

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS EXERCITADOS
EM DIFERENTES INTENSIDADES

MICHEL BARBOSA DE ARAÚJO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade (Área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

RIO CLARO
Estado de São Paulo-Brasil
Dezembro/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS EXERCITADOS
EM DIFERENTES INTENSIDADES

MICHEL BARBOSA DE ARAÚJO

Orientadora: MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade (Área de Biodinâmica da Motricidade Humana).

RIO CLARO
Estado de São Paulo-Brasil
Dezembro/2008

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão sempre presentes.
Em especial, o meu pai e minha mãe – amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora Aparecida que iluminaram meus caminhos, por me darem saúde, paz, sabedoria, conforto e alegria durante a realização deste projeto.

A minha querida orientadora em especial, Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello, pela sabedoria, força, profissionalismo, competência, amizade, por acreditar em mim e beleza dedicada à orientação deste trabalho, e paciência para me aturar durante esses dois anos. Muito obrigado do fundo do meu coração, a senhora é muito importante para mim e sempre será! .

À minha que foi e sempre será a eterna professora, Profa. Dra. Eliane Stevanato, pelo companheirismo, a confiança, apoio em todos esses anos, amizade, pelas sugestões, serei eternamente grato a você minha amiga!

Ao Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto, profissional extremamente competente, por aceitar carinhosamente o convite para compor a minha Banca de Dissertação de Mestrado, muito obrigado!

Aos docentes e funcionários do Departamento de Educação Física da UNESP Rio Claro, especialmente aos professores, Profa. Dra. Eliete Luciano, Prof. Dr. Sebastião Gobbi, Prof. Dr. Eduardo Kokubun, aos técnicos de Laboratório Clarice, Beto e China, pelos auxílios e amizade e aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Graduação, Pós – Graduação e Revista Motriz.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo fomento e acreditarem neste projeto.

Ao Prof. Dr. Renato Almeida da Universidade de Taubaté – UNITAU, por ser um dos meus incentivadores a buscar a carreira acadêmica e pelo carinho, amizade por todos esses anos, meu muito obrigado!

Agradeço imensamente meus três que considero meus mestres: Fúvia, Ricardo Contarteze e Fabrício, cada um com sua particularidade, mas sem sombra de dúvidas, pessoas verdadeiramente humanas, leais e acima de tudo humildes, agradeço do fundo do meu coração, vocês terão sempre um espaço comigo aonde quer que estejam!

Eu não tenho irmãs, mas aqui em minha breve passagem pelo Mestrado ganhei logo duas, Clecia e Carla. Minhas queridas irmãs, assim que as considero, eu fui, estou e estarei sempre sendo grato a vocês, aprendi muito, mas muito mesmo com as duas, obrigado pelo carinho, respeito, compreensão, disposição e amizade para comigo, obrigado! obrigado! obrigado! obrigado!

Aos amigos do laboratório e Pós - graduação: Gustavo, Ricardo D'Angelo, Camila, Ricardo (Rica), Rodrigo, José Alexandre, Barrão, Rayra, Soneca, Murf, que me ajudaram muito durante os experimentos.

Aos amigos de minha primeira moradia em república: Glaucio, Marcio, Leo, Gabriel, Luiz e Bola pelo companheirismo todo esse tempo.

Aos amigos de minha segunda moradia em república: Kiki, Fusca, Saci, Franz e Guloso pela amizade, força e alegria.

Aos amigos da Academia Vitay: Alda, Alessandra, Denize, Pé, Patrícia, Salma, Irineu e minhas alunas: Jô, Patricia Rosa, Denize Bianchine, Fátima Bassi, Fernanda, Silmara, Simone, Vilma e Beti, por confiarem em mim, me apoiarem e pela estimada amizade. Adoro vocês!

O Mestrado não se faz de amigos só dentro do laboratório, mas fora também, agradeço especialmente a Paula e Boto, esse lindo casal a qual tenho a honra de ser amigo, agradeço pelo carinho, respeito, admiração para comigo. Amo vocês!

A agradeço também ao Maurinho e Viviane, donos da pastelaria na rua 1, não só por matar minha fome nos momentos que precisei, mas por toda atenção, carinho e amizade de vocês, meu muito obrigado!

Aos amigos de Taubaté a qual tenho muito carinho que são: Rodrigo, Renato, Thomaz, Ney, Juninho, Periquita, Rodrigão pela eterna contribuição todos esses anos todos, que foi a simples e eterna amizade. Valeu!

Agradeço aos ratinhos, que cederam suas vidas em prol a ciência.

E ao final o agradecimento mais importante vai para minha família, aos meus pais Osvaldo e Lúcia, que sempre acreditaram nem mim, me deram forças, me apoiaram, fizeram todos os esforços do mundo para que eu pudesse realizar meus sonhos, me confortaram nos momentos de solidão. Meu pai e minha mãe AMO VOCÊS, vocês são tudo para mim, são o ar que eu respiro, a água que bebo e a terra que ando, saibam que serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram por mim, e se orgulhem de mim que logo serei Doutor!

E agradeço meus irmãos, Murilo e Rafael que sempre estiveram a me apoiar e a me dar forças. Amo vocês!

Agradeço minha cunhada Adelaide pela amizade e bons momentos juntos, agora que entrou pra família, cuide bem de meu irmão hein.. rs..rs..

Por fim, agradeço todos aqueles, amigos, colegas e familiares, que fizeram e fazem parte da minha vida e que muito contribuiriam para a realização deste trabalho.

RESUMO

São raros os estudos que associam variáveis metabólicas à intensidade de esforço em ratos. O presente estudo visou analisar os efeitos do treinamento físico em diferentes intensidades sobre biomarcadores de condicionamento aeróbio e de estresse oxidativo em ratos. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (90 dias), que tiveram a transição metabólica aeróbia / anaeróbia determinada pelo teste de Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL). O teste para determinação da MFEL foi composto de séries de 25 minutos de exercício de corrida em esteira, com diferentes velocidades, fixas em cada série, com intervalos de 48 horas entre elas e coleta de sangue a cada 5 minutos para dosagem de lactato. Em seguida, os ratos foram treinados 40 minutos por dia, 5 dias por semana, na velocidade equivalente à MFEL (TT) ou 25% superior essa (TS), por 8 semanas. Como controles, foram usados ratos mantidos sedentários (S). Ao final, todos os animais foram sacrificados para análise de biomarcadores de ataque oxidativo: produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico – TBARs, do sistema de defesa antioxidante: atividade da enzima catalase e de atividade celular: atividade da enzima fosfatase alcalina em diferentes órgãos: músculo sóleo, fígado, cérebro e sangue assim como aspectos do metabolismo da glicose (captação e oxidação da glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato) pelo músculo sóleo. Os principais resultados foram: No início do experimento, considerando todo o lote de animais avaliados, a maior parte dos animais (82%) obtiveram a MFEL na velocidade de 25m/min à concentração de $4,38 \pm 0,22$ mmol/L sanguínea de lactato. Ao final do experimento, a maior parte dos ratos treinados na TT (63,63%) apresentou MFEL na velocidade de 25m/min, à concentração sanguínea de lactato $3,10 \pm 0,27$ mmol/L. A maioria (54,54%) dos treinados TS teve MFEL na velocidade de 25m/min à concentração sanguínea de lactato de $3,36 \pm 0,62$ mmol/L. Os sedentários (72,72%) mostraram a MFEL na velocidade de 20m/min à concentração sanguínea de lactato de $4,83 \pm 0,67$ mmol/L. Os valores de TBARs (μ mol/L) foram no Soro: S $6,95 \pm 0,38$, TT $6,91 \pm 0,22$, TS $6,77 \pm 0,33$; no Cérebro: S $16,11 \pm 2,69$, TT $13,60 \pm 4,08$, TS $15,20 \pm 3,25$; no Fígado: S $19,57 \pm 3,39$, TT $17,03 \pm 2,93$, TS $17,77 \pm 2,88$ e Gastrocnêmio: S $8,34 \pm 2,72$, TT $7,74 \pm 1,42$, TS

7,48±1,7. Os valores da atividade da CAT ($\mu\text{mol}/\text{mg.Hb}$) foram, no Soro : S 82,93±23,35, TT 74,34±29,56, TS 79,59±23,46; no Cérebro: S 0,40±0,27, TT 0,27±0,08, TS 0,19±0,07; no Fígado: S 0,36±0,05, TT 0,40±0,04, TS 0,63±0,29 e Gastrocnemio: S 0,48±0,25, TT 0,44±0,20, TS 0,28±0,07. Os valores da atividade da enzima Fosfatase Alcalina ($\mu\text{mol}/\text{mg. proteína}$) foram, no Cérebro: S 59,47±9,66, TT 68,82±13,18, TS 85,76±9,92; no Fígado: S 10,96±1,93, TT 10,03±3,16, TS 10,11±2,07 e no Gastrocnemio: S 6,79±4,45, TT 5,28±2,05, TS 4,35±1,95. Quanto aos aspectos do metabolismo da glicose pelo músculo sóleo dos animais, ao final do experimento, os valores observados foram: Captação de glicose ($\mu\text{mol}/\text{g.h}$): S 14,87±3,83, TT 13,24±4,22, TS 19,96±2,6; oxidação de glicose ($\mu\text{mol}/\text{g.h}$): S 21,73±11,68, TT 24,68±11,09, TS 46,76±7,55; síntese de glicose ($\mu\text{mol}/\text{g.h}$): S 0,51±0,58, TT 0,43±0,17, TS 0,66±0,25; concentração de glicogênio ($\mu\text{mol}/\text{g.h}$): S 0,43±0,10, TT 0,51±0,12, TS 0,55±0,13 e produção de lactato ($\mu\text{mol}/\text{g.h}$): S 4,31±0,58, TT 4,71±0,39, TS 3,83±0,62. O treinamento físico nas intensidades equivalentes à transição metabólica e 25% superior a esta (TS), melhorou o condicionamento aeróbio dos animais, pois durante o teste de esforço no final do experimento, as concentrações de sanguíneas de lactato foram menores nos grupos treinados de que nos sedentários. Além disso, houve aumento da oxidação de glicose e redução da produção de lactato pelo músculo sóleo no treinamento efetuado acima da MFEL. O treinamento físico em intensidade superior a MFEL, ainda desencadeou, respostas compensatórias antioxidantes no fígado. Assim sendo os mecanismos de defesa antioxidantes adaptaram ao treinamento de maneiras distintas, nos diferentes órgãos e tecidos aqui estudados.

Palavras Chaves: estresse oxidativo, enzimas, esteira rolante

ABSTRACT

There are few the studies that associate metabolic variables to the intensity of the effort in rats. The present study aim to analyze the effects of physical training in different intensities on biomarkers of aerobic conditioning and of oxidative stress in rats. Wistar rats (80 days) that had the aerobic / anaerobic metabolic transition determined by Maximal Lactate Steady State test (MLSS) were used. The test for determination of MLSS was composed of 25 minutes treadmill running, with different speeds, fixed in each series, with intervals of 48 hours between them and collection of blood every 5 minutes for lactate dosage. Soon afterwards, the rats were trained 40 minutes a day, 5 days a week, in the speed equivalent to MLSS (MT) or 25% above it (AT), for 8 weeks. As controls, rats maintained sedentary (S) were used. At the end, all rats were sacrificed for analysis of biomarkers of oxidative attack: amount of substances that react with thiobarbituric acid - TBARs, of the antioxidant defense system: activity of the enzyme catalase and of cellular activity: activity of the enzyme alkaline phosphatase in different organs: muscle soleus, liver, brain and blood. Aspects of glucose metabolism (glucose uptake and oxidation, glycogen synthesis and lactate production) by the soleus muscle were also evaluated. The main results were: in beginning of the experiment, considering the whole lot of animals, in most of them (82%) the MLSS was obtained in the speed of 25m/min, to the concentration of 4.38 ± 0.22 mmol/L of blood lactate. At the end of the experiment, most of the rats training at the MLSS intensity (63,63%) presented MLSS in the speed of 25m/min, to the concentration of 3.10 ± 0.27 mmol/L of blood lactate. Most (54,54%) of those animals trained above-MLSS they had MLSS in the speed of 25m/min, to the concentration of 3.36 ± 0.62 mmol/L of blood lactate. The sedentary ones (72,72%) showed MLSS in the speed of 20m/min to the concentration of blood lactate of 4.83 ± 0.67 mmol/L. The TBARs concentration (μ mol/L) were as follows in the Blood: S 6.95 ± 0.38 , MT 6.91 ± 0.22 , AT 6.77 ± 0.33 ; in the Brain: S 16.11 ± 2.69 , MT 13.60 ± 4.08 , AT 15.20 ± 3.25 ; in the Liver: S 19.57 ± 3.39 , MT 17.03 ± 2.93 , AT 17.77 ± 2.88 and in the Gastrocnemius: S 8.34 ± 2.72 , MT 7.74 ± 1.42 , AT 7.48 ± 1.7 . The CAT activity values (μ mol/mg.Hb) was as follows in the Blood: S 82.93 ± 23.35 , MT 74.34 ± 29.56 , AT 79.59 ± 23.46 ; Brain: S 0.40 ± 0.27 , MT 0.27 ± 0.08 , AT 0.19 ± 0.07 ; in the Liver: S 0.36 ± 0.05 , - MT 0.40 ± 0.04 , AT 0.63 ± 0.29 and in the Gastrocnemius: S

0.48±0.25, - MT 0.44±0.20, AT 0.28±0.07. The values of Alkaline Phosphatase activity ($\mu\text{mol/mg}$. protein) were as follows in the Brain: S 59.47±9.66, MT 68.82±13.18, AT 85.76±9.92; in the Liver: S 10.96±1.93, MT 10.03±3.16, AT 10.11±2.07 and in the Gastrocnemius: S 6.79±4.45, MT 5.28±2.05, AT 4.35±1.95. In the soleus muscle of the animals to the end of the experiment the following values for glucose metabolism were observed: Glucose uptake ($\mu\text{mol/g.h}$): S 14.87±3.83, MT 13.24±4.22, AT 19.96±2.6; Glucose oxidation ($\mu\text{mol/g.h}$): S 21.73±11.68, MT 24.68±11.09, AT 46.76±7.55; Glucose synthesis ($\mu\text{mol/g.h}$): S 0.51±0.58, MT 0.43±0.17, AT 0.66±0.25; Glucose concentration ($\mu\text{mol/g.h}$): S 0.43±0.10, TT 0.51±0.12, AT 0.55±0.13 e Lactate production ($\mu\text{mol/g.h}$): S 4.31±0.58, MT 4.71±0.39, AT 3.83±0.62. Physical training at the intensities equivalent to the metabolic transition and 25% above to the this, improved the aerobic conditioning of the animals, since during the effort test at the end of the experiment, the concentrations of blood lactate were lower in the trained groups than in the sedentary one. Also, there was an increase in glucose oxidation and a decrease in lactate production by the soleus muscle in response to the training above the MLSS. The physical training at intensity above the MLSS, unchained antioxidant compensatory responses in the liver. Therefore, antioxidant defense mechanisms adapted to exercise training in the different ways, in the different organs and tissue here evaluated .

Key Words: oxidative stress, enzymes, treadmill running

SUMARIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
I - INTRODUÇÃO	1
II - OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
III - REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Conceito de estresse oxidativo	4
3.2. Exercício físico e estresses oxidativo	6
3.3. Transição metabólica	8
IV - MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. Animais	11
4.2. Grupos experimentais	11
4.3. Adaptação ao ergômetro	12
4.4. Determinação da transição metabólica aeróbia / anaeróbia	12
4.5. Avaliação do condicionamento aeróbio	13
4.6. Obtenção de material biológico	13
4.7. Preparação dos tecidos	13
4.7.1. Hemácias e plasma	13
4.7.2. Cérebro, Fígado e Músculo	14
4.8. Biomarcadores de ataque oxidativo:	14
4.8.1. Concentração dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) ...	14
4.9. Biomarcadores do sistema de defesa antioxidante:	15
4.9.1. Catalase (CAT)	15
4.10. Biomarcadores de atividade celular:	15
4.10.1. Fosfatase Alcalina	15
4.11. Indicadores do metabolismo muscular	15
4.11.1. Captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato	15
V – ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
VI – RESULTADOS	20
6.1. Indicadores somáticos	20
6.2. Indicador de condicionamento aeróbio	20
6.3. Biomarcadores do Sistema de Defesa Antioxidante e Ataque Oxidativo	21
6.4. Indicadores do metabolismo muscular	22
VII - DISCUSSÃO	33
VIII – CONCLUSÕES	43
IX-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
X- APÊNDICE	60
10.1. Parecer do Comitê de Ética para Experimentação Animal CEEA/UNITAU nº 018/08	60
10.2. Cópia do Artigo publicado na Revista Motriz - ARAÚJO, M. B. ; PRADA, F. J. A. ; MELLO, M. A. R. . Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço. Motriz (Rio Claro), v. 12, p. 307-312, 2007.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
Quadro 1. Protocolo de adaptação à esteira rolante.	11

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. A) Peso Corporal (g) e B) Ganho de Peso (g) dos animais durante o experimento.	21
Tabela 2. Ingestão alimentar (g/100de peso corporal) dos animais durante o experimento.	22
Tabela 3. Concentração de lactato sanguíneo entre o início e o final do experimento.	25
Tabela 4. Concentração de substancias que reagem ao ácido tiobarbiturico (TBARs, $\mu\text{mol/L}$) em soro cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio (nmol MDA/mg Proteína) dos animais ao final do experimento.	26
Tabela 5. Atividade da enzima Catalase ($\mu\text{mol/mg. Hb}$) em soro, cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/min. mg proteína}$) dos animais ao final do experimento.	27
Tabela 6. Atividade da enzima Fosfatase Alcalina (nmol/mg. proteína) em soro, cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/min. mg proteína}$) dos animais ao final do experimento.	28
Tabela 7. Captação ($\mu\text{mol/g.h}$) e oxidação ($\mu\text{mol/g.h}$) de glicose, síntese de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$), concentração ($\mu\text{mol/g.h}$) de glicogênio e produção de lactato ($\mu\text{mol/g.h}$) no músculo sóleo dos animais ao final do experimento.	29

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1. Sistema de incubação para medida do metabolismo de glicose no músculo sóleo. A) Frasco de incubação e aparato para a colocação de líquido de absorção de CO ₂ ; B) Frasco de incubação montado e C) Banho.	17
Figura 2. A) Peso Corporal (g) B) Ganho de Peso (g) dos animais durante o experimento.	21
Figura 3. Ingestão alimentar (g/100de peso corporal) dos animais durante o experimento.	22
Figura 4. Lactato Sanguíneo de um animal, a titulo de exemplo durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato no inicio do experimento.	23
Figura 5. Lactato Sanguíneo de um animal, a titulo de exemplo durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato no final do experimento.	24
Figura 6. Concentração de substancias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) em Soro, Cérebro, Fígado e Músculo Gastrocnêmio dos animais ao final do experimento.	26
Figura 7. Atividade da enzima Catalase (CAT) em soro, Cérebro, Fígado e Músculo Gastrocnêmio dos animais ao final do experimento.	27
Figura 8. Atividade da enzima Fosfatase Alcalina (FAT) em Cérebro, Fígado e Músculo Gastrocnêmio dos animais ao final do experimento.	28
Figura 9. Captação e oxidação de glicose, síntese de glicose, concentração de glicogênio e produção de lactato no músculo sóleo dos animais ao final do experimento.	30

I - INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos, e não enzimáticos, e, continuamente, causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1989).

Peroxidação de ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios das membranas celulares pode resultar em perda significativa da integridade da membrana, o que consiste em um dos mais marcantes efeitos dos danos oxidativos (TAPPEL, 1973), levando à geração de aldeídos e danos potencialmente nocivos. O teste não específico das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [TBARs] é frequentemente aplicado para inferir sobre os danos oxidativos aos lipídios (SILVEIRA, 2003). O papel fisiológico tecidual da enzima fosfatase alcalina pode estar associada a sistemas de transporte e atividade celular (CALHAU et al. 1999), de forma que a medida da atividade dessa enzima pode oferecer informações importantes para avaliação dos danos oxidativos ao funcionamento das células.

Para se protegerem contra a oxidação, os organismos contam com mecanismos químicos e enzimáticos (YU, 1994). O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase [SOD] (CuZn-SOD-Citosólica e extracelular e Mn-SOD-mitocondrial), catalase [CAT] (CAT-heme-enzima) e glutatona peroxidase [GR/GPX] (dependente e não dependente do selênio), para decomporem o ânion O_2^- , H_2O_2 e hidróxidos (YU, 1994).

