

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A TREINAMENTO DE NATAÇÃO E OVERTRAINING**Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto^{1,2}Ivana Maria Passini Sodré Siviero²Renata Maria Padovani²**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi comparar níveis de estresse oxidativo em camundongos da linhagem Balb-C submetidos a duas condições distintas de treinamento: treinamento moderado e progressivo de natação (G-T) e indução de overtraining (G-OVER). Foram investigados alguns marcadores de estresse oxidativo, tais como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas (PC) e grupamentos sulfidrílica (GSH) no plasma e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) no hemolisado. Como marcadores de alteração celular, quantificaram-se concentrações plasmáticas das enzimas creatina quinase (CK), aspartato transferase (AST), creatinina (CRE) e uréia (UR). Como resultados importantes observamos que na situação G-OVER houve queda significativa de CAT e GR ($p < 0,001$) e CAT ($p < 0,05$) em relação a G-T, bem como aumentos significativos de TBARS, PC e CK ($p < 0,01$) e AST, CRE e UR ($p < 0,001$) em relação a G-T. Concluiu-se que a alteração do estado redox celular pode ser um importante objeto de estudo para detecção de overtraining.

Palavras-chave: Natação. Estresse oxidativo. Treinamento. Overtraining. Biomarcadores.

1-Instituto de Ensino Superior de Itapira-IESI, São Paulo, Brasil.

2-Instituição de Ensino São Francisco-IESF, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

Oxidative stress parameters in mice submitted to swimming training and overtraining

The aim of this study was to compare oxidative stress levels in mice (Balb-C) submitted to two different training conditions: moderate and progressive training (training group, T-G) and overtraining condition (G-OVER). We investigated some markers of oxidative stress, such as plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (PC) and sulfhydryl groups (GSH) and the antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) in hemolysate. As markers of cell damage was quantified plasma creatine kinase (CK) and aspartate transferase (AST) concentrations; were also observed patterns of physiological changes by quantifying plasma creatinine (CRE) and urea (UR). As the most important results, it was observed that in G-OVER a significant decrease of CAT and GR ($p < 0.001$) compared to G-T, as well as significant increases in TBARS, PC and CK ($p < 0.01$) and AST, CRE and UR ($p < 0.001$) compared to G-T. We concluded that changes in cellular redox state can be an important object of study for overtraining detection.

Key words: Swimming. Oxidative stress. Training. Overtraining. Biomarkers.

E-mails dos autores:

joaquim_netho@yahoo.com.br

Endereço do para correspondência:

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto.

Instituto de Ensino Superior de Itapira.

Avenida Rio Branco, 99, Centro, Itapira-SP.

CEP: 13970-070.

Telefone: (19) 3863-5510

INTRODUÇÃO

O monitoramento do treinamento de atletas possibilita a compreensão de respostas adaptativas, sobretudo quanto a parâmetros de estresse oxidativo.

Como tais estudos ainda carecem de muitas respostas, as pesquisas básicas, com utilização de animais, podem trazer informações relevantes.

As espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecidas como radicais livres, são formadas, principalmente, pela redução incompleta do oxigênio nos processos de geração de energia. O estresse oxidativo ocorre em circunstâncias nas quais há desequilíbrio entre os sistemas prooxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Schneider e Oliveira, 2004).

Dentro de uma estratégia de manutenção do estado redox contra condições oxidantes, o sangue exerce um papel fundamental, fazendo o transporte e redistribuição dos antioxidantes para todo o corpo; dessa maneira, a capacidade antioxidante no sangue pode nos dar estimativas dos níveis de estresse oxidativo, permitindo um modo de mensuração menos invasivo que por outras vias, como pela biopsia (Antunes Neto e colaboradores, 2006).

Para livrar o organismo dos efeitos deletérios das EROs, há sistemas antioxidantes divididos em duas classes: o sistema não enzimático, composto principalmente por β -caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e grupamentos sulfidríla (SH), e o sistema enzimático, com a catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR) e superóxido desmutase (SOD) como as principais enzimas (Powers e colaboradores, 1994; Yu, 2004).

Quando não há um sincronismo otimizado entre carga de esforço, tempo de recuperação ao exercício e uma metodologia adequada para o desenvolvimento do condicionamento atlético, pode ocorrer uma sobrecarga de determinado sistema biológico, ocasionando superatividades metabólica e

funcional e até mesmo desintegração dos sistemas de defesa do organismo.

Neste caso, estamos falando da síndrome do super treinamento ou overtraining (Kreher e Schartz, 2012; Kuipers, 1990; Smolka e colaboradores, 2000).

O overtraining, uma vez instalado, não é facilmente revertido, podendo levar várias semanas ou meses para ocorrer a recuperação (Kuipers e Keizer, 1988; Eichener, 1995).

Poucos são os trabalhos que buscam indicar marcadores confiáveis de instalação da fase inicial de overtraining e, até mesmo, em sugerir valores de referência para modulação das cargas de treinamento (Lazarim e colaboradores, 2009).

Por meio de estratégia de experimentação animal, nosso objetivo foi observar o padrão de modulação dos marcadores de defesa antioxidante e ataque oxidativo, bem como as variações na magnitude das alterações celulares (micro lesões celulares), em duas situações distintas do processo de treinamento (moderado progressivo e overtraining).

Com isso, visamos propiciar aprofundamento desta temática sobre determinação de indicadores satisfatórios de diagnóstico do quadro de overtraining.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Utilizou-se 60 camundongos do tipo "Balb-C", obtidos do Centro de Biotério da UNICAMP. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle (G-CO; n = 10), treinamento (G-T; n = 10), "overreaching" (G-Over; n = 10) (Tabela 1).

Durante toda a execução dos protocolos, os camundongos foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 18 - 22°C e fotoperíodo invertido de 12 horas, estando providos de ração de laboratório e água ad libitum.

Todos os procedimentos experimentais estavam de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética da UNICAMP (01/2008) e das recomendações do Canadian Council on Animal Care.

Tabela 1 - Características dos camundongos utilizados nos experimentos no momento do sacrifício.

	Peso (g)	Hemoglobina (mg/mL)
G-CO (n = 20)	28 ± 1,2	13,4 ± 0,3
G-T (n = 20)	27 ± 2,1	15,1 ± 0,6
G-OVER (n = 20)	23 ± 1,2*	11 ± 0,6*

Legenda: *p<0.05 em relação a G-CO.

Treinamento

Os camundongos passaram por um período de adaptação ao treinamento de natação, com duração de uma semana (15 minutos de sessão de treino). Após o período de natação, os camundongos passaram a nadar cinco vezes por semana (segunda a sexta-feira), por um período de quatro semanas, com o tempo de sessão de treinamento elevando-se de 20 minutos até 60 minutos.

Após esse período, um lote de camundongos foi sacrificado para análise desta fase sistematizada de treinamento (G-T). Os animais sobreviventes ao treinamento descrito foram submetidos a um novo ciclo de treinamento, o qual classificamos como fase de *overtraining* (G-OVER), consistindo de aumento progressivo semanal de uma sessão de treino, até chegar a quatro sessões de treino por dia, com duração de 60 minutos cada sessão.

Preparação da amostra

Após o animal ter sido anestesiado com hidrato de cloral (10%) por via intraperitoneal, realizou-se uma secção abdominal, de forma que se pôde alcançar a veia hepática e coletar todo o sangue possível, que era depositado em tubo heparinizado.

O animal, após a extração de sangue, era sacrificado por deslocamento cervical. Plasma e hemácias eram obtidos após centrifugação do sangue total por 10 min a 3.000rpm.

As amostras plasmáticas foram armazenadas para a realização das dosagens e determinações. As hemácias foram lavadas com solução gelada de tampão fosfato 0,1M com NaCl a 0,9%, pH 7,4, e centrifugadas a 3.000rpm, desprezando-se em seguida o sobrenadante.

O processo foi repetido três vezes. Aliquotas de 500µL foram retiradas e hemolisadas com água destilada na proporção 1:1 (v/v), com posterior armazenamento a -30°C para as análises.

Catalase

A preparação da amostra iniciava-se com a adição de 900µl de tampão fosfato, pH 7.4, a 100µl do hemolisado (1:1), obtendo-se, assim, uma diluição 1:20 da amostra inicial. Deste hemolisado, 1µl era adicionado ao meio básico de reação, que continha tampão fosfato 50mm, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10mM.

A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da enzima, provocando diminuição no valor da absorvância em 240nm. A diferença na leitura das absorvâncias a 240nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do H₂O₂, que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT (Aebi, 1984). A unidade final expressa-se em k/gHb/min.

Glutaciona Redutase

O ensaio foi conduzido de acordo com Smith e colaboradores (1988). A preparação da amostra dava-se da mesma forma para a análise de CAT. Deste hemolisado, 5 µL era adicionado a um meio de incubação contendo KH₂PO₄ 0,2 M e EDTA 2 mM, em pH 7,0. Adicionávamos, ainda, para a ocorrência da reação, 50µL de NADPH 2 mM, 250µL de DTNB 3 mM e 50µL de GSSG 20 mM. A formação de TNB foi acompanhada por espectrofotômetro (Beckman - modelo DU 640) a 412 nm de absorvância. A unidade final expressou-se em UI/gHb/min.

Dosagem de hemoglobina no hemolisado

A determinação da concentração de Hb no hemolisado torna-se fundamental para a obtenção dos valores finais de CAT. Os valores foram obtidos através do método de Drabkin (Beutler, 1975), em que a Hb (100 µL da amostra preparada a partir do hemolisado 1:20), em presença de reagente de Drabkin (2mL), forma um composto, a

cianometemoglobina, que é absorvida