.

MILNE, K. J. e EARL, G. N. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. **J Appl Physiol.**, v. 93, n. 3, p. 561 – 568, 2002.

NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, n. 2, 2001

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Savier, 2002.

NEWHAM, D. J., MCPHAIL, G., MILLS, K. R., EDWARDS, R. H. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. **J. Neurol. Sci.**, v. 61, n.1, p.109 - 122, 1983.

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

OKANO, A.H. Desempenho físico e respostas eletromiográficas dos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral durante esforços intermitentes anaeróbio em ciclistas. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

PAFFENBERG, R. S.; HYDE, R. T.; WING, A. L.; LEE, I. M.; JUNG, D. L.; KAMPERT, J. B. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, n. 3, p. 538 - 545, 1993.

PEREIRA, B.; COSTA ROSA L. F.; SAFI, D. A.; MEDEIROS, M. H.; CURI, R.; BECHARA, E. J. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. **Physiol. Behav.**, v. 56, n. 5, p.1095 - 1099, 1994.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, n. 4, p. 1154 -11 62, 2005.

PETTE, D.. Training effects on the contractile apparatus. **Acta. Physiol. Scandinavia**, v. 162, n. 3, p. 367 - 376, 1998.

PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; WOJTINA, J. Anaerobic Thershold in Rats. **Biochem. Physiol.**, v. 106A, p. 285 - 289, 1993.

PINHO, R. A.; ANDRADES, M. E.; OLIVEIRA, M. R.; PIROLA, A. C.; ZAGO, M. S.; SILVEIRA, P. C. L.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Imbalance in SOD/CAT

activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell. Biol. Int.**, v. 30, n. 10, p. 848 - 853, 2006.

POWERS, S. K. e HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício. Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho.** 5 ed. Barueri - SP: Manole, 2005.

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L. L.; MARTIN D.; HERB, R. A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 266, n. 2.2, p. 375 - 380, Feb. 1994.

POWERS, S. K. e LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 1025 -1033, 1999.

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

REID, M. B. Invited review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, n. 2, p. 724 - 731, 2001.

RINALDI B, C. G.; BOCCUTI, S.; FILIPPELLI, W.; RENGO, G.; LEOSCO, D.; ROSSI, F.; FILIPPELLI, A.; FERRARA, N. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. **Exp. Gerontol.**, v. 41, n. 8, p. 764 - 767, 2006.

ROBERTSON, J. D.; MAUGHAN, R. J.; DUTHIE, G. G.; MORRICE, P. C. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. **Clin. Sci.**, v. 80, n. 6, p. 611 - 618, 1991.

ROSENBERG, J. L.; EPSTEIN, L. M. **Química geral.** 8.ed. Porto Alegre: Bookman, 2003.

ROSSI, L.; TIRAPÉGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Revista Paulista de Educação Física**. v. 13, n. 1, p. 67-82, 1999.

SELMAN, C.; MCLAREN, J. S.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G.; SPEAKMAN, J. R. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 401, p. 255 - 261, 2002.

SEMIN, I.; ACIKGÖZ, O.; GÖNENC, S.; UYSAL, N.; KAYATEKIN, B.M. Antioxidant enzyme levels in intestinal and renal tissues after a 60-minute exercise in untrained mice. **Acta. Physiol. Hung.**, v. 88, n. 1, p. 55 - 62, 2001.

SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 79, n. 3, p. 686 - 675, 1995.

_____. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, n. 1, p. 368 - 370, 2001.

SHEPHARD, R. J. Cytokine responses to physical activity, with particular reference to IL-6: sources, actions, and clinical implications. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 22, n. 33, p. 165 - 182, 2002.

SIGNORI, J. L. e SIGNORI, S. L. **Atividade física e radicais livres**. São Paulo: Ícone, 1995.

SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v. 222, n. 11, p. 1 -15, 1984.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; ALVES, A. A.; SILVEIRA, L. R.; MARANGONI, S.; PEREIRA – DA - SILVA, L.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus

muscle of rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, n. 2, p. R1539 -R1545, 2000.

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

SOUZA, C. F.; FERNANDES, L. C.; CYRINO, E. S. Produção de espécies reativas de oxigênio durante o exercício aeróbio e anaeróbio. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, Florianópolis, v. 8, n. 2, p. 102-109, 2006.