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e mecanismo de defesa antioxidante. Durante o exercício físico ocorrem várias reações químicas que implicam na formação dos EROS. Para proteger os tecidos contra possíveis danos causados pelos EROS, as enzimas antioxidantes como SOD, catalase e GPX/GR, parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados (AVULA, FERNANDES, 1999; JENKINS, GOLD 1993; PEREIRA et al. 1996), embora haja contradições (PRADA et al. 2004).

Por razões óbvias, muitos estudos envolvendo estresse oxidativo e exercícios têm sido conduzidos em modelos animais, especialmente o rato. Contudo, esses estudos são passíveis erros, pois poucos associam as variáveis metabólicas com a intensidade do esforço nesses animais (PRADA et al. 2004).

II - OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos do treinamento físico em diferentes intensidades: equivalente à transição metabólica aeróbia / anaeróbia e 25% superior a esta, sobre biomarcadores de condicionamento aeróbio e de estresse oxidativo em ratos.

2.2. Objetivos específicos

- 1.** Determinar a transição metabólica aeróbia / anaeróbia individual dos animais;
- 2.** Submeter os animais ao treinamento em intensidades equivalentes à transição metabólica e 25% superior a ela;
- 3.** Avaliar o condicionamento aeróbio, pela medida das concentrações de Lactato sanguíneo durante sessões de exercício;
- 4.** Analisar biomarcadores de danos oxidativos aos lipídios, de membrana (produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico – TBARs), proteção antioxidante (atividade da enzima catalase) e de atividade celular (atividade da enzima fosfatase alcalina) em diferentes tecidos: músculo esquelético, fígado, cérebro e sangue;
- 5.** Analisar indicadores do metabolismo oxidativo (oxidação de glicose) no músculo esquelético.

III - REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Conceito de estresse oxidativo

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados na última camada de valência (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; SEN et al. 2001, SILVEIRA, 2003). Exemplos de radicais livres são o próprio oxigênio molecular (O_2), o radical hidroxila (OH^\cdot), o radical ânion superóxido (O_2^-), o radical peróxido nítrico ($ONOO^\cdot$), o radical alcoxi (RO^\cdot) e o óxido nítrico (NO) (PEREIRA, 1994; ARUOMA, 1994; YU, 1994; SJODIN; JACOBS et al. 1990; SEN et al. 2001, SILVEIRA, 2003). Destes radicais livres, o OH^\cdot e o O_2^- possuem grande importância biológica, porque são formados em várias situações durante o processo normal ou exacerbados de redução do O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993); durante a metabolização de bases purínicas no ciclo de Lowenstein (LOWENSTEIN, 1990); ou devido à redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo O_2^- catalizado por redutores como o Fe^{2+} e Cu^+ ou ascorbato (YU, 1994).

Existem, também, compostos igualmente reativos quanto os radicais livres, que não possuem elétrons não-pareados na última camada e, portanto, não podem ser chamados de radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROS) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), ânion nitroxila

(NO⁻) e o peróxido nitrito (ONOO⁻) (PEREIRA, 1994; PEREIRA, 1996; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; DRÖGE, 2002; COOPER et al. 2002).

A maior reatividade exibida pelos radicais livres, comparativamente a outros elementos, é consequência do menor tempo de vida média que possuem. Os radicais OH⁻ e O₂⁻ possuem vida média de 1×10^{-9} e 1×10^{-6} segundos respectivamente, enquanto o H₂O₂, superior 10^{-2} segundos e o O₂, superior a 10^{-2} segundos (YU, 1994). Esta meia vida extremamente curta deve-se à instabilidade eletrônica que apresentam. Isto resulta na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com quais venham a colidir, promovendo formação de outras espécies radicalares, como por exemplo, os radicais ONOO⁻ e RO⁻, formados durante a lipoperoxidação das membranas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989, SILVEIRA, 2003). Para se protegerem contra oxidação os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, selênio, cobre, zinco, ácido ascórbico entre outros diminuem a ação tóxica das EROS produzida intra e extracelularmente (YU, 1994; SEN et al. 2001).

O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases [SOD] (CuZn-SOD – citosólica e extracelular, Mn-SOD – mitocondrial), a catalase [CAT] (heme-enzima) e a glutathione peroxidase [GR/GPX] (dependente e não dependente de selênio) para decomponem respectivamente o ânion O₂⁻, H₂O₂ e lipoperóxidos (YU, 1994). A Glutathione redutase [GR] é uma enzima importante nesse processo uma que ela não age diretamente na remoção de radicais, mas é responsável pela regeneração da glutathione oxidada [GSSG] em sua forma reduzida [GSH], utilizando como substrato da enzima GPX.

A pesar das defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROS, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Quando acontece um desbalanço entre a produção de EROS e defesa antioxidante se

estabelece uma situação que se denomina estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

3.2. Exercício físico e estresses oxidativo

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. Durante os exercícios físicos, ocorrem várias reações químicas que levam à formação de radicais livres tais como O_2 , OH^\cdot , O_2^- , ROO^\cdot , RO^\cdot e NO (PEREIRA, 1994; BALAKRISSHNAN, 1998; SEN et al., 2001; VAN REMEN et al. 2003).

Durante o exercício, o O_2^- pode ser formado no músculo de várias maneiras (HESS; MANSON, 1984; SJODIN, 1990; ARUOMA, 1994; SEN et al. 2001; DIMEO & VENDIT, 2001; COOPER et al. 2002): na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra numa situação de hipóxia muscular e é “reperfundida” pelo oxigênio durante, por exemplo, pausa após um esforço de alta intensidade; por enzimas como xantina oxidase e pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase. O músculo esquelético também produz óxido nítrico (NO) pela reação da enzima óxido nítrico sintase (REID, 1996). O óxido nítrico pode reagir com O_2^- para formar peróxido nítrico, um intermediário instável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao radical hidroxila (BECKMAN et al. 1990, SEN et al. 2001; DRÖGE, 2002). Além disso, a presença de ferro, na forma livre ou ligada à heme, pode converter o radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton, em radical hidroxila, uma das espécies mais reativas que se conhece (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Aumento na peroxidação lipídica tem sido relatado após o exercício (ALESSIO & GOLDFARB, 1980; MIYAZAKI et al. 2001), embora nem sempre seja constatado (SELMAN et al. 2002; VIINIKKA, et al. 1984). O aumento na peroxidação lipídica parece ser tecido específico. AVULA e FERNANDES (1999) constataram redução da peroxidação lipídica nos rins e nas glândulas salivares e aumento da mesma no fígado de camundongos treinados por corrida em esteira analisados em repouso, em comparação aos sedentários. Nenhuma diferença foi constatada no músculo esquelético e cardíaco entre dois grupos. RADÁK et al. (1999) também não verificaram qualquer

diferença nos níveis de peroxidação lipídica no músculo esquelético de ratos treinados por natação e sedentários, analisados em repouso. Os níveis de pentano e etano apareceram duas a três vezes mais elevadas em comparação aos valores de repouso em homogeneizados de fígado e músculo esquelético de ratos depois da corrida até exaustão (GEE et al. 1981). ALESSIO e GOLDFARB (1980) constataram pequeno aumento na peroxidação tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos após exercício submáximo decorrida em esteira.

QUINDRY et al. (2003) observaram que duas horas após sessão única de exercício máximo, em indivíduos jovens do sexo masculino, ocorreu aumento de ânions superóxido (O_2^-) e decréscimo do teor de ácido ascórbico, indicando ocorrência de estresse oxidativo sanguíneo. RADÁK et al. (2003), relataram que o exercício aeróbico exaustivo (corrida de super maratona) causa estresse oxidativo e aumento da nitração e a carbonilação das proteínas séricas. OWEN et al. (2003) verificaram em um modelo com ratos, que o exercício agudo elevou os níveis cardíacos de peroxidação lipídica.

Em contrapartida, o treinamento físico de intensidade moderada é um procedimento que favorece a homeostase oxidativa das células e tecidos, por diminuir os níveis basais de danos oxidativos e aumentar a resistência ao estresse oxidativo (NEISS et al. 1999; DI MEO & VENDITTI, 2001; COOPER et al. 2003). O exercício regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante, as quais protegem as células contra os efeitos deletérios das EROS, prevenindo danos celulares resultantes (AGUILO et al. 2003).

Para proteger os tecidos contra danos causados pelos radicais livres produzidos durante o exercício físico as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPX/GR parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de animais e seres humanos treinados (PEREIRA et al. 1994; JENKINS, 1987; CLARKSON & THOMPSON, 2000; OSORIO et al. 2003). Isso ocorre principalmente em treinamento do tipo de endurance (SEN et al. 2001; MIYAZAKI et al. 2001; AVULA, FERNANDES et al. 1999). Por outro lado existem também relatos de aumento da peroxidação lipídica associada a não compensação completa ou redução de componentes do sistema antioxidante (glutaciona, ácido ascórbico e atividade glutaciona

peroxidase) (BENZI et al. 1993; BALAKRISHNAN & ANURADHA, 1998; SEN et al. 2001; OOKAWARA et al. 2003).

RUSH e SANDIFORD (2003) relataram que populações jovens, saudáveis, mas sedentárias, femininas apresentam concentrações plasmáticas da enzima antioxidante GPX, ligeiramente maior que a população masculina, mas o significado funcional disso não foi estabelecido. GROUSSARD et al. (2003), constataram que após sessão de exercício supra-máximo (teste de Wingate 30-s), sujeitos ativos não atletas mostraram aumento significativo da peroxidação lipídica (radicais lipídicos séricos detectados por ressonância eletro-spin), bem como redução das atividades das enzimas antioxidantes GPX e SOD nas hemácias. Concluíram, que o exercício supra – máxima fase estável de lactato induz ao estresse oxidativo.

O treinamento também aumenta a expressão das “heat shock proteins” (HSPs), proteínas com função de reparo de danos teciduais (HAMILTON et al. 2003; SIU et al. 2004), no músculo esquelético e cardíaco, sendo capaz de reduzir a ocorrência de apoptose (morte celular programada) em ratos submetidos ao treinamento aeróbio moderado, por diminuir os níveis de genes pró-apoptóticos e aumentar os níveis de genes anti-apoptóticos (SIU et al. 2004).

3.3. Transição metabólica

O fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção do exercício pode ser proveniente dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Durante o exercício moderado, as respostas fisiológicas estabilizam-se rapidamente e o oxigênio supre de maneira satisfatória a demanda energética. Em intensidades mais elevadas, a via metabólica predominante é a anaeróbia, o que resulta na redução abrupta do pH muscular em consequência da produção de lactato. Isso dificulta a manutenção do exercício por tempo prolongado, já que ocorre a inibição da atividade enzimática e redução da atividade do Ca^{++} a troponina (MCARDLE et al. 2003).

Existe uma zona de transição a partir da qual ocorre a mudança da predominância aeróbia para a anaeróbia, sendo essa zona de exercício extremamente importante para o condicionamento físico, treinamento e rendimento desportivo. Por

essa razão, diversas investigações acerca dessa zona de transição vêm sendo realizadas nas últimas décadas, resultando em diferentes protocolos de avaliação. Dentre os mais utilizados, destacam-se o limiar ventilatório observado WASSERMAN e McILROY (1964), a concentração de lactato sangüíneo para identificar o limiar anaeróbio (LAN), proposto por KINDERMAN et al. (1979), o limiar anaeróbio obtido pela concentração fixa de 4,0 mm (OBLA), inicialmente sugerido por SJODIN & JACOBS (1981), o modelo de potência crítica não invasiva e exaustiva proposto por MONOD e SCHERER (1965), entre outros.

Grande parte desses protocolos de avaliação utiliza a resposta do lactato sangüíneo, devido à fidedignidade dessa variável sangüínea na mensuração da intensidade de transição metabólica bem como excelente resposta ao treinamento físico, permitindo além da caracterização do esforço, acompanhamento da eficiência do treinamento.

O limiar anaeróbio (LAN) foi definido como a carga de trabalho na qual o lactato sangüíneo começa a se acumular desproporcionalmente durante o exercício, com cargas progressivas (WASSERMAN & McILROY, 1964) e, teoricamente, indica a máxima fase estável de lactato (MFEL) (MADER & HECK, 1986). A MFEL equivale a mais alta concentração sangüínea de lactato onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante o exercício com carga constante (HECK et al. 1985). O pressuposto de que o LAN coincide com MFEL mostrou-se verdadeiro em diferentes tipos de exercício, como corrida em esteira rolante e cicloergometria (STEGGMAN & KINDERMAN, 1982; HECK et al. 1985), entretanto a carga de exercício MFEL parece diferir do LAN na ergometria de braço (KRUGER et al. 1990) e no remo (BENEKE, 1995).

A MFEL também já foi utilizada para determinação da transição metabólica em ratos. GOBATTO et al. (2001) desenvolveram um estudo para a determinação do MFEL de ratos durante o exercício de natação. Nesse estudo, a MFEL foi obtida na carga de 6% do peso corporal à concentração sangüínea de lactato foi de 5.5 mmol/l de sangue. Mais recentemente, nosso grupo descreveu, também, um protocolo para determinação da MFEL de ratos durante exercício de corrida em esteira rolante. Neste

caso, a MFEL foi obtida na velocidade de 20m/min, à concentração de lactato sanguíneo 3,9 mmol/L. (MANCHADO et al., 2005).

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar com 90 dias de idade no início do experimento, que tiveram livre acesso à água e o alimento (ração comercial para roedores). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0cm, (5 animais por gaiola) sob condições de temperatura (25°C) e ciclo claro/escuro (12h / 12h) controladas. Todos os experimentos envolvendo animais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética para Experimental Animal da Universidade de Taubaté – UNITAU (registro CEEA/UNITAU nº 018/08). O projeto foi analisado por instituição distinta daquela onde foi conduzido, pelo fato de o Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, onde o estudo foi realizado, ainda não contar com Comitê de Ética para Experimentos com animais.

4.2. Grupos experimentais

- Sedentários (S) – mantidos inativos (*n. 12*);
- Treinados Transição Metabólica (TT) – submetidos ao treinamento de corrida em esteira rolante, na velocidade equivalente à transição metabólica aeróbia / anaeróbia, 40 min por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas (*n. 12*);

- Treinados acima da Transição Metabólica (TS) – submetidos ao treinamento em velocidade 25% superior à transição metabólica aeróbia / anaeróbia, 40 min por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas (*n. 12*).

4.3. Adaptação ao ergômetro

Previamente ao experimento, foi feita uma seleção dos ratos naturalmente “corredores”, e demais foram incluídos no grupo sedentário. Nas 3 semanas que antecederam o período de treinamento, os animais foram adaptados à corrida em esteira, conforme protocolo descrito no quadro 1.

Quadro 1. Protocolo de adaptação à esteira rolante.

Semanas	Velocidade (m/min)	Tempo (min)
1	10	5 a 10
2	15 a 20	5 a 10
3	25	10 a 20

4.4. Determinação da transição metabólica aeróbia / anaeróbia

Foi efetuada através da detecção da máxima fase estável de lactato (MFEL). Para determinação da MFEL foram realizadas séries de exercícios de 25 minutos de corrida em esteira rolante, a diferentes velocidades fixas a cada série, com intervalos de 48 horas entre elas e coleta de sangue (25 μ L) a cada 5 minutos, para dosagem de lactato. As coletas de sangue foram realizadas a partir de pequeno corte na extremidade da cauda do animal. Uma só incisão, efetuada antes do início do exercício, foi suficiente para a coleta de todas as amostras. A concentração sanguínea de lactato representativa da MFEL foi considerada na maior velocidade onde não ocorreu variação do lactato sanguíneo superior a 1,0mmol/L entre 10 a 25 min de exercício. A concentração de lactato sanguínea foi determinada por método enzimático (ENGELS et al.1978).

4.5. Avaliação do condicionamento aeróbio

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos a uma sessão de corrida em esteira na velocidade equivalente à MFEL por 25 minutos. Foram coletadas amostras de sangue, através de corte na extremidade distal da cauda, a cada 5 minutos de exercício para determinação das concentrações de lactato.

4.6. Obtenção de material biológico

Quarenta e oito horas após a realização da última sessão de exercício (no caso dos grupos treinados), os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg de peso corporal, intraperitonal) e, logo após, o sangue (8ml) foi coletado da veia hepática. Foram, também, coletadas amostras do músculo sóleo esquerdo, do fígado e do cérebro para avaliação dos seguintes biomarcadores: atividade da enzima catalase (CAT), produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e atividade da enzima fosfatase alcalina. O músculo sóleo direito foi isolado para avaliação da taxa de oxidação de glicose.

4.7. Preparação dos tecidos

4.7.1. Hemácias e plasma

O sangue foi coletado na veia hepática do mesmo animal, foi centrifugado 3 vezes a 2.500 rpm por 5 minutos em Tampão fosfato 0,05N (composição, em g/L: KH_2PO_4 , 1,34 e $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,1) com NaCl 0,9% pH 7,4. Após o isolamento da hemáceas, esta foram lisadas adicionando-se H_2O (1:1 v/v) e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos por duas vezes, a fim de retirar as membranas remanescentes. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi congelado -70°C para posterior análise. A dosagem de hemoglobina do hemolisado foi feita pelo método de DRABKIN (BEUTLER, 1975).

4.7.2. Cérebro, Fígado e Músculo

As amostras de tecidos (100 – 150mg) foram retiradas e tratadas adequadamente para cada determinação efetuada, como se segue. Para a determinação de TBARs, as amostras foram colocadas em tubo plástico (tipo RIA) contendo 1,5 mL de tampão fosfato 0,05N (composição, em g/L: KH_2PO_4 , 1,34 e $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,1) frio e homogeneizado no Polytron e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm. Em seguida foi separado o sobrenadante que foi armazenado a -20°C para posterior análise.

Para a determinação da atividade da Catalase, as amostras foram colocados em tubos tipo eppendorf contendo 1 mL de tampão fosfato 0,05N (composição, em g/L: KH_2PO_4 , 1,34 e $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,1) gelado, submetidas a sonicação e centrifugadas 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para posterior análise.

Para determinação da atividade da Fosfatase Alcalina, as amostras foram sonicadas em 500 uL de água destilada gelada e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos à 10°C , sendo o sobrenadante separado e armazenado a -20°C para posterior dosagem.

4.8. Biomarcadores de ataque oxidativo:

4.8.1. Concentração dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 5nm, ou por fluorescência a 515nm de excitação e 555nm de emissão (OKAWA et al., 1979).

4.9. Biomarcadores do sistema de defesa antioxidante:

4.9.1. Catalase (CAT)

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras dos tecidos a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10mM, (AEBI, 1984). A queda nos valores de absorbância do H₂O₂ é seguida espectrofotometricamente a 240nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde a é o volume de amostra na cubeta e b é o volume total da cubeta, A₁ o valor da absorbância em t=0 e A₂ são os valores da absorbância no tempo final, que em nosso caso se dá aos 15 segundos após o início da reação (AEBI, 1984).

4.10. Biomarcadores de atividade celular:

4.10.1. Fosfatase Alcalina

Foi determinada pelo método colorimétrico, por meio do kit labtest.

4.11. Indicadores do metabolismo muscular

4.11.1. Captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato

O músculo sóleo direito foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais, pesando entre 25 e 35 mg, foram colocadas em frascos de cintilação com

capacidade de 20ml siliconizados, contendo 1,5 ml de tampão Krebs-Ringer bicarbonato. Os frascos foram fechados com tampas de borracha, selados com anel plástico e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubnoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂/CO₂ (95%/15%). Após esse período, as fatias do músculo foram transferidas para novos frascos de cintilação (frasco externo) em cujo interior foram instalados pequenos tubos em forma de concha (frasco interno) (Fig.1) com uma haste reta de aproximadamente três cm de comprimento que se insere nas tampas de borracha do frasco externo.

Cada frasco externo continha 1,5 ml de tampão Krebs-ringer e cada frasco interno, 700µl de hiamina10x. Após 60 minutos de incubação nesse sistema, com gaseamento durante os 15 primeiros minutos, foram adicionados 100µl de ácido tricloroacético (TCA) 25% ao frasco externo, visando à liberação de CO₂. A preparação foi mantida por mais 3 horas no sistema. Porém com a fatia do músculo fora do alcance da solução com TCA. Decorrido esse tempo, 200µl do líquido contido no frasco interno foram retirados para a determinação do CO₂ produzido. O meio de incubação acidificado contido no frasco externo foi armazenado para a determinação do lactato e a fatia de músculo imediatamente digerida em 0,5 ml de KOH para extração (SJÖRGREEN et al., 1938) e dosagem (DUBOIS, et al., 1956) do glicogênio muscular. A temperatura na pré-incubação e incubação será de 37° C.

O tampão Krebs-Ringer, base dos meios de pré-incubação e incubação, é constituído de: NaCl 06%, NaHCO₃ 019%, HEPES 6,64mM, KCl 0,032%, CaCl₂ 1,14nM, KH₂PO₄ 0,015%, MgSO₄ 0,03%. A solução assim preparada foi gaseada durante 20 a 30 minutos em O₂/CO₂ (95%/15%) e o pH ajustado a 7,4. A esta solução foram adicionados 20 volumes de albumina sérica bovina livre de gordura. Ao meio de

pré-incubação foi adicionado piruvato de sódio para concentração de 5 mM. Ao meio de incubação, foi adicionada glicose (5,5mM) contendo [U-¹⁴C] glicose (0,25 µCi/ml), [³H] 2-deoxiglicose (2DG=0,5µCi/ml) e insulina (100µUI/ml). Feitas às adições, o pH foi ajustado a 7,4 e os meios transferidos para os frascos que foram selados e equilibrados no banho a 37° C sob gaseamento em O₂/CO₂ (95%/15%) durante pelo menos 15 minutos. Fatias do mesmo músculo com peso semelhante àquelas incubadas foram utilizadas para determinação da concentração controle de glicogênio.

Foram avaliadas captação de glicose, utilizando-se a 2 DG como marcador, e incorporação do ¹⁴C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ³H da 2 DG ¹⁴C da glicose, respectivamente, através de contador de partícula beta. O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólicos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma). Para a estimativa da glicose oxidada (produção de CO₂), foi determinada a radioatividade do ¹⁴C presente no líquido (hiamina) coletado do frasco interno do sistema de incubação.

A)



B)



C)



Figura 1. Sistema de incubação para medida do metabolismo de glicose no músculo sóleo. A) Frasco de incubação e aparato para a colocação de líquido de absorção de CO₂; B) Frasco de incubação montado e C) Banho.

V – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita por ANOVA *one way* e aplicação do teste post-hoc de Newman-Keuls, onde adequado, com nível de significância pré-fixado em 5%.

VI – RESULTADOS

6.1. Indicadores somáticos

A tabela 1 e a figura 2 (A) mostram os valores do peso corporal dos animais de todos os grupos avaliados. Fica evidente que ambos os protocolos de treinamento (TT e TS) reduziram significativamente o peso corporal dos animais ao longo do experimento. Isso se refletiu em redução do ganho de peso nos animais treinados.

A tabela 2 e a figura 3 mostram os valores de ingestão alimentar dos animais durante todo experimento. A ingestão alimentar de todos os animais manteve-se estável ao longo do estudo, não havendo diferenças significativas entre os grupos.

6.2. Indicador de condicionamento aeróbio

Os valores de lactato sanguíneo durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) encontrados no início do experimento, referentes a um rato, a título de exemplo acham-se na figura 4. Para esse animal, a MFEL ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração de $4,11 \pm 0,53$ mmol/L sanguínea de lactato. Considerando todo o lote de animais avaliados, 82% dos animais obtiveram a MFEL na velocidade de 25m/min à concentração de $4,38 \pm 0,22$ mmol/L sanguínea de lactato e 17% obtiveram na velocidade de 30m/min à concentração de $4,42 \pm 0,45$ mmol/L sanguínea de lactato.

Os valores de lactato sanguíneo durante o teste de esforço para determinar a MFEL no final do experimento, referentes a um rato de cada grupo, a título de exemplo acham-se na figura 5. Considerando todo lote de animais sedentários avaliados ao final do experimento, a maior parte dos animais (72,72%) obteve a MFEL na velocidade de 20m/min a concentração de $4,83 \pm 0,67$ mmol/L sanguínea de lactato. Em relação aos treinados na intensidade de transição metabólica (TT), a maior parte dos animais (63,63%) obteve a MFEL na velocidade de 25m/min a concentração de $3,10 \pm 0,27$ mmol/L sanguínea de lactato. Quanto aos treinados na intensidade superior a (TS), a maior parte dos animais (54,54%) obteve a MFEL na velocidade de 25m/min à concentração de $3,36 \pm 0,62$ mmol/L sanguínea de lactato.

Na tabela 3 encontram-se os valores referentes à diferença de concentração de lactato sanguíneo de máxima estabilização entre o início e o final do experimento. No início do experimento os animais mantidos sedentários apresentaram a média de concentração de $4,86 \pm 1,30$ mmol/L sanguíneos lactato, sendo que ao final do experimento os animais deste grupo apresentaram a concentração de $4,83 \pm 0,67$ mmol/L obtendo assim uma diminuição de 0,03 mmol/L na concentração sanguínea de lactato. Em relação aos animais do grupo TT, estes apresentaram a concentração de $3,93 \pm 0,49$ mmol/L sanguínea de lactado no início do experimento e concentração de $3,10 \pm 0,27$ mmol/L ao final do experimento, havendo também uma diminuição na concentração de 0,83 mmol/L sanguínea de lactato. Quanto aos animais do grupo TS, os mesmos apresentaram a concentração de $3,61 \pm 0,62$ mmol/L no início do experimento e de $3,36 \pm 0,62$ mmol/L ao final do experimento, não havendo diferença significativa entre os valores.

6.3. Biomarcadores do Sistema de Defesa Antioxidante e Ataque Oxidativo

Na tabela 4 e figura 6 são apresentados os valores da concentração da substâncias que reagem ao ácido tiobarbiturico (TBARs) no sangue, no cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio dos animais no final do experimento. Os valores não apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados.

A tabela 5 e figura 7 mostram os valores referentes à atividade da enzima catalase no sangue, cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio dos animais ao final do

experimento. Houve aumento significativo da atividade da catalase no fígado dos animais do grupo TS.

Na tabela 6 e figura 8 acham-se os valores da atividade da enzima fosfatase alcalina no cérebro, fígado e gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Notou-se aumento da atividade desta enzima no cérebro dos animais TS em relação aos grupos TT e Sedentário.

6.4. Indicadores do metabolismo muscular

Na tabela 7 e figura 9 são apresentados os valores da captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio, concentração de glicogênio e produção de lactato no músculo sóleo dos animais ao final do experimento. Houve um aumento na oxidação de glicose dos animais TS em relação aos grupos TT e Sedentário. Já a síntese de glicogênio apresentou aumento entre os animais dos grupos Treinados (TS) em relação ao grupo TT. A captação de glicose apresentou diminuição no grupo de animais TS em relação aos animais do grupo Sedentário. A produção de lactato apresentou também diminuição no grupo de animais TS em relação aos animais TT. A concentração de glicogênio não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados.

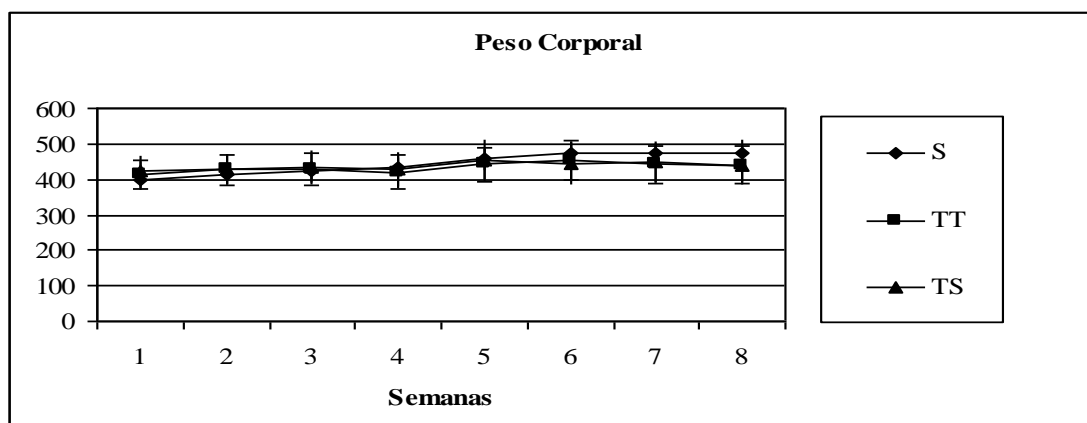
Tabela 1. Peso Corporal (g) e ganho de peso (g) dos animais durante o experimento.

Semanas	S (12)	TT (12)	TS (12)
1°	400,54±33,04	412,64±41,37	423,41±47,09
2°	412,95±31,74	426,43±42,80	430,74±45,12
3°	432,25±31,36	427,77±45,03	434,73±47,08
4°	432,25±31,36	418,84±47,71	430,82±50,18
5°	456,42±33,06	441,25±48,79	455,52±56,80
6°	471,64±31,07	454,28±54,59	446,21±60,69
7°	474,91±34,49	441,23±51,68	446,23±56,85
8°	474,89±39,22	439,25±52,80	440,22±58,21
Ganho de Peso	74,15 ± 23,00	27,33 ± 17,36 ^b	27,83 ± 20,13 ^a

Resultados expressos com média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses.

Diferenças significativas (ANOVA p.< 0,05/teste de Newman-Keuls) a- S x TS, b – S x TT

A)



B)

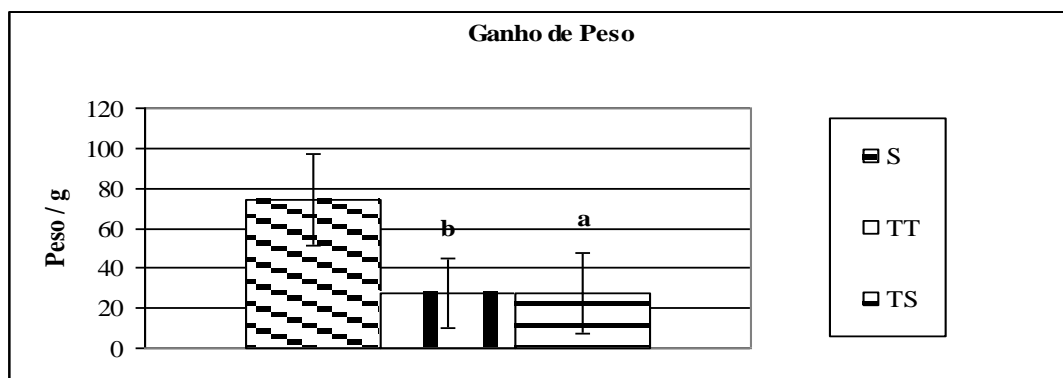


Figura 2. A) Peso Corporal (g) e B) Ganho de Peso (g) dos animais durante o experimento. Resultados expressos com média ± desvio padrão de 12 animais por grupo. Diferenças significativas (ANOVA p.< 0,05/teste de Newman-Keuls) a- S x TS, b – S x TT

Tabela 2. Ingestão alimentar diária (g/100 de peso corporal) dos animais durante o experimento.

Semanas	S (12)	TT (12)	TS (12)
1º	5,45±0,51	5,57±0,21	5,48±0,48
2º	6,10±0,54	5,58±0,26	5,32±0,29
3º	5,79±0,19	5,44±0,44	5,07±0,51
4º	6,19±0,1	5,23±0,07	5,15±0,24
5º	5,66±0,04	5,42±0,48	5,64±0,57
6º	6,11±0,57	5,39±0,58	4,93±0,55
7º	5,57±0,39	5,56±0,37	5,32±1,26
8º	5,39±0,01	5,19±0,39	5,96±1,26

Resultados expressos com média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses.

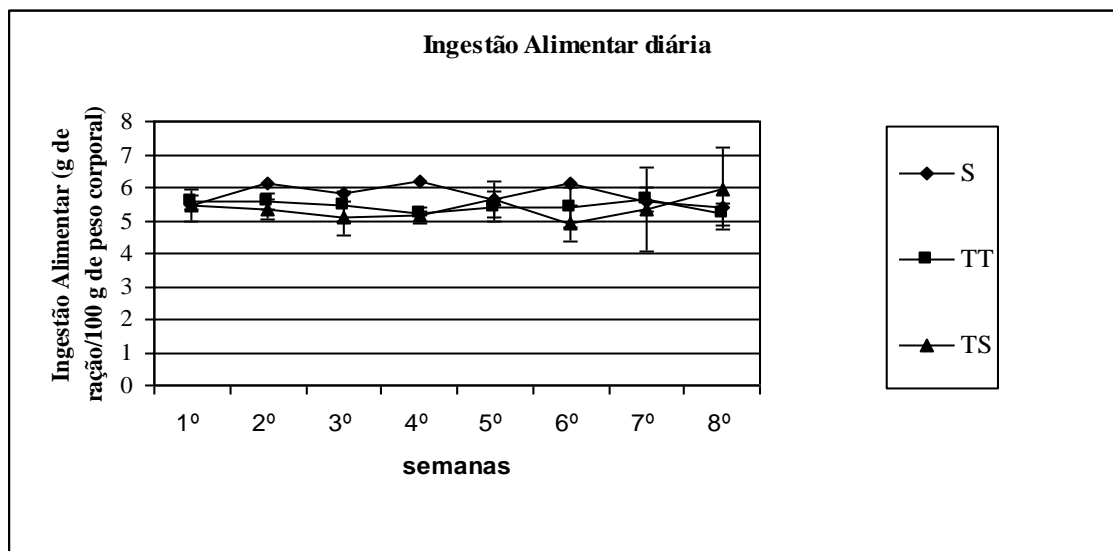


Figura 3. Ingestão alimentar dos animais durante o experimento. Resultados expressos com média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo.

Teste de esforço inicial no início do experimento

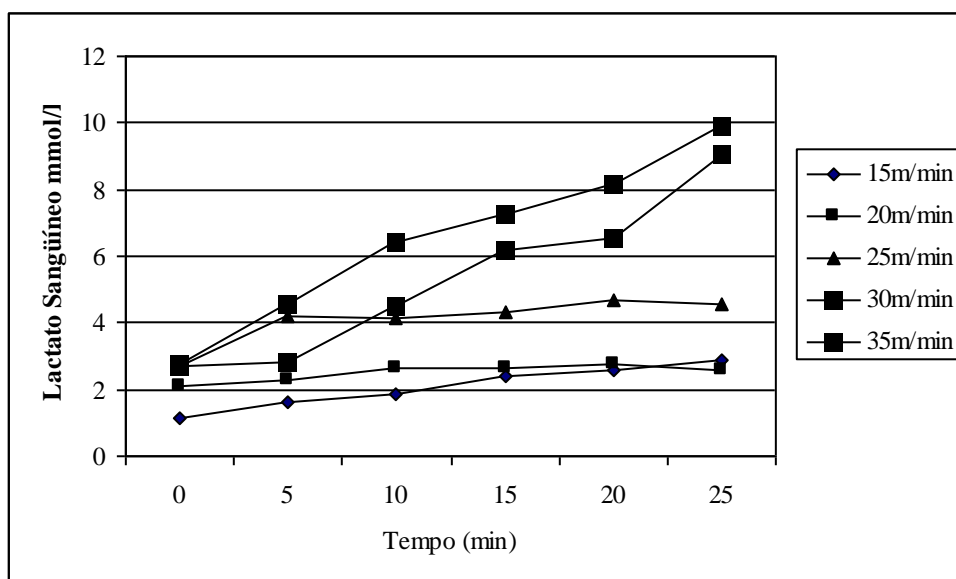
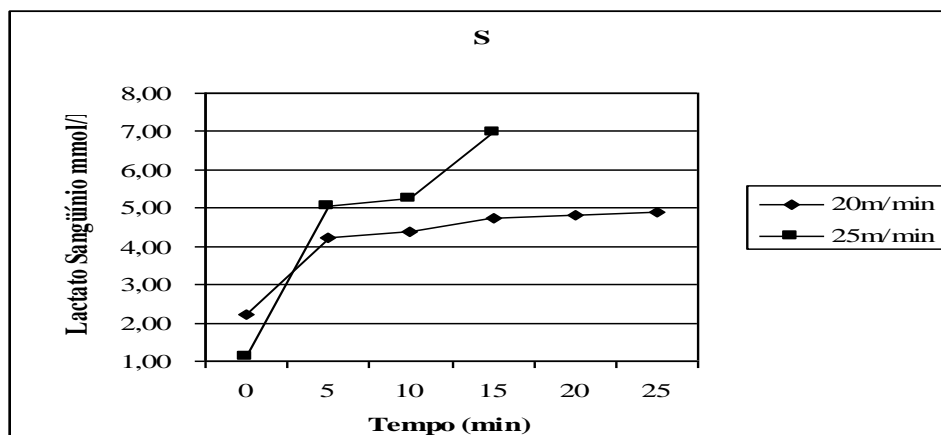


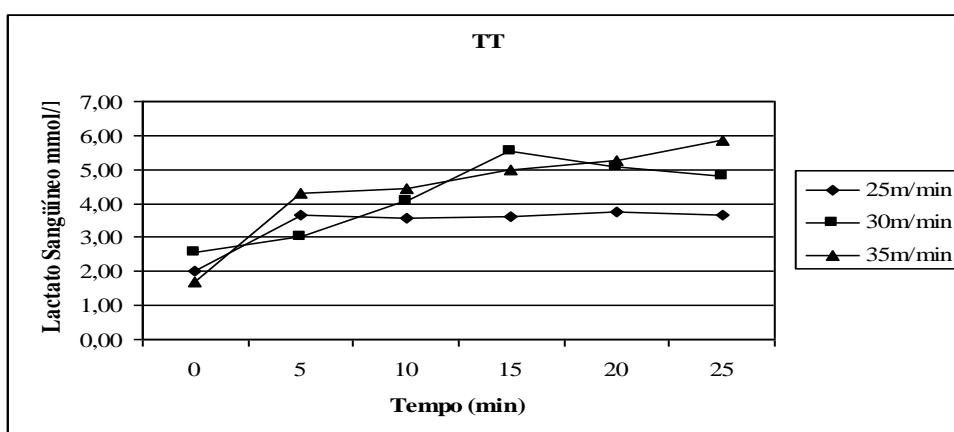
Figura 4. Lactato Sanguíneo de um animal, a título de exemplo durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato no início do experimento. Para esse animal, a MFEL ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração sanguínea de lactato de $4,11 \pm 0,53$ mmol/L.

Teste de esforço ao final do experimento

A)



B)



C)

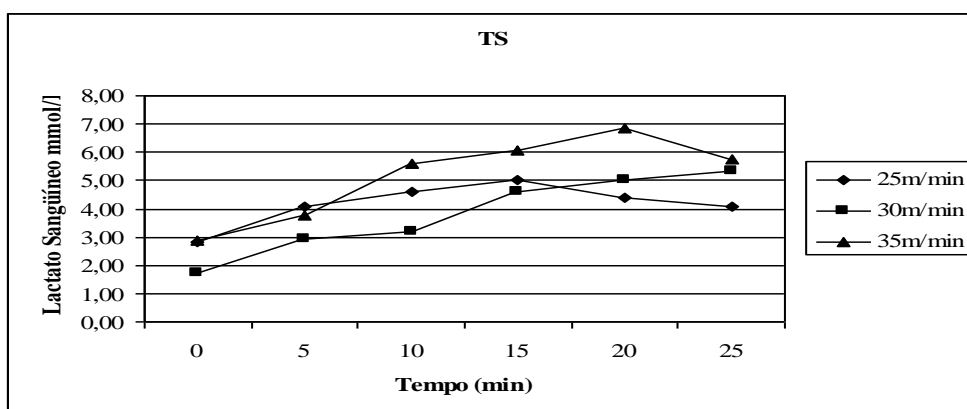


Figura 5. Lactato Sanguíneo de um animal, a título de exemplo durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato no final do experimento. **A)** Grupo S; **B)** Grupo TT e **C)** Grupo TS. Para o rato do grupo S a MFEL ocorreu na velocidade de 20m/min à concentração sanguínea de lactato de $4,90 \pm 1,02$ mmol/L, o animal não suportou a realização do exercício na velocidade de 35m/min. Para o rato do grupo TT ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração de $3,37 \pm 0,67$ mmol/L. Para o animal do grupo TS ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração de $4,16 \pm 0,74$ mmol/L.

Tabela 3. Concentração sanguínea de lactato em máxima estabilização no início e no final do experimento.

	S (10)	TT (6)	TS (7)
Concentração lactato sanguíneo no início do experimento	4,86 ± 1,30	3,93 ± 0,49 _b	3,61 ± 0,52 _a
Concentração de lactato sanguíneo no final do experimento	4,83 ± 0,67	3,10 ± 0,27 _b	3,36 ± 0,62 _a
Diferença entre início e o final	0,03 mmol/L	0,83 mmol/L _b	0,25 mmol/L _{a c}

Resultados expressos com média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls) a- S x TS, b – S x TT, c- TS x TT

Tabela 4. Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbiturico (TBARs, $\mu\text{mol/L}$) em soro, cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio (nmol MDA/mg Proteína) dos animais ao final do experimento

	S (10)	TT (6)	TS (7)
Soro	$6,95 \pm 0,38$	$6,91 \pm 0,22$	$6,77 \pm 0,33$
Cérebro	$16,11 \pm 2,69$	$13,60 \pm 4,08$	$15,50 \pm 3,25$
Fígado	$19,57 \pm 3,39$	$17,03 \pm 2,93$	$17,77 \pm 2,88$
Gastrocnêmio	$8,34 \pm 2,72$	$7,74 \pm 1,42$	$7,48 \pm 1,7$

Resultado expresso com média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses.

