

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE EDUCAÇÃO FÍSICA BACHARELADO

CAMILA BAUMER TROMM

**EFEITOS DE DUAS E TRÊS FREQUENCIAS DE TREINAMENTO FÍSICO
AERÓBIO SEMANAL SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO**

CRICIÚMA

2011

CAMILA BAUMER TROMM

**EFEITOS DE DUAS E TRÊS FREQUENCIAS DE TREINAMENTO FÍSICO
AERÓBIO SEMANAL SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel no curso de Educação Física da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

Co-Orientador: Prof. Me. Luciano Acordi da Silva

CRICIÚMA

2011

CAMILA BAUMER TROMM

**EFEITOS DE DUAS E TRÊS FREQUENCIAS DE TREINAMENTO FÍSICO
AERÓBIO SEMANAL SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Educação Física da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Aspectos Fisiológicos do Exercício.

Criciúma, 30 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ricardo Aurino de Pinho - Doutor - (UFRGS) - Orientador

Prof. Cleber de Medeiros - Mestre - (UNESC)

Prof. Gustavo da Costa Ferreira - Doutor - (UFRGS)

Aos meus professores:

"O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira."

William Arthur Ward

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar ao meu lado me dando força para nunca desistir e por ter me dado oportunidades jamais previstas.

Agradeço a toda minha família, em especial a minha mãe, pelo apoio incondicional, e ao meu pai, pela confiança e preocupação. Vocês são à base da minha vida, amo vocês!

Aos meus amigos de turma, que estiveram presentes comigo no dia-a-dia, rindo, chorando, brincando, estudando, e lutando para concretizar esta etapa. Como em uma trajetória normal, um dia cada um segue o seu caminho e por circunstâncias da vida, acabamos nos distanciando um pouco. Mas o sentimento de torcida continua forte sempre!

A todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica. Ao meu professor e orientador Ricardo Pinho, pela oportunidade da iniciação científica, além de toda confiança, atenção e compreensão que sempre demonstrou por mim. Ao meu co-orientador, Luciano Acordi, por me ensinar, incentivar, cobrar, sempre com muita paciência e atenção.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, grupo do Prof. Cláudio, e em especial aos meus colegas de iniciação científica, Débora Scheffer, Douglas Moreira, Guilherme Laurentina, Karoliny Bom, Izadora Mariano e Bruna Pozzi.

Muito obrigada a todos!

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito, não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos.”

Martin Luther King

RESUMO

Durante a contração muscular intensa induzida pelo exercício físico, há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo (EO) em diversos órgãos, dentre eles o fígado e o coração. O treinamento físico pode aumentar as defesas antioxidantes e diminuir o EO. Contudo, ainda existem dúvidas sobre a frequência de treinamento físico necessária para melhorar parâmetros de EO. Este trabalho tem como objetivo verificar o efeito das frequências de duas e três sessões de exercício físico por semana sobre biomarcadores de EO no fígado e coração. Foram utilizados 18 camundongos machos (CF1), jovens (3 meses), pesando entre 30 e 35g, divididos em três grupos (n=6/grupo): não treinado (NT); treinado duas vezes por semana (T2) e treinado três vezes por semana (T3). Os animais foram submetidos ao treinamento durante oito semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão os animais foram sacrificados. O fígado e o coração foram cirurgicamente removidos e armazenados em freezer – 70°C. Foram analisadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteína (CP), conteúdo total de tióis (TT), atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). Os resultados demonstraram que apenas o grupo T3 reduziu dano oxidativo (TBARS e CP). Ademais, houve aumento no TT, atividades da SOD e CAT no mesmo grupo em comparação com o não treinado. A atividade da GPX não apresentou diferença significativa entre os grupos. Este estudo demonstrou que somente a frequência de treinamento de três sessões por semana reduz o dano oxidativo e aumenta a eficiência do sistema enzimático antioxidante de camundongos.

Palavras-chave: dano oxidativo. enzimas antioxidantes. exercício físico. frequência de treinamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – Adenina Difostato
AMP – Adenina Monofosfato
AMPK – Proteína Quinase Mitogênica Ativada
AP-1 – Ativador Protéico 1
ATP – Adenina Trifosfato
CAT – Catalase
CP – Carbonilação de proteínas
CTE – Cadeia Transportadora de Elétrons
CuZnSOD – Superóxido Dismutase dependente de Cobre e Zinco
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DTNB – Ácido Ditionitrobenzóico
EO – Estresse Oxidativo
ERK – Quinase Extracelular
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
GPX – Glutaciona Peroxidase
GSH – Glutaciona
GSSH – Glutaciona Oxidada
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HOCl – Ácido Hipocloroso
HSP – Proteínas de Estresse
IKK – IκB Quinase
iNOS – Óxido Nítrico Sintase
JNK – c-jun N-terminal Quinase
LPO – Lipoperoxidação
LPS – Lipopolissacarídeos
MEK1 – Proteína Quinase Serina Treonina
MnSOD – Superóxido Dismutase dependente de Manganês
mRNA – RNA mensageiro
MtDNA – DNA Mitocondrial
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NFκB – Fator Nuclear Kappa B

nm - Nanômetros

NO• - Óxido Nítrico

NRF-1 – Fator Nuclear Respiratório 1

$1O_2$ – Oxigênio Singlet

O_2 – Oxigênio

$O_2^{\bullet -}$ - Radical Ânion Superóxido

OH• - Radical Hidroxila

ONOO- - Peroxinitrito

PGC-1α – Coativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma

RL – Radical Livre

RNA – Ácido Ribonucléico

SH – Sulfidrilas

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Espécies Reativas ao Aquecimento do Ácido Tiobarbitúrico

TRX – Tio-redoxina Redutase

TT – Tióis Totais

VO_{2max} – Consumo Máximo de Oxigênio

XDH – Xantina Desidrogenase

XO – Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 Treinamento Físico.....	13
2.2 Estresse Oxidativo.....	14
2.2.1 Geração de espécies reativas de oxigênio.....	14
2.2.2 Danos oxidativos.....	17
2.2.2.1 Lipoperoxidação.....	17
2.2.2.2 Carbonilação de proteínas.....	18
2.2.3 Sistema de defesa antioxidante.....	19
2.3 ARTIGO 1: Mecanismos Moleculares Antioxidantes modulados pelo exercício físico.....	20
2.3.1 Sinalização da biogênese mitocondrial.....	21
2.3.2 Fatores de transcrição antioxidantes.....	21
2.3.3 Exercício e adaptação antioxidante.....	25
2.3.4 Expressão de genes antioxidantes modulados pelo exercício.....	26
3 ARTIGO 2: Efeito de diferentes frequências de treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo.....	28
3.1 METODOLOGIA.....	29
3.1.1 Caracterização da pesquisa.....	29
3.1.2 Amostra.....	29
3.1.3 Tratamento Estatístico.....	30
3.1.4 Protocolo de treinamento físico.....	30
3.1.5 Eutásia.....	30
3.1.6 Ensaio Bioquímico.....	31
3.1.6.1 Danos oxidativos.....	31
3.1.6.2 Atividade antioxidante.....	31
3.2 RESULTADOS.....	32
3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	36
4 CONCLUSÃO.....	40
5 PERSPECTIVAS PARA FUTUROS ESTUDOS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

ANEXOS.....	51
--------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Durante a contração muscular induzida por exercícios, o consumo de oxigênio pode aumentar de 10 a 20 vezes em níveis sistêmicos e de 100 a 200 vezes em níveis musculares em relação aos valores de repouso (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) ocasionando concomitantemente elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; JENKINS; GOLDFARB, 1993)

O desequilíbrio entre produção e remoção das ERO leva ao processo denominado estresse oxidativo (EO) que está associado a danos musculares e disfunções metabólicas e, por conseguinte redução do desempenho físico (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; AUCELLO; DOBROWOLNY; MUSARÒ, 2009). Adicionalmente, o EO altera o funcionamento fisiológico de diversos órgãos, dentre eles o fígado e o coração. A alta taxa metabólica apresentada por esses órgãos está associada ao alto fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e conseqüente elevada produção de EROs (SILVA et al., 2009).

O fígado é o principal órgão relacionado ao controle metabólico e, diversos autores sugerem que o mesmo é acometido, de forma importante, ao EO durante e após o exercício físico (NAVARRO-AREVALO; SANCHEZ-DEL-PINO, 1998; OGONOVSKY et al., 2005). Do mesmo modo o coração, órgão central do sistema circulatório, também apresenta um elevado consumo de oxigênio durante a realização de exercícios, o que favorece a produção de EROs. As ERO são produzidas principalmente em decorrência vazamento de elétrons ao nível da Coenzima Q entre os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (CTE). Ainda, a xantina oxidase presente no citosol e a NADPH oxidase presente na membrana celular são outras fontes importantes de produção de EROs durante a realização de exercício físico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O estresse oxidativo provoca diversas alterações em células hepáticas e cardíacas, podendo ocasionar doenças como esteatose hepática, hepatite C e aterosclerose. No entanto, o treinamento físico quando bem planejado, pode melhorar tanto os mecanismos de defesa antioxidantes (SILVA et al., 2009; NAVARRO-AREVALO; SANCHEZ-DEL-PINO, 1998; HUSAIN; SOMANI, 2005) ,como a capacidade oxidativa do tecido (SILVA et al., 2009), podendo diminuir a magnitude do ataque oxidativo (PINHO et

al., 2006; RADAK et al., 1999) e prevenir efeitos deletérios decorrentes do mesmo (FREDERICO et al., 2009; COELHO et al., 2010).

Existem evidências de que a presença contínua de pequenos estímulos, que provocam elevações mínimas nas concentrações de EROs são hábeis para induzir a expressão de enzimas antioxidantes e outros mecanismos de defesa (JI, 2007). A base deste fenômeno pode ser explicada pelo conceito de hormese, onde a adaptação ao exercício ocorre por meio de estímulos que expõem a célula a baixas doses de oxidantes, mas sendo inibida por altas doses do mesmo (ZOPPI, 2005; JI et al., 2006). Neste contexto, EROs podem ser benéficas, atuando como sinalizadores para aumentar as defesas antioxidante do organismo (CALABRESE; BALDWIN 2003; JI et al. 2006).

Estudos prévios em modelo animal já demonstraram que o treinamento físico altera positivamente o estado *redox* de inúmeras células e tecidos podendo melhorar parâmetros de estresse oxidativo (SILVA et al., 2010; PINHO et al., 2006; NOJIMA et al., 2008; HAMILTON et al. 2001). Silva et al. (2010) e Frederico et al. (2009) demonstraram que oito semanas de treinamento com cinco sessões semanais foram suficientes para reduzir estresse oxidativo no fígado e no coração. Contudo, não se sabe se as frequências de duas e três sessões semanais efetuadas durante oito semanas de treinamento são suficientes também para induzir melhorias nos parâmetros de EO nos tecidos hepático e cardíaco. Desta forma este trabalho tem como **tema**: Efeitos de duas e três frequências de treinamento físico semanal sobre parâmetros de estresse oxidativo, e como **problema de estudo**: Diferentes frequências de exercício apresentam respostas diferenciadas sobre parâmetros de estresse oxidativo? Para responder este questionamento tem-se como **objetivo geral**: Verificar a resposta de diferentes frequências de exercício sobre parâmetros de estresse oxidativo, e **objetivos específicos**: verificar os efeitos do treinamento físico com duas sessões semanais sobre parâmetros de estresse oxidativo; verificar os efeitos do treinamento físico com três sessões semanais sobre parâmetros de estresse oxidativo.

O trabalho está estruturado da seguinte forma: Capítulo 1: Fundamentação Teórica; Capítulo 2: Metodologia; Capítulo 3: Resultados; Capítulo 4: Análise dos resultados, além de conclusão, referências e anexos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico pode ser definido como uma atividade desportiva sistemática e crônica, individualmente graduada, com intuito de preparar as funções orgânicas e fisiológicas do corpo humano para poder superar as tarefas mais exigentes (BOMPA, 2002). Para que um treinamento seja eficaz e reflita a necessidade do indivíduo evitando lesões musculares, articulares ou ainda overtraining, é necessário respeitar alguns princípios biológicos.

Os princípios biológicos já estabelecidos são: individualidade biológica; adaptação; carga; supercompensação; continuidade; especificidade; reversibilidade; progressão; detecção de fadiga, sobrecarga e recuperação (TUBINO & MOREIRA, 2003; GOMES, 2002). Estes dois últimos princípios vão garantir a existência da supercompensação de forma permanente, que é caracterizada por uma melhora no desempenho físico. O aproveitamento da supercompensação, que permite a aplicação progressiva da sobrecarga, pode ser severamente comprometido por uma inadequada disposição do tempo de aplicação das cargas, ou seja, incorreta recuperação (TUBINO & MOREIRA, 2003). Uma recuperação adequada ocorre, dependendo do tipo do exercício, entre 12 e 72 horas após o mesmo, devido à recuperação de aspectos musculares e metabólicos como a ressíntese do glicogênio muscular e hepático, e síntese de proteínas estruturais (MAUGHAN, GLEESON, GREENHAFF, 2000). Portanto, para a programação de um treinamento a frequência de estímulos se torna um aspecto muito importante. Com uma frequência muito baixa não ocorre aumento da capacidade adquirida, com uma frequência alta pode desencadear o excesso de treinamento (overtraining) (COUNSILMAN, 1968; NOBREGA, 2005). Associadas a estes princípios existem duas variáveis interdependentes: volume e intensidade. O volume consiste na frequência de treino, na duração e no número das sessões (GOMES, 2002). A intensidade consiste na carga, na velocidade ou no intervalo recuperativo. Muitas vezes o aumento dos estímulos de uma dessas variáveis é seguido por um declínio na abordagem em treinamento da outra, evidenciando sua interdependência (TUBINO & MOREIRA,

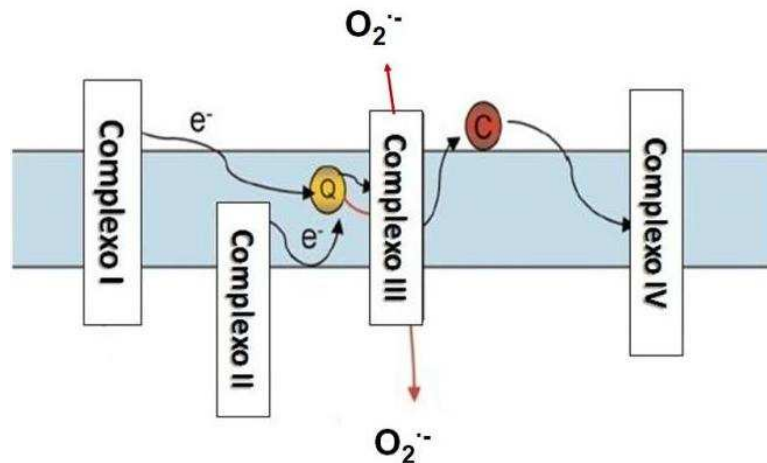
2003; GOMES, 2002).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

2.2.1 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio

Os mecanismos de geração de EROs durante o exercício físico ocorrem em diversos compartimentos celulares, tais como, mitocôndrias, membranas e citoplasma.

Na mitocôndria, uma das formas de produção de EROs durante o exercício é devido a um escape de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (CTE). O escape de elétrons entre o complexo I e ubisemiquinona e entre ubisemiquinona e o complexo III parecem ser os responsáveis pela maior parte dos superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) gerados (BOVERIS; CHANCE 1973; CADENAS; DAVIES 2000). Estudos *in vitro* mostram que a CTE gera superóxido a partir da redução univalente do O_2 . Este único elétron vem da redução da ubiquinona que em vez de aceitar um outro elétron e um próton para formar ubiquinol, pode doar o seu elétron desemparelhado para o O_2 , formando $O_2^{\bullet-}$. Salo et al. (1991) demonstrou que a estabilidade da família ubiquinona diminui com o aumento da temperatura, e a transferência de elétrons ao longo da CTE diminui enquanto a transferência eletrônica direta ao oxigênio (a reação "vazamento") aumenta, gerando mais $O_2^{\bullet-}$. Estima-se que de 2-4% do oxigênio consumido por seres humanos seja reduzido a $O_2^{\bullet-}$ por mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) .



(BAYIR; KAGAN, 2008)

Figura 1: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio através da Cadeia Transportadora de Elétrons

No citoplasma, a produção de EROs durante o exercício exaustivo pode ser causada pela ativação da enzima xantina oxidase. O exercício intenso pode causar isquemia fazendo com que o ATP seja convertido em ADP, AMP, inosina e hipoxantina. Sob tais condições a enzima xantina desidrogenase intracelular (XDH) é convertida em xantina oxidase (XO), que utiliza o O_2 como aceptor de elétrons, gerando diretamente superóxido e peróxido de hidrogênio. Quando o oxigênio é reperfundido uma explosão de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 ocorre. Tem sido argumentado que a XO pode desempenhar um papel mais importante na produção de radicais livres do que a CTE durante exercícios exaustivos (VINA et al., 2000; SACHDEV; DAVIES, 2007). No entanto é mais provável que ambos contribuam, dependendo do tipo, intensidade e duração do exercício.

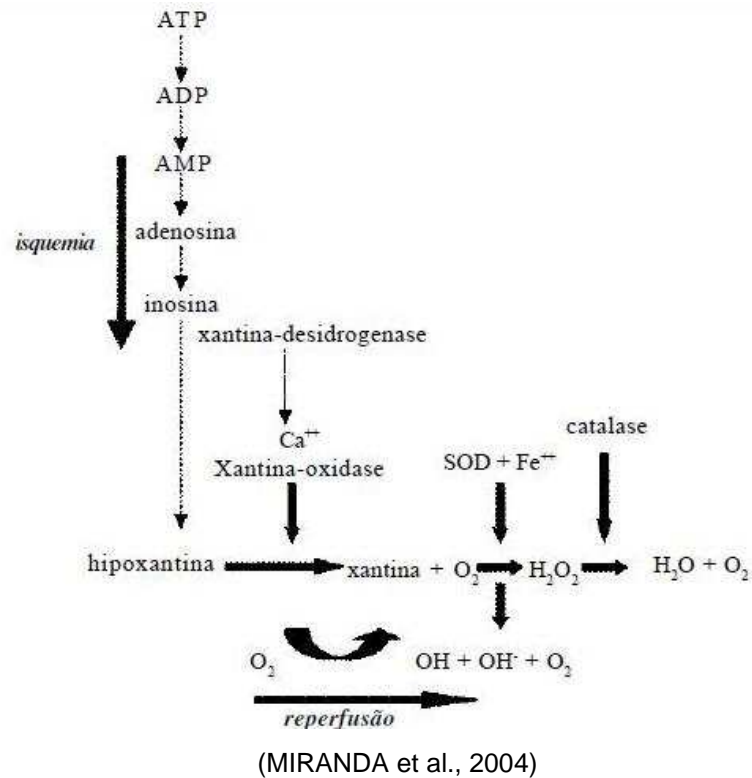
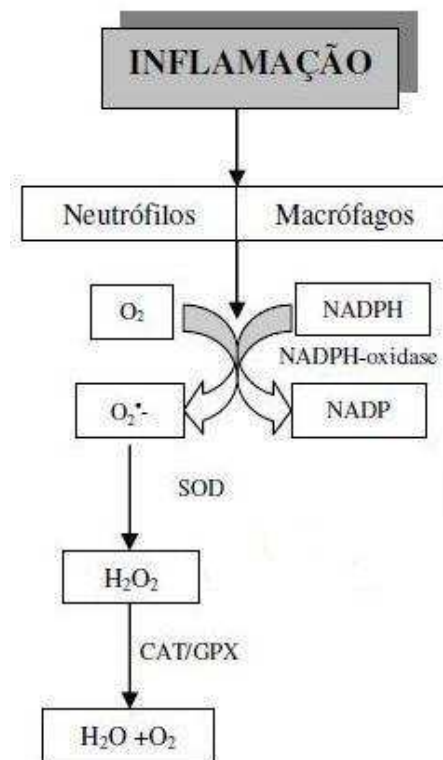


Figura 2: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio nos processos de Isquemia/Reperfusão.

Nas membranas plasmáticas a produção de EROs, especialmente em casos de exercícios excêntricos, é resultado da migração de neutrófilos e outras células fagocíticas do organismo como parte de uma resposta imune à lesão tecidual (MCARDLE et al., 1999). Macrófagos e neutrófilos ativam a enzima NADPH oxidase que em sua reação oxida NADPH a NADP, utilizando neste processo o oxigênio como aceptor de elétrons, formando conseqüentemente $O_2^{\bullet-}$. Este $O_2^{\bullet-}$ em contato com óxido nítrico pode formar peroxinitrito. O $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer ação da SOD e ser dismutado a H_2O_2 . O H_2O_2 pode ser convertido em HOCl, que em contato com Ferro ou H_2O_2 pode gerar o radical hidroxila.



(PINHO et al., 2006)

Figura 3: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio em processos Inflamatórios.

2.2.2 Danos Oxidativos

2.2.2.1 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica é o processo através do qual ERO agredem os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos de membranas das células, desintegrando-as (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Durante a lipoperoxidação (LPO), intermediários podem sofrer quebras gerando hidrocarbonetos de cadeia curta (etano, pentano), aldeídos (como o malonaldeído-MDA, 4-hidroxinonenal), epóxidos e outros produtos altamente citotóxicos. Como resultado da lipoperoxidação as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, resultando em perda na homeostase e morte celular. (BARREIROS; DAVID, 2006).

A LPO é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o radical livre (RL) remove um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado produzindo um radical de lipídio, que ao reagir com o oxigênio molecular forma o radical peroxila. Na propagação, o radical peroxila retira hidrogênio de outro lipídio, formando o hidroperóxido de lipídio e novamente radical de lipídio. Na fase terminal, os radicais produzidos se combinam formando um não-radical. O hidroperóxido de lipídio pode sofrer outras reações produzindo aldeídos e alcanos. (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

2.2.2.2 Carbonilação de Proteínas

Durante a oxidação, as proteínas podem perder aminoácidos ou eles podem ser fragmentados. A oxidação dos aminoácidos pode resultar na formação de grupos carbonil, tióis oxidados, entre outras modificações que levam a alterações estruturais na proteína ou alterações na função da enzima. Os grupos carbonil são formados principalmente a partir da oxidação de alguns aminoácidos mediados por ERO, como lisina, arginina, prolina e treonina. Porém, reações secundárias de cadeias laterais de alguns aminoácidos (cisteína, lisina e histidina) com sub-produtos da LPO e da oxidação de carboidratos, também formam grupos carbonil. (DALLEDONNE et al., 2003).

Tióis são uma classe de moléculas caracterizadas por apresentar grupos sulfidrilas (SH) em seu sítio ativo, e que quando oxidados por radicais livres, comprometem o funcionamento das proteínas. (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

As ERO também têm a capacidade de alterar o sistema dos lisossomas e dos proteossomas, duas principais vias pelas quais as proteínas são degradadas. (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). De acordo com Davies e Shringarpure (2006), os danos em proteínas mediados por RL e o acúmulo de proteínas oxidadas levam a um concomitante aumento na oxidação de proteínas reduzindo a degradação de proteínas oxidadas.

2.2.3 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O sistema de defesa antioxidante é constituído por proteínas enzimáticas como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPX) e Tio-redoxina Redutase (TRX) (responsável pela manutenção dos grupos tiol das proteínas); e por antioxidantes não enzimáticos, como o ascorbato (doador de elétrons), urato (sequestrador do radical hidroxila e peroxila) glutathione reduzida (doador de elétrons e precursora da GPX), tocoferol (doador de elétrons), flavonoides e carotenoides (supressores do oxigênio singlet). (POWERS et al., 2004, TIRAPEGUI, 2006)

Mecanicamente a SOD dismuta o $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 . Sendo que a CAT e GPX catalisam a degradação subsequente do H_2O_2 a H_2O . No músculo esquelético, 15 – 35% da atividade da SOD encontra-se nas mitocôndrias e o restante no citosol (LEEUEWENBURGH; HEINECKE, 2001). Já as concentrações da CAT são mais elevadas nos peroxissomas do que nas mitocôndrias (ASCENSÃO et al., 2003). A GPX tem aproximadamente 45% de atividade no citosol e o restante na mitocôndria (LEEUEWENBURGH; HEINECKE, 2001), e parece demonstrar maior afinidade com o H_2O_2 em altas concentrações (JENKINS; GOLDFARB, 1993).

Estudos reportaram que uma única sessão de corrida (40min e 70min) é capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no músculo esquelético de ratos (LAWLER et al., 1994; RADAK et al., 1995), e também após uma sessão de natação (GUNDUZ et al., 2004). Contudo o treinamento físico tem também demonstrado aumento na atividade destas enzimas após treinamento físico aeróbio (corrida) em ratos (POWERS et al., 1994; LEEUEWENBURGH et al., 1997; HOLLANDER et al., 2000) e aumento da SOD e GSH após treinamento resistido (ATABEK et al., 2010; KIM et al., 2010).

2.3 ARTIGO 1

MECANISMOS MOLECULARES ANTIOXIDANTES MODULADOS PELO EXERCÍCIO FÍSICO

Camila Baumer Tromm, Luciano Acordi da Silva, Ricardo Aurino de Pinho
Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício

(Submetido na Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício (Anexo A))

2.3.1 Sinalização da Biogênese Mitocondrial

EROs podem ativar vias de sinalização envolvidas na biogênese mitocondrial. EROs têm demonstrado induzir a ramificação e alongamento do mtDNA (DNA mitocondrial) (PESCE et al., 2005). O aumento no mtDNA foi acompanhado por uma indução na massa mitocondrial. Esta resposta parece ser mediada por PGC-1 α (coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma) e NRF-1 (fator nuclear respiratório 1), pois a expressão de ambos aumenta após tratamento com LPS (lipopolissacarídeos) (SULIMAN et al., 2003). Recentemente um estudo demonstrou que EROs podem induzir um aumento da atividade e expressão de PGC-1 α através de vias tanto de AMPK-dependente como AMPK-independente (IRRCHER et al., 2009). Estes dados demonstram que EROs são agentes envolvidos no aumento da biogênese mitocondrial. A ativação da AMPK aumenta PGC-1 α mRNA (RNA mensageiro) (IRRCHER et al., 2003). Este fato é provavelmente mediado por uma ativação transcricional, haja vista que a ativação da AMPK leva a melhor atividade de PGC-1 α (IRRCHER et al., 2008). A regulação de PGC-1 α , sua transcrição e tradução é acompanhada pelo aumento na atividade do DNA de NRF-1 (ZONG et al., 2002). Adicionalmente, a ativação farmacológica crônica do AMPK resultou em aumentos das enzimas mitocondriais como citocromo c, citrato sintase, e malato desidrogenase no músculo esquelético (WINDER et al., 2000). Assim, a ativação da AMPK parece ser outro importante regulador da biogênese mitocondrial em condições de alta demanda energética nas células musculares.

2.3.2 Fatores de Transcrição Antioxidantes

Fatores de transcrição são proteínas adicionais exigidas pela RNA polimerase para iniciar a transcrição e são responsáveis pela regulação da expressão gênica (ORPHANIDES; LAGRANGE; REINBERG, 1996). Um fator de transcrição (por vezes chamado de fator de seqüência específica de ligação ao DNA) é uma proteína que se liga a seqüências específicas de DNA, assim, controla

o fluxo (ou transcrição) da informação genética do DNA para o mRNA. O mRNA carrega informações do DNA aos ribossomos, onde serve como molde para a síntese de proteínas (são intermediários no fluxo da informação genética) e são transcritos pela RNA polimerase (BEELMAN; PARKER, 1995). As moléculas de RNA são sintetizadas a partir de moldes do DNA (isso é transcrição) e as proteínas são sintetizadas a partir de moldes de RNA (isso é tradução) (COOPER; HAUSMAN, 2007).

AMPK

A família de proteínas AMPK é composta por quatro módulos de sinalização no músculo esquelético: 1) quinase extracelular (ERK) 1 e 2 (ERK1/2); 2) p38 AMPK; 3) c-Jun N-terminal quinase (JNK) e 4) ERK5 ou grande AMPK. Estes ramos de AMPK são estimuladas por citocinas, fatores de crescimento e estresse celular e tem como função regular várias atividades celulares como a expressão genética (FORCE; BONVENTRE, 1998; KYRIAKIS; AVRUCH, 2001). Um papel importante de ativação da AMPK pelo exercício é a regulação da transcrição do status redox no músculo esquelético. O estresse mecânico e metabólico associado ao exercício aumenta a produção de EROs que são neutralizadas devido ao aumento na adaptação antioxidante através da regulação de enzimas antioxidantes (KRAMER; GOODYEAR, 2007). A atividade da AMPK pode parcialmente mediar essa resposta. O H_2O_2 induz a ativação de ERKs, JNKs (KEFALOYIANNI; GAITANAKI; BEIS, 2006) e desencadeia a fosforilação da p38 AMPK aumentando o transporte de glicose no músculo esquelético.

ERK1/2 é ativada rapidamente após treinamento físico com diferente volume e intensidade (GOODYEAR et al., 1996). Da mesma forma que em humanos sedentários e treinados após sessão de ciclismo submáximo (YU et al., 2003; WIDEGREN et al., 2000) e maratona (YU et al., 2001). A magnitude da fosforilação de ERK1/2 durante o exercício correlaciona-se com a intensidade do protocolo (WIDEGREN et al., 2000), e tanto exercício de endurance como resistido (CREER et al., 2005; KARLSSON et al., 2004) podem aumentar ERK1/2. Protocolos de exercício intenso estimulam a transdução de sinal através da via JNK (ARONSON et al., 1998; FUJII et al., 2004). A fosforilação de JNK aumenta linearmente com os níveis de força muscular (MARTINEAU; GARDINER, 2001). Portanto, a tensão

muscular total, em vez da duração do estímulo parece ser o modulador influente sobre a atividade de JNK (RUSS; LOVERING, 2006).

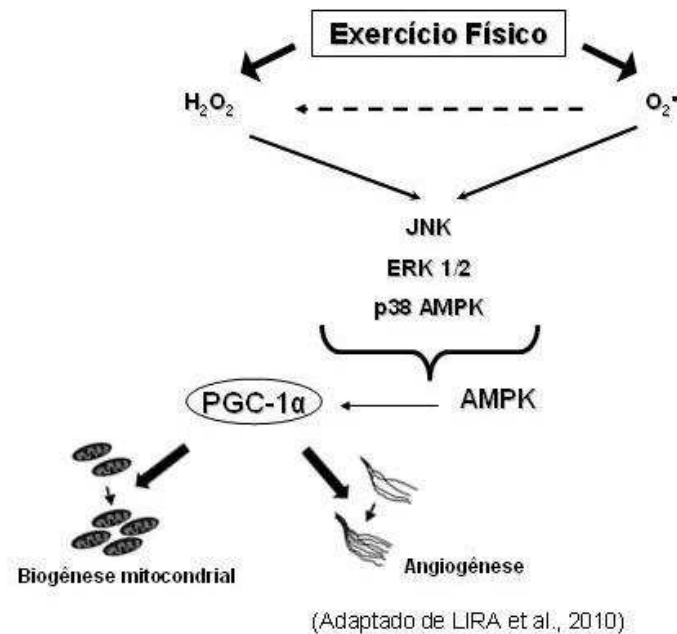


Figura 4: Via de sinalização envolvida na ativação de AMPK e PGC-1 α induzida pelo exercício físico.

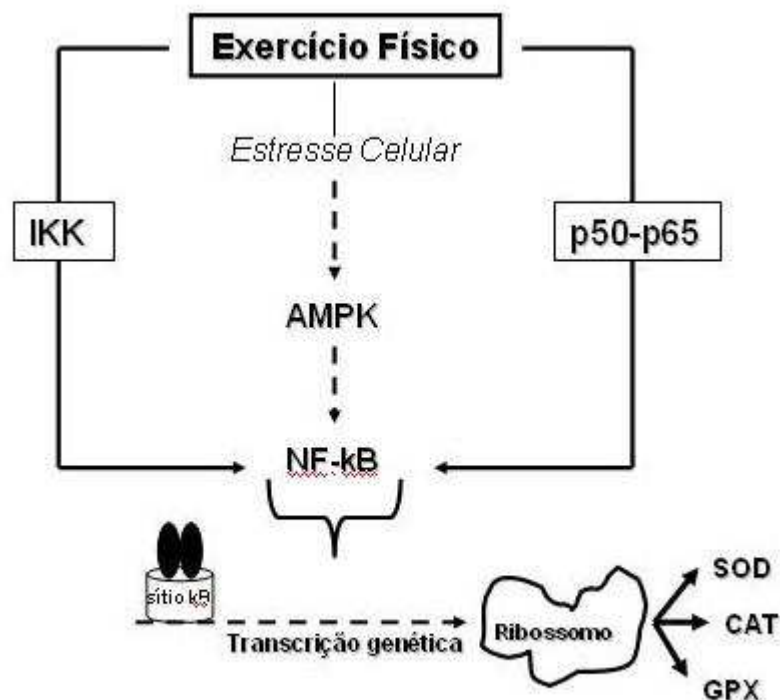
NF κ B

NF κ B é composto por cinco membros, incluindo p50, p52, p65, RelB, e c-Rel (DELHALLE et al., 2004). Evidências sugerem que o heterodímero p50 e p65 são os principais responsáveis pela atividade de NF κ B no músculo esquelético (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Contrações musculares estimulam o retículo sarcoplasmático liberando cálcio aumentando os níveis de EROs, que ativam diversas vias de sinalização, incluindo AMPK (HUGHES; ANTONSSON; GRUNDSTROM, 1998). O aumento da cálcio intracelular, a acumulação de EROs (KAMATA et al., 2002), e a ativação da AMPK (CHEN; LIN, 2001) ativam o NF κ B, levando à hipótese de que o exercício também ativa o NF κ B.

Alguns estudos demonstraram que uma única sessão de corrida em esteira aumenta a fosforilação de IKK, aumentando a atividade do NF κ B no músculo esquelético de ratos (HO et al., 2005; JI et al., 2004). O treinamento físico também pode alterar a composição e atividade do NF κ B. Doze semanas de corrida resultou em fosforilação aumentada de IKK, sugerindo que a ativação do NF κ B foi elevada após o treinamento (KRAMER; GOODYEAR, 2007). Diferenças na atividade de

NFkB após o treinamento podem refletir a natureza (intensidade, duração e frequência) do exercício realizado ou a recuperação entre as séries do exercício.

NFkB responde a EROs aumentando a transcrição de pelo menos três genes antioxidantes importantes, incluindo MnSOD, óxido nítrico sintase (iNOS) e glutamincisteína sintetase (ALLEN; TRESINI, 2000). Assim, é possível que o aumento do NFkB verificado após o exercício promova maior resistência celular ao estresse oxidativo.



(Adaptado de KRAMER e GOODYEAR, 2007)

Figura 5: Via de sinalização envolvida na ativação de NFkB induzida pelo exercício físico.

AP-1

Outro fator de transcrição regulado pelo estado redox intracelular, induzido pelo exercício, é o ativador protéico 1 (AP-1). O AP-1 é um dímero expresso por dois genes, *jun* e *fos* (COOPER; HAUSMAN, 2007). Uma das proteínas que possuem sua expressão controlada pelo AP-1 é uma das subunidades da enzima Glutaciona S-transferase (ZOOPI, 2005). O AP-1 regula a expressão gênica em resposta a uma variedade de estímulos incluindo EROs (ZHOU et al., 2001). Além disso, sua ligação ao DNA também é controlada pelo estado redox. Hollander et al. (2001) relatou que o AP-1 foi aumentado no músculo esquelético de

ratos após uma realização de uma sessão de exercício de longa duração (corrida). O aumento de AP-1 ocorreu simultaneamente ao aumento na expressão de mRNA MnSOD.

2.3.3 Exercício e Adaptação Antioxidante

Alguns tecidos corporais, tais como, fígado, coração e cérebro haja vista uma maior taxa de consumo de oxigênio, expressam um número maior de enzimas antioxidantes em relação aos órgãos com menor consumo de oxigênio (JENKINS, 1993). A atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético varia amplamente em função dos tipos de fibra. Por exemplo, o tipo I de fibras musculares possuem maior atividade antioxidante do que as fibras tipo IIa e fibras musculares tipo IIb (JI et al., 1992). É fato que a atividade contrátil pode causar um aumento na geração de EROs in vitro e in vivo (DAVIES et al., 1982; BEJMA; JI, 1999). Contudo a exposição repetida das células musculares ao estresse oxidativo é capaz de promover uma adaptação ao sistema de defesa antioxidante protegendo contra potenciais danos oxidativos (SILVA et al., 2010; FREDERICO et al., 2009; COELHO et al., 2010).

Entre as enzimas antioxidantes no músculo esquelético, a atividade da SOD tem sido consistentemente aumentada com o treinamento de forma dependente da intensidade (caminhada/corrida) (HIGUCHI et al., 1985). A MnSOD é a principal responsável pelo aumento observado na atividade da SOD total, enquanto a atividade CuZnSOD parece pouco afetada (JI et al., 1988; HIGUCHI et al., 1985). Na atividade da GPX também tem sido demonstrado um aumento após o treinamento aeróbio (corrida) (LEEWENBURGH et al., 1994; LAWLER et al., 1993). Da mesma forma, uma sessão extenuante de natação demonstrou induzir aumento da SOD no miocárdio e no diafragma de ratos (POWERS et al., 1993).

Há algumas evidências de que a adaptação antioxidante ocorra devido a expressão proteica, com os níveis da proteína e seu mRNA sendo aumentados com o treinamento. No entanto, os dados são limitados e controversos. Por exemplo, em alguns estudos a atividade e a expressão da MnSOD aumentaram com treinamento aeróbio (corrida) nos músculos de ratos, mas a expressão de mRNA da

MnSOD não foi afetada (OHNO et al., 1994; OH-ISHI et al., 1997). Já a expressão do mRNA CuZnSOD foi elevado com o treinamento, com nenhuma mudança na expressão da proteína (GORE et al., 1998). Geralmente mRNAs têm uma meia-vida curta e nos estudos citados acima o tecido muscular foi recolhido entre 24h e 48h após o exercício. Pode-se concluir que o mRNA pode aumentar apenas transitoriamente após sessões únicas de exercício. Em contraste com a atividade da SOD, a literatura é bastante limitada em relação a regulação gênica da GPX e CAT. Os dados disponíveis indicam que os níveis de mRNA GPX de ratos treinados não são diferentes daqueles em ratos controle (GORE et al., 1998).

A adaptação ao treinamento de enzimas antioxidante é fortemente influenciada por uma série de fatores fisiológicos e ambientais. Resumidamente, ratas demonstraram menor extensão no dano oxidativo muscular induzido pelo exercício e melhor adaptação ao treinamento (corrida) do que ratos, possivelmente devido ao efeito antioxidante do estrogênio (TIIDUS; HOUSTON, 1993). Animais e humanos idosos geralmente mostram uma escala menor de adaptação antioxidante do que jovens indivíduos exercitando em uma carga de trabalho semelhante (JI, 2001). A razão para esta discrepância pode estar relacionada com mudanças em ambos os sistemas de defesa antioxidante e a capacidade de transdução de sinal (MCARDLE et al., 2002).

2.3.4 Expressão de Genes Antioxidantes Regulados pelo Exercício

O primeiro a reportar a ativação de JNK, ERK1 / 2, p38 AMPK no músculo esquelético de ratos após uma sessão de corrida em esteira foi Goodyear et al. (1996). Este grupo mostrou posteriormente que p42 e p44 AMPK (ERK1 / 2) foram fosforiladas após exercício em cicloergometro no músculo humano, juntamente com a ativação de MEK1, Raf-1 (ARONSON et al., 1997). Desde então, alguns estudos têm mostrado que a AMPK pode ser ativada pela atividade contrátil em músculo esquelético (RYDER et al., 2000; GINNEKEN et al., 2006). Os sinais que desencadeiam a ativação da AMPK têm sido atribuídos a uma variedade de estímulos fisiológicos associados ao exercício, incluindo liberação hormonal, liberação de cálcio, atividade neural, e força mecânica (JI, 2008). No entanto, a

influência do exercício sobre as enzimas da família AMPK de forma individual e suas integrações em outras vias de sinalização são ainda discretas.

Comparado à AMPK, o conhecimento sobre o efeito do exercício na sinalização do NFκB é relativamente limitado. Hollander et al. (2001) demonstrou pela primeira vez que NFκB foi significativamente elevado em músculo esquelético após um sessão de exercício prolongado (aproximadamente 60min de corrida). O aumento de NFκB foi acompanhado pelo aumento na expressão de mRNA MnSOD no músculo exercitado. Ji et al. (2004) realizaram uma série de experimentos para analisar a cascata de sinalização de NFκB em resposta ao exercício. Estes autores encontraram níveis mais elevados de NFκB após o exercício (corrida até a exaustão), juntamente com aumento da atividade de IKK e acumulação de P50 no núcleo celular. Em um estudo recente, Ho et al. (2005) relatou que a ativação NFκB foi elevada no sóleo (fibras tipo I) e no gastrocnêmio (fibras tipo II) durante 60 min. de corrida em esteira, acompanhado por fosforilação de IKK. Em ratos adultos, a atividade basal do NFκB foi duas vezes maior no sóleo e no diafragma em relação ao gastrocnêmio e três vezes maior maior no sóleo em comparação ao extensor longo dos dedos. Esses dados indicam que a ativação do NFκB é dependente do tipo de fibra muscular (ATHERTON et al., 2004; DURHAM et al., 2004). Estas diferenças podem refletir as concentrações das enzimas antioxidantes nas diferentes fibras musculares A ativação de NFκB também parece ser influenciada pelo estado metabólico da célula muscular (JI, 2008). Durham et al. (2004) mostrou que os níveis de NFκB foram reduzidos abaixo do nível pré exercício após uma sessão de exercício resistido extenuante, mas retornando ao nível basal após uma recuperação de 60min. Sugerindo que a contração muscular é provavelmente necessária para ativação desta via de sinalização (HUNTER et al., 2004; DURHAM et al., 2006).

3 ARTIGO 2

**EFEITOS DE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE TREINAMENTO SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Camila Baumer Tromm, Guilherme Laurentina da Rosa, Karoliny Bom, Izadora
Mariano, Bruna Pozzi, Talita Tuon, Luciano Acordi da Silva, Ricardo Aurino de Pinho.
Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício

(Aceito para publicação na Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho
Humano (Anexo B))

3 METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício – LaFiBe, localizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense – Unesc e vinculado ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde desta instituição. Todos os procedimentos foram baseados de acordo com “Guidling Principles in the Care and uses of Animals” (OLERT, 1993), e aprovados pelo Comitê de Ética local conforme parecer nº27/2009 (Anexo C).

3.1 Caracterização da pesquisa

Esta pesquisa caracteriza-se por ser do tipo experimental, na qual envolve a manipulação de tratamentos na tentativa de estabelecer relações de causa e efeito. (THOMAS et al., 2007).

3.2 Amostra

A amostra do estudo foi constituída de camundongos machos CF1 (3 meses – 30 a 35g de peso), provenientes do biotério da Unesc. Fizeram parte da amostra 18 animais agrupados em gaiolas com acesso livre a água e comida, em temperatura ambiente de 23°C graus e ciclo de claro e escuro de 12h. Os animais foram randomicamente distribuídos em três grupos (n=6):

Grupo 1 – Não treinado (NT)

Grupo 2 – Treinado duas vezes por semana (T2)

Grupo 3 – Treinado três vezes por semana (T3)

3.2.1 Cálculo e tamanho da amostra

Estimando-se uma relação média de $0,050 \pm 0,009$ nmol/TBARS/mg proteína de acordo com estudos prévios de nosso laboratório, o tamanho do grupo amostral necessário para detectar uma diferença significativa, considerando um nível de significância de 5% e poder de 80%, é de 6 animais por grupo. (SILVA et al., 2009).

3.3 Protocolo de treinamento aeróbio

Todos os animais foram adaptados em esteira ergométrica por uma semana (10m/min, sem inclinação, durante 10 min/dia) todos os dias da semana. Após o período de adaptação, os grupos T2 e T3 foram submetidos a oito semanas de treinamento (corrida em esteira), com velocidade constante de 13m/min, sem inclinação, totalizando 45 minutos por sessão (SILVA et al., 2009). Esta velocidade de treinamento corresponde a uma intensidade moderada de aproximadamente 78% do $VO_{2\text{máx}}$ (FERNANDO; BONEN; HOFFMAN-GOETZ; 1993).

3.4 Eutanasia

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de Cetamina (80mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) e posteriormente sacrificados. O fígado e o coração foram cirurgicamente removidos e imediatamente armazenados em freezer – 70°C para análises posteriores.

3.5 Ensaios Bioquímicos

3.5.1 Marcadores de Dano Oxidativo

Os danos oxidativos em lipídeos foram determinados a partir da formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBARS) medido espectrofotometricamente (532nm), e expresso em nmol/mg de proteína, conforme descrito por Draper e Hadley (1990).

Os danos oxidativos em proteínas (CP) foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas baseados na reação com dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente $22.000 \text{ Molar}^{-1}$, e expresso em nmol/mg de proteína, como previamente descrito por Levine et al. (1990).

O conteúdo total de tióis (TT) foi determinado numa reação dos grupos tióis com 5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico) (DTNB), gerando um derivado de coloração amarela. A leitura do conteúdo de TT foi feita espectrofotometricamente a 412nm e expressa em DTNB/mg de proteína (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

3.5.2 Atividade Antioxidante

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm), expressa em U de SOD/mg de proteína, como previamente descrito por Bannister e Calabrese (1987).

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio, medido espectrofotometricamente (240nm) e expressa em U de CAT/mg de proteína, conforme previamente descrito por Aebi (1984).

A determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPX) foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria (340nm), e expressa em mM/min/mg de proteína, conforme Flohé e Gungler (1984).

A quantidade de proteínas em todos os ensaios foi mensurada usando a técnica de Lowry et al. (1951).

3.6 Tratamento estatístico

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 95% ($p < 0,05$). O software utilizado para análise dos dados será o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 17.0 para Windows.

4 RESULTADOS

Conforme figura 1A, os resultados demonstram menor nível de TBARs no fígado ($0,13 \pm 0,02$ nmol/mg de proteína) e no coração ($0,20 \pm 0,01$ nmol/mg de proteína) no grupo T3 em relação ao não treinado ($0,25 \pm 0,02$; $0,36 \pm 0,06$ nmol/mg/proteína), respectivamente. Da mesma forma, os resultados de carbonilação de proteínas (figura 1B) demonstram uma diminuição no conteúdo de carbonilas no fígado ($0,19 \pm 0,049$ nmol/mg de proteína) e no coração ($0,15 \pm 0,011$ nmol/mg de proteína) no grupo T3 em relação não treinado ($0,35 \pm 0,041$; $0,26 \pm 0,017$ nmol/mg de proteína), respectivamente. Entretanto o treinamento realizado duas vezes por semana (T2) não foi suficientemente capaz de alterar os níveis de TBARS e conteúdo de carbonilas no fígado ($0,23 \pm 0,02$; $0,32 \pm 0,09$) e no coração ($0,32 \pm 0,03$; $0,24 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína) em relação aos animais não treinados. Os resultados de tióis totais observados na figura 1C demonstram maior conteúdo no fígado ($71,08 \pm 4,79$ DTNB/mg de proteína) e no coração ($97,7 \pm 14,2$ DTNB/mg de proteína) dos animais pertencentes ao grupo T3 em relação ao grupo não treinado ($41,7 \pm 4,07$; $41,6 \pm 8,3$ DTNB/mg de proteína) respectivamente. Entretanto, o grupo submetido ao treinamento com duas sessões semanais não foi

suficientemente capaz de alterar este marcador ($47,7 \pm 4,2$; $51,9 \pm 5,8$ DTNB/mg de proteína) em relação ao grupo não treinado.

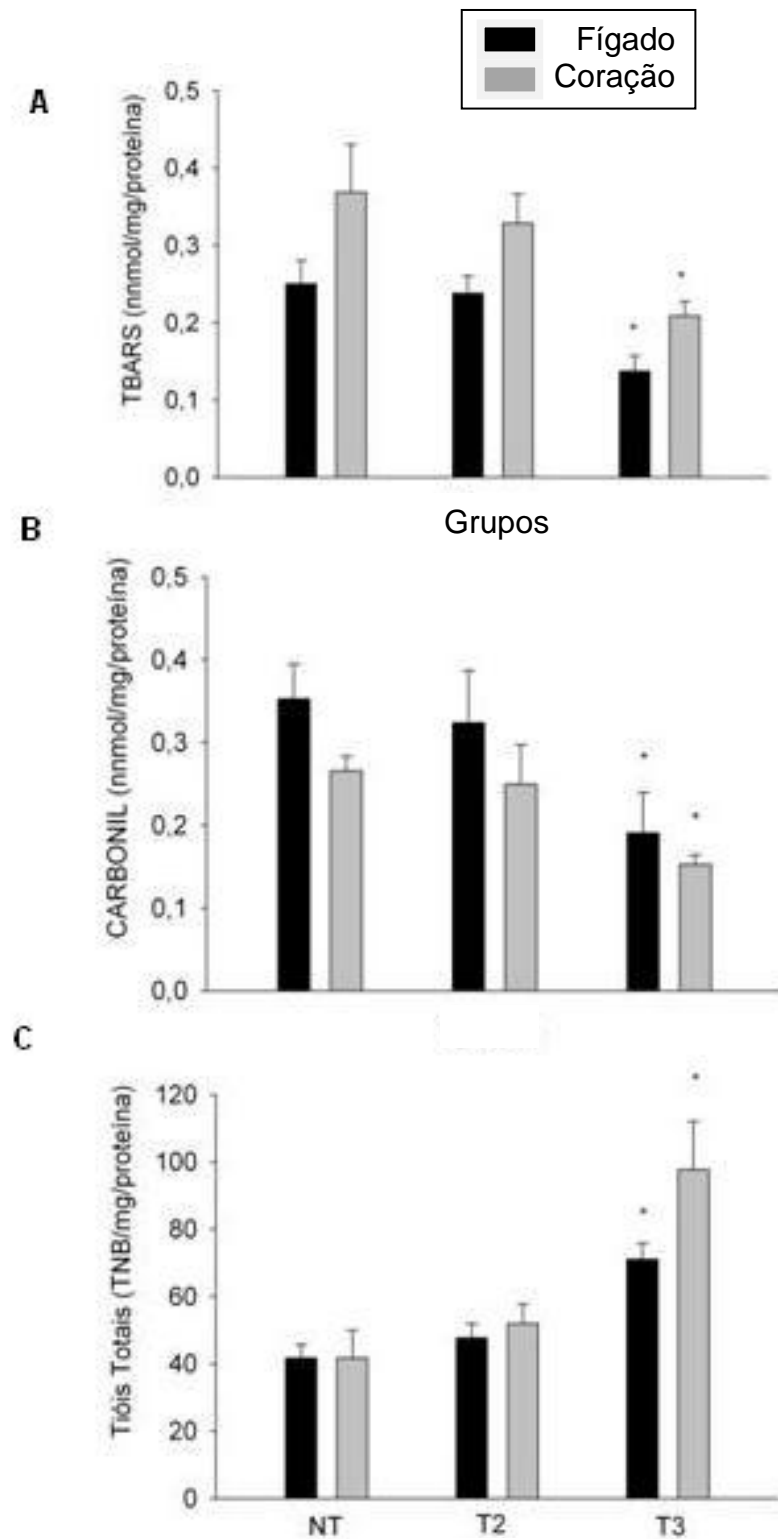


Figura 6: Lipoperoxidação (A), carbonilação de proteínas (B) e conteúdo total de tióis (C) no fígado e coração de camundongos após 48 horas da última sessão de treinamento. Os valores foram apresentados em Média \pm EPM, avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A lipoperoxidação

e a carbonilação de proteínas foram expressas em nmol/mg de proteína e o conteúdo total de tióis expresso em DTNB/mg de proteína. $p < 0,05$, * vs NT.