STANGEL, M.; ZETTL, U. K.; MIX, E.; ZIELASEK, J.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P.; GOLD, R. H₂O₂ and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. **J. Neuropathol Exp. Neurol.**, v. 55, n. 1, p. 36 - 43, 1996.

STARON, R. S., PETTE, D.. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain the based fiber types in rat skeletal muscle. **Histochemistry**. v. 100, n. 4, p. 149 - 153, 1993.

STRYER, L. **Oxidative Phosphorylation. In: Biochemistry**. Lubert Styer ed. 4th ed. W.H. Freeman and Company. New York. Cap. 21, p. 529- 558, 1995.

STUPKA, N.; TARNOPOLSKY, M. A.; YARDLEY, N. J.; PHILLIPS, S. M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 4, p. 1669 -1678, 2001.

SUZUKI, K.; OHNO, S.; OH-ISHI; KIZAKI, T.; OOKAWARA, T.; RADÁK, Z.; TANIGUCHI, N.; IN: SEN, C. K.; PACKER, L.; HANNINEN, O. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. **Netherlands**. p. 243 - 296, 2000.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, n. 4, p. 533 - 538, 1998.

TRICOLI, W. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.**, v. 9, n. 2, p. 39 - 44, 2001.

TSIGOS, C.; PAPANICOLAOU, D. A.; KYROU, I.; DEFENSOR, R.; MITSIADIS, C. S.; CHOROUSOS, G. P. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 2, p. 4167 - 4170, 1997.

VOCES, J.; CABRAL, A. C.; PRIETO, J. G.; VILA, L.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D.; ALVAREZ, A. I. Ginseng administration protects skeletal muscle from oxidative stress induced by acute exercise in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 12, p. 1863 - 1871, 2004.

VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; LLORET, A.; MARQUEZ, R.; MIRIIANA, J. B., PALLARDÓ; SASTRE, J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB. Life.**, v. 50, n. 2, p. 271 - 277, 2000.

WEINECK, J. **Treinamento ideal**. 9 ed. São Paulo: Manole, 2003.

WILHELM FILHO, D. *et al.* Comparative antioxidant defences in vertebrates emphasis on fish and mammals trends. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 7, n. 4, p. 33 - 45, 2000.

YOSHIDA, T.; SUDA, Y.; TAKEUCHI, N. Endurance training regimen based upon Arterial blood lactate: effects on anaerobic threshold. **Eur. J. Appl. Physiol.**, V. 49, n. 2, p. 223 - 230, 1982.

10 – ANEXOS

ANEXO 1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **049** nas fls. **5** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rozangela Verlengia, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Caracterização da lesão muscular (apoptose ou necrose) no músculo de ratos e humanos frente ao exercício físico intenso e a resposta de defesa reparo**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Leonardo Silveira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **28.09.2004**.

São Paulo, 28 de setembro de 2004



Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA



Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

ANEXO 2 PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXAUSTÃO

Padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica com intensidade progressiva para ratos *Wistar*

TEMPO minutos	VELOCIDADE EM m/min	INCLINAÇÃO graus
5	13	0
5	14	0
5	14	2,5
10	14	5
5	15	5
5	16	5
5	17	5
5	21	5
10	21	10
Até exaustão	25	10

Borges, (2006)