TBARs

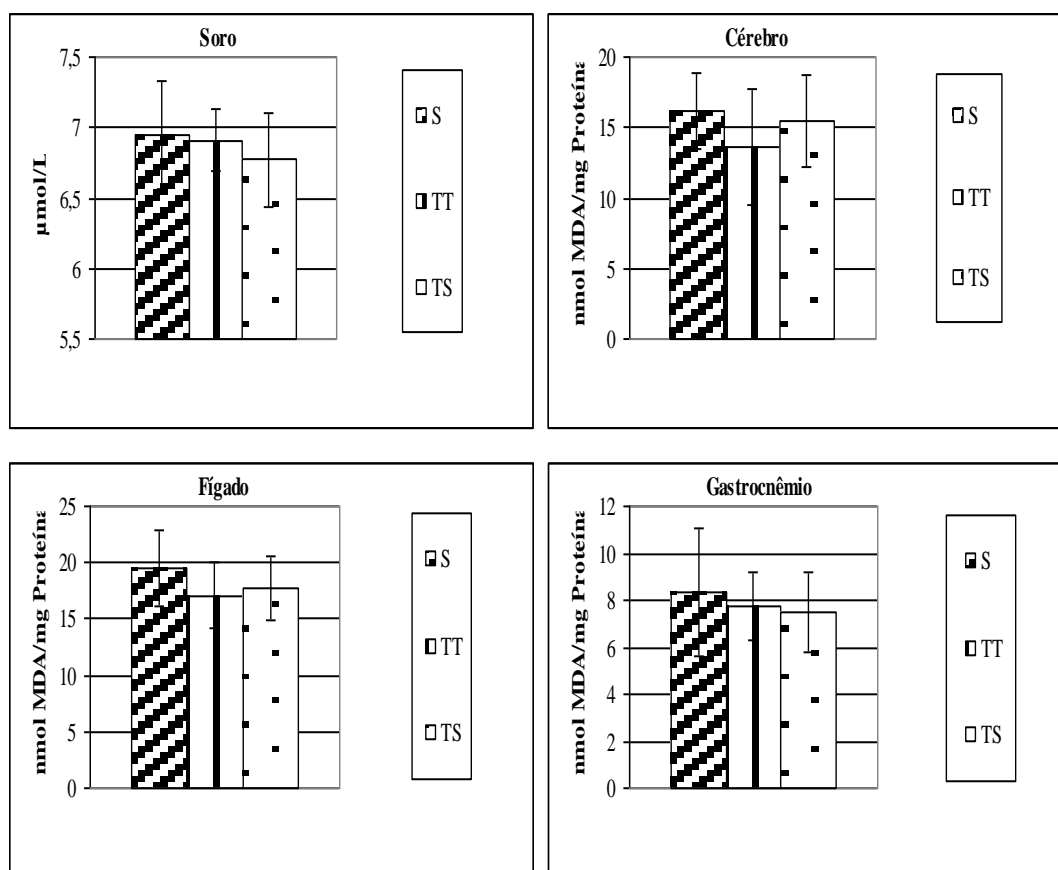


Figura 6. Concentração de substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) em Soro, Cérebro, Fígado e Músculo Gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos com média + desvio padrão de 6 a 10 animais por grupo.

Tabela 5. Atividade da enzima Catalase ($\mu\text{mol}/\text{mg}$. Hb) em soro, cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol}/\text{min}$. mg proteína) dos animais ao final do experimento.

	S (10)	TT (6)	TS (7)
Soro	$82,93 \pm 23,35$	$74,34 \pm 29,56$	$79,59 \pm 23,46$
Cérebro	$0,40 \pm 0,27$	$0,27 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,07$
Fígado	$0,36 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,29$ ^{a e b}
Gastrocnêmio	$0,48 \pm 0,25$	$0,44 \pm 0,20$	$0,28 \pm 0,07$

Resultado expresso com média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses.

Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls)

a – TS x TT , b – S x TS

Catalase

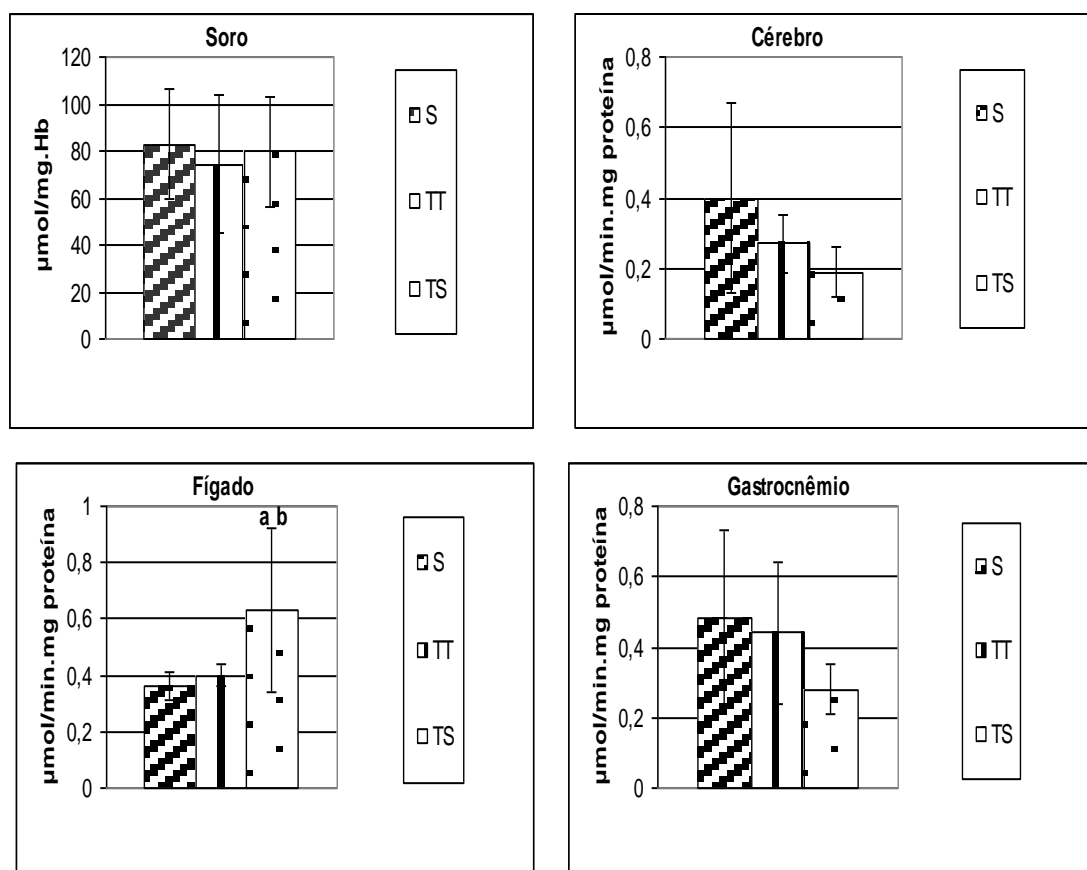


Figura 7. Atividade a enzima Catalase (CAT) em Soro, Cérebro, Fígado e Músculo Gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos com média \pm desvio padrão de 6 a 10 animais por grupo. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls)

a – TS x TT , b – S x TS

Tabela 6. Atividade da enzima Fosfatase Alcalina ($\mu\text{mol}/\text{min. mg}$ proteína) cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento.

	S (10)	TT (6)	TS (7)
Cérebro	$59,47 \pm 9,66$	$68,82 \pm 13,18$	$85,76 \pm 9,92$ ^{a b}
Fígado	$10,96 \pm 1,93$	$10,03 \pm 3,16$	$10,11 \pm 2,07$
Gastrocnêmio	$6,79 \pm 4,45$	$5,28 \pm 2,05$	$4,35 \pm 1,95$

Resultado expresso com média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses.

(ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls), a – TT x TS b – S x TS

Fosfatase Alcalina

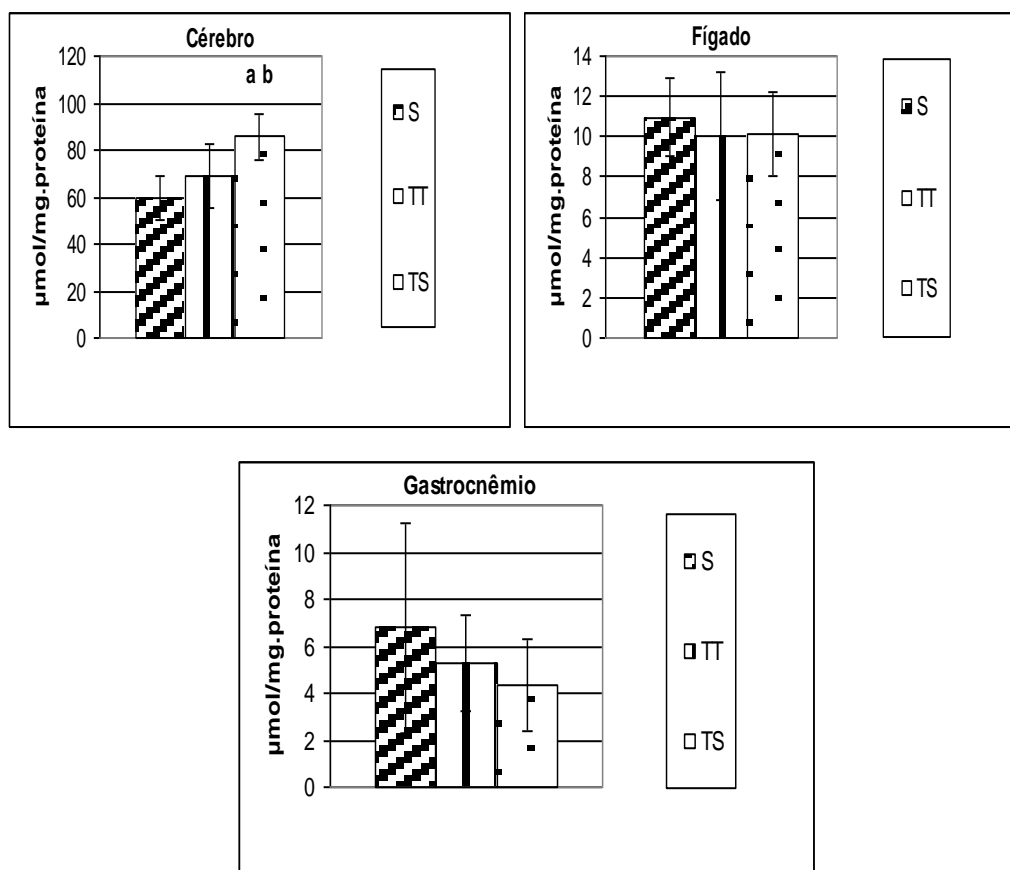


Figura 8. Atividade a enzima Fosfatase Alcalina (FAT) em Cérebro, Fígado e Músculo Gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos com média \pm desvio padrão de 6 a 10 animais por grupo. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls) a – TT x TS b – S x TS

Tabela 7. Captação ($\mu\text{mol/g.h}$) e oxidação ($\mu\text{mol/g.h}$) de glicose, síntese de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$), concentração ($\mu\text{mol/g.h}$) de glicogênio e produção de lactato ($\mu\text{mol/g.h}$) no músculo sóleo dos animais ao final do experimento.

	S (5)	TT (5)	TS (5)
Captação de glicose	14,87 \pm 3,83	13,24 \pm 4,22	10,96 \pm 2,6 ^b
Oxidação de glicose	21,73 \pm 11,68	24,68 \pm 11,09	46,76 \pm 7,55 ^{a b}
Síntese de glicogênio	0,51 \pm 0,58	0,43 \pm 0,17	0,66 \pm 0,25 ^a
Concentração de glicogênio	0,43 \pm 0,10	0,51 \pm 0,12	0,55 \pm 0,13
Produção de lactato	4,31 \pm 0,58	4,71 \pm 0,39	3,83 \pm 0,62 ^a

Resultado expresso com média \pm desvio padrão de 5 animais por grupo.

Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls). a- TS x TT, b- S x TS

Captação e Oxidação de Glicose, Síntese de glicose, Concentração de glicogênio e Produção de lactato

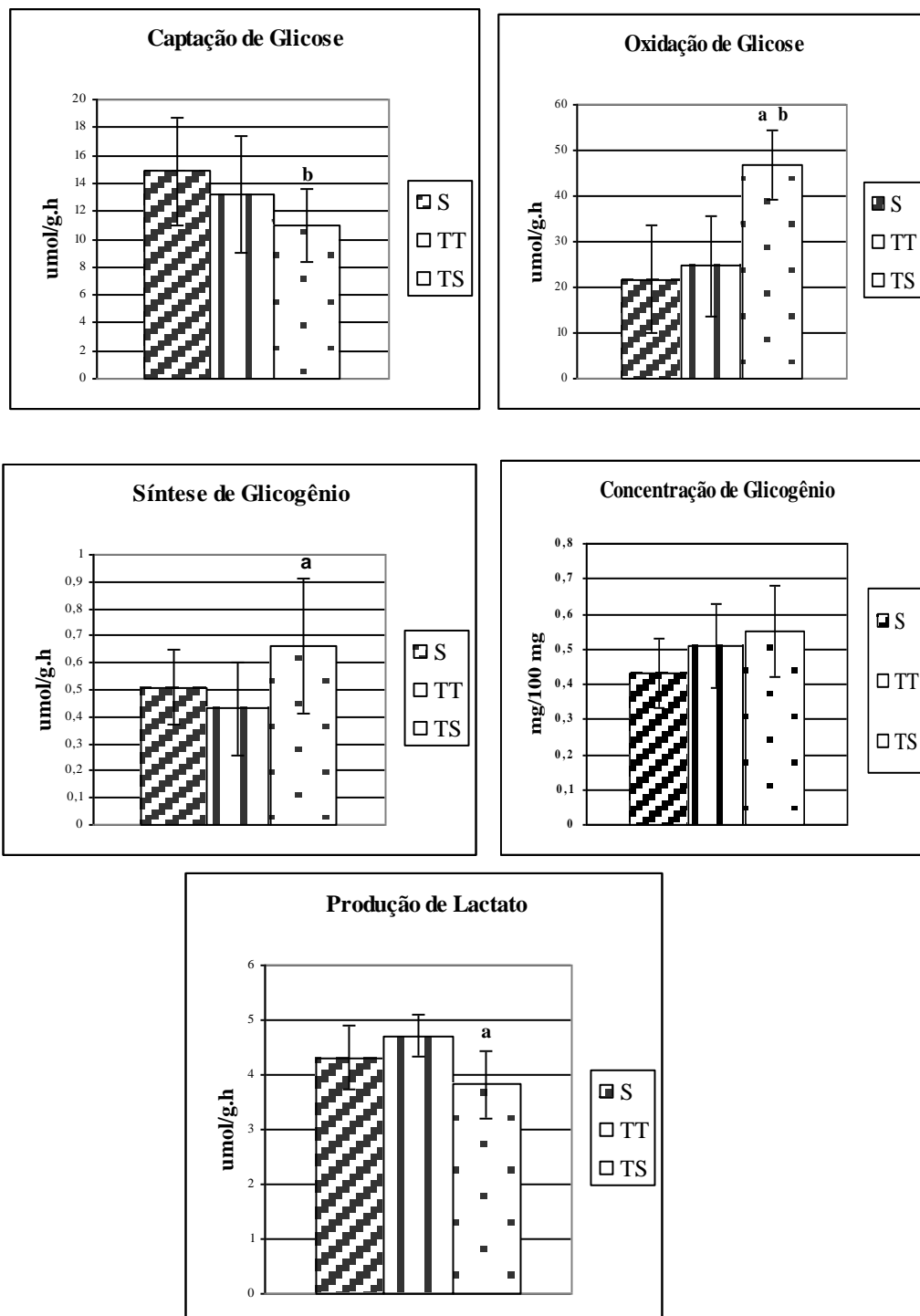


Figura 9. Captação e oxidação de glicose, síntese de glicose, concentração de glicogênio e produção de lactato no músculo sóleo dos animais ao final do experimento. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de Newman-Keuls)

a – TS x TT , b – S x TS

VII - DISCUSSÃO

O organismo dos mamíferos possui uma fantástica habilidade de se adaptar a variados estresses, internos e externos, aos quais é submetido. Se o organismo é habitualmente exposto a um estímulo estressor, o corpo sofrerá adaptações para ajudar o organismo a recuperar a homeostase (VANCINI, et al., 2005). Quando o O₂ passou a ser utilizado no processo de respiração ocorreu, paralelamente, o desenvolvimento de um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade desse gás, já que o metabolismo aeróbio conduz à formação de radicais livres (VANCINI, et al., 2005). Assim, os organismos se adaptaram à quantidade de O₂ presente na atmosfera e a conseqüente produção de radicais livres, desenvolvendo um sistema de defesa antioxidante (VANCINI, et al., 2005). Desse modo, qualquer estímulo que leve à produção excessiva de radicais livres e/ou à depleção de antioxidantes conduz a uma alteração significativa do balanço entre a produção e remoção de radicais livres (DRÖGE, 2002; URSO et al.; 2003). No presente estudo buscou-se avaliar os efeitos do treinamento físico realizado em intensidades distintas sobre biomarcadores do condicionamento aeróbio e de estresses oxidativo em ratos.

A análise dos resultados referentes aos testes de MFEL, efetuados no início do experimento, demonstrou que, em ratos submetidos ao exercício físico em esteira rolante, o lactato sanguíneo apresenta um padrão semelhante aquele descrito para seres humanos. Resultados semelhantes foram observados, recentemente, ao se utilizarem ratos submetidos ao exercício de natação e de corrida em esteira rolante (GOBATTO et al., 2001; MANCHADO, 2005; CONTARTEZE, et al., 2007). A concentração média de

lactato sanguíneo equivalente à MFEL, para todos os animais avaliados no início de nosso experimento, foi de $4,38 \pm 0,22$ mmol/L e está de acordo com estudos prévios, os quais aplicaram o teste da MFEL em corrida em esteira rolante em animais sedentários e eutróficos (MANCHADO, 2005; CONTARTEZE et al., 2007).

Para avaliar a eficácia do protocolo de treinamento como uma ferramenta útil na melhoria do condicionamento aeróbio dos animais, analisamos, ao final do experimento, a concentração de lactato sanguíneo dos animais pertencentes aos grupos S, TT e TS durante a realização de um segundo teste visando à determinação da MFEL. Os valores de lactato sanguíneo, observados nesse teste, mostraram-se mais elevados no grupo S quando comparado aos grupos treinados TT e TS, não sendo observadas diferenças entre os dois últimos. No que diz respeito aos valores de velocidade de corrida equivalentes à MFEL, estes foram menores nos S em relação aos treinados TT e TS, sem diferenças entre estes dois últimos.

Durante o exercício, a concentração sanguínea de lactato é dependente da razão entre a velocidade em que esse substrato é produzido pelo músculo esquelético e a velocidade com que o mesmo é removido da corrente sanguínea (WASSERMAN et al., 1986). Os mecanismos envolvidos no acúmulo de lactato durante o exercício são diversos, sendo o aumento da intensidade do exercício uma de suas principais causas (MCARDLE et al., 1992). A produção de lactato é decorrente da degradação do glicogênio muscular ou da glicose sanguínea. Neste processo a enzima lactato desidrogenase catalisa uma reação de oxirredução na última etapa da via glicolítica anaeróbia assim, piruvato é reduzido, formando L-lactato e NADH é oxidado a NAD^+ . Essa é uma reação reversível e a única que pode resultar na formação de L-lactato ou em sua utilização. A lactato desidrogenase utiliza duas moléculas de NADH na conversão de uma molécula de glicose em duas moléculas de lactato. Sob condições anaeróbias ou em células sem mitocôndrias o NAD^+ , uma molécula solúvel presente no citosol, está disponível em quantidades limitadas e deve ser regenerado, a partir de NADH, para continuação da glicólise. A reação geral, catalisada pelas ações combinadas da gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase e da lactato desidrogenase, é a conversão de piruvato, gliceraldeído 3-fosfato e P_i em lactato e 1,3 – difosfoglicerato.

Durante o exercício a concentração sanguínea de lactato depende da velocidade na qual o substrato é produzido bem como a taxa de remoção. Durante o exercício de

baixa ou moderada intensidade, em seres humanos e ratos, o lactato sangüíneo permanece estável (MCARDLE, 1992). Nessa situação, a taxa de produção de lactato acha-se em equilíbrio ou mesmo mostra-se inferior à sua remoção (GOBATTO, 1991). Quando indivíduos são submetidos a exercícios de alta intensidade, a concentração sangüínea de lactato eleva-se após 3 a 4 minutos de atividade indicando, assim, que a taxa de produção supera a velocidade de remoção. (WASSERMAN et al., 1986). Diferentemente do exercício agudo, o treinamento, principalmente de natureza aeróbia, gera adaptações metabólicas consideráveis em relação ao *turnover* de lactato e, como conseqüência, leva à redução de acúmulo do mesmo na corrente sanguínea durante o exercício para uma mesma intensidade submáxima de esforço (DONOVAN & BROOKS, 1983; GOBATTO et al., 2001).

Uma das causas da diminuição da concentração de lactato sangüíneo após o treinamento aeróbio é a redução na produção, conseqüente à maior oxidação de ácidos graxos e redução da glicólise anaeróbia (HOLLOSZY; COYLE, 1984). As observações que suportam essa hipótese são: aumento da capacidade oxidativa mitocondrial (ANDERSEN; HENRIKSSON, 1977); aumento do pool enzimático do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da cadeia transportadora de elétrons (HOLLOSZY, 1973); aumento da capacidade de oxidar ácidos graxos (BALDWIN et al., 1972), verificado pela redução da razão de troca respiratória (RER) (MacRAE et al., 1992; MAUGHAN et al., 2000); aumento das concentrações de ADP, AMP, NADH e citrato, que reduzem o ritmo da glicólise (HOLLOSZY; COYLE 1984; MAUGHAN et al., 2000); menor concentração de insulina e de catecolaminas, o que pode reduzir os estoques de glicogênio e o ritmo da glicogenólise e produção de lactato (DUAN & WINDER, 1994).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que a redução da concentração de lactato sangüíneo em exercício submáximo é determinada pela maior remoção de lactato. O aumento da remoção de lactato, verificada tanto em ratos (DONOVAN; BROOKS, 1983) como em seres humanos (STANLEY et al., 1985), é feita pelo fígado, rins coração e fibras musculares tipo I (BROOKS, 1991). A remoção da maior parte do lactato deve-se à oxidação e o restante, à conversão a glicose e glicogênio (BROOKS, 2000). Evidências recentes mostram que a membrana mitocondrial contém transportadores de lactato (*monocarboxylate transporters* - mMCT) e a enzima lactato desidrogenase (LDH). A atividade da LDH citosólica é muito alta, fazendo com que o

piruvato seja convertido a lactato, invariavelmente. A passagem do lactato para dentro da mitocôndria por meio dos mMCT permitiria sua oxidação de volta a piruvato (Brooks, 2000).

Apesar da controvérsia sobre o mecanismo que reduz a concentração de lactato sanguíneo em exercício submáximo, MacRAE et al. (1992) observaram que ambos, redução na produção e aumento da remoção de lactato sanguíneo, ocorrem durante exercício progressivo.

Os resultados dos testes de esforço, efetuados após o treinamento aeróbio, mostraram que os protocolos utilizados no presente estudo levaram a uma redução do acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício. Isso indica que os protocolos de corrida por nós utilizados foram eficazes em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais. Além disso, os resultados aqui obtidos demonstraram que o treinamento aeróbio evitou a deterioração do condicionamento aeróbio imposta pelo avanço da idade. Os ratos treinados mantiveram constante a intensidade de esforço (velocidade) equivalente à transição metabólica no decorrer do experimento. Por outro lado, os ratos mantidos inativos apresentaram redução da intensidade de esforço equivalente à transição metabólica determinada no final do experimento, se comparada com os achados do teste efetuado pelos animais no início do experimento.

Acreditamos que a melhora no condicionamento aeróbio observado no presente estudo deveu-se, ao menos em parte, os ratos terem sido treinados no período noturno, aproveitando-se dos seus hábitos naturais que noturnos. MANCHADO et al. (2007) evidenciaram que o ciclo de luminosidade promoveu alterações na avaliação de performance física de ratos, especialmente nas respostas aeróbias, sendo o período de escuridão associado à valores elevados de capacidade aeróbia.

Sabe-se que núcleo supraquiasmático do hipotálamo anterior é o mais importante centro de controle da ritmicidade diária, gerenciando informações como atividade locomotora, temperatura corporal, corticosterona plasmática e melatonina (KLEIN et al. 1991). Contudo, diversos são os osciladores associados ao controle de ritmo circadiano em mamíferos (KLEIN et al. 1991; VAN DEN BUUSE, 1999). A luminosidade é um dos mais importantes fatores extrínsecos ou ambientais promotores de alterações nesse controle, tanto para humanos (REILLY, 1990) quanto para ratos (EDMONDS e ADLER, 1997; BAUMGART et al. 1989, DEPRÉS-BRUMMER et al.

1995). Dentre as respostas fisiológicas modificadas no período de sono é possível destacar a depressão da atividade simpática e, conseqüentemente a redução da frequência cardíaca, pressão arterial (VAN DEN BUUSE, 1999, VAN DEN BUUSE, 1994) e tônus muscular. Essa diminuição nas respostas cardiovasculares acarreta uma redução na razão metabólica que pode variar de 10% a 30%. Todos esses aspectos podem interferir na performance de ratos, quando estes são treinados no período diurno, contrapondo seus hábitos noturnos.

Os animais exercitados em intensidades correspondentes à transição metabólica e 25% acima desta não mostraram diferenças significativas nos biomarcadores de ataque oxidativo quando comparados aos ratos sedentários.

Peroxidação de resíduos de ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios da membrana celular pode resultar em perda significativa da integridade da membrana, que se caracteriza como um dos efeitos mais expressivos do dano oxidativo (TAPELL et al. 1973), levando à geração de alcanos e aldeídos potencialmente deletérios. Infelizmente, se 4 hidroxinonenal (4-HNE) é excluído, a detecção de lesão na membrana não é diretamente mensurável. Por isso, o teste inespecífico de produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) é freqüentemente empregado como indicador de ataque oxidativo (STEGGMAN et al. 1991). No presente estudo, as concentrações de TBARs não apresentaram diferenças significativas entre os grupos em todos os tecidos analisados.

A peroxidação lipídica é dependente de vários fatores (MATAIX et al. 1998), porém, os resultados de diversos estudos envolvendo a mensuração de peroxidação lipídica frente ao estresse oxidativo, induzido pelo exercício, em órgãos e tecidos de diferentes modelos animais são, ainda, contraditórios e obscuros (RADAK et al. 2001; KAYATEKIN et al., TURGUT et al., 2003; KINNUNEN et al., 2005).

Aumento na peroxidação lipídica tem sido relatado após o exercício, (ALESSIO et al. 1980; MIYAZAKY et al. 2001) embora nem sempre seja significativamente constatado (SELMAN et al. 2002; VIINIKKA et al. 1984). Os fatores que estão relacionados com o aumento da peroxidação lipídica durante e após o exercício são, principalmente, a intensidade do exercício, o nível de aptidão física, a capacidade de defesa antioxidante do indivíduo (BAER et al. 2001), o tecido avaliado (AVULA et al. 1999; RADAK et al. 1999), a dieta ingerida (MATAIX, et al. 1998), a recuperação

pós-exercício (LEAF et al.1997), além da diferença existente entre os gêneros (GINSBURG et al.1998).

A enzima fosfatase alcalina (FA) tem importância no diagnóstico de doenças ósseas e é também associada a sistemas de transporte e atividade celular (CALHAU et al. 1999). Em nosso experimento, a atividade dessa enzima apresentou-se aumentada no tecido cerebral dos animais treinados na intensidade superior à transição metabólica (TS) em relação aos treinados na intensidade equivalente à mesma (TT) e aos animais mantidos inativos, sugerindo, assim, maior atividade celular nos primeiros. Estudos em andamento em nosso laboratório, onde foram avaliados aspectos do metabolismo da glicose (captação e oxidação de glicose e síntese de glicogênio) no hipocampo e no cérebro de ratos treinados, mostraram alterações nesses parâmetros (dados não publicados). Pode haver relação entre aumento da atividade celular observado no cérebro dos animais TS do presente estudo e alterações metabólicas induzidas no tecido nervoso pelo exercício. Mas estudos são necessários, para que se possa confirmar esta hipótese.

O aumento da atividade celular e do ataque oxidativo, ocasionado pelo exercício, é menos deletério quando compensado por uma elevação da atividade dos mecanismos celulares de defesa antioxidante. Espécies reativas de oxigênio são removidas por uma série de enzimas, iniciando-se pela superóxido dismutase (SOD), seguida pela catalase (CAT) e pela glutathione peroxidase (GP) (YU, B.P., 1994). No presente estudo, observamos aumento significativo na atividade da enzima CAT no tecido hepático dos animais treinados na intensidade superior a transição metabólica (TS) se comparados aos animais treinados na intensidade equivalente à mesma (TT) e aos ratos mantidos sedentários. Por outro lado, no que diz respeito ao soro, ao cérebro e ao músculo gastrocnêmio, não encontramos diferenças significativas entre grupos.

Em nosso estudo, uma hipótese para a ausência de alterações nos níveis de peroxidação lipídica no fígado entre os grupos treinados (TS) e o sedentário seria que, os mecanismos compensatórios envolvendo a atividade da catalase, apresentaram diferenças significativas, contribuindo assim, para a minimização dos efeitos oxidantes nesse tecido. Adaptação de outros mecanismos de defesa antioxidante não avaliado no presente estudo podem ter participado nesse processo nos demais tecidos estudados.

A questão se o treinamento físico aumentar ou não a atividade das enzimas do sistema antioxidante ainda não foi totalmente elucidada. Enquanto alguns autores demonstraram aumento na atividade enzimática antioxidante (CAT, SOD e GP), em músculo esquelético, induzida pelo treinamento físico (PEREIRA et al., 1996; SMOLKA et al. 2000) outros não constataram alterações significativas na atividade das mesmas enzimas (ALESSIO et al. 1980). As respostas das enzimas antioxidantes músculo-esqueléticas parecem ser dependentes do ergômetro utilizado: natação (PEREIRA et al. 1994), corrida em esteira (ALESSIO et al. 2000; SMOLKA et al. 2000) ou corrida em roda de atividade espontânea (SELMAN et al. 2002); do protocolo de exercício contínuo (ALESSIO et al. 1980) ou intermitente (ATALAY et al. 1996; SMOLKA et al. 2000) assim como do tipo de fibra muscular (ATALAY et al. 1996; POWERS et al. 1994) e da espécie estudada: rato (ALESSIO et al., 2000; PEREIRA et al. 1994; SMOLKA et al. 2000), camundongos (AVULA et al., 1996) ou outros mamíferos (SELMAN et al. 2002).

Em estudos realizados por AVULA e FERNANDES (1999), foi demonstrado que o treinamento físico elevou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no rim, coração e musculatura esquelética de camundongos. Aumento na atividade da enzima catalase foi observado no fígado, coração, músculo esquelético e glândula salivar de animais exercitados quando comparados aos mantidos sedentários nesse mesmo estudo. O exercício também elevou a atividade da enzima glutatona peroxidase no fígado, rim e coração, assim como a atividade da glutatona transferase no fígado e glândula salivar. Além disso, nesse estudo, o treinamento físico elevou os níveis de glutatona total e reduzida no coração, musculatura esquelética e glândula salivar. Esses resultados indicam que o exercício é benéfico no sentido de diminuir os níveis de peroxidação lipídica e de elevar a atividade das enzimas antioxidantes, especificamente na glândula salivar e, também, em vários outros órgãos. Assim sendo, o efeito benéfico do treinamento sobre atividade das enzimas antioxidantes, supressão da peroxidação lipídica e atividade celular parece variar de tecido para tecido ou de órgão para órgão. Os resultados do presente estudo corroboram essa hipótese.

No presente estudo, apenas o treinamento físico efetuado na intensidade superior à transição metabólica acarretou aumento da atividade das enzimas catalase e fosfatase alcalina, sendo o cérebro e o fígado, respectivamente, os tecidos afetados. O músculo

esquelético não foi afetado quanto a estes aspectos, nas condições do presente estudo. Dessa forma, para ampliar a compreensão dos efeitos do treinamento físico na intensidade equivalente a transição metabólica e em intensidades 25% superior a ela, procedeu-se à avaliação de etapas do metabolismo da glicose nesse estudo.

O exercício físico é conhecido por melhorar a tolerância à glicose através do aumento da sensibilidade periférica à insulina (DELA et al., 1994), especialmente no músculo esquelético.

O transporte de glicose para o músculo esquelético é regulado tanto pela insulina quanto pela atividade contrátil (HENDRICKSEN et al., 1996), através da translocação de uma isoforma de transportadores de glicose, o GLUT 4 (EZAKI, 1997). A capacidade de transportar glicose depende do conteúdo muscular de GLUT 4 (HENDRICKSEN et al., 1996; EZAKI, 1997) e tanto os transportadores de glicose estimuladas pela insulina (HENDRICKSEN et al., 1996) quanto à proteína GLUT 4 (RODNICK et al., 1992; HOUMARD et al., 1995; EZAKI, 1997) estão aumentados no músculo esquelético treinado pelo exercício físico. Dessa forma, esperar-se-ia um aumento da captação de glicose nos ratos treinados em relação aos sedentários, o que não ocorreu no presente estudo. Contrariando essa hipótese, os animais pertencentes ao grupo TS apresentaram valores menores de captação de glicose muscular se comparados aos demais grupos. Por outro lado, os resultados referente a oxidação de glicose e síntese de glicogênio pelo músculo sóleo sugeriu que o treinamento em intensidade superior a MFEL resultou em aumento, nos animais do grupo TS em relação aos grupos restantes.

Maior síntese de glicogênio em músculos treinados tem sido reportada e parece envolver processos complexos, incluindo numerosos eventos regulatórios. HENDRICKSEN et al. (1989) e HENDRICKSEN e RITTER (1993) verificaram aumento rápido da síntese de glicogênio sintetase ou redução da fosforilase. HENDRICKSEN et al. (1996) encontraram relação direta entre aumento da glicogênese e maior transporte de glicose por mecanismos insulino-dependentes, que parecem envolver a presença de Ca^{+} liberado nos processos contráteis do músculo. Além disso, REN et al. (1993) observaram que o aumento intramuscular dos transportadores GLUT 1 e GLUT 4, implicou em maior transporte de glicose. HENDRIKSEN et al. (1996)

propuseram que aumento na taxa de síntese de glicogênio possa ser, entre outros fatores, relacionado ao maior transporte de glicose.

No presente estudo, observou-se redução da liberação de lactato pelo músculo sóleo isolado em decorrência do treinamento em intensidade superior a MFEL pelo músculo esquelético, esses resultados contestam com os dados da literatura. Estudos envolvendo seres humanos sugerem que indivíduos treinados apresentaram aumento na capacidade de transporte do lactato da fibra muscular para a circulação sanguínea. JACOBS et al. (1986), em estudos envolvendo seres humanos, relataram que indivíduos treinados apresentaram aumento na capacidade de transporte do lactato da fibra muscular para a circulação sanguínea. Essa observações também foram descritas por OYONO-ENGUELLE et al. (1990) em seres humanos e por GOBATTO (1997) em ratos, sendo que os mesmos associaram o aumento da concentração de lactato sanguíneo, e menor concentração de lactato no músculo, ao maior efluxo muscular desse substrato durante o exercício físico agudo envolvendo indivíduos bem condicionados.

ROTH (1991), em estudos com ratos submetidos a diferentes treinamentos de velocidade e resistência muscular, verificou aumento da atividade de transporte do lactato para fora do tecido muscular. PILEGAARD et al. (1993) submeteram animais a programas de treinamento de sete semanas, com aumento progressivo da intensidade do treinamento. Os autores verificaram, em estudos com vesículas de sarcolema gigantes, maior atividade de transporte do lactato do músculo para a corrente sanguínea, com correlação positiva com a intensidade do treinamento. BONEN & McCULLAGH (1994) submeteram camundongos ao exercício agudo em esteira rolante durante 60 minutos, com posterior retirada de amostras de músculos para procedimentos de incubação. Nesse trabalho, os autores verificaram aumento do transporte de lactato pelos músculos sóleos anteriormente exercitados. No entanto, os reais mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não foram totalmente elucidados. Estes autores, assim como PILEGAARD et al. (1993), sugeriram que o treinamento físico pode aumentar a atividade do carreador de lactato ou, ainda, que o trabalho físico regular induz a síntese de mais proteínas carreadoras.

McCULLAGH et al. (1996) verificaram, em sarcolemas gigantes, que a estimulação elétrica muscular crônica é capaz de aumentar o transporte de lactato no músculo tibial anterior de ratos. O mesmo músculo de localização contralateral dos animais foi utilizado como controle. Os autores, por sua vez, sugeriram a existência de duas proteínas transportadoras de lactato, MCT₁ e MCT₂ (monocarboxylate transporters), as quais foram previamente encontradas em ovários de hamsters chineses e fígados de hamsters sírios, respectivamente. Entretanto, essas isoformas apresentam cinéticas de transporte diferentes no músculo, o que levou os autores a sugerirem a existência de uma isoforma específica nesse tecido. Isso já havia sido mencionado por GARCIA et al. (1994), os quais verificaram a presença do MCT₁ no coração e no músculo vermelho, mas não no músculo branco. Sendo assim, era de se esperar que houvesse um aumento dos valores do lactato liberado para o meio durante a incubação do músculo sóleo, fato que não foi observado no presente estudo.

Os resultados de produção de lactato pelo músculo sóleo isolado mostraram valores menores pelo grupo TS quando comparado aos grupos TT e S. Uma vez que os animais treinados na intensidade equivalente à transição metabólica (TT) apresentaram respostas semelhantes aos animais do grupo sedentário, nesse mesmo parâmetro, podemos sugerir que o treinamento físico na intensidade superior à máxima fase estável de lactato influenciou o metabolismo glicolítico dos animais. Isso pode indicar diminuição da metabolização da glicose pela via anaeróbia láctica no grupo TS ou, ainda, um possível redirecionamento desse substrato para a re-síntese de glicose e, conseqüentemente, de glicogênio muscular.

As discrepâncias observadas entre os resultados do presente estudo e aqueles relatados previamente na literatura podem ser devidas, pelo menos em parte, às diferenças nos protocolos de treinamento aplicados nos diferentes estudos.

VIII – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Os resultados referentes ao ganho de peso corporal e ingestão alimentar indicam que os protocolos de treinamento utilizado mostraram ser eficazes em reduzir o primeiro sem alterar o segundo e, por sua vez, corroboram a hipótese de que o exercício, em esteira rolante, pode exercer efeitos benéficos na restrição do ganho de peso corporal sem alterar drasticamente o comportamento alimentar.
- Provavelmente, o treinamento físico realizado nas intensidades equivalente à transição metabólica aeróbia/anaerobia e 25% superior a esta, melhorou o condicionamento aeróbio dos animais, uma vez que, durante o teste de esforço no final do experimento, as concentrações sanguíneas de lactato foram menores nos grupos treinados em relação aos animais sedentários;
- O treinamento físico na intensidade superior de 25% superior à transição metabólica melhorou o metabolismo oxidativo muscular;
- O treinamento físico na intensidade de 25% superior à transição metabólica desencadeou respostas compensatórias antioxidantes no fígado envolvendo a atividade da enzima catalase, que, por sua vez, evitaram a peroxidação lipídica nesse tecido;
- Nos tecidos estudados, os mecanismos de defesa antioxidantes parecem adaptar-se ao treinamento de maneira distinta.

IX-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H Catalase. In: **Methods in Enzymology**, edited by L. Packer. Orlando FL: Academic, v.105, p.121-126, 1984.

AGUILO, A; TAULER, P; PILAR, G.M; VILLA, G; TUR, J.A; PONS, A. Effects of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. **J. Nutr. Biochem.** v.14, p.319-25, 2003.

ANDERSEN, P.; HENRIKSSON, J. Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v.99, 1977.

ALESSIO, H. M.; GOLFARB, A. H. Lipid Peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive responses to training. **J. Appl. Physiol.** v.64, p.1333-1336, 1980.

ALESSIO, H.M. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v.32, n. 9, p.1576-1581, 2000.

ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants.

Food. Chem. Toxicol. v. 32, p. 671-83, 1994.

ATALAY, M.I.; SEENE, T.; ANIÑEN, O.; SEN, C.K. Skeletal muscle and heart antioxidant differences in response to sprint training. **Acta Physiol. Scand.** v.158, p.129-139, 1996.

AVULA, R.C.P.; FERNANDES, G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. **Aging.** v.11, p. 246-52, 1999.

BALAKRISHNAN, S.D.; ANURADHA, C.V Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. **Cell Biochem. Funct.** v.16, p. 269-75, 1986.

BALDWIN, K. M. et al. Respiratory capacity of white, red and intermediate muscle: adaptative response to exercise. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.222, p.373-378, 1972.

BAER, J.T.; AYRES, S.A. Estrogen levels and lipid peroxidation following exercise. **Prev. Cardiol.** v. 4, p.85-87, 2001.

BAUMGART, P.; WALGER, P.; FUCHS, G.; VON EIFF, M.; RAHN, K.H. Diurnal variations of blood pressure in shift workers during day night shift. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.** v.61, p.463-6, 1989.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.87, p.1620-4, 1990.

BEUTLER, E. In: **Red. cell metabolism.** N.Y.: Greene and Stratton, 1975.

BENEKE, R. Anaerobic threshold individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in running. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.27, p.863-671, 1995.

BONEN, A.; McCULLAGH, P.A.; TAN, M.H. Chronic exercise increases insulin binding in muscle but not liver. **Am. J. Physiol.** v.251, p. E193-E203, 1994.

BROOKS, G. A. Current concepts in lactate exchange. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.23, p.895-906, 1991.

BROOKS, G. A. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. **Medicine & Science in Sports & Exercise.** v.32,n. 4, p.790-799, 2000.

BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free-radicals. **The J. Sports Med. Physical Fitness.** v.33, p.205-222, 1993.

CALHAU, C.; CÂNDIDO.H.R; AZEVEDO, I. Alkaline Phosphatase and Exchange Surfase. **Clin. Biochem.** v.32, p.153-154, 1999.

COOPER, C.E; VOLLAARD, N.B; CHOUEIRI, T; WILSON, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.** v.30, p.280-5, 2002.

CONTARTEZE, R.V.L.; MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A ; M.A .R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp. Biochem. Physiol.* v. A, p. 1-8, 2007.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* v.72, p.637S-76S, 2000.

DELA, F.; MIKINES, K.J.; SONNE, B.; GALBO, H. Effect of training on interaction between insulin and exercise in human muscle. *J. Appl. Physiol.* v. 76, p. 2386-93, 1994.

DESPRÉS-BRUMMER, P.; LEVI, F.; METZGER, G.; TOUITOU, Y. Light induced suppression of the rat circadian system. *Am. J. Physiol.* v. 268, p. R1111-6, 1995.

DI MEO, S; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise – induced oxidative stress. *Biol. Signals Recept.* v.10, p.125-40, 2001.

DONOVAN, C.M.; BROOKS, G.A. Endurance training effects lactate clearance, not lactate production. *Am. J. Physiol.* v.244, p.E83-E92, 1983.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* v.82, p.47-95, 2002.

DUAN, C.; WINDER, W.W. Effect the endurance training on activators of glycolysis in muscle during exercise. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.76, n.2, p.846-852, 1994.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* v.28, p.350-356, 1956.

DUBOUCHARD, H.; GRANIER, P.; MERCIER, J.; PEUCH, C.L.E.; PREFAUT, C. Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. **J. Appl. Physiol.** v. 80, p. 416-21, 1996.

EDMONDS, S.C.; ADLER, N.T. The multiplicity of biological oscillators in the control of circadian running activity in the rat. **Physiol Behav.** v.18, n. 5, p. 921-30, 1977.

ENGELS, R.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal Biochem.** v. 88, p.475-484, 1978.

EZAKI, O., Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT 4) gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.241, p.1-6, 1997.

GARCIA, C.K.; GOLDSTEIN, J.L.; PATHAK, R.K.; ANDERSON, R.G.W.; BROWN, M.S. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the cori cycle. **Cell**, v. 75, p. 865-73, 1994.

GEE, D.L.; TAPPEL, A.L. The effect of exhaustive exercise on expired pentane as a measure of in vivo lipid peroxidation in rat. **Lif. Sci.** v. 28, p. 2445-2449, 1981.

GINSBURG, G.S.; O'TOOLE, M.; RIMM, E.; DOUGLAS, P.S.; RIFAI, N. Gender differences in exercise – induced changes in Sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon. Ginsburg – gender and exercise – induced lipid peroxidation. **Clin. Chim Acta.** v. 305, p. 131-9, 2001.

GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C.Y.; MELLO, M. A. R. Efeitos da desnutrição protéico – calórico e do treinamento físico na produção de ácido láctico em

ratos machos adultos após testes de cargas progressivas. Resultados preliminares. **Ciência e Cultura**. v.43, p.725-6, 1991.

GOBATTO, C.A. Metabolismo glicídico em músculo sóleo isolado de ratos desnutridos e recuperados. Efeito dos ácidos graxos livres e do treinamento físico. **Campinas, SP (Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP)**, 1997.

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

GROUSSARD, C.; RANNOU-BEKONO, F.; MACHEFER, G.; CHEVANNE, M.; VICENT, S.; SERGENT, O.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A . Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.89, p. 14-20, 2003.

HAMILTON, K.L; STAIB, J.L; PHELLIPS, T.; HESS, A ; LENNON, S.L; POWERS, S.K. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia / reperfusion. **Free Radic. Biol. Med.** v.34, p.800-9, 2003.

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

HECK, H., MADER, A.; HESS, G.; MUCKE, S.; MULLER, R; HOLLMANN,. W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. **Int. J. Sports Med.**, v.6, p. 117-130, 1985.

HENDRIKSEN, E.J.; STUMP, C.S.; TRINH, T.H.T.; & BEATY, S.D. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v.80, p. 1540-6, 1996.

HESS, M.L. E MANSON, N.H. Molecular oxygen: Friend and foe. The role of oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v.16, p. 969-985, 1984.

HENDRIKSEN, E.J.; KIRBY, C.R.; TISCHLER, M.E. Glycogen supecompensation in the rat soleus muscle during recovery from non – weight bearing. **J. Appl. Physiol.** v.65, p.2782-7, 1989.

HENDRIKSEN, E.J.; RITTER, L.S. Effect of soleus unweighting on insulin independent glucose transport activity. **J. Appl. Physiol.** v.74, p. 1653-1657, 1993.

HENDRIKSEN, E.J.; STUMP, C.S.; TRINH, T.H.T.; & BEATY, S.D. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v.80, p. 1540-6, 1996.

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

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations to exercise: aerobic metabolism. **Exercise Sports Science Reviews.** p.45-71, 1973.

HOUARD, J.A.; HICKEY, M.S.; TYNDALL, G.L. Seven days of exercise increase GLUT – 4 protein content in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v.79, p. 1936-8, 1995.

JACOBS, I. Blood lactate. Implications for training and sports performance. **Sports Med.** v. 3, p.10-25, 1986.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry: Relationship to exercise. **Sports Med.** v.5, p. 156-170, 1987.

JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. **Med. Sci. Sport. Exerc.** v. 25, p. 210-212, 1993.

KAYATEKIN, B.M.; GONENC, S.; ACILKGOZ, O.; UYSAL, N.; DAYI, A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. **Eur. J. Appl. Physiol.** v. 87, p. 141-4, 2002.

KINDERMAN, W.; SIMON, G.; KEUL, J. The significance of the aerobic / anaerobic transition of the determination of the work load intensity during endurance training. **Eur. J. appl. Physiol. and Accup. Physio.** v.42, p. 25-34, 1979.

KINNUNEN, S.; HYYPPA, S.; LAPPALAINEN, J.; OKSALA, N.; VENOJARVI, M.; NAKAO, C.; HANNINEN, O.; SEN, C.K.; ATALAY, M. Exercise – induce oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. **Eur. J. Appl. Physiol.** v. 93, p. 498-501, 2005.

KLEIN, D.C.; MOORE, R.Y.; REPERT, S.M. Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock. **Oxford University Press**, New York, 1991.

KRUGER, J.; SCHNETTLER, S.; HECK, H. Relationship between rectangular triangular increasing work load and maximal lactate steady state on the crank ergometer. **In Sports Med. and health.** G.P. Hermans and W.L. Mosterd (Eds). Amsterdam: Expecta Medica, p. 685-690, 1990.

LEAF, D.A.; KLEINMAN, M.T.; HAMILTON, M.; BARSTOW, T.J. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Med. Sci. Exerc.** v. 29, p. 1036-9, 1997.

LOWENSTEIN, J.M. The urine nucleotide cycle revised. **Int. J. Sports Med.** v.11, p.S37-S46, 1990.

MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int. J. Sports Med.** v.7 , p. 45-46, 1986.

MANCHADO, F.B.; GOBATO, C.A ; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A .R. Maximal lactate steady in running rats. **JEP. online.** v.8, p. 4, 2005.

MANCHADO, F. B., MOTA, C.S.A.; RIBEIRO, C.; ARAUJO, G.G.; ARAÚJO, M. B., CONTARTEZE, R. V. L., GOBATO, C. A., MELLO, M. A. R. Effects of light-dark cycle on critical velocity and anaerobic capacity determination in running wistar rats. Submetido ao periódico “**Physiology and Behavior,**” 2007.

MCARDLE, W.D; KATCH, F.I., KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2003.

MCARDLE, W.D; KATCH, F.I., KATCH, V.L. **Fundamentos de Fisiologia do exercício**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2002.

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

McCULLAGH, K.J.A.; JUEL, C.; O'BRIEN, M.; BONEN, A. Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. **Mole. Cell. Biochem.** v. 156, p.51-7, 1996.

MATAIX, J.; QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MANAS, M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free Radic. Biol. Med.** v. 24, p.511-21, 1998.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHALFF, P. L. **Bioquímica do exercício e treinamento**. São Paulo: Manole. 240 p. 2000.

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

MONOD, H.; SCHERER, J. The work capacity of a synergic muscular group. **Ergonomics.** v.8, p. 329-38, 1965.

NIESS, A .M; DICKHUTH, H.H; NORTHOFF, H; FEHRENBACH, E. Free radicals and oxidative stress in exercise – imunological aspects. **Exerc. Immunol. Rev.** v.5, p.22-56, 1999.

OKAWA, H., NOBUKO, O. AND YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** v. 95, p. 351-358, 1979.

OOKAWARA, T.; HAGA, S.; HAS., OH-ISHI; TOSHINAI, K.; KIZAKI, T.; JI, L.L.; SUZUKI, K.; OHONO, H. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. **Free Radic Res.** v. 37, p.713-9, 2003.

OSORIO, R.A.L.; CHRISTOFANI, J.S.; ALMEIDA, V.D.; RUSSO, A.K.; PIÇARRO, I.C. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. **Comp. Biochem. and Physiol.** v.135, p. 89-95, 2003.

OWEN, A.J.; FTZGERALD, K.J.; PEOPLES, G.E.; MCLENNAN, P.L. Effect of diet on fatty acid composition and markers of oxidative stress in response to acute exercise in rat mode. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v.30, p.A8-A9, 2003.

OYONO-ENGUELLE, S.; MARBACH, J.; HEITZ, A.; OTT, C.; GARTNER, M.; PAPE, A.; VOLLMER, J.C.; FREUND, H. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **J. Appl. Physiol.** v. 68, p. 905-11, 1990.

PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L.F.P.B.; BECHARA, E.J.H. & CURI, R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. **Ci. & Cult.** v.48, p.43-46, 1996.

PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L.F.P.B.; BECHARA, E.J.H. & CURI, R.; SAFI, D.A.; Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise – trained rats. **Physiol. of Behav.**, v.56, p.1095 – 1099, 1994.

PILEGAARD, H.; CARSTEN, J.; WIBRAND, F. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: effect of training. **Am. J. Physiol.** v.264, p. E156-E60, 1993.

PILEGAARD, H.; JUEL, C. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats skeletal muscle: effect of denervation. **Am. J. Physiol.** v.269, p. E679-E82, 1995.

POWERS, S.K.I.; CRISWELL, D.; LAWER, J.; JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am. J. of Physiol. Regul. Int. and Comp. Physiol.** v.266, p.R375-R380, 1994.

PRADA, F.J.A ; VOLTARELLI, F.A ; OLIVEIRA, C; GOBATTO, C.A ; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A . R. Condicionamento aerobio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. **Rev. Bras. Cien. Mov.** v.12, p. 29-34, 2004.

QUINDRY, J.C.; STONE, W.L.; KING, J.; BROEDER, C.E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. **Med. Sci. in Sports Exerc.** v.35, p.1139-1145, 2003.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; THARA,S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effects of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skletal muscle: evidence for beneficial autcomes. **Free Rad. Biol. and Med.** v.27, p.69-74, 1999.

RADÁK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S.; Adaptation to exercise – induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exerc. Immunol. Rev.** v.7, p. 90-107, 2001.

RADÁK, Z.; APOR, P.; PUCSOK, J.; BERKES, I.; OGONOVSKY, H.; PAVLIK, G.; NAKAMOTO, H.; GOTOS, S. Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. **Life Sci.** v.72, p.1627-33, 2003.

REID, M.B. React oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. **News Physiol. Sci.** v.11, p.114-119, 1996.

REILLY, T. Human circadian rhythms and exercise. **Crit. Rev. Biomed. Eng.** v. 18, n.3, p. 165-80, 1990.

REN, J.M.; MARSHALL, B.A.; GULVE, E.A.; GAO, J.; JOHNSON, D.W.; HOLLOSZY, J.O.; MIUKER, M. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. C9-14, 1993.

RODNICK, K.J. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 262, p. C9-14, 1992.

ROTH, D.A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. **Méd. Sci. Sports Exerc.** v.23, p. 925-34, 1991.

RUSH, J.W.E.; SANDIFORD, S.D. Plasma glutathione peroxidase in healthy Young adults: influence of gender and physical activity. **Clin. Biochem.** v.30, p.345-351, 2003.

SEN, C.K.; Exercise – induced oxidative stress and antioxidant nutrients. **Nutrition in Sports – Volume VII of Encyclopaedia of Sports Medicine – Chapter.** v.22, 2001.

SELMAN, C.; McLAREN, J.C; COLLINS ALI DUTHIE, G.G.; SPEAKMAN, J.R. Antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and DNA oxidative damage: Effects of short-term voluntary where running. **Arch. Biochem. Biophys.** v.401, p.255-261, 2002.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.48, 2003.

SIU, P.M; BRYNER, R.W; MARTYN, J.K; ALWAY, S.E. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscle. **FASEB J.** v.18, p.1150-2, 2004.

SJORGREEN, B; NORDEN, S. K; JOLD, T; HOLMGREN, H; WOLLERSTRON, J. Bertrag zur kenthis des le berrhythmik. Pflügers. **Arch. Gesante Physiol. Menscen Tiere.** p.240-247, 1938.

SJODIN, B. & JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon performance. **Inter. J. of Sports Med.** v.2, p.23-6, 1981.

SJODIN, B.; WESLING, H.E.; APPLE, S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.** v.10, p.236-254, 1990.

SMOLKA, M.; ZOPPI, C.C.; ALVES, A.A.; SILVEIRA, L.R.; MARANGONI, S.; PEREIRA DA SILVA. HSP-72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. of Physiol. Regul. and Comp. Physiol.** v.279, p.E1539-45, 2000.

STANLEY, W. C.; GERTZ, E. W.; WISNESKI, J. A.; NEESE, R. A.; BROOKS, G.A. Systemic lactate kinetics during exercise graded exercise man. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.249, p.E595-602, 1985.

STEGGMAN, H.; KINDERMAN, N. Comparison of prolonged exercise tests at the individual anaerobic threshold and the fixed threshold of 4.0 mmol/l lactate . **In J. Sports Med.** v.3, p.105-110, 1982.

STEGGMAN, H.; OLIVER, C.N. Metal catalyzed oxidation of protein. **J. Biol. Chem.** v.266, p.2005-2008, 1991.

TAPPEL, A . L; Lipid peroxidation damage to cell. **Comp. Ted. Proc.** v.32, p.1870-1874, 1973.

TURGUT, G.; DEMIR, S.; GENÇ, O.; KARABULUT, I.; AKALIN, N.; The effect of swimming exercise on lipid peroxidation in the rat brain, liver and heart. **Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg.** v. 27, p. 43-5, 2003.

URSO, M.L; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology.** v. 189, p. 41-51, 2003.

VANCINI, RODRIGO LUIZ; LIRA, CLAUDIO ANDRE BARBOSA; GUEDES JR, DILMAR PINTO; SILVA, ANTONIO CARLOS; NOUAILHETAS, VIVIANE LOUISE ANDRÉE. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. **Rev. Bras. Ativ. Fís. e Saúde**, v. 10, n. 2, p. 47 - 58, 2005.

VAN DEN BUUSE, M. Circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radio-telemetry. **Physiol Behav.** v.55, n.4, p.783-7, 1994.

VAN DEN BUUSE, M. Circadian rhythms of blood pressure and heart rate in conscious rats: Effects of light cycle shift and timed feeding. **Physiol Behav.** v.68, p.9-11, 1999.

VAN REMEN, H.; HAMILTON, L.M.; RICHARDSON, A . Oxidative damage to DNA and Aging. **Exerc. Sports Sci. Rev.** v.31, p.149-153, 2003.

VIINIKKA, L.; VUORI, J.; YLIKORKALA, O. Lipid peroxides, protacyclin and thromboxane A2 in runners during acute exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.16, p. 275-277, 1984.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of aerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz. J. Med. Biol.** v.35, 2002. (Impress)

WASSERMAN, K.; McILROY, M.B. Detecting the threshold of anaerobic threshold in cardiac patients during exercise. **Pedia. Cardio.** v.20, p.12-15, 1964.

WASSERMAN, K. The anaerobic threshold: definition, physiological significance and identification. *Adv Cardiol*, v.35, p.1-23, 1986

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** v.74, p.139-161, 1994.

X- APÊNDICE

10.1. Parecer do Comitê de Ética para Experimentação Animal CEEA/UNITAU nº 018/08

10.2. Cópia do Artigo publicado na Revista Motriz - ARAÚJO, M. B. ; PRADA, F. J. A. ; MELLO, M. A. R. . Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço. Motriz (Rio Claro), v. 12, p. 307-312, 2007.

Motriz, Rio Claro, v.12 n.3 p.307-312, set./dez. 2006

Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço

Michel Barbosa de Araújo
Francisco José Andreotti Prada
Maria Alice Rostom de Mello

Departamento de Educação Física – IB/Unesp Rio Claro SP Brasil

Resumo: Espécies reativas de oxigênio (EROS) são formadas durante o metabolismo normal e, continuamente, causam danos celulares. O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e mecanismo de defesa antioxidante. Para proteger os tecidos contra possíveis danos causados pelos EROS, as enzimas antioxidantes parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades em indivíduos treinados. Muitos estudos envolvendo estresse oxidativo e exercícios têm sido conduzidos em modelos animais, especialmente o rato. Contudo, esses estudos são passíveis erros, pois poucos associam as variáveis metabólicas com a intensidade do esforço nesses animais.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo. Exercício Físico. Enzimas Antioxidantes.

Oxidative Stress in Exercise, animal models and effort intensity

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) are formed during the normal metabolism, and continually cause cell damage. The main antioxidant defense system is constituted by antioxidant enzymes as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. Physical exercise is a condition that influences the balance between oxidative attack and antioxidant defense mechanisms. To protect the tissues against possible damages caused by ROS, the antioxidant enzymes seem to adapt, increasing their activities in trained individuals. Many studies involving oxidative stress and exercises have been conducted in animal models, especially the rat. However, most of these studies are criticized, because few associate the metabolic variables to the intensity of the effort experienced by the animal during the exercise.

Key Words: Oxidative Stress. Physical Exercise. Antioxidant Enzymes.

Generalidades

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos, e não enzimáticos, e, continuamente, causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1989).

Peroxidação de ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios das membranas celulares pode resultar em perda significativa da integridade da membrana, o que consiste em uma das mais marcantes efeitos dos danos oxidativos (TAPPEL, 1973), levando à geração de aldeídos e danos potencialmente nocivos. O teste não específico das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) é frequentemente aplicado para inferir sobre os danos oxidativos aos lipídios (SILVEIRA, 2001). O papel fisiológico tecidual da enzima fosfatase alcalina pode estar associada a sistemas de transporte e atividades celular (CALHAU et al., 1999), de forma que a medida da atividade dessa enzima pode oferecer informações importantes para avaliação dos danos oxidativos ao funcionamento das células.

Para se protegerem contra a oxidação, os organismos contam com mecanismos químicos e enzimáticos (YU, 1994). O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes como superóxido desmutase (CuZn- SOD-Citosólica e extracelular e Mn-SOD-mitocondrial), catalase (CAT-heme-enzima) e glutatona peroxidase (GR/GPX – dependente e não dependente do selênio), para decomponem o ânion o^- , H_2O_2 e hidróxidos (YU, 1994).

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e mecanismo de defesa antioxidante. Durante o exercício físico ocorrem várias reações químicas que implicam na formação dos EROS. Para proteger os tecidos contra possíveis danos causados pelos EROS, as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPX/GR, parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados (AVULA, FERNANDES, 1999; JENKINS, 1987; PEREIRA et al., 1996), embora haja contradições (PRADA et al., 2004).

Por razões óbvias, muitos estudos envolvendo estresse oxidativo e exercícios têm sido conduzidos em modelos animais, especialmente o rato. Contudo, esses estudos são passíveis erros, pois poucos associam as variáveis metabólicas com a intensidade do esforço nesses animais (PRADA et al., 2004).

Conceito de Estresse Oxidativo

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de valência (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; SEN et al., 2001, SILVEIRA, 2001). Exemplos de radicais livres são o, próprio oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxi (ROO), radical alcoxi (RO) e óxido nítrico (NO) (PEREIRA, 1994; ARUOMA, 1994; YU, 1994; SJODIN et al., 1990; SEN et al., 2001, SILVEIRA, 2001). Destes radicais livres, o OH^\cdot e o $O_2^{\cdot-}$ possuem uma grande importância biológica porque são formados em várias situações durante o processo normal ou exacerbado de redução do O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993); durante a metabolização de bases purínicas no ciclo de (LOWENSTEIN, 1990); ou devido à redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo $O_2^{\cdot-}$ catalizado por redutores como o Fe^{2+} e Cu^+ ou ascorbato (YU, 1994). O H_2O_2 surge no interior das células quando o O_2 é reduzido divalentemente ou quando o $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação espontânea ou catalisada. Por não possuir elétrons desemparelhados, não é classificado como radical livre, sendo, portanto, menos reativo que os radicais livres citados anteriormente (PEREIRA, 1994; PEREIRA, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

A maior reatividade exibida pelos radicais livres, comparativamente a outros elementos é consequência do menor tempo de vida – média que possuem. Os radicais OH^\cdot e o $O_2^{\cdot-}$ possuem vida média de 1×10^{-9} e 1×10^{-6} segundos respectivamente, enquanto o H_2O_2 , superior 10^{-2} segundos e o O_2 superior a 10^2 segundos (YU, 1994). Esta meia vida extremamente curta deve-se à instabilidade eletrônica que apresentam. Isto resulta na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com quais venham a colidir, promovendo formação de outras espécies radiculares, como por exemplo, os radicais ROO e RO, formados durante a lipoperoxidação das membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Devido a seu potencial oxidante e menor reatividade, todas essas espécies radiculares são chamadas coletivamente de espécies reativas de oxigênio (EROS).

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis a oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989, SILVEIRA, 2001). Para se protegerem contra oxidação os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, selênio, cobre, zinco, ácido ascórbico, glutatona reduzida (GSH), entre outros diminuem a ação tóxica das EROS produzidas intra e extracelularmente (YU, 1994; SEN et al.; 2001).

O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes como as superóxidos dismutase (CuZn-SOD – citosólica e extracelular, Mn-SOD – mitocondrial), catalase (heme-enzima, CAT) e glutatona peroxidase (GR/GPX – dependentes e não dependentes de selênio) para decomporem respectivamente o ânion $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e lipoperóxidos (YU, 1994). A Glutatona redutase (GR) é outra enzima importante nesse processo. Esta enzima, mesmo não agindo diretamente na remoção de radicais é responsável pela regeneração da glutatona oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH), utilizando como substrato da enzima GPX. Apesar dessas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROS, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Quando acontece um desbalanço entre a produção de EROS e defesa antioxidante se estabelece uma situação de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Exercício Físico e Estresse Oxidativo

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. Durante os exercícios físicos, ocorrem várias reações químicas que levam à formação de radicais livres tais como $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, ROO, RO e NO (PEREIRA, 1994; BALAKEISNAN, ANURADHA, 1998; SEN et al., 2001; VAN REMEN et al., 2003).

Durante o exercício, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser formado no músculo de várias maneiras (HESS et al., 1984; SJODIN et al., 1990; AURUOMA, 1994; SEN et al.; 2001; DIMEO & VENDIT, 2001): 1) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra numa situação de hipóxia muscular e é “reperfundida” pelo oxigênio durante, por exemplo, pausa após um esforço de alta intensidade; 2) por enzimas como xantina oxidase e 3) pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase. O músculo esquelético também produz óxido nítrico (NO) pela reação da Estresse oxidativo e exercício enzima óxido nítrico sintase (REID, 1996). O óxido nítrico pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitito, um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao radical hidroxila (BECKMAN et al. 1990, SEN et al., 2001). Além disso, a presença de ferro, na forma livre ou ligado à heme, pode converter o radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton, em radical hidroxila, uma das espécies mais reativas que se conhece (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Aumento na peroxidação lipídica tem sido relatado após o exercício (ALESSIO; GOLDFARB, 1980; MIYAZAKY et al., 2001), embora nem sempre seja constatado (SELMAN et al., 2002; VIINIKKA, et al., 1984). O aumento na peroxidação lipídica parece ser tecido específico. AVULA e FERNANDES (1999) constataram redução da peroxidação lipídica nos rins e nas glândulas salivares e aumento da mesma no fígado de camundongos treinados por corrida em esteira analisados em repouso, em comparação dos sedentários. Nenhuma diferença foi constatada no músculo esquelético e cardíaco entre dois grupos. RADÁK et al., (1999) também não verificaram qualquer diferença nos níveis de peroxidação lipídica no músculo esquelético de ratos treinados por natação e sedentários, analisados em repouso. Os níveis de pentano e etano apareceram 2 a 3 vezes mais elevados do que em valores de repouso em homogeneizados de fígado e músculo esquelético de ratos depois da corrida até exaustão (GEE et al., 1981). ALESSIO e GOLDFARB (1980) constataram pequeno aumento na peroxidação tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos após exercício sub-máximo decorrida em esteira.

Quindry et al., (2003) observaram que 2 horas após sessão única de exercício máximo, em indivíduos jovens do sexo masculino, ocorreu aumento de ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) e decréscimo do teor de ácido ascórbico e ácido nítrico, indicando ocorrência de estresse oxidativo sanguíneo. Radák et al., (2003), relataram que o exercício aeróbico exaustivo (corrida de super maratona) causa estresse oxidativo e aumento da nitração e a carbonilação das proteínas séricas. Owen et al., (2003) verificaram em um modelo com ratos, que o exercício agudo elevou os níveis cardíacos de peroxidação lipídica.

Para proteger os tecidos contra danos causados pelos radicais livres produzidos durante o exercício físico as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPX/GR parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de animais e seres humanos treinados (PEREIRA et al., 1994; JENKINS, 1987; CASE et al., 1994, CLARKSON; THOMPSON, 2000; OSORIO et al., 2003). Isso ocorre principalmente em treinamento do tipo de endurance (SEN et al., 2001; MIYAZAKI et al., 2001; AVULA et al., 1999). Por outro lado existem também relatos de aumento da peroxidação lipídica associada à não compensação completa ou redução de componentes do sistema antioxidante (glutathione, ácido ascórbico e atividade glutathione peroxidase) (BENZI, 1993; BALAKRISHNAN; ANURADHA, 1998; SEN et al., 2001; OOKAWARA et al., 2003).

RUSH e SANDIFORD (2003) reportaram que as populações jovens, saudáveis, mas sedentária, feminina apresenta concentrações plasmáticas de enzimas antioxidante GPX, ligeiramente maior que a população masculina, mas o significado funcional disso não foi estabelecido. GROUSSARD et al. (2003), constataram que após sessão de exercício supra-máximo (teste de Wingate 30-s), sujeitos ativos mas não atletas mostraram aumento significativo da peroxidação lipídica (radicais lipídicos séricos detectados por ressonância eletro-spin), bem como redução das atividades das enzimas antioxidantes GPX e SOD nas hemácias. Concluíram, então, que o exercício supra - máximo induz estresse oxidativo.

Transição Metabólica

O fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção do exercício pode ser proveniente dos metabolismos aeróbico e anaeróbico. Durante o exercício moderado, as respostas fisiológicas estabilizam-se rapidamente e o oxigênio supre de maneira satisfatória a demanda energética. Em intensidades mais elevadas, a via metabólica predominante é a anaeróbia, o que resulta na redução abrupta do pH muscular em consequência da produção de lactato. Isso dificulta a manutenção do exercício por tempo prolongado,

já que ocorre a inibição da atividade enzimática e redução da atividade do Ca^{++} a troponina (McArdle et al., 1998).

Existe uma zona de transição a partir da qual ocorre a mudança da predominância aeróbia para a anaeróbia, sendo essa zona de exercício extremamente importante para o condicionamento físico, treinamento e rendimento desportivo. Por essa razão, diversas investigações acerca dessa zona de transição vêm sendo realizadas nas últimas décadas, resultando em diferentes protocolos de avaliação. Dentre os mais utilizados, destacam-se o limiar ventilatório observado (WASSERMAN; McILROY, 1964), a concentração de lactato sanguíneo para identificar o limiar anaeróbio (LAN), proposto por KINDERMAN et al. (1979), o limiar anaeróbio M. B. Araújo, F. J. A. Prada & M. A. R. Mello obtido pela concentração fixa de 4,0 mm (OBLA), inicialmente sugerido por SJODIN; JACOBS (1981), o modelo de potência crítica não invasivo e exaustivo proposto por MONOD e SCHERER (1969), entre outros.

Grande parte desses protocolos de avaliação utilizam, a resposta do lactato sanguíneo devido à fidedignidade dessa variável sanguínea na mensuração da intensidade de transição metabólica bem como excelente resposta ao treinamento físico, permitindo além da caracterização do esforço, acompanhamento da eficiência do treinamento.

O limiar anaeróbio (LAN) foi definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a reacumular desproporcionalmente durante o exercício, com cargas progressivas (WASSERMAN; McILROY, 1964) e, teoricamente, indica a máxima fase estável de lactato (MFEL) (MADER; HECK, 1986). A MFEL equivale a mais alta concentração sanguínea de lactato onde sua entrada na circulação é recuperado pela remoção durante o exercício com carga constante (HECK et al., 1985). O pressuposto de que o LAN coincide com MFEL mostrou-se verdadeiro em diferentes tipos de exercício, como corrida em esteira rolante e cicloergometria (STEGGMAN; KINDERMAN, 1982, HECK et al., 1985), entretanto a carga de exercício MFL parece deferir do LAN na ergometria de braço (KRUGER et al., 1990) e no remo (BENEKE, 1995).

A MFEL também já foi utilizada para determinação da transição metabólica em ratos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa (GOBATTO et al., 2001) desenvolveu um estudo para a determinação do MFEL de ratos durante o exercício de natação nesse estudo, a MFEL foi obtida na carga de 6% do peso corporal à concentração sanguínea de lactato foi de 5.5 mmol/l de sangue. Em outro estudo, nosso grupo apresentou uma descrição detalhada de protocolo para a determinação do MFEL de ratos durante exercício de corrida em esteira rolante (MANCHADO et al., 2005). Nesse estudo, a MFEL aconteceu na velocidade de 20m/min., à concentração sanguínea de lactato de 4,0 mmol/L.

Estresse Oxidativo, Exercício e Transição Metabólica

Modelos animais fornecem condições apropriadas para a obtenção de resultados referentes a mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas adaptações metabólicas ao exercício, que não seriam possíveis de outra forma. São raros ainda, na literatura, estudos que relacionam estresse oxidativo à intensidade do esforço durante o exercício em ratos. Nesse sentido, nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa, do Departamento de Educação Física, do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, SP, tem oferecido algumas contribuições.

Recentemente, realizamos trabalhos com finalidade de estudar como se comportam os sistemas de defesa antioxidante perante o exercício físico e dietas alimentares. Os trabalhos se voltaram a mensuração da biomarcadores do ataque oxidativo (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico – TBARs), do sistema antioxidante: atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathione Redutase (GR) e atividade celular: Fosfatase Alcalina (FA).

Em um dos estudos realizados com ratos em corrida em esteira rolante na intensidade equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia, inferida pela determinação da MFEL, os valores de TBARs circulantes foram maiores nos ratos treinados do que nos sedentários. O inverso ocorreu com a CAT. A análise desses resultados indica que o treinamento por corrida na intensidade da MFEL favoreceu o aparecimento de estresse oxidativo nos animais. (PRADA et al., 2003).

Em outro estudo semelhante só que realizado com natação obtivemos resultados semelhantes: valores de TBARs circulantes relativamente maiores do que os de CAT reforçando a teoria de que o exercício realizado na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia pode gerar estresse oxidativo em ratos (PRADA et al., 2004). Por outro lado, mais recentemente constatamos que o treinamento físico por corrida em esteira rolante na velocidade da MFEL não alterou as concentrações de TBARs em cérebro, músculo esquelético e fígado de ratos (ARAÚJO et al., 2007)

No presente momento, estamos realizando estudos para ampliar as informações referentes ao estresse oxidativo em ratos exercitados por corrida em esteira rolante em diferentes intensidades, pois as mesmas podem contribuir para o avanço do conhecimento científico dentro desta área.

Conclusão

A literatura aponta que o exercício regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante, as quais protegem as células contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo, prevenindo danos celulares subsequentes.

Em contrapartida, nosso grupo de estudos verificou que, independente do ergômetro utilizado (natação ou esteira), ratos treinados em intensidade equivalente a MFEL apresentaram estresse oxidativo.

Dessa forma, o desenvolvimento de marcadores sanguíneos e teciduais mais sensíveis pode ajudar a elucidar muitas das contradições presentes na literatura e, deste modo, Estresse oxidativo e exercício contribuir para o avanço do conhecimento científico dentro desta área.

Referências

- ALESSIO, H. M.; GOLFARB, A. H. Lipid Peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative responses to training. **J. Appl. Physiol.**, Washington, v. 64, p.1333-1336, 1988.
- ARAÚJO, M. B.; CONTARTEZE, R.V. L.; VOLTARELLI, F. A.; MANCHADO, F. B.; MELLO, M. A. R. Treinamento físico e peroxidação lípidica em diferentes tecidos de ratos. In: ENCONTRO DE BIÓLOGOS. CRBio1, 18, 2007, Cuiabá. **Anais e Resumo**. Cuiabá: UFMT, p.143-144, 2007.
- ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidantes. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.32, n.7, p.671-83, 1994.
- AVULA, R.C. P.; FERNANDES, G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. **Aging**, Washington, v.11, n.4, p.246-52, 1999.
- BALAKRISHNAN, S. D.; ANURADHA, C. V. Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. **Cell Biochem. Funct.**, Guildford, v.16, n. 4, p. 269-75, 1998.
- BENEKE, R. Anaerobic threshold individual anaerobic threshold and maximal lactate steady state in running. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 27, p. 863-671, 1995.
- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free-radicals. **The J. Sports Med. Phys. Fitness**, Torino, v.33: p.205-222, 1993.
- CALHAU, C.; CÂNDIDO, H. R; AZEVEDO, I. Alkaline phosphatase and exchange surfase. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.32, n.2, p.153-154, 1999.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do the paly in physical activity and health? **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.72, n.2, p.637S-76S, 2000.
- GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C.Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp. Biochem. Physiol**, London, v.130, p.21-27, 2001.
- GROUSSARD, C.; RANNOU-BEKONO, F.; MACHEFER, G.; CHEVANNE, M.; VICENT, S.; SERGENT, O.; CILLARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A . Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.89, p.14-20, 2003
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MUCKE, S.; MULLER, R; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. **Int. J. Sports Med.**, Stuttgart, v.6, p.117-130, 1985.
- HESS, M. L.; MANSON, N. H. Molecular oxygen: friend and foe: the role of oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, London, v.16, p.969-985, 1984.
- JENKINS, R.R. Free radical chemistry: Relationship to exercise. **Sports Med.** v.5, p.156-170, 1987.
- KRUGER, J.; SCHNETTLER, S.; HECK, H. Relationship between rectangular triangular increasing work blood and maximal lactato steady state on the crank ergometer. In: HERMANS, G. P.; MOSTERD, W. L. (Ed.) **Sports, medicine and health**. Amsterdam: Excerpta Medica, 1990. p.685-690. (International Congress Series)
- LOWENSTEIN, J. M. The urine nucleotide cycle revised. **Int. J. Sports Med.**, Stuttgart, v. 11, p. S37-S46, 1990.
- MADER, A.; HECK, H. A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. **Int. J. Sports Med.**, Stuttgart, v.7, suppl., p.45-46, 1986.

- MANCHADO, F.B.; GOBETTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A. R. Maximal lactate steady in running rats. **JEP. online.** v.8, p.4, 2005.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- OOKAWARA, T.; HAGA, S.; HA, S.; OH-ISHI, S.; TOSHINAI, K.; KIZAKI, T.; JI, L. L.; SUZUKI, K.; OHONO, H. Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. **Free Radic. Res.,** Yverdon, v.37, n.7, p.9-713, 2003.
- OSORIO, R. A. L.; CHRISTOFANI, J. S.; ALMEIDA, V. D.; RUSSO, A. K.; PIÇARRO, I. C. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. **Comp. Biochem. Physiol.,** London, v.135, p.89-95, 2003.
- OWEN, A. J.; FTZGERALD, K. J.; PEOPLES, G. E.; MCLENNAN, P. L. Effect of diet on fatty acid composition and markers of oxidative stress in response to acute exercise in rat mode. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.,** Oxford, v.30, n.5-6, p.A8-A9, 2003.
- PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L. F. P. B.; BECHARA, E. J. H.; CURI, R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. **Cienc. Cult.,** São Paulo, v.48, n.43-46, 1996.
- PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L. F. P. B.; BECHARA, E. J. H.; CURI, R.; SAFI, D. A.; Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise – trained rats. **Physiol. Behav.,** Oxford, v.56, n.5, p.1095-1099, 1994.
- PRADA, F. J. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. Indicadores metabólicos e estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento por corrida em esteira rolante em velocidade equivalente à máxima fase estável de lactato. **R. Bras. Ci. Mov.,** Brasília, v. especial, p.240-240, 2003.
- PRADA, F. J. A.; VOLTARELLI, F. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. Indicadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento em natação. **Espaço: Rev. Port. Ci. Desporto,** Porto, v.4, n.2, p.237-274, 2004.
- QUINDRY, J. C.; STONE, W. L.; KING, J.; BROEDER, C. E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. **Med. Sci. Sports Exerc.,** Madison, v.35, n.7, p.1139-1145, 2003.
- RADÁK, Z.; KANEKO, T.; THARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effects of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Rad. Biol. Med.,** New York, v.27, p.69-74, 1999.
- RADÁK, Z.; APOR, P.; PUCSOK, J.; BERKES, I.; OGONOVSKY, H.; PAVLIK, G.; NAKAMOTO, H.; GOTOS, S. Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. **Life Sci.** v.72, p.1627-33, 2003.
- REID, M. B. React oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. **News Physiol. Sci.,** Bethesda, v.11, p.114-119, 1996.
- RUSH, J. W. E.; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clin. Biochem.,** Toronto, v.30, p.345-351, 2003.
- SEN, C. K. et al. Exercise: induced oxidative stress and antioxidant nutrients. In: KOMI, P. V. (Ed.). **Nutrition in sports.** Oxford: Blackwell, p.22, 2001. (Encyclopaedia of sports medicine, v. 7)
- SELMAN, C.; McLAREN, J. C.; COLLINS ALI DUTHIE, G. G.; SPEAKMAN, J. R. Antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and DNA oxidative damage: effects of short-term voluntary where running. **Arch. Biochem. Biophys.,** New York, v.401, p.255-261, 2002.
- SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.48, n.6, 2003.
- SJODIN, B.; JACOBS, I. Onset of blood lactate accumulation and marathon performance. **Int. J. Sports Med.,** Stuttgart, v.2, p.23-6, 1981.
- SJODIN, B.; WESLING, H. E.; APPLE, S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.,** Auckland, v.10, p.236-254, 1990.
- STEGGMAN, H.; KINDERMAN, N. Comparison of prolonged exercise tests at the individual anaerobic threshold and the fixed threshold of 4.0 mmol/l lactate. **Int. J. Sports Med.,** Stuttgart, v.3, p.105-110, 1982.
- TAPPEL, A. L.; Lipid peroxidation damage to cell. **Comp. Ted. Proc.** v.32, p.1870-1874, 1973.
- VIINIKKA, L.; VUORI, J.; YLIKORKALA, O. Lipid peroxides, protacyclin and throwboxane A2 in runners during acute exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.,** Madison, v.16, p.275-277, 1984.
- WASSERMAN, K.; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic threshold in cardiac patients during exercise. **Pediatr. Cardiol.,** New York, v.20, p.12-15, 1964.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, Washington, v.74, p.139-161, 1994.

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, FAPESP.

Endereço:

Michel Barbosa de Araújo

Av. 20 A, 867 – Fundos – Vila Indaiá

Rio Claro SP

13506-710

e-mail: mbujo@ig.com.br

Manuscrito recebido em 16 de abril de 2007.

Manuscrito aceito em 26 de maio de 2007.

10.3. Cópia do Artigo Aceito para publicado na Journal of Chinese Clinical

Original article

Oxidative stress in rats exercised at different intensities

Michel Barbosa de Araújo*, Fabrício Azevedo Voltarelli, Ricardo Vinícius Ledesma Contarteze, Fúlvia de Barros Manchado-Gobatto, Maria Alice Rostom de Mello

Department of Physical Education, UNESP, University of São Paulo State, Rio Claro, São Paulo, Brazil

Corresponding Author: Michel Barbosa de Araújo - Sao Paulo State University – UNESP, Department of Physical

Education, Rio Claro, São Paulo, Brazil, 13506-900.

Phone: +55 (19) 35264320; Fax: +55 (19) 3526432;

E-mail address: mbujo@ig.com.br

[Abstract] Objective The present study aimed to analyze the effects of physical training at different intensities on aerobic conditioning and oxidative stress biomarkers in rats. **Methods** Wistar rats (90 days of age) weighing 320-400g at the beginning of the experiment had the aerobic / anaerobic metabolic transition determined by Maximal Lactate Steady State test (MLSS). The rats were trained during 40 min/day, 5 days/week, at the speed equivalent to MLSS (MT) or 25% above it (AT), during 8 weeks. As controls, rats maintained sedentary (S) were used. At the end, all rats were sacrificed in order to analyze biomarkers of the lipid peroxidation: concentration of substances that react to thiobarbituric acids (TBARs): antioxidant status: catalase activity (CAT) and cellular activity: alkaline phosphatase activity (AP) in different organs: muscle gastrocnemius, liver, brain and blood. **Results** Physical training at intensities equivalent to the metabolic transition and 25% above it improved the aerobic conditioning of the animals. Exercise-training at both intensities probably unchained antioxidant compensatory responses which avoided tissue lipid peroxidation. **Conclusion** These results suggest that, at least in part, that the antioxidant defense mechanisms showed adaptative responses to training in the different ways, in the different organs and tissues analyzed.

[Key words] Maximal lactate steady state test; free radical; lactate; exercise training

INTRODUCTION

The beneficial effects of regular physical exercise have long been known. The effectiveness of regular physical activity in the prevention of chronic diseases such as diabetes, cancer, hypertension, obesity, depression, and osteoporosis and premature death, is well established. However, the beneficial effects of exercise are lost with exhaustion. It is well known that exhaustive exercise, especially when sporadic, causes structural damage to or inflammatory reactions within the muscles. This damage is due, at least in part, to the production of reactive oxygen species (ROS) ^[1]. Also, it was reported that ROS production by acute or chronic exercise may elicit different responses depending on the organ tissue type and its endogenous antioxidant levels ^[2].

ROS are formed during normal metabolism, through enzymatic and non-enzymatic processes and continually damage cell lipids, proteins, and nucleic acids ^[3]. Peroxidation of unsaturated fatty acids from the phospholipids of the cell membrane can result in a significant loss of its integrity, which consists in one of the most remarkable effects of the oxidative damages ^[4], leading to the generation of aldehydes and potentially harmful substances. The non-specific test of the substances reactive to the thiobarbituric acid (TBARs) is frequently applied to infer the oxidative damages to lipids ^[5].

To protect themselves against oxidation, the organisms count on chemical and enzymatic mechanisms. The main antioxidant defensive system consists of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) (CuZn-SOD-Cytosolic and extra cellular

and Mn-SOD- mitochondrial), catalase (CAT) (CAT-heme-enzyme) and glutathione peroxidase (GR/GPX) (selenium dependent and non-dependent), to decompose the O^- anion, H_2O_2 and hydroxides ^[6]. During physical exercise, several chemical reactions that result in the formation of ROS take place. To protect tissues against possible damage caused by ROS, antioxidant enzymes such as the SOD, catalase and GPX/GR, seem to respond in an adaptive manner, increasing their activities in the tissues and organs of trained individuals ^[7,8,9], although there are contradictions ^[10].

Although there have been many studies on oxidative stress caused by exercise that utilized oxidative biomarkers in various tissues, few associated those biomarkers to the exercise intensity. Therefore many questions still remain unanswered, such as 1) does exercise intensity affects the balance between ROS production and the antioxidant system in organs such as brain in a similar way it does in skeletal muscle and liver? 2) what is the relationship between the exercise intensity, the exercise-induced oxidative stress and endogenous antioxidants in different organs? We hypothesize that exercise intensity may have important effects on organs such as the brain as well as on the skeletal muscle and the liver and that endogenous antioxidants may play an important role in the adaptation to exercise-induced oxidative stress in these organs.

In the present study, rats were subjected to exercise training at two different intensities: equivalent to the aerobic / anaerobic metabolic transition and 25% above this intensity. The aerobic capacity of the animals was evaluated by the maximal lactate steady state determination. Oxidative damage was assayed by examining lipid peroxidation (TBARs concentrations), the antioxidant status was examined by the CAT activity and the cell activity was evaluated by measuring alkaline phosphatase activity. Assays were done in blood, brain, liver and gastrocnemius muscle. Results indicate tissue heterogeneity in the oxidative stress associated to the exercise intensity.

MATERIAL AND METHODS

Adult male wistar rats, weighing between 320-400g at the beginning of the experiment and between 420-500g at the end, which had free access to water and food (commercial rodent chow), were used. The animals were kept in collective polyethylene

cages, measuring 37.0 x 31.0 x 16.0cm, (5 animals / cage) under controlled temperature condition (25°C) and light/dark cycle (12h / 12h, with the lights on from 6:00 pm to 6:00 am). All experiments involving the animals were performed in accordance to the specific Brazilian resolutions on the Bioethics in Experiments with Animals (Law n° 6.638, of May 8th, 1979 and decree n° 26.645 of June 10th, 1934).

The animals were divided in three experimental groups: Sedentary (S) – not submitted to exercise training ($n = 10$); Trained at the Metabolic Transition intensity (MT) – submitted to run training on a treadmill, with speed equivalent to the aerobic / anaerobic metabolic transition, 40 minutes / day, 5 days / week, for 8 weeks ($n = 6$) and Trained at intensity 25% Above the Metabolic Transition (AT) – submitted to run training at speed 25% higher to the aerobic / anaerobic metabolic transition, 40 minutes / day, 5 days / week, for 8 weeks ($n = 7$).

These animals had aerobic/anaerobic metabolic transition was estimated by the detection of the maximal lactate steady state (MLSS). To determine the MLSS, series of 25 minute exercises were performed through running on the treadmill, at different speeds in each series, with 48 hour intervals between them and blood sampling every 5 minutes, for lactate determination. The blood lactate concentration representative of the MLSS was considered at the highest speed in which blood lactate concentration varied by less than 1 mmol/L between 10 and 25 minutes of exercise ^[11,12]. The blood lactate concentration was determined by an enzymatic method ^[13]. To evaluate the possible effects of exercise training on the aerobic conditioning, the animals were submitted to MLSS tests at the beginning and at the end of the experimental period.

The rats 48 horas after exercise session, had been anesthetized with sodium thiopental (40mg/kg of body weight, intraperitoneal) and blood (8ml) was collected through the hepatic vein. Samples from the left gastrocnemius muscle, liver and brain were also collected for the evaluation of the following biomarkers: as an indicator of the antioxidant status, catalase enzyme activity – CAT ^[14], products that react to the

thiobarbituric acid – TBARs ^[15], as an indicator of lipid peroxidation and alkaline phosphatase enzyme activity, as an indicator of cell activity (Commercial kit from Labtest Diagnostica, MG, Brazil).

The statistical procedure consisted of one-way ANOVA. When necessary, the Newman-Keuls post-hoc comparison test was used ^[16]. In all cases, the statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

The blood lactate values during the effort test for the determination of MLSS obtained at the beginning of the experiment, referent to one rat, as an example (figure. 1). For this animal, the MLSS occurred at the speed of 25m/min, with blood lactate concentration of 4.11 ± 0.53 mmol/L. Taking the whole lot of animals in consideration, 82% of the animals obtained the MLSS at the speed of 25m/min, with a blood lactate concentration of 4.38 ± 0.22 mmol/L and 17% obtained it at the speed of 30m/min, with a blood lactate concentration of 4.42 ± 0.45 mmol/L.

INSERT FIG. 1.

Figure. 2 presents the concentration of the substances that react to the thiobarbituric acid (TBARs, biomarker of lipid peroxidation) in blood, brain, liver and gastrocnemius muscle at the end of the experiment. The values did not present any significant difference between the groups.

INSERT FIG. 2.

Fig. 3 shows the of the catalase activity (CAT, biomarker of antioxidant status) in blood, brain, liver and gastrocnemius muscle at the end of the experiment. There was a significant increase of CAT in the liver of the animals trained above the metabolic transition (AT) compared to the other groups.

INSERT FIG. 3.

The values of the alkaline phosphatase activity (AK, cell activity biomarker) in brain, liver and gastrocnemius muscle at the end of the experiment (figure. 4). There was an increase of AK activity in the brain of the animals trained above the metabolic transition (AT) in relation to those trained at the metabolic transition intensity (MT) and Sedentary animals.

INSERT FIG. 4.

DISCUSSION

The present study was designed to clarify the effect of exercise training performed at the aerobic/anaerobic metabolic transition and 25% above it on aerobic conditioning and on biomarkers of lipid peroxidation by reactive oxygen species as well as antioxidant enzyme activities in different rat tissues. The main findings were: I) exercise training at both intensities equally improved the aerobic conditioning of the animals; II) exercise training at both intensities did not alter lipid peroxidation biomarkers (TBARs) in any of the tissues evaluated and III) training at the intensity above the metabolic transition increased cell activity biomarkers (alkaline phosphatase) in brain and antioxidant enzyme activity (CAT) in liver.

The MLSS corresponds to the highest workload that can be maintained over time without increasing blood lactate accumulation. The MLSS workload defines the exercise intensity above which there is a net contribution of energy associated with blood lactate accumulation consequent to a rate of glycolysis that exceeds the rate of mitochondrial pyruvate utilization^[17]. At exercise intensities up to the MLSS, there is a balance between lactate production and clearance. For this reason, the MLSS determination is considered a good indicator of the endurance exercise capacity and the work rate associated to MLSS is often used in the assessment of the endurance capacity^[18].

The analysis of the MLSS tests performed in the beginning of the experiment showed that, in rats submitted to physical exercise on the treadmill, the blood lactate

presents a pattern and/or kinetic similar to those described for human beings ^[19]. Similar results were observed recently, when using rats submitted to swimming and treadmill running exercise ^[20,21,11,22]. The mean blood lactate concentration equivalent to the MLSS, for whole lot of animals evaluated in the beginning of our experiment, was of 4.38 ± 0.22 mmol/L and similar to those obtained in previous studies in which the treadmill running MLSS test was applied in sedentary and eutrophic animals ^[11,22].

Lipid damage by ROS is dependent on various factors ^[23], although the results of the studies involving the measurement of lipid peroxidation consequent of the oxidative stress induced by exercise in organs and tissues of different animal models are, still controversial and obscure ^[4,17]. In experimental studies, the lipid peroxidation can be rated by the determination of the concentration of products that react to the thiobarbituric acid (TBARs). In the present study, the TBARs concentrations did not present significant differences in any of the tissues analyzed. According to some authors, oxidative stress could be observed only after exhaustive exercise. During non exhaustive exercise, the antioxidant defense would prevent the damage induced by ROS generation by exercise and training diminishes oxidative stress due to exhaustive exercise ^[1]. Here, although part of the rats was exercised above the MLSS, the exercise was not performed until exhaustion. This is a matter that deserves further investigation in our rat model, since a limitation of the present study is that we used only one lipid peroxidation biomarker. There are a number of biomarkers for lipid peroxidation (i.e., hydroperoxides) that could be tested before a definitive conclusion.

Another important factor in the determination of the effects of physical training on different tissues and organs is the evaluation of the cell activity. Alkaline phosphatase activity [AK], which is important in the diagnostic of bone diseases, is also associated to cell activity and transport systems and, for this reason, employed as a cell activity index ^[24]. For instance, skeletal muscle AK activity was reported increased in catabolic conditions such as cancer cachexia and food restriction ^[25]. In our study, AK activity showed higher in the brain of animals trained in the intensity above the metabolic transition (AT) when compared to the animals trained in the intensity equivalent to it (MT) and the sedentary animals, therefore indicating greater cell activity in the first ones.

The increase in cell activity and lipid peroxidation, induced by exercise, is less deleterious if compensated by an increase in the antioxidant defense system activity. Reactive species of oxygen are removed by a series of enzymes, beginning with the superoxide dismutase (SOD), followed by the catalase (CAT) and the glutathione peroxidase (GP) ^[6]. In the present study, we observed a significant increase in liver CAT activity of the animals trained in the intensity above the metabolic transition (AT) when compared to the animals trained in the intensity equivalent to it (MT) and the rats kept sedentary. On the other hand, in serum and gastrocnemius muscle, no significant difference was found between the groups.

The most plausible hypothesis for the absence of alterations in lipid peroxidation levels among the groups, at least in the liver, resides in the fact that the compensatory antioxidant mechanisms adapted themselves adequately, contributing to the minimization of the oxidant effects on this specific tissue. Unfortunately, it was not possible the measurement of other antioxidant status biomarkers (i.e. SOD, GP) that could be used to corroborate the results.

If physical training increases the antioxidant enzyme activity is still a matter that has not been totally elucidated. While some authors demonstrated increase in the antioxidant enzymatic activity (CAT, SOD and GP) in skeletal muscle, induced by physical training ^[8,6], others did not report significant changes in the activities of these enzymes ^[26]. The responses of the skeletal muscle antioxidant enzymes seem to be dependent on the ergometer used: swimming ^[8], treadmill running ^[27,6] or running in a spontaneous activity wheel ^[28], the exercise protocol: continuous ^[26] or intermittent ^[29,30], as much as the muscle fiber type ^[29] and the species studied: rat ^[27,30], mouse ^[7] or other mammals ^[28]. Moreover, the responses of the antioxidant enzymes to training seem to be tissue-dependent. In a study performed by Avula, *et al.* ^[7], it was demonstrated that physical training elevated the glutathione peroxidase activity in liver, kidney, heart and skeletal muscle, as much as the glutathione transferase activity in liver and salivary glands. The results of this study indicated that physical training was beneficial in decreasing lipid peroxidation and increasing the activity of antioxidant enzymes not only in the skeletal muscle, but also in various other tissues. Therefore, the beneficial effects of physical exercise on the increase of the antioxidant enzymes

activity and suppression of lipid peroxidation varies from tissue to tissue and/or from organ to organ. The results of the present study corroborate this hypothesis.

CONCLUSION

From the results obtained in the present study, it can be concluded that results concerning to the antioxidant status and the lipid peroxidation, support the hypothesis that the responses to physical exercise are not only dependent on the effort intensity but, also, on the tissue being analyzed. Probably compensatory responses of the antioxidant defense system to physical training avoided the tissue lipid peroxidation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by ‘Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proc. 05/58810-1)’. Grateful to Clarice Yoshio Sibuya, Eduardo Custódio and José Roberto Rodrigues da Silva, who provided essential, help to the project.

REFERENCES

1. Gomez-Cabrera M, Domenech M, Vica J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Rad Biol Med*, 2008, 44: 126-131.
2. Liu J, Helen CY, Eva O, Vervik-Douki, Tory H, Stephanie JD, Daniel WC, George AB, Bruce NA. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*, 2000, 89: 21–28.

3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 89rd ed. Oxford Clarendon Press, 1989.
4. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell. *Comp Ted Proc*, 1973, 32: 1870-1874.
5. Selman C, McLaren JC, Collins ADGG, Speakman JR. Antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and DNA oxidative damage: Effects of short-term voluntary where running. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 401: 255-261.
6. Silveira LR. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2004, 48:15-23.
7. Avula RCP, Fernandes G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging*, 1999, 11: 246-52.
8. Okawa H, Nobuko O, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351-358.
9. Oztasan N, Seyithan T, Kenan GKA, Omer A, Handan TES, Sait K, Sedat A, Fatih ASD, Mustafa G. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol*, 2004, 91: 622–627.
10. Pereira B, Costa Rosa LFPB, Bechara EJH, Curi R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. *Cien & Cult*, 1991, 48: 43-46.
11. Kinnunen S, Hyyppa S, Lappalainen J, Oksala N, Venojarvi M, Nakao C, Hanninen O, Sen CK, Atalay M. Exercise – induce oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *Eur J Appl Physiol*, 2005, 93: 498-501.
12. Vancini, Rodrigo L, Lira, Claudio AB, Guedes JR, Dilmar P, Silva, Antonio C, Nouailhetas, Viviane LA. 2005. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. *Rev Bras Ativ Fis Saúde*, 2005, 10: 47-58.
13. Engels RC, Jones JB. Causes and elimination of erratic blanc in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved

conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Anal Biochem*, 1978, 88: 475-484.

14. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. Orlando, 1984, 105:121-126.

15. Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 1998, 24: 511-21.

16. B. Dawson-Saunders, R.G. Trapp. *Basic and Clinical Biostatistics*. Appleton and Lange, East Norwalk, Connecticut, 1994.

17. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med*, 1985, 6: 117-30.

18. Billat VL, Pascal S, Guillaume P, Jean-Pierre K, Jacques M. The Concept of Maximal Lactate Steady State A Bridge Between Biochemistry, Physiology and Sport Science. *Sports Med*, 2003, 33: 407-42.

19. Denadai BS, Gomide EB, Greco CC. Relationship between onset of blood lactate accumulation, critical velocity, and maximal lactate steady state in soccer players. *J Strength Cond Res*, 2005, 19: 364-368.

20. Gobatto CA, Kokubun E, Sibuya CY, Mello MAR. Efeitos da desnutrição protéico – calórico e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após testes de cargas progressivas. Resultados preliminares. *Ciência e Cultura*, 1991, 43: 725-736.

21. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 130: 21-27.

22. Contarteze RVL, Manchado FB, Gobatto CA, Mello MAR. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 14: 1-8.

23. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Maximal lactate steady in running rats. *JEP Online*, 2005, 8: 4-11.

24. Calhau C, Cândido H, Azevedo I. Alkaline Phosphatase and Exchange Surface. *Clin Biochem*, 1999, 32: 153-154.
25. Ventrucci G, Mello MAR, Gomes-Marcondes MCC. Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats a leucine-rich diet. *Endocrinol Related Cancer*, 2004, 11: 887-895.
26. Alessio HM. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2000, 32: 1576-1581.
27. Prada FJA, Voltarelli FA, Oliveira C, Gobatto CA, Macedo DV, Mello MAR. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. *Rev Bras Cien Mov*, 2004, 12: 29-34.
28. Atalay MI, Seene T, Aniñen O, Sen CK. Skeletal muscle and heart antioxidant differences in response to sprint training. *Acta Physiol Scand*, 1986, 158:129-139.
29. Smolka M, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira S. HSP-72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regul Comp Physiol*, 2000, 279: E1539-1545.
30. Alessio HM, Golfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive responses to training. *J Appl Physiol*, 1980, 64: 1333-1336.

LIST OF LEGENDS OF THE FIGURES

Fig. 1. Blood lactate of a single rat during, for example effort test for determination of the Maximal Lactate Steady State in the beginning of the experiment. For this animal, the MFEL occurred at speed of 25m/min and blood lactate concentration of 4.11 ± 0.53 mmol/L.

Fig. 2. Concentration of substances that react with thiobarbituric acid (TBARs) in the blood, brain, liver and gastrocnemius muscle of the animals at the end of experiment. Results expressed by mean \pm standard deviation of 6 to 10 animals per group. MT = Animals trained at intensity of Maximal Lactate Steady State; AT = Animals trained at intensity of 25% above of Maximal Lactate Steady State.

Fig. 3. Activity of catalase enzyme (CAT) in blood, brain, liver and gastrocnemius muscle of the animals at the end of experiment. Results expressed by mean \pm standard deviation of 6 to 10 animals per group. MT = Animals trained at intensity of Maximal Lactate Steady State; AT = Animals trained at intensity of 25% above of Maximal Lactate Steady State. a – AT x MT, b – Sedentary x AT.

Fig. 4. Activity of alkaline phosphatase enzyme (AP) in brain, liver and gastrocnemius muscle of the animals at the end of experiment. Its expressed by mean \pm standard deviation of 6 to 10 animals per group. MT = Animals trained at intensity of Maximal Lactate Steady State; AT = Animals trained at intensity of 25% above of Maximal Lactate Steady State. a – AT x MT, b – Sedentary x AT.