Em relação às atividades das enzimas antioxidantes, os resultados mostrados pela figura 2A denotaram aumento no fígado ($0,37 \pm 0,05$ U/mg de proteína) e no coração ($0,23 \pm 0,02$ U/mg de proteína) da atividade da SOD no grupo T3 em comparação ao grupo S ($0,15 \pm 0,01$; $0,12 \pm 0,01$ U/mg de proteína). Entretanto, o treinamento físico realizado apenas duas vezes por semana (T2) não foi suficientemente capaz de alterar este marcador ($0,24 \pm 0,03$; $0,07 \pm 0,006$ U/mg de proteína). Similarmente, a atividade da CAT (figura 2B) mostrou-se aumentada no fígado ($0,17 \pm 0,03$ U/mg de proteína) e no coração ($0,45 \pm 0,04$ U/mg de proteína) no grupo T3 em relação ao grupo não treinado ($0,07 \pm 0,02$; $0,02 \pm 0,001$ U/mg de proteína). Novamente, o treinamento realizado duas vezes por semana (T2) não foi suficientemente capaz de aumentar a atividade da CAT no fígado ($0,05 \pm 0,01$) e no coração ($0,02 \pm 0,001$ U/mg de proteína) em relação ao grupo não treinado. A atividade da GPX (figura 2C) no grupo T2 e T3 no fígado ($0,8 \pm 0,06$; $1,0 \pm 0,1$ mM/mg de proteína) e no coração ($0,7 \pm 0,1$; $0,9 \pm 0,1$ mM/mg de proteína) não foi significativamente diferente em relação ao grupo não treinado ($0,7 \pm 0,1$; $0,6 \pm 0,04$ mM/mg de proteína).

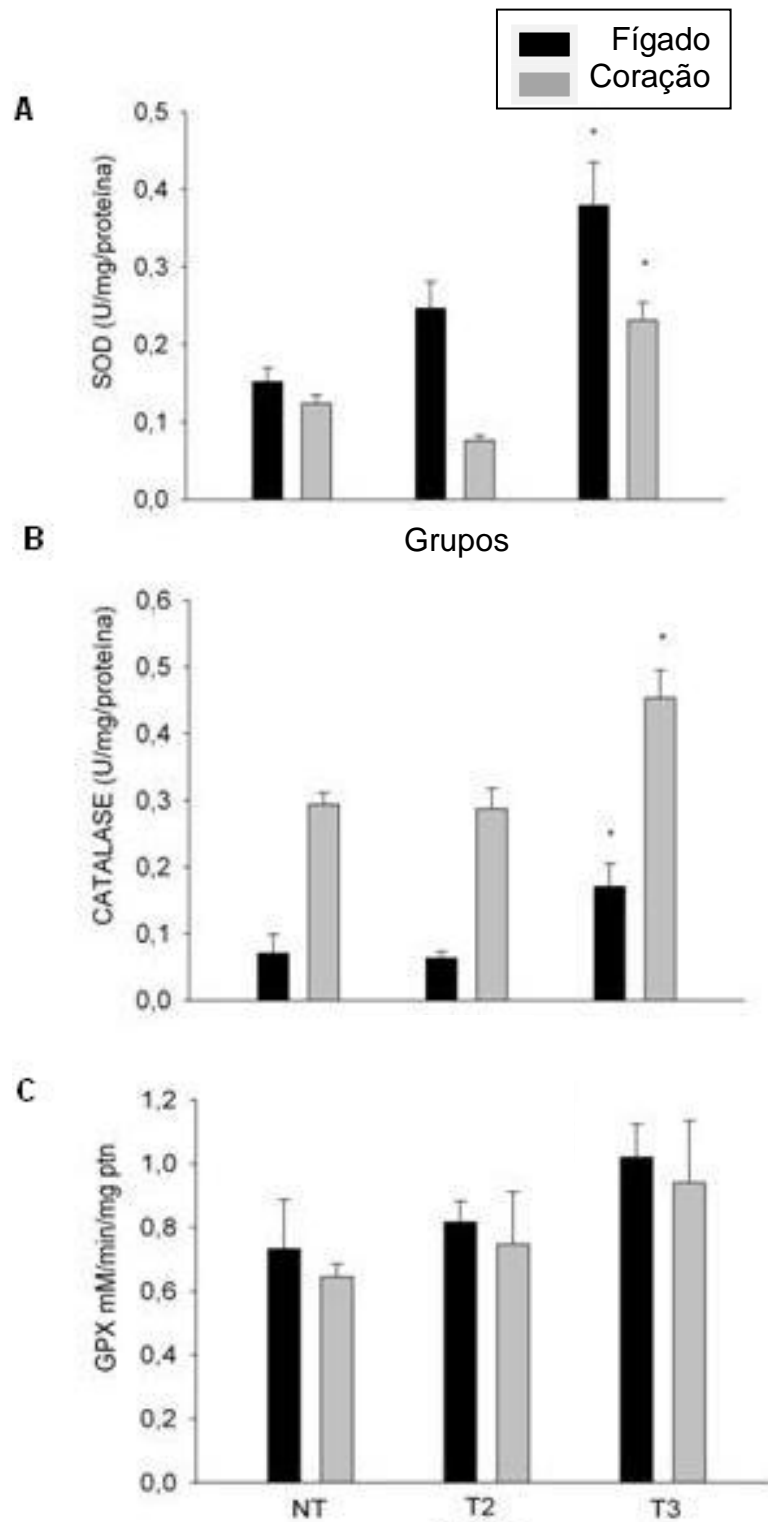


Figura 7: Atividades enzimáticas da superóxido dismutase (A), catalase (B) e glutathiona peroxidase (C) no fígado e coração de camundongos após 48 horas da última sessão de treinamento. Os valores foram apresentados em Média \pm EPM, avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. As atividades da superóxido dismutase e da catalase foram expressas em U/mg de proteína e da glutathiona peroxidase expressa em mM/min/mg de proteína. $p < 0,05$, * vs NT.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Estudos demonstraram que o exercício físico exaustivo aumenta a produção das EROs e, conseqüentemente provoca EO em diversos órgãos e tecidos (NAVARRO-AREVALO; SANCHEZ-DEL-PINO, 1998; OGONOVSKY et al., 2005). Entretanto, estudos demonstraram que o exercício crônico moderado produz adaptações metabólicas que podem ajudar a reduzir o EO em diversos órgãos, principalmente em populações especiais (COELHO et al., 2010; HAMILTON et al., 2001).

Sobre as adaptações fisiológicas decorrentes da prática de treinamento físico realizada com duas sessões semanais de exercício, Dalleck et al. (2010) reportou melhoras nos parâmetros fisiológicos de treinamento (lactato e $VO_2max.$). Entretanto ainda não se tem claro as respostas bioquímicas sobre os marcadores de estresse oxidativo. O resultado do presente estudo demonstrou que duas sessões de exercício por semana não são suficientes para promover melhorias nos parâmetros de EO. É possível que um longo período de intervalo (>72horas) entre as sessões ultrapasse a fase de supercompensação inibindo o efeito adaptativo bioquímico do treinamento.

Sabe-se que a relação entre EO e exercício físico está diretamente relacionada à intensidade e duração do treinamento (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; SMOLKA et al., 2000). Assim, o protocolo de treinamento deve ter intensidade e volume suficiente, a fim de criar uma resposta adaptativa ao organismo a cada sessão. Portanto, de acordo com nossos resultados, sugere-se que são necessárias no mínimo, três sessões semanais, durante oito semanas de exercício para reduzir danos oxidativos e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no fígado e no coração dos animais.

As ERO atacam lipídeos e proteínas celulares abstraindo seus elétrons, a fim de encontrar um estado químico estável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os resultados do presente estudo demonstram ainda que animais submetidos no mínimo a três sessões semanais de treinamento, apresentam menores níveis de danos em lipídeos (TBARS) e proteínas (CP). Estes achados corroboram com os resultados de diversos estudos que encontraram redução nos parâmetros de estresse oxidativo com programa de treinamento similar

(frequência semanal de três vezes) (NOJIMA et al., 2008; KAROLKIEWICZ et al., 2009).

A diminuição dos danos oxidativos induzidos pelo treinamento físico pode ser explicada por pelo menos, três principais mecanismos. Primeiro, pelo aumento tanto da expressão (FREDERICO et al., 2009) como da atividade (SILVA et al., 2009) de enzimas antioxidantes. Segundo, pela redução na produção de oxidantes (COELHO et al., 2010) e também por menor extravasamento de elétrons mitocondrial (SILVA et al., 2009). E terceiro, outro mecanismo que poderia explicar esse fenômeno é a exposição crônica do tecido às ERO, induzida pelo treinamento, tornando o órgão mais resistente aos efeitos derivados do mecanismo de estresse oxidativo (PINHO et al., 2006).

As EROs podem modificar aminoácidos por reações em cadeia por meio de agregados de proteínas suscetíveis a degradações proteolíticas. Durante esse processo, alguns aminoácidos são convertidos em derivados de carbonil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Está bem estabelecido na literatura que as proteínas oxidadas são menos degradadas por proteassomas. Essas proteases intracelulares são responsáveis por 70 a 80% da degradação após exposição oxidante, exercendo um papel essencial no sistema antioxidante (DAVIES; SHRINGARPURE, 2006). Um dos possíveis mecanismos para redução nos níveis de carbonilação de proteínas (CP), segundo Radak et al. (1999) é que o treinamento físico aumenta a atividade de proteassomas como um processo adaptativo à oxidação de proteínas, acelerando o reparo das mesmas (*turnover* protéico).

Outro marcador importante da oxidação protéica é o conteúdo total de tióis (TT). O presente trabalho demonstrou aumento no conteúdo total de tióis somente no grupo T3. Esta técnica verifica a quantidade de sulfidrilas (SH) não oxidadas, que estão presentes nos aminoácidos (AKSENOV; MARKESBERY, 2001). O grupo SH pode ser oxidado por radicais livres, comprometendo o funcionamento das proteínas. Uma possível explicação para esses resultados é o aumento das proteínas de estresse (HSP) induzidas pelo exercício (SMOLKA et al., 2000). Essas proteínas têm a função de controlar a homeostase celular, protegendo contra a excessiva oxidação. Contudo, a dosagem das HSP foi uma limitação do presente estudo.

Em relação às atividades das enzimas antioxidantes os resultados apontaram aumento da SOD e CAT somente no grupo treinado com três sessões

semanais. A SOD dismuta o radical $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de H_2O_2 , o qual é subsequentemente catalisado pela CAT e convertido em água e oxigênio molecular. Alguns estudos têm apontado que o treinamento físico não exerce efeito sobre as enzimas antioxidantes no fígado (OGONOVSKY et al., 2005) e no coração (TIIDUS; HOUSTON, 1994). Por outro lado, os resultados do presente estudo estão de acordo com outros estudos, demonstrando que o treinamento físico aumenta atividade da SOD no fígado (SILVA et al., 2010) e no coração (HAMILTON et al., 2001).

Após o treinamento físico, a atividade da SOD aumenta, provavelmente, como resposta ao estresse oxidativo induzido pelo exercício. Este achado pode ser explicado pelo fato do treinamento físico regular ativar fatores de transcrição como o NFkB, sendo este responsável por acionar uma variedade de genes, incluindo SOD mitocondrial (DUNCAN; HARRIS; ARDIES, 1997).

O efeito do treinamento sobre a atividade e expressão da CAT é ainda inconsistente e controverso (PINHO et al., 2006). Contudo, o aumento da atividade dessa enzima foi observado no fígado (SILVA et al., 2010) e no coração de ratos treinados (HUSAIN; SOMANI, 2005). O treinamento físico ativa fatores de transcrição como a AMPK, que ativam CAT mRNA estimulando sua síntese protéica e possivelmente aumentando a sua atividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUSAIN; SOMANI, 2005). Ademais, a alta atividade da CAT pode ser atribuída à formação de H_2O_2 pela SOD. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), a interação química do H_2O_2 no sítio ativo da catalase faz com que um dos átomos de hidrogênio seja transferido do primeiro oxigênio para o segundo ocasionando uma quebra heterolítica entre os átomos e formando água. Isto por sua vez explica a diminuição do dano oxidativo nos tecidos.

Em contrapartida, a atividade da glutathione peroxidase (GPX), não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais do presente estudo. A GPX e a CAT possuem funções similares no que se refere a decomposição do H_2O_2 . No entanto, sob esse aspecto, a GPX é mais eficiente na presença de altas concentrações de EROs, enquanto que a CAT desempenha importante função em presença de baixas concentrações de H_2O_2 (JENKINS; GOLDFARB, 1993). Uma hipótese para os resultados supracitados é que o treinamento físico realizado três vezes por semana proporcionou um efeito adaptativo no balanço *redox* de

antioxidantes, fazendo com que as baixas concentrações de H_2O_2 sofressem ação somente da CAT.

4 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos com o presente trabalho, concluímos que oito semanas de treinamento físico com no mínimo três sessões semanais reduzem o dano oxidativo e aumentam a eficiência do sistema enzimático antioxidante no fígado e no coração de camundongos.

5 PERSPECTIVAS PARA FUTUROS ESTUDOS

No presente trabalho, tomamos o cuidado especial quanto a prescrição do protocolo de treinamento. Entretanto observamos algumas limitações quanto às frequências e o volume total de treinamento. No grupo com três sessões semanais o volume total de treino foi maior em comparação ao grupo com duas sessões semanais. Sendo assim, este trabalho serve como salto inicial para que novos estudos sejam realizados com diferentes frequências e com o mesmo volume de treinamento.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth Enzymol.** v.105, p.121-126, 1984.

AKSENOV, MY; MARKESBERY, WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.** v.302, p.141-5, 2001.

ALLEN RG, TRESINI M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med.** v.28, p.463–499, 2000.

ARONSON, D; BOPPART, MD; DUFRESNE, SD; FIELDING, RA; GOODYEAR, LJ. Exercise stimulates c-Jun NH2 kinase activity and c-Jun transcriptional activity in human skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun.** v.251, p.106–110, 1998.

ARONSON, D; VIOLAN, MA; DUFRESNE, SD; ZANGEN, D; FIELDING, R; GOODYEAR, LJ. Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. **J Clin Invest.** v.99, p.1251–1257, 1997.

ASCENSÃO, A; MAGALHÃES, J; SOARES, J; OLIVEIRA, J; DUARTE, J. Exercício e stress oxidativo cardíaco. **Revista Portuguesa de Cardiologia.** v.22, p.651-678, 2003.

ATHERTON, PJ; HIGGINSON, JM; SINGH, J; WACKERHAGE, H. Concentrations of signal transduction proteins exercise and insulin responses in rat extensor digitorum longus and soleus muscles. **Mol Cell Biochem.** v.261, p.111–116, 2004.

AUCELLO, M; DOBROWOLNY, G; MUSARÒ, A. Localized accumulation of oxidative stress causes muscle atrophy through activation of an autophagic pathway. **Autophagy.** v.5, p.527-9, 2009.

BANNISTER, JV; CALABRESE, L. Assay for SOD. **Meth Biochem.** v.32, p.279-312, 1987.

BARREIROS, ALBS; DAVID, JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.** v.29, p.113-123, 2006.

BAYIR, H; KAGAN, V. Review Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis – there is nothing more practical than a good theory. **Critical Care.** v.12, p.206, 2008.

BEELMAN, CA; PARKER, R. Degradation of mRNA in eukaryotes. **Cell.** v.81, p.179-83, 1995.

BEJMA, J; JI, LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol.** v.87, p.465–470, 1999.

BOMPA, TO. **Periodização: teoria e metodologia do treinamento**. São Paulo: Phorte, 2002.

BOVERIS, A; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**. v.134, p.707–716, 1973.

CADENAS, E; DAVIES, KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Méd**. v.29, p.222–230, 2000.

CAKIR-ATABEK, H; DEMIR, S; PINARBAŞILI, RD; GÜNDÜZ, NJ. Effects of different resistance training intensity on indices of oxidative stress. **Strength Cond Res** v.24, p.2491-7, 2010.

CALABRESE, EJ; BALDWIN, LA. Hormesis: the dose–response revolution. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.43, p.175–197, 2003.

CHEN, BC; LIN, WW. PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. **Br J Pharmacol**. v.134, p.1055–1065, 2001.

COOPER, GM; HAUSMAN, RE. **A Célula – Uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CREER, A; GALLAGHER, P; SLIVKA, D; JEMIOLO, B; FINK, W; TRAPPE, S. Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**. v.99, p.950–956, 2005.

DAVIES, KJ; SHRINGARPURE, R. Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and in inflammatory neuromuscular diseases. **Neurology**. v.66, p.93-6, 2006.

DAVIES, KJ; QUANTANILLA, AT; BROOKS, GA; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun**. v.107, p.1198–1205, 1982.

DELHALLE, S; BLASIUS, R; DICATO, M; DIEDERICH, M. A beginner's guide to NFkappaB signaling pathways. **Ann NY Acad Sci**. v.1030, p.1–13, 2004.

DURHAM, WJ; LI, YP; GERKEN, E; FARID, M; ARBOGAST, S; WOLFE, RR; REID, MB. Fatiguing exercise reduces DNA binding activity of NFkappaB in skeletal muscle nuclei. **J Appl Physiol**. v.97, p.1740–17405, 2004.

DURHAM, WJ; ARBOGAST, S; GERKEN, E; LI, YP; REID, MB. Progressive nuclear factor-kappaB activation resistant to inhibition by contraction and curcumin in mdx mice. **Muscle Nerve**. v.34, p.298–303, 2006.

COELHO, BLP; ROCHA, LGC; SCARABELOT, KS; SCHEFFER, D; ROSANI, MM; SILVEIRA, PCL'; et al. Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative

stress parameters in chronic kidney disease. **Journal of Renal Nutrition**. v.47, p.16-19, 2010.

COUNSILMAN, JE. **The science of swimming**. London: Pelham Books, 1968.

DALLECK, L; BUSHMAN, TT; CRAIN, RD; GAJD, M; KOGER, EM; DERKSEN, LA. Dose-response relationship between interval training frequency and magnitude of improvement in lactate threshold. **Int J Sports Med**. v.31, p.567-71, 2010.

DALLE-DONNE, I; GIUSTARINI, D; COLOMBO, R; ROSSI, R; MILZANI, A. Protein carbonylation in human Diseases. **Trends in Molecular Medicine**. v.9, p.169-176, 2003.

DRAPER, HH; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Meth Enzymol**. v.186, p.421-31, 1990.

DUNCAN, K; HARRIS, S; ARDIES, CM. Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. **Cancer Lett**. v.116, p.151-8, 1997.

FERNANDO, P; BONEN, A; HOFFMAN-GOETZ, L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice. **Can J Physiol Pharmacol**. v.71, p.854-7, 1993.

FINAUD, J; LAC, G; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports med**. v.36, p.327-58, 2006.

FLOHÉ, L; GUNZLER, W. Assays of glutathione peroxidase. **Meth Enzymol**. v. 105, p.114-21, 1984.

FORCE, T; BONVENTRE, JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. **Hypertension**. v.31, p.152–161, 1998.

FREDERICO, M; LUZ, G; JUSTO, SL; SILVA, S; MEDEIROS, C; BARBOSA, VA; et al. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. **Free Radic Res**. v.11, p.1-8, 2009.

FUJII, N; BOPPART, MD; DUFRESNE, SD; CROWLEY, PF; JOZSI, AC; SAKAMOTO, K; YU, H; ASCHENBACH, WG; KIM, S; MIYAZAKI, H; RUI, L; WHITE, MF; HIRSHMAN, MF; GOODYEAR, LJ. Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.287, p.C200–C208, 2004.

GINNEKEN, MM; GRAAF-ROELFSEMA, E; KEIZER, HA; VAN DAM, KG; WIJNBERG, ID; VAN DER KOLK, JH; VAN BREDA, E. Effect of exercise on activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, c-Jun NH2 terminal kinase, and heat shock protein 27 in equine skeletal muscle. **Am J Vet Res**. v.67, p.837–844, 2006.

GOMES, AC. **Treinamento desportivo: estruturação e periodização.** Porto Alegre: ArTmed, 2002. 205 p.

GOODYEAR, LJ; CHANG, PY; SHERWOOD, DJ; DUFRESNE, SD; MOLLER, DE. Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.271, p. E403–E408, 1996.

GORE, M; FIEBIG, R; HOLLANDER, J; GRIFFITHS, M; LEEUWENBURGH, C; OHNO, H; JI, LL. Exercise training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle. **Can J Physiol Pharmacol.** v.76, p.1139–1145, 1998.

GUNDUZ, F; SENTURK, UK; KURU, O; AKTEKIN, B; AKTEKIN, MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. **Physiol Res.** v.53, p.171–176, 2004.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, MC. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford: university press; 2007.

HAMILTON, KL; POWERS, SK; SUGIURA, T; KIM, S; LENNON, S; TUMER, N; et al. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.281, p.1346–52, 2001.

HIGUCHI, M; CARTIER, LJ; CHEN, M; HOLLUSZY, JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: Adaptive response to exercise. **J Gerontol.** v.40, p.281–286, 1985.

HO, RC; HIRSHMAN, MF; LI, Y; CAI, D; FARMER, JR; ASCHENBACH, WG; WITCZAK, CA; SHOELSON, SE; GOODYEAR, LJ. Regulation of I κ B kinase and NF κ B in contracting adult rat skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 289, p.C794–C801, 2005.

HOLLANDER, J; BEJMA, J; OOKAWARA, T; OHNO, H; JI, LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. **Mech Ageing Dev** v.116, p.33–45, 2000.

HOLLANDER, J; FIEBIG, R; OOKAWARA, T; OHNO, H; JI, LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise. **Pflug Arch (Eur J. Physiol)** v.442, p.426–434, 2001.

HUGHES, K; ANTONSSON, A; GRUNDSTROM, T. Calmodulin dependence of NF κ B activation. **FEBS Lett.** v.441, p.132–136, 1998.

HUNTER, RB; STEVENSON, E; KONCAREVIC, A; MITCHELL-FELTON, H; ESSIG, DA; KANDARIAN, SC. Activation of an alternative NF- κ B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. **FASEB J.** v.16, p.529–538, 2004.

HUSAIN, K; SOMANI, SM. Interaction of exercise and adenosine receptor agonist and antagonist on rat heart antioxidant defense system. **Mol Cell Biochem.** v.270, p.209-14, 2005.

IRRCHEER, I; ADHIHETTY, PJ; SHEEHAN, T; JOSEPH, AM; HOOD, DA. PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.284, p.C1669–C1677, 2003.

IRRCHEER, I; LJUBICIC, V; HOOD, DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.296, p.C116–C123, 2009.

IRRCHEER, I; LJUBICIC, V; KIRWAN, AF; HOOD, DA. AMPactivated protein kinase-regulated activation of the PGC-1 α promoter in skeletal muscle cells. **PLoS One** v.3, p.e3614, 2008.

JACKMAN, RW; KANDARIAN, SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.287, p.C834–C843, 2004.

JENKINS, RR. Exercise, oxidative stress and antioxidant: A review. **Intl J Sports Nutr.** v.3, p.356–375, 1993.

JENKINS, RR; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. **Med Sci Sports Exerc.** v.25, p.210-2, 1993.

JI, LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. **Experimental Gerontology.** v.12. p.582-593, 2007.

JI, LL. Exercise at old age: Does it increase or alleviate oxidative stress? **Ann N Y Acad Sci.** v.923, p.236–247, 2001.

JI, LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. **Free Radic Biol Med.** v.44, p.142-152, 2008.

JI, LL; CABRERA, G; VINA, J. Exercise and Hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v.1067, p.425-435, 2006.

JI, LL; FU, RG; MITCHELL, EW. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity. **J Appl Physiol.** v.73, p.1854–1859, 1992.

JI, LL; GOMEZ-CABRERA, MC; STEINHAFEL, N; VINA, J. Acute exercise activates nuclear factor NFkappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. **FASEB J.** v.18, p.1499–1506, 2004.

JI, LL; STRATMAN, FW; LARDY, HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver, and skeletal muscle: influences of selenium deficiency, chronic training and acute exercise. **Arch Biochem Biophys.** v.263, p.150–160, 1988.

KAMATA, H; MANABE, T; OKA, S; KAMATA, K; HIRATA, H. Hydrogen peroxide activates I κ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. **FEBS Lett.** v.519, p.231–237, 2002.

KARLSSON, HK; NILSSON, PA; NILSSON, J; CHIBALIN, AV; ZIERATH, JR; BLOMSTRAND, E. Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.287, p.E1–E7, 2004.

KAROLKIEWICZ, J; MICHALAK, E; POSPIESZNA, B; DESKUR-SMIELECKA, E; NOWAK, A; PILACZYŃSKA-SZCZEŚNIAK, Ł. Response of oxidative stress markers and antioxidant parameters to an 8-week aerobic physical activity program in healthy, postmenopausal women. **Arch Gerontol Geriatr.** v.49, p.67-71, 2009.

KEFALOYIANNI, E; GAITANAKI, C; BEIS, I. ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. **Cell Signal.** v.18, p.2238– 2251, 2006.

KIM KS, PAIK IY, WOO JH, KANG BY. The effect of training type on oxidative DNA damage and antioxidant capacity during three-dimensional space exercise. **Med Princ Pract.** v.19, p.133-41, 2010.

KRAMER, HF; GOODYEAR, LJ. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol** v.103, p388 –395, 2007.

KYRIAKIS, JM; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev.** v.81, p.807–869, 2001.

LAWLER, JM; POWERS, SK; VAN DIJK, H; VISSER, T; KORDUS, MJ; JI, LL. Metabolic and antioxidant enzyme activities in the diaphragm: effects of acute exercise. **Respir Physiol.** v.96, p.139–149, 1994.

LAWLER, JM; POWERS, SK; VISSER, T; VAN DIJK, H; KORDUS, MJ; JI, LL. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effect of fiber type and age. **Am J Physiol.** v.265, p.R1344–R1350, 1993.

LEEWENBURGH, C; FIEBIG, R; CHANDWANNEY, R; JI, LL. Aging and exercise training in skeletal muscle: Responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **Am J Physiol.** v.267, p.R439–R445, 1994.

LEEUWENBURGH, C; HEINECKE, JW. Oxidative stress Antioxidant in Exercise. **Curr Med Chem.** v.8, p.829-38, 2001.

LEEUWENBURGH, C; HOLLANDER, J; LEICHTWEIS, S; GRIFFITHS, M; GORE, M; JI, LL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol.** v.272, p.R363–R369, 1997.

LEVINE, RL; GARLAND, D; OLIVER, CN; AMICI, A; CLIMENT, I LENZ, AG; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth Enzymol.** v.186, p.464-78, 1990.

LIRA, VA; BENTON, CR; YAN, Z; BONEN, A. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.299, p.E145-61, 2010.

LOWRY, OH; ROSEBROUGH, NJ; FARR, AL; RANDALL, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v.193, p.265-7, 1951.

MARTINEAU, LC; GARDINER, PF. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. **J Appl Physiol.** v.91, p. 693–702, 2001.

MAUGHAN, J; GLEESON, M; GREENHAFF, PL. **Bioquímica do exercício e treinamento.** São Paulo: Manole, p.240, 2000.

MCARDLE, A; VAN DER MEULEN, JH; CATAPANO, M; SYMONS, MC; FAULKNER, JA; JACKSON, MJ. Free radical activity following contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats. **Free Radic Biol Med.** v.26, p.1085–1091, 1999.

MCARDLE, A; VASILAKI, A; JACKSON, M. Exercise and skeletal muscle ageing: Cellular and molecular mechanisms. **Ageing Res Rev.** v.1, p.79–93, 2002.

MIRANDA, L; VIARO, F; CENEVIVA, R; EVORA, PR. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. **Acta Cirurgica Brasileira** v. 19, p.3-11, 2004.

NAVARRO-AREVALO, A; SANCHEZ-DEL-PINO, MJ. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. **Mech Ageing Dev.** v.104, p.91-102, 1998.

NOBREGA, AC. The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. **Exerc Sport Sci Rev.** v.33, p.84-7.24, 2005.

NOJIMA, H; WATANABE, H; YAMANE, K; KITAHARA, Y; SEKIKAWA, K; YAMAMOTO, H; et al. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism.** v.57, p.70-6, 2008.

OHNO, H; SUZUKI, K; FUJII, J; YAMASHITA, H; KIZAKI, T; OH-ISHI, S; TANIGUCHI, N. Superoxide dismutases in exercise and disease. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, eds. **Exercise and Oxygen Toxicity.** New York: Elsevier Science, p.127–161, 1994.

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

OGONOVSKY, H; SASVÁRI, M; DOSEK, A; BERKES, I; KANEKO, T; TAHARA, S; et al. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Can J Appl Physiol.** v.30, p.186-95, 2005.

OLERT, E; CROSS, B; MCWILLIAMS, A. **Guide to care and use of experimental animals.** 2nd ed. Canadian Council on Animal, Ottawa; 1993.

ORPHANIDES, G; LAGRANGE, T; REINBERG, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. **Genes Dev.** v.10, p.2657-83, 1996.

PESCE, V; CORMIO, A; FRACASSO, F; LEZZA, AM; CANTATORE, P; GADALETA MN. Age-related changes of mitochondrial DNA content and mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in rat hind-limb skeletal muscles. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v.60, p.715–723, 2005.

PINHO, RA; ANDRADES, ME; OLIVEIRA, MR; PIROLA, AC; ZAGO, MS; SILVEIRA, PC; et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int.** v.30, p.848-53, 2006.

PINHO, RA; et al. Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral. **Rev Bras Med Esporte.** v.12, 2006.

POWERS, SK; CRISWELL, D; LAWLER, J; JI, LL; MARTIN, D; HERB, RA; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol.** v.266, p.R375–R380, 1994.

POWERS, SK; CRISWELL, D; LAWLER, J; MARTIN, D; LIEU, FK; JI, LL; HERB, RA. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in the ventricular myocardium. **Am J Physiol.** v.265, p.H2094–H2098, 1993.

POWERS, SK; DERUISSEAU, KC; QUINDRY, J; HAMILTON, KL. Dietary antioxidants and exercise. **J Sports Sci.** v.22, p.81– 94, 2004.

RADAK, Z; ASANO, K; INOUE, M; KIZAKI, T; OH-ISHI, S; SUZUKI, K; TANIGUCHI, N; OHNO, H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **J Appl Physiol.** v.79, p.129–135, 1995.

RADÁK, Z; TAHARA, TK; NAKAMOTO, H; OHNO, H; SASVÁRI M NYAKAS, C; et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic Biol Med.** v.27, p.69-74, 1999.

RUSS, DW; LOVERING, RM. Influence of activation frequency on cellular signalling pathways during fatiguing contractions in rat skeletal muscle. **Exp Physiol.** v.91, p.957–966, 2006.

RYDER, J; FAHLMAN, R; WALLBERG-HENRIKSSON, H; ALESSI, D; KROOK, A; ZIERATH, J. Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. **J Biol Chem.** v.275, p.1457–1462, 2000.

SACHDEV, S; DAVIES, KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. **Free Radic Biol Med.** v.44, p.215-223, 2007.

SALO, DC; DONOVAN, CM; DAVIES, KJA. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. **Free Radic Biol Med.** v.11, p.239-246, 1991.

SILVA, LA; ROSANI, MM; SOUZA, PS; SEVERINO, JB; FRAGA, D; STRECK, EL; et al. Comparação do treinamento físico de quatro e oito semanas sobre a atividade da cadeia transportadora de elétrons e marcadores de estresse oxidativo em fígado de camundongos. **Rev Bras Med Esporte.** v.16, p.126-9, 2010.

SILVA, LA; PINHO, CA; SCARABELOT, KS; FRAGA, DB; VOLPATO, AM; BOECK, CR. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol.** v.105, p.861-7, 2009.

SMOLKA, MB; ZOPPI, CC; ALVES, AA; SILVEIRA, LR; MARANGONI, S; PEREIRA-DA-SILVA, L; et al. HSP72 as a complementary protection against exercise induced oxidative stress in the soleus muscle of rats. **Am J Physiology.** v.279, p.1539-45, 2000.

SULIMAN, HB; CARRAWAY, MS; WELTY-WOLF, KE; WHORTON, AR; PIANTADOSI, CA. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. **J Biol Chem.** v.278, p.41510-41518, 2003.

TIIDUS, PM; HOUSTON, ME. Vitamin E status does not affect the response to exercise training and acute exercise in female rats. **J Nutr.** v.123, p.834-840, 1993.

TIIDUS, PM; HOUSTON, ME. Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. **Med Sci Sports Exerc.** v.26, p.354-9, 1994.

TIRAPÉGUI J. **Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais.** 2nd ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

THOMAS, JR; NELSON, JK; SILVERMAN, SJ. **Métodos de pesquisa em atividade física.** 5.ed. Porto Alegre: Artmed, p.396, 2007.

TUBINO, MJG; MOREIRA, SB. **Metodologia científica do treinamento desportivo.** 13. ed. rev. e ampl São Paulo: Shape, 2003. 462 p.

VINA, J; GOMEZ-CABRERA, MC; LLORETMARQUEZ, R; MINANA, JB; PALLARDO, FV; SASTRE, J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life.** v.5, p.271-277, 2000.

WIDEGREN, U; WRETMAN, C; LIONIKAS, A; HEDIN, G; HENRIKSSON, J. Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. **Pflügers Arch.** v.441, p.317-322, 2000.

WINDER, WW; HOLMES, BF; RUBINK, DS; JENSEN, EB; CHEN, M; HOLLOSZY, JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **J Appl Physiol.** v.88, p.2219–2226, 2000.

YU, M; BLOMSTRAND, E; CHIBALIN, AV; KROOK, A; ZIERATH, JR. Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. **J Physiol.** v.536, p.273–282, 2001.

YU, M; STEPTO, NK; CHIBALIN, AV; FRYER, LG; CARLING, D; KROOK, A; HAWLEY, JA; ZIERATH, JR. Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. **J Physiol.** v.546, p.327–335, 2003.

ZHOU, LZ; JOHNSON, AP; RANDO, TA. NFkB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. **Free Radic Biol Med.** v.31, p.1405-1416, 2001.

ZONG, H; REN, JM; YOUNG, LH; PYPART, M; MU, J; BIRNBAUM, MJ; SHULMAN, GI. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. **Proc Natl Acad Sci.** v.99, p.15983–15987, 2002.

ZOPPI, CC. Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico. . **Rev Saúde Com.** v.1, p.60-70, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo 1

Mecanismos moleculares antioxidantes modulados pelo exercício físico **Molecular mechanisms antioxidants modulated by exercise**

Camila Baumer Tromm *, Luciano Acordi da Silva MSc**, Ricardo Aurino de Pinho DSc***

*Bacharelanda em Educação Física, ** Mestre em Ciências da Saúde, ***
Doutor em Bioquímica.

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
Criciúma – SC.

Endereço para correspondência: Camila Baumer Tromm, Av. Universitária,
1105, Bairro Universitário, 88806-000, Criciúma, SC – Brasil. (48) 3431 2773
milatromm@hotmail.com

Mecanismos antioxidantes e exercício físico

Resumo

A geração de espécies reativas de oxigênio é um fenômeno biológico que ocorre durante a vida celular. Estes compostos podem ativar vias de sinalização envolvidas na regulação do crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose. A presença contínua de pequenos estímulos induzidos pelo exercício, provoca elevações mínimas nas concentrações de espécies reativas de oxigênio sendo abeis para induzir a expressão de enzimas antioxidantes e outros mecanismos de defesa. O NFκB e MAPK são duas grandes vias de sinalização que podem ser ativadas em resposta às EROs induzidas pelo exercício, tanto agudo quanto crônico (treinamento). Embora o papel destes compostos sobre a ativação de enzimas antioxidantes vem sendo investigado, os mecanismos intrínsecos da adaptação antioxidante permanecem obscuros.

Palavras-chave: treinamento físico, vias de sinalização, defesa antioxidante.

Abstract

The generation of reactive oxygen species is biological phenomenon that occurs during cell life. These compounds can activate signaling pathways involved in regulating growth, proliferation, differentiation and apoptosis. The continued presence of small stimuli induced by exercise, causes minimal elevations in concentrations of reactive oxygen species and Abels to induce expression of antioxidant enzymes and other defense mechanisms. The NFκB and AMPK are two major signaling pathways that can be activated in response to reactive oxygen species induced by exercise, both acute and chronic (training). Although the role of these compounds on the activation of antioxidant enzymes has been investigated, the intrinsic mechanisms of antioxidant adaptation remain unclear.

Key-words: physical training, signaling pathways, antioxidant defense.

Introdução

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um fenômeno biológico que ocorre durante a vida celular. Durante as últimas duas décadas, muita atenção tem sido dada aos efeitos prejudiciais de EROs, como estresse oxidativo que conseqüentemente pode provocar envelhecimento e diversas patologias. No entanto, mais recentemente surgiram evidências de que EROs não são apenas agentes prejudiciais para a estrutura e função celular mas são moléculas de sinalização que regulam o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose celular (1,2,3). Algumas proteínas antioxidantes podem ser rapidamente ativadas durante o estresse oxidativo induzido por uma única sessão de exercício físico (4,5), enquanto que outras proteínas são ativadas mais lentamente após o treinamento físico (6).

Existem evidências de que a presença contínua de pequenos estímulos, que provocam elevações mínimas nas concentrações de EROs são capazes para induzir a expressão de enzimas antioxidantes e outros mecanismos de defesa (7). A base deste fenômeno pode ser explicada pelo conceito de hormese, onde a adaptação ao exercício ocorre por meio de estímulos que expõem a célula a baixas doses de oxidantes, mas sendo inibida por altas doses do mesmo (3,8). Neste contexto, EROs podem ser benéficos, atuando como sinalizadores para aumentar as defesas antioxidante do organismo (3,9).

A resposta adaptativa obtida com o treinamento físico resulta dos efeitos cumulativos de sessões repetidas de exercício, onde a célula é exposta a baixos níveis de EROs durante cada sessão de exercício (8). Isto torna a célula mais resistente ao estresse oxidativo, por pelo menos três mecanismos: 1) aumento da expressão (10) e atividade (11) de enzimas antioxidantes; 2) redução na produção de oxidantes (12); 3) Controle do fluxo de elétrons mitocondrial (13). Embora o papel de EROs sobre a ativação de enzimas antioxidantes vem sendo investigado, os mecanismos intrínsecos da adaptação antioxidante permanecem obscuros.

Geração de EROs

Os mecanismos de geração de EROs durante o exercício físico ocorrem em diversos compartimentos celulares, tais como, mitocôndrias, membranas e citoplasma.

Na mitocôndria, uma das formas de produção de EROs durante o exercício é devido a um escape de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (CTE). O escape de elétrons entre o complexo I e ubiquinona e entre ubiquinona e o complexo III parecem ser os responsáveis pela maior parte dos superóxidos gerados (14,15). Estudos *in vitro* mostram que a CTE gera superóxido a partir da redução univalente do O_2 . Este único elétron vem da redução da ubiquinona que em vez de aceitar um outro elétron e um próton para formar ubiquinol, pode doar o seu elétron desemparelhado para o O_2 , formando superóxido. Salo et al. (16) demonstrou que a estabilidade da família ubiquinona diminui com o aumento da temperatura, e a transferência de elétrons ao longo da CTE diminui enquanto a transferência eletrônica direta ao oxigênio (a reação "vazamento") aumenta, gerando mais superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estima-se que de 2-4% do oxigênio consumido por seres humanos seja reduzido a $O_2^{\cdot-}$ por mitocôndrias.

No citoplasma, a produção de EROs durante o exercício exaustivo pode ser causada pela ativação da enzima xantina oxidase. O exercício intenso pode causar isquemia fazendo com que o ATP seja convertido em ADP, AMP, inosina e hipoxantina. Sob tais condições a enzima xantina desidrogenase intracelular (XDH) é convertida em xantina oxidase (XO), que utiliza o O_2 como acceptor de elétrons, gerando diretamente $O_2^{\bullet-}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando o oxigênio é reperfundido uma explosão de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 ocorre. Tem sido argumentado que a XO pode desempenhar um papel mais importante na produção de radicais livres do que a CTE durante exercícios exaustivos (17,18). No entanto é mais provável que ambos contribuam, dependendo do tipo, intensidade e duração do exercício.

Nas membranas plasmáticas a produção de EROs, especialmente em casos de exercícios excêntricos, é resultado da migração de neutrófilos e outras células fagocíticas do organismo como parte de uma resposta imune à lesão tecidual (19). Macrófagos e neutrófilos ativam a enzima NADPH oxidase que em sua reação oxida NADPH a NADP, utilizando neste processo o oxigênio como acceptor de elétrons, formando consequentemente $O_2^{\bullet-}$. Este superóxido em contato com óxido nítrico pode formar peroxinitrito. Ou então pode sofrer ação da SOD e ser dismutado a H_2O_2 . O H_2O_2 pode ser convertido em HOCl, que em contato com Ferro ou outro H_2O_2 pode gerar o radical hidroxila. No entanto, o papel da resposta inflamatória e dos neutrófilos ainda permanecem mal caracterizados.

O desequilíbrio entre os mecanismos de produção e de neutralização das EROs, a favor da produção, denomina-se estresse oxidativo. Este fenômeno natural é resultado de uma incapacidade dos sistemas antioxidantes em combater a produção adicional de EROs (20).

Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante é constituído por proteínas enzimáticas como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPX) e Tio-redoxina Redutase (TRX) (responsável pela manutenção dos grupos tiol das proteínas); e por antioxidantes não enzimáticos, como o ascorbato (doador de elétrons), urato (sequestrador do radical hidroxila e peroxila) glutathione reduzida (doador de elétrons e precursora da GPX), tocoferol (doador de elétrons), flavonoides e carotenoides (supressores do oxigênio singlet) (21,22).

Mecanicamente a SOD dismuta o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Sendo que a CAT e GPX catalisam a degradação subsequente do H_2O_2 a H_2O . No músculo esquelético, 15 – 35% da atividade da SOD encontra-se nas mitocôndrias e o restante no citosol (23). Já as concentrações da CAT são mais elevadas nos peroxissomas do que nas mitocôndrias (24). A GPX tem aproximadamente 45% de atividade no citosol e o restante na mitocôndria (23), e parece demonstrar maior afinidade com o H_2O_2 em altas concentrações (25).

Estudos reportaram que uma única sessão de corrida (40min e 70min) é capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no músculo esquelético de ratos (26,27), e também após uma sessão de natação (28). Contudo o treinamento físico tem também demonstrado aumento na atividade destas enzimas em ratos após corrida aeróbia (29,30,31) e aumento da SOD e GSH após treinamento resistido (32,33).

Sinalização da Biogênese Mitocondrial

EROs podem ativar vias de sinalização envolvidas na biogênese mitocondrial. EROs têm demonstrado induzir a ramificação e alongamento do mtDNA (DNA mitocondrial) (34). O aumento no mtDNA foi acompanhado por uma indução na massa mitocondrial. Esta resposta parece ser mediada por PGC-1 α (coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma) e NRF-1 (fator nuclear respiratório 1), pois a expressão de ambos aumenta após tratamento com LPS (lipopolissacarídeos) (35). Recentemente um estudo demonstrou que EROs podem induzir o aumento da atividade e expressão de PGC-1 α através de vias tanto de AMPK-dependente como AMPK-independente (Proteína Quinase Mitogênica Ativada) (36). Estes dados demonstram que EROs são agentes envolvidos no aumento da biogênese mitocondrial. A ativação da AMPK aumenta o mRNA (RNA mensageiro) de PGC-1 α (37). Este fato é provavelmente mediado por uma ativação transcricional, haja vista que a ativação da AMPK leva a melhor atividade de PGC-1 α (38). A regulação de PGC-1 α , sua transcrição e tradução é acompanhada pelo aumento na atividade do DNA de NRF-1 (39). Adicionalmente, a ativação farmacológica crônica do AMPK resultou em aumentos das enzimas mitocondriais como citocromo c, citrato sintase, e malato desidrogenase no músculo esquelético (40). Assim, a ativação da AMPK parece ser outro importante regulador da biogênese mitocondrial em condições de alta demanda energética nas células musculares.

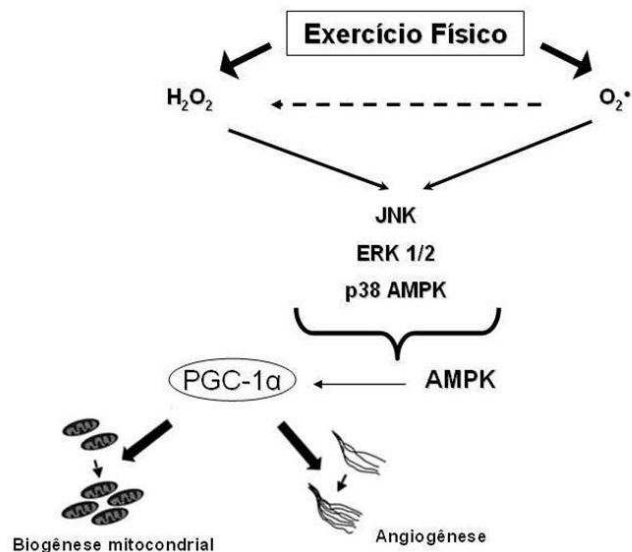
Fatores de transcrição antioxidantes

Fatores de transcrição são proteínas adicionais exigidas pela RNA polimerase para iniciar a transcrição e são responsáveis pela regulação da expressão gênica (41). Um fator de transcrição (chamado de fator de seqüência específica de ligação ao DNA) é uma proteína que se liga a seqüências específicas de DNA, assim, controla o fluxo (ou transcrição) da informação genética do DNA para o mRNA. O mRNA carrega informações do DNA aos ribossomos, onde serve como molde para a síntese de proteínas (são intermediários no fluxo da informação genética) e são transcritos pela RNA polimerase (42). As moléculas de RNA são sintetizadas a partir de moldes do DNA (isso é transcrição) e as proteínas são sintetizadas a partir de moldes de RNA (isso é tradução) (43).

AMPK

A família de proteínas AMPK é composta por quatro módulos de sinalização no músculo esquelético: 1) quinase extracelular (ERK) 1 e 2 (ERK1/2); 2) p38 AMPK; 3) c-Jun N-terminal quinase (JNK) e 4) ERK5 ou grande AMPK. Estes ramos de AMPK são estimuladas por citocinas, fatores de crescimento e estresse celular e tem como função regular várias atividades celulares como a expressão genética (44,45). Um papel importante de ativação da AMPK pelo exercício é a regulação da transcrição do status redox no músculo esquelético. O estresse mecânico e metabólico associado ao exercício aumenta a produção de EROs que são neutralizadas devido ao aumento na adaptação antioxidante através da regulação de enzimas antioxidantes (46). A atividade da AMPK pode parcialmente mediar essa resposta. O H₂O₂ induz a ativação de ERKs, JNKs (47) e desencadeia a fosforilação da p38 AMPK aumentando o transporte de glicose no músculo esquelético.

ERK1/2 é ativada rapidamente após treinamento físico com diferente volume e intensidade (48). Da mesma forma que em humanos sedentários e treinados após sessão de ciclismo submáximo (49,50) e maratona (51). A magnitude da fosforilação de ERK1/2 durante o exercício correlaciona-se com a intensidade do protocolo (50), e tanto exercício de endurance como resistido (52,53) podem aumentar ERK1/2. Protocolos de exercício intenso estimulam a transdução de sinal através da via JNK (54,55). A fosforilação de JNK aumenta linearmente com os níveis de força muscular (56). Portanto, a tensão muscular total, em vez da duração do estímulo parece ser o modulador influente sobre a atividade de JNK (57).



(Adaptado de Lira et al., 2010⁵⁸)

Figura 1: Via de sinalização envolvida na ativação de AMPK e PGC-1 α induzida pelo exercício físico.

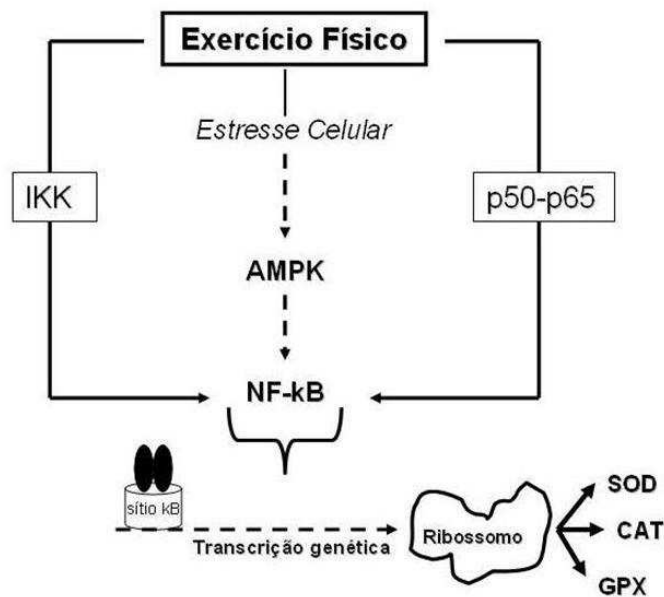
NF κ B

NF κ B (Fator Nuclear Kappa B) é composto por cinco membros, incluindo p50, p52, p65, RelB, e c-Rel (59). Evidências sugerem que o heterodímero p50 e p65 são os principais responsáveis pela atividade de NF κ B no músculo esquelético (60). Contrações musculares estimulam o retículo sarcoplasmático liberando cálcio aumentando os níveis de EROs, que ativam diversas vias de sinalização, incluindo AMPK (61). O aumento da cálcio intracelular, a acumulação de EROs (62), e a ativação da AMPK (63) ativam o NF κ B, levando à hipótese de que o exercício também ativa o NF κ B.

Alguns estudos demonstraram que uma única sessão de corrida em esteira aumenta a fosforilação de IKK, aumentando a atividade do NF κ B no músculo esquelético de ratos (64,65). O treinamento físico também pode alterar a composição e atividade do NF κ B. Doze semanas de corrida resultou em fosforilação aumentada de IKK, sugerindo que a ativação do NF κ B foi elevada após o treinamento (46). Diferenças na atividade de NF κ B após o treinamento podem refletir a natureza (intensidade, duração e frequência) do exercício realizado ou a recuperação entre as séries do exercício.

NF κ B responde a EROs aumentando a transcrição de pelo menos três genes antioxidantes importantes, incluindo MnSOD (SOD dependente de manganês), iNOS (óxido nítrico sintase) e glutamilsteína sintetase (66). Assim, é possível que o

aumento do NFkB verificado após o exercício promova maior resistência celular ao estresse oxidativo.



(Adaptado de Kramer e Goodyear 2007⁴⁶)

Figura 2: Via de sinalização envolvida na ativação de NFkB induzida pelo exercício físico.

AP-1

Outro fator de transcrição regulado pelo estado redox intracelular, induzido pelo exercício, é o ativador protéico 1 (AP-1). O AP-1 é um dímero expresso por dois genes, *jun* e *fos* (43). Uma das proteínas que possuem sua expressão controlada pelo AP-1 é uma das subunidades da enzima Glutathiona S-transferase (8). O AP-1 regula a expressão gênica em resposta a uma variedade de estímulos incluindo EROs (67). Além disso, sua ligação ao DNA também é controlada pelo estado redox. Hollander et al. (68) relatou que o AP-1 foi aumentado no músculo esquelético de ratos após um realização de uma sessão de exercício de longa duração (corrida). O aumento de AP-1 ocorreu simultaneamente ao aumento na expressão do mRNA de MnSOD.

Exercício e adaptação antioxidante

Alguns tecidos corporais, tais como, fígado, coração e cérebro haja vista uma maior taxa de consumo de oxigênio, expressam um número maior de enzimas antioxidantes em relação aos órgãos com menor consumo de oxigênio (69). A atividade de enzimas antioxidantes no músculo esquelético varia amplamente em função dos tipos de fibra. Por exemplo, fibras musculares tipo I possuem maior atividade antioxidante do que as fibras tipo IIa e fibras tipo IIb (70). É fato que a atividade contrátil pode causar um aumento na geração de EROs in vitro e in vivo (71,72). Contudo a exposição repetida das células musculares ao estresse oxidativo é capaz de promover uma adaptação ao sistema de defesa antioxidante protegendo contra potenciais danos oxidativos (10,11,12).

Entre as enzimas antioxidantes no músculo esquelético, a atividade SOD tem sido consistentemente aumentada com o treinamento de forma dependente da intensidade (caminhada/corrída) (73). A MnSOD é a principal responsável pelo aumento observado na atividade da SOD total, enquanto a atividade CuZnSOD (SOD dependente de cobre e zinco) parece pouco afetada (73,74). Na atividade da GPX também tem sido demonstrado um aumento após o treinamento aeróbio (corrída) (75,76). Da mesma forma, uma sessão extenuante de natação demonstrou induzir aumento da SOD no miocárdio e no diafragma de ratos (77).

Há algumas evidências de que a adaptação antioxidante ocorra devido a expressão proteica, com os níveis da proteína e seu mRNA sendo aumentados com o treinamento. No entanto, os dados são limitados e controversos. Por exemplo, em alguns estudos a atividade e a expressão da MnSOD aumentaram com treinamento aeróbio (corrída) nos músculos de ratos, mas a expressão do mRNA da MnSOD não foi afetada (78,79). Já a expressão do mRNA de CuZnSOD foi elevada com o treinamento, com nenhuma mudança na expressão da proteína (80). Geralmente mRNAs têm uma meia-vida curta e nos estudos citados acima o tecido muscular foi recolhido entre 24h e 48h após o exercício. Pode-se concluir que o mRNA pode aumentar apenas transitoriamente após sessões únicas de exercício. Em contraste com a atividade da SOD, a literatura é bastante limitada em relação a regulação gênica da GPX e CAT. Os dados disponíveis indicam que os níveis do mRNA da GPX de ratos treinados não são diferentes daqueles em ratos controle (80).

A adaptação ao treinamento de enzimas antioxidante é fortemente influenciada por uma série de fatores fisiológicos e ambientais. Resumidamente, ratas demonstraram menor extensão no dano oxidativo muscular induzido pelo exercício e melhor adaptação ao treinamento (corrída) do que ratos, possivelmente devido ao efeito antioxidante do estrogênio (81). Animais e humanos idosos geralmente mostram uma escala menor de adaptação antioxidante do que jovens indivíduos exercitando em uma carga de trabalho semelhante (82). A razão para esta discrepância pode estar relacionada com mudanças em ambos os sistemas de defesa antioxidante e a capacidade de transdução de sinal (83).

Expressão de genes antioxidantes regulados pelo exercício

O primeiro a reportar a ativação de JNK, ERK1 / 2, p38 AMPK no músculo esquelético de ratos após uma sessão de corrida em esteira foi Goodyear et al. (48). Este grupo mostrou posteriormente que p42 e p44AMPK (ERK1 / 2) foram fosforiladas após exercício em cicloergometro no músculo humano, juntamente com a ativação de MEK1 e Raf-1 (84). Desde então, alguns estudos têm mostrado que a AMPK pode ser ativada pela atividade contrátil em músculo esquelético (85,86). Os sinais que desencadeiam a ativação da AMPK têm sido atribuídos a uma variedade de estímulos fisiológicos associados ao exercício, incluindo liberação hormonal, liberação de cálcio, atividade neural, e força mecânica (87). No entanto, a influência do exercício sobre as enzimas da família AMPK de forma individual e suas integrações em outras vias de sinalização são ainda discretas.

Comparado à AMPK, o conhecimento sobre o efeito do exercício na sinalização do NFκB é relativamente limitado. Hollander et al. (68) demonstrou pela primeira vez que NFκB foi significativamente elevado em músculo esquelético após um sessão de exercício prolongado (aproximadamente 60min. de corrida). O aumento de NFκB foi acompanhado pelo aumento na expressão do mRNA de MnSOD no músculo exercitado. Ji et al. (65) realizaram uma série de experimentos

para analisar a cascata de sinalização de NFκB em resposta ao exercício. Estes autores encontraram níveis mais elevados de NFκB após o exercício (corrida até a exaustão), juntamente com aumento da atividade de IKK e acumulação de p50 no núcleo celular. Em um estudo recente, Ho et al. (64) relatou que a ativação NFκB foi elevada no sóleo (fibras tipo I) e no gastrocnêmio (fibras tipo II) durante 60 min. de corrida em esteira, acompanhado por fosforilação de IKK. Em ratos adultos, a atividade basal do NFκB foi duas vezes maior no sóleo e no diafragma em relação ao gastrocnêmio e três vezes maior maior no sóleo em comparação ao extensor longo dos dedos. Esses dados indicam que a ativação do NFκB é dependente do tipo de fibra muscular (88,89). Estas diferenças podem refletir as concentrações das enzimas antioxidantes nas diferentes fibras musculares. A ativação de NFκB também parece ser influenciada pelo estado metabólico da célula muscular (87). Durham et al. (89) mostrou que os níveis de NFκB foram reduzidos abaixo do nível pré exercício após uma sessão de exercício resistido extenuante, mas retornando ao nível basal após uma recuperação de 60min. Sugerindo que a contração muscular é provavelmente necessária para ativação desta via de sinalização (90,91).

Conclusão

A geração de EROs durante a contração muscular tem um papel importante na adaptação do músculo ao estresse oxidativo induzido pelo exercício, ativando vias de sinalização de enzimas antioxidantes e outras proteínas vitais para a célula. O NFκB e AMPK são duas grandes vias de sinalização que podem ser ativadas em resposta às EROs induzidas pelo exercício. Tanto o exercício agudo quanto o treinamento ativam essas vias de sinalização. Contudo, o treinamento físico parece ser capaz de promover resistência celular ao estresse oxidativo prolongando a adaptação antioxidante. Além disso, a existência de múltiplos sítios redox-sensíveis nos genes antioxidantes sugere que a ativação sinérgica e interação de diversos fatores de transcrição são requeridos para garantir a exatidão da expressão genética de enzimas antioxidantes.

ANEXO B – Carta de aceite e Artigo 2

Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano - ISSN 1980-0037
Brazilian Journal of Kinanthropometry and Human Performance
Universidade Federal de Santa Catarina.
Centro de Desportos – NuCIDH – <http://www.periodicos.ufsc.br/index.php/rbcdh/index>
CEP: 88.040-900 – Florianópolis, SC
Tel. (048) 3331.8562 Fax. 3331.8562
E-MAIL: nucidh@cds.ufsc.br petroski@cds.ufsc.br

Florianópolis, 18 de Agosto de 2011


Prezados autores: Camila Baumer Tromm, Guilherme Laurentina da Rosa, Karoliny Bom, Izadora Mariano, Bruna Pozzi, Talita Tuon, Luciano Acordi da Silva, Ricardo Aurino Pinho.

Artigo: Efeito de diferentes frequências semanais de treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo.

Número: 19331-60775-3-RV.DOC

É com satisfação que informamos que vosso artigo foi aceito para publicação na **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.** Tão logo a data de publicação esteja programada, entraremos em contato.

Atenciosamente,


Edio Luiz Petroski (Dr)
Editor RBCDH
Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Desportos
Campus Universitário – Trindade – Caixa postal 476
CEP – 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil
Fone 55 48 3721.6348 Fax. 55 48 3721.8562

Artigo Original

EFEITO DE DIFERENTES FREQUENCIAS SEMANAIS DE TREINAMENTO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

EFFECT OF DIFFERENT FREQUENCIES WEEKLY TRAINING ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS

FREQUENCIA DE TREINAMENTO E ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO

Durante a contração muscular intensa induzida pelo exercício físico, há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo (EO) em diversos órgãos, dentre eles o fígado e o coração. O treinamento físico pode aumentar as defesas antioxidantes e diminuir o EO. Contudo, ainda existem dúvidas sobre a frequência de treinamento necessária para melhorar parâmetros de EO. Este trabalho tem como objetivo verificar o efeito das frequências de duas e três vezes de exercício por semana sobre biomarcadores de EO no fígado e coração. Foram utilizados 18 camundongos machos (CF1), jovens (30 a 35g) divididos em grupos (n=6/grupo): não treinado (NT); treinado duas vezes por semana (T2) e treinado três vezes por semana (T3). Os animais foram submetidos ao treinamento durante oito semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão os animais foram sacrificados. O fígado e o coração foram removidos e armazenados em freezer – 70°C. Foram analisadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteína (CP), conteúdo total de tióis (TT), atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). Os resultados demonstraram que apenas o grupo T3 reduziu dano oxidativo (TBARS e CP). Ademais, houve aumento no TT, atividades da SOD e CAT no mesmo grupo em comparação com o não treinado. A atividade da GPX não apresentou diferença significativa entre os grupos. Este estudo demonstrou que somente a frequência de treinamento de três vezes por semana reduz o dano oxidativo e aumenta a eficiência do sistema enzimático antioxidante de camundongos.

Palavras-chave: dano oxidativo, enzimas antioxidantes, exercício físico, frequência de treinamento.

ABSTRACT

During the muscle contraction induced by exercises there is an increase in the reactive oxygen species production, causing oxidative stress (OS) in several organs, including liver and heart. The exercise may can increases antioxidant defenses and decrease OS in these organs. However, the number of the sessions a week necessary to improve the parameters of OS is not to well defined. The aim of the study was to investigate the frequency effects of exercise performed two and three times a week on changes in biomarkers of OS in the liver and heart. Were used 18

male mice (CF1), young (30 to 35g) and divided into groups (n=6/group): not trained (NT) trained twice a week (T2) and trained three times a week (T3). The animals were subjected to training for eight weeks. Forty-eight hours after the last session, the animals were killed. The liver and heart were removed and stored in - 70°C. Were analyzed the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (CP), content of total thiols (TT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX). Our findings showed that the group T3 reduced oxidative damage (TBARS and CP) if compared to NT. There was increase in TT, SOD and CAT in the T3 group when compared to NT. The GPX activity showed no significant difference between groups. This study demonstrated that only the frequency of training performed three times a week was able to reduce oxidative damage and increase the efficiency of antioxidant system of mice.

Key-words: antioxidants enzymes, oxidative damage, physical exercise, training frequency.

INTRODUÇÃO

Durante a contração muscular induzida por exercícios, o consumo de oxigênio pode aumentar de 10 a 20 vezes em níveis sistêmicos e de 100 a 200 vezes em níveis musculares em relação aos valores de repouso¹, ocasionando concomitantemente elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)^{2,3}.

O desequilíbrio entre produção e remoção das ERO leva ao processo de estresse oxidativo (EO) que está associado a danos musculares e disfunções metabólicas e, por conseguinte redução do desempenho físico^{2,4}. Adicionalmente, o EO altera o funcionamento fisiológico de diversos órgãos, dentre eles o fígado e o coração. A alta taxa metabólica apresentada por esses órgãos está associada ao alto fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e conseqüente elevada produção de EROs⁵.

O fígado é o principal órgão relacionado ao controle metabólico e, diversos autores sugerem que o mesmo é acometido, de forma importante, ao EO durante e após o exercício físico^{6,7}. Do mesmo modo o coração, órgão central do sistema circulatório, também apresenta um elevado consumo de oxigênio durante a realização de exercícios, o que favorece a produção de EROs. As ERO são produzidas principalmente em decorrência vazamento de elétrons ao nível da Coenzima Q entre os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (CTE). Ainda, a xantina oxidase presente no citosol e a NADPHoxidase presente na membrana celular são outras fontes importantes de produção de EROs durante a realização de exercício físico¹. O estresse oxidativo provoca diversas alterações em células hepáticas e cardíacas, podendo ocasionar doenças como esteatose hepática, hepatite C e aterosclerose. No entanto, o treinamento físico quando bem planejado, pode melhorar tanto os mecanismos de defesa antioxidantes^{5,6,8}, como a capacidade oxidativa do tecido⁹, podendo diminuir a magnitude do ataque oxidativo^{10,11} e prevenir efeitos deletérios decorrentes do mesmo^{12,13}.

Estudos prévios em modelo animal já demonstraram que o treinamento físico altera positivamente o estado *redox* de inúmeras células e tecidos e pode melhorar parâmetros de estresse oxidativo^{5,10,14,15}. Conhecimento este que pode ser

transponível aos humanos, dado o vínculo existente entre as diferentes espécies animais, extrapolando assim os dados obtidos em pesquisa animal para a espécie humana. Silva et al.⁵ e Frederico et al.¹² demonstraram que oito semanas de treinamento com cinco sessões semanais foram suficientes para reduzir estresse oxidativo no fígado⁵ e no coração¹². Contudo, não se sabe se as frequências de duas e três sessões semanais efetuadas durante oito semanas de treinamento serão suficientes também para induzir melhorias nos parâmetros de EO nos tecidos hepático e cardíaco. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos das frequências de duas e três vezes semanais de exercício por um período de oito semanas sobre parâmetros de estresse oxidativo em fígado e coração de camundongos.

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O protocolo do estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brasil, de acordo com "Guiding Principles in the Care and Uses Animals"¹⁶. Foi utilizado um total de 18 camundongos machos (CF1), com idade aproximadamente de 90 dias, com massa corporal entre 30 e 35g, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas de polipropileno, e foram alimentados "ad libitum" com água e uma dieta equilibrada (Purina®). Durante o período de experimento, todos os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada de aproximadamente 23°C e com um fotoperíodo definido de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.

Protocolo experimental

Os camundongos foram divididos randomicamente em três grupos (n=6): não treinado (NT); treinado duas vezes por semana (T2) e treinado três vezes por semana (T3). Todos os animais foram adaptados em esteira ergométrica por uma semana (10m/min, sem inclinação, durante 10 min/dia) todos os dias da semana. Após o período de adaptação, os grupos T2 e T3 foram submetidos a oito semanas de treinamento (corrida em esteira), com velocidade constante de 13m/min, sem inclinação, totalizando 45 minutos por sessão⁹. Esta velocidade de treinamento corresponde a uma intensidade moderada de aproximadamente 78% do $VO_2 \text{ máx}$ ¹⁷. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de Ketamina (80mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) e posteriormente sacrificados. O fígado e o coração foram cirurgicamente removidos e imediatamente armazenados em freezer – 70°C para posterior análise.

Marcadores de dano oxidativo

Os danos oxidativos em lipídeos foram determinados a partir da formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBARS) o qual foi mensurado espectrofotometricamente (532nm), e expresso em nmol/mg de proteína, conforme descrito por Draper & Hadley¹⁸.

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas baseados na reação com dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonila foi determinado espectrofotometricamente (370nm) usando um coeficiente $22.000 \text{ Molar}^{-1}$, e expresso em nmol/mg de proteína, como previamente descrito por Levine et al.¹⁹.

O conteúdo total de tióis (TT) foi determinado numa reação dos grupos tióis com 5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico) (DTNB), gerando um derivado de coloração amarela. A leitura do conteúdo de TT foi feita espectrofotometricamente (412nm) e expressa em DTNB/mg de proteína²⁰.

Atividade enzimática antioxidante

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm), expressa em U de SOD/mg de proteína, como previamente descrito por Bannister & Calabrese²¹.

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio, medido espectrofotometricamente (240nm) e expressa em U de CAT/mg de proteína, conforme previamente descrito por Aebi²².

A determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPX) foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria (340nm), e expressa em mM/min/mg de proteína, conforme Flohé e Gungler²³. A quantidade de proteínas em todos os ensaios foi mensurada usando a técnica de Lowry et al.²⁴.

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média e analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc de Tukey. O nível de significância pré-estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). O *software* utilizado para análise dos dados foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®), versão 17.0 para *Windows*.

RESULTADOS

Conforme figura 1A, os resultados demonstram menor nível de TBARs no fígado ($0,13 \pm 0,02$ nmol/mg de proteína) e no coração ($0,20 \pm 0,01$ nmol/mg de proteína) no grupo T3 em relação ao não treinado ($0,25 \pm 0,02$; $0,36 \pm 0,06$ nmol/mg/proteína), respectivamente. Da mesma forma, os resultados de carbonilação de proteínas (figura 1B) demonstram uma diminuição no conteúdo de carbonilas no fígado ($0,19 \pm 0,049$ nmol/mg de proteína) e no coração ($0,15 \pm 0,011$ nmol/mg de proteína) no grupo T3 em relação não treinado ($0,35 \pm 0,041$; $0,26 \pm 0,017$ nmol/mg de proteína), respectivamente. Entretanto o treinamento realizado duas vezes por semana (T2) não foi suficientemente capaz de alterar os níveis de TBARS e conteúdo de carbonilas no fígado ($0,23 \pm 0,02$; $0,32 \pm 0,09$) e no coração ($0,32 \pm 0,03$; $0,24 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína) em relação aos animais não treinados. Os resultados de tióis totais observados na figura 1C demonstram maior conteúdo no fígado ($71,08 \pm 4,79$ DTNB/mg de proteína) e no coração ($97,7 \pm 14,2$ DTNB/mg de proteína) dos animais pertencentes ao grupo T3 em relação ao grupo não treinado ($41,7 \pm 4,07$; $41,6 \pm 8,3$ DTNB/mg de proteína) respectivamente. Entretanto, o grupo submetido ao treinamento com duas sessões semanais não foi suficientemente capaz de alterar este marcador ($47,7 \pm 4,2$; $51,9 \pm 5,8$ DTNB/mg de proteína) em relação ao grupo não treinado.

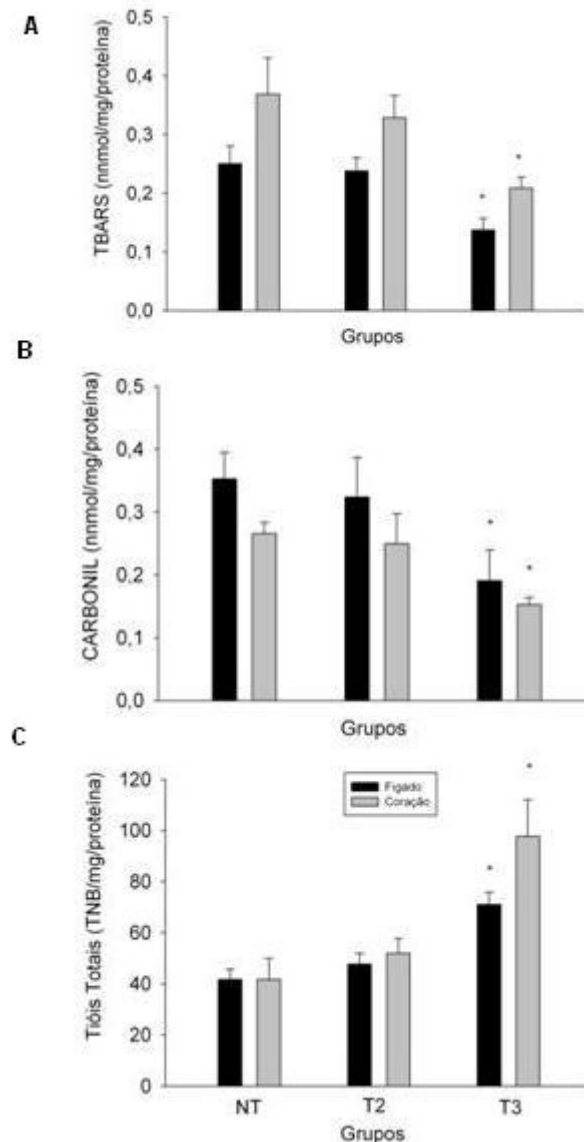


Figura 1: Lipoperoxidação (A), carbonilação de proteínas (B) e conteúdo total de tióis (C) no fígado e coração de camundongos após 48 horas da última sessão de treinamento. Os valores foram apresentados em Média \pm EPM, avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A lipoperoxidação e a carbonilação de proteínas foram expressas em nmol/mg de proteína e o conteúdo total de tióis expresso em DTNB/mg de proteína. $p < 0,05$, * vs NT.

Em relação às atividades das enzimas antioxidantes, os resultados mostrados pela figura 2A denotaram aumento no fígado ($0,37 \pm 0,05$ U/mg de proteína) e no coração ($0,23 \pm 0,02$ U/mg de proteína) da atividade da SOD no grupo T3 em comparação ao grupo S ($0,15 \pm 0,01$; $0,12 \pm 0,01$ U/mg de proteína). Entretanto, o treinamento físico realizado apenas duas vezes por semana (T2) não foi suficientemente capaz de alterar este marcador ($0,24 \pm 0,03$; $0,07 \pm 0,006$ U/mg de proteína). Similarmente, a atividade da CAT (figura 2B) mostrou-se aumentada no fígado ($0,17 \pm 0,03$ U/mg de proteína) e no coração ($0,45 \pm 0,04$ U/mg de proteína) no grupo T3 em relação ao grupo não treinado ($0,07 \pm 0,02$; $0,02 \pm 0,001$ U/mg de proteína). Novamente, o treinamento realizado duas vezes por semana (T2) não foi suficientemente capaz de aumentar a atividade da CAT no fígado ($0,05 \pm 0,01$) e no coração ($0,02 \pm 0,001$ U/mg de proteína) em relação ao grupo não treinado. A atividade da GPX (figura 2C) no grupo T2 e T3 no fígado ($0,8 \pm 0,06$; $1,0 \pm 0,1$ mM/mg de proteína) e no coração ($0,7 \pm 0,1$; $0,9 \pm 0,1$ mM/mg de proteína) não foi

significativamente diferente em relação ao grupo não treinado ($0,7 \pm 0,1$; $0,6 \pm 0,04$ mM/mg de proteína).

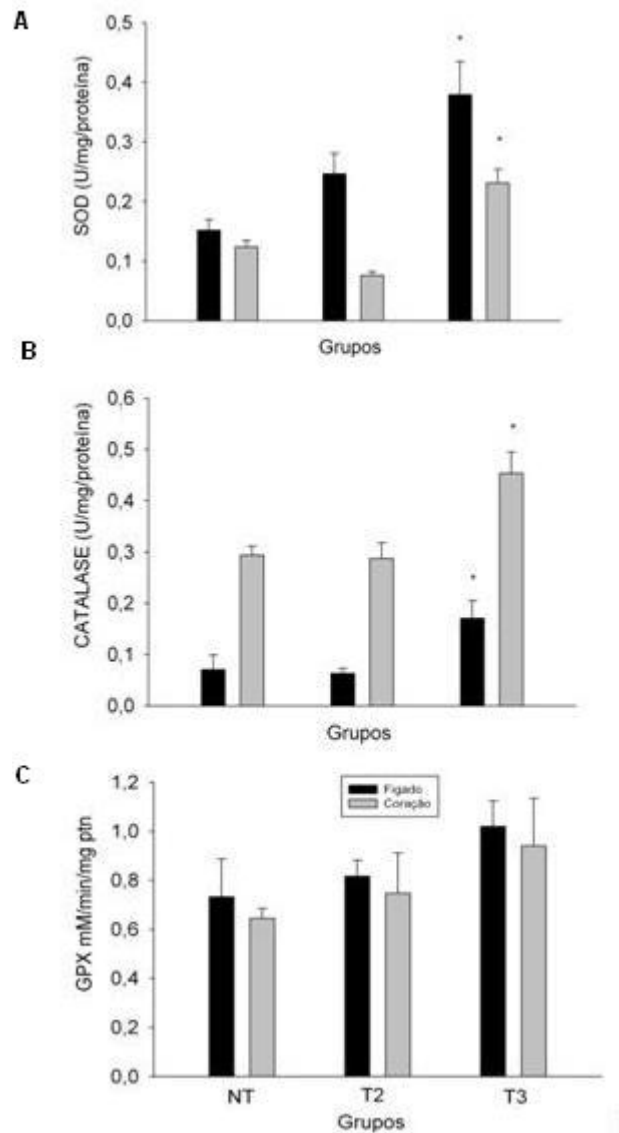


Figura 2: Atividades enzimáticas da superóxido dismutase (A), catalase (B) e glutatona peroxidase (C) no fígado e coração de camundongos após 48 horas da última sessão de treinamento. Os valores foram apresentados em Média \pm EPM, avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. As atividades da superóxido dismutase e da catalase foram expressas em U/mg de proteína e da glutatona peroxidase expressa em mM/min/mg de proteína. $p < 0,05$, * vs NT.

DISCUSSÃO

Estudos demonstraram que o exercício físico exaustivo aumenta a produção das EROs e, conseqüentemente provoca EO em diversos órgãos e tecidos^{6,7}. Entretanto, estudos demonstraram que o exercício crônico moderado produz adaptações metabólicas que podem ajudar a reduzir o EO em diversos órgãos, principalmente em populações especiais^{13,14}.

Sobre as adaptações fisiológicas decorrentes da prática de treinamento físico realizada com duas sessões semanais de exercício, Dalleck et al.²⁵ reportou melhoras nos parâmetros fisiológicos de treinamento (lactato e VO_2 max.). Entretanto ainda não se tem claro as respostas bioquímicas sobre os marcadores de estresse

oxidativo. O resultado do presente estudo demonstrou que duas sessões de exercício por semana não são suficientes para promover melhorias nos parâmetros de EO. É possível que um longo período de intervalo (>72horas) entre as sessões ultrapasse a fase de supercompensação inibindo o efeito adaptativo bioquímico do treinamento.

Sabe-se que a relação entre EO e exercício físico está diretamente relacionada à intensidade e duração do treinamento^{2,26}. Assim, o protocolo de treinamento deve ter intensidade e volume suficiente, a fim de criar uma resposta adaptativa ao organismo a cada sessão. Portanto, de acordo com nossos resultados, sugere-se que são necessárias no mínimo, três sessões semanais, durante oito semanas de exercício para reduzir danos oxidativos e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no fígado e no coração dos animais.

As ERO atacam lipídeos e proteínas celulares abstraindo seus elétrons, a fim de encontrar um estado químico estável¹. Os resultados do presente estudo demonstram ainda que animais submetidos no mínimo a três sessões semanais de treinamento, apresentam menores níveis de danos em lipídeos (TBARS) e proteínas (CP). Estes achados corroboram com os resultados de diversos estudos que encontraram redução nos parâmetros de estresse oxidativo com programa de treinamento similar (frequência semanal de três vezes)^{14,27}.

A diminuição dos danos oxidativos induzidos pelo treinamento físico pode ser explicada por pelo menos, três principais mecanismos. Primeiro, pelo aumento tanto da expressão¹² como da atividade⁹ de enzimas antioxidantes. Segundo, pela redução na produção de oxidantes¹³ e também por menor extravasamento de elétrons mitocondrial⁹. E terceiro, outro mecanismo que poderia explicar esse fenômeno é a exposição crônica do tecido às ERO, induzida pelo treinamento, tornando o órgão mais resistente aos efeitos derivados do mecanismo de estresse oxidativo¹⁰.

As EROs podem modificar aminoácidos por reações em cadeia por meio de agregados de proteínas suscetíveis a degradações proteolíticas. Durante esse processo, alguns aminoácidos são convertidos em derivados de carbonil¹. Está bem estabelecido na literatura que as proteínas oxidadas são menos degradadas por proteassomas. Essas proteases intracelulares são responsáveis por 70 a 80% da degradação após exposição oxidante, exercendo um papel essencial no sistema antioxidante²⁸. Um dos possíveis mecanismos para redução nos níveis de carbonilação de proteínas (CP), segundo Radák et al.¹¹ é que o treinamento físico aumenta a atividade de proteassomas como um processo adaptativo à oxidação de proteínas, acelerando o reparo das mesmas (*turnover* protéico).

Outro marcador importante da oxidação protéica é o conteúdo total de tióis (TT). O presente trabalho demonstrou aumento no conteúdo total de tióis somente no grupo T3. Esta técnica verifica a quantidade de sulfidrilas (SH) não oxidadas, que estão presentes nos aminoácidos²⁰. O grupo SH pode ser oxidado por radicais livres, comprometendo o funcionamento das proteínas. Uma possível explicação para esses resultados é o aumento das proteínas de estresse (HSP) induzidas pelo exercício²⁶. Essas proteínas têm a função de controlar a homeostase celular, protegendo contra a excessiva oxidação. Contudo, a dosagem das HSP foi uma limitação do presente estudo.

Em relação às atividades das enzimas antioxidantes os resultados apontaram aumento da SOD e CAT somente no grupo treinado com três sessões semanais. A SOD dismuta o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é subsequentemente catalisado pela CAT e convertido em água e oxigênio molecular.

Alguns estudos tem apontado que o treinamento físico não exerce efeito sobre as enzimas antioxidantes no fígado⁷ e no coração²⁹. Por outro lado, os resultados do presente estudo estão de acordo com outros estudos, demonstrando que o treinamento físico aumenta atividade da SOD no fígado^{5,6} e no coração¹⁵.

Após o treinamento físico, a atividade da SOD aumenta, provavelmente, como resposta ao estresse oxidativo induzido pelo exercício. Este achado pode ser explicado pelo fato do treinamento físico regular ativar fatores de transcrição como o NF- κ B, sendo este responsável por acionar uma variedade de genes, incluindo SOD mitocondrial³⁰.

O efeito do treinamento sobre a atividade e expressão da CAT é ainda inconsistente e controverso¹⁰. Contudo, o aumento da atividade dessa enzima foi observado no fígado⁵ e no coração de ratos treinados⁸. O treinamento físico ativa fatores de transcrição como a AMPK, que ativam CATmRNA estimulando sua síntese protéica e possivelmente aumentando a sua atividade^{1,8}. Ademais, a alta atividade da CAT pode ser atribuída à formação de H₂O₂ pela SOD. Segundo Halliwell e Gutteridge¹, a interação química do H₂O₂ no sítio ativo da catalase faz com que um dos átomos de hidrogênio seja transferido do primeiro oxigênio para o segundo ocasionando uma quebra heterolítica entre os átomos e formando água (molécula não deletéria). Isto por sua vez explica a diminuição do dano oxidativo nos tecidos.

Em contrapartida, a atividade da glutathiona peroxidase (GPX), não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais do presente estudo. A GPX e a CAT possuem funções similares no que se refere a decomposição do H₂O₂. No entanto, sob esse aspecto, a GPX é mais eficiente na presença de altas concentrações de EROs, enquanto que a CAT desempenha importante função em presença de baixas concentrações de H₂O₂³. Uma hipótese para os resultados supracitados é que o treinamento físico realizado três vezes por semana proporcionou um efeito adaptativo no balanço *redox* de antioxidantes, fazendo com que as baixas concentrações de H₂O₂ sofressem ação somente da CAT.

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstraram que o treinamento em esteira com frequência semanal de três vezes, porém não o de duas, reduz o dano oxidativo e aumenta a eficiência do sistema enzimático antioxidante no fígado e coração de camundongos.

ANEXO C – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Resolução

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 1153/95 (Lei Arouca), analisou o projeto abaixo.

Projeto: 27/2009

Pesquisador:

Ricardo Pinho

Título: "Efeitos adaptativos de diferentes intensidades do treinamento sobre parâmetros do metabolismo energético, muscular e estresse oxidativo".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com a Lei Federal 1153/95 – Lei Arouca. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores

Criciúma, 13 de abril de 2009.


Carina Rodrigues Boeck
Coordenadora do CEUA