ANEXO 3 TESTE MULTIPLO ALCANCE DE FISHER MÉTODO LSD

Comparação de significância para a enzima GSH-Rd no músculo EDL

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of concentração into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 2,16066, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean concentração from one level of tratamento to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 1	-1,192	2,4887
0 - 12	-0,638	2,4887
0 - 2	-2,488	2,4887
0 - 24	-1,56	2,4887
0 - 4	-0,202	2,4887
0 - 48	-2,022	2,4887
0 - 72	*-4,152	2,4887
0 - 8	-0,156	2,4887
0 - c	-1,272	2,4887
1 - 12	0,554	2,4887
1 - 2	-1,296	2,4887
1 - 24	-0,368	2,4887
1 - 4	0,99	2,4887
1 - 48	-0,83	2,4887
1 - 72	*-2,96	2,4887
1 - 8	1,036	2,4887
1 - c	-0,08	2,4887
12 - 2	-1,85	2,4887
12 - 24	-0,922	2,4887
12 - 4	0,436	2,4887
12 - 48	-1,384	2,4887
12 - 72	*-3,514	2,4887
12 - 8	0,482	2,4887
12 - c	-0,634	2,4887
2 - 24	0,928	2,4887
2 - 4	2,286	2,4887
2 - 48	0,466	2,4887
2 - 72	-1,664	2,4887
2 - 8	2,332	2,4887
2 - c	1,216	2,4887
24 - 4	1,358	2,4887
24 - 48	-0,462	2,4887
24 - 72	*-2,592	2,4887
24 - 8	1,404	2,4887
24 - c	0,288	2,4887
4 - 48	-1,82	2,4887
4 - 72	*-3,95	2,4887
4 - 8	0,046	2,4887
4 - c	-1,07	2,4887
48 - 72	-2,13	2,4887
48 - 8	1,866	2,4887
48 - c	0,75	2,4887
72 - 8	*3,996	2,4887
72 - c	*2,88	2,4887
8 - c	-1,116	2,4887

* denotes a statistically significant difference.

Comparação de significância para a enzima CAT no músculo EDL

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of concentração into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 2,72603, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean concentração from one level of tratamento to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 1	0,73	1,0175
0 - 12	0,142	1,0175
0 - 2	0,18	1,0175
0 - 24	0,92	1,0175
0 - 4	0,242	1,0175
0 - 48	0,082	1,0175
0 - 72	*-1,126	1,0175
0 - 8	0,744	1,0175
0 - c	-0,256	1,0175
1 - 12	-0,588	1,0175
1 - 2	-0,55	1,0175
1 - 24	0,19	1,0175
1 - 4	-0,488	1,0175
1 - 48	-0,648	1,0175
1 - 72	*-1,856	1,0175
1 - 8	0,014	1,0175
1 - c	-0,986	1,0175
12 - 2	0,038	1,0175
12 - 24	0,778	1,0175
12 - 4	0,1	1,0175
12 - 48	-0,06	1,0175
12 - 72	*-1,268	1,0175
12 - 8	0,602	1,0175
12 - c	-0,398	1,0175
2 - 24	0,74	1,0175
2 - 4	0,062	1,0175
2 - 48	-0,098	1,0175
2 - 72	*-1,306	1,0175
2 - 8	0,564	1,0175
2 - c	-0,436	1,0175
24 - 4	-0,678	1,0175
24 - 48	-0,838	1,0175
24 - 72	*-2,046	1,0175
24 - 8	-0,176	1,0175
24 - c	*-1,176	1,0175
4 - 48	-0,16	1,0175
4 - 72	*-1,368	1,0175
4 - 8	0,502	1,0175
4 - c	-0,498	1,0175
48 - 72	*-1,208	1,0175
48 - 8	0,662	1,0175
48 - c	-0,338	1,0175
72 - 8	*1,87	1,0175
72 - c	0,87	1,0175
8 - c	-1,0	1,0175

* denotes a statistically significant difference.

Comparação de significância para a enzima CAT no músculo sóleo

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of concentração into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 2,42091, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean concentração from one level of tratamento to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 1	*-5,49	4,16188
0 - 12	*-5,072	4,16188
0 - 2	-2,214	4,16188
0 - 24	*-5,41	4,16188
0 - 4	1,172	4,16188
0 - 48	*-4,362	4,16188
0 - 72	-3,72	4,16188
0 - 8	-2,284	4,16188
0 - c	-3,006	4,16188
1 - 12	0,418	4,16188
1 - 2	3,276	4,16188
1 - 24	0,08	4,16188
1 - 4	*6,662	4,16188
1 - 48	1,128	4,16188
1 - 72	1,77	4,16188
1 - 8	3,206	4,16188
1 - c	2,484	4,16188
12 - 2	2,858	4,16188
12 - 24	-0,338	4,16188
12 - 4	*6,244	4,16188
12 - 48	0,71	4,16188
12 - 72	1,352	4,16188
12 - 8	2,788	4,16188
12 - c	2,066	4,16188
2 - 24	-3,196	4,16188
2 - 4	3,386	4,16188
2 - 48	-2,148	4,16188
2 - 72	-1,506	4,16188
2 - 8	-0,07	4,16188
2 - c	-0,792	4,16188
24 - 4	*6,582	4,16188
24 - 48	1,048	4,16188
24 - 72	1,69	4,16188
24 - 8	3,126	4,16188
24 - c	2,404	4,16188
4 - 48	*-5,534	4,16188
4 - 72	*-4,892	4,16188
4 - 8	-3,456	4,16188
4 - c	*-4,178	4,16188
48 - 72	0,642	4,16188
48 - 8	2,078	4,16188
48 - c	1,356	4,16188
72 - 8	1,436	4,16188
72 - c	0,714	4,16188
8 - c	-0,722	4,16188

* denotes a statistically significant difference.

Comparação de significância para a enzima SOD no músculo sóleo

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of concentração into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 5,03017, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean concentração from one level of tratamento to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 1	-1,112	2,87243
0 - 12	0,56	2,87243
0 - 2	-0,784	2,87243
0 - 24	-2,368	2,87243
0 - 4	2,034	2,87243
0 - 48	-0,824	2,87243
0 - 72	*-5,59	2,87243
0 - 8	-1,778	2,87243
0 - c	*-4,35	2,87243
1 - 12	1,672	2,87243
1 - 2	0,328	2,87243
1 - 24	-1,256	2,87243
1 - 4	*3,146	2,87243
1 - 48	0,288	2,87243
1 - 72	*-4,478	2,87243
1 - 8	-0,666	2,87243
1 - c	*-3,238	2,87243
12 - 2	-1,344	2,87243
12 - 24	*-2,928	2,87243
12 - 4	1,474	2,87243
12 - 48	-1,384	2,87243
12 - 72	*-6,15	2,87243
12 - 8	-2,338	2,87243
12 - c	*-4,91	2,87243
2 - 24	-1,584	2,87243
2 - 4	2,818	2,87243
2 - 48	-0,04	2,87243
2 - 72	*-4,806	2,87243
2 - 8	-0,994	2,87243
2 - c	*-3,566	2,87243
24 - 4	*4,402	2,87243
24 - 48	1,544	2,87243
24 - 72	*-3,222	2,87243
24 - 8	0,59	2,87243
24 - c	-1,982	2,87243
4 - 48	-2,858	2,87243
4 - 72	*-7,624	2,87243
4 - 8	*-3,812	2,87243
4 - c	*-6,384	2,87243
48 - 72	*-4,766	2,87243
48 - 8	-0,954	2,87243
48 - c	*-3,526	2,87243
72 - 8	*3,812	2,87243
72 - c	1,24	2,87243
8 - c	-2,572	2,87243

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 4 CONGRESSO DOS PAÍSES DE LÍNGUA PORTUGUESA



Certificado



Certificamos que o trabalho "**Efeitos do exercício de alta intensidade na cinética de resposta da enzima antioxidante SOD**", de autoria de: **EDUARDO BORGES; SÉRGIO PAULO DE TARSO DOMINGUES; LUIS FELIPE MILANO TEIXEIRA; WAGNER JOSÉ DA SILVA; LÉA HORII; ADRIANNE PALANCH; CLÁUDIA CAVAGLIERI; ROZANGELA VERLENGIA; IVY ALINE GORDON LEME; SILVANA MARINA PUGINE; MARIZA DE MELO**, foi apresentado no XI Congresso de Ciências do Desporto e Educação Física dos Países de Língua Portuguesa, em 7 de setembro de 2006.


 Presidente do Congresso
 
 Diretor Regional do SESC -SP

Realização:         

Anexo 5 XXII Congresso Latinoamericano e 1 Iber-Americano de Ciências Fisiológicas da Argentina

Eduardo	Borges	BRASIL	eduardo.borges@terra.com.br	18-31
---------	--------	--------	-----------------------------	-------

Dear Participant :

We inform you that your abstract has been accepted and included in the Program. It must be presented as a poster (max height 1.50; max wide 0.90 mtrs). Time schedule will be in the web in few days. See poster number in the upper strip

Sincerely

Congress Secretariat

IBERO-ALACF

E-mail classificado pelo Identificador de Spam Inteligente.

Para alterar a categoria classificada, visite o [Terra Mail](#)

Esta mensagem foi verificada pelo [E-mail Protegido Terra](#).
Scan engine: McAfee VirusScan / Atualizado em 03/10/2006 / Versão: 4.4.00/4865
Proteja o seu e-mail Terra: <http://mail.terra.com.br/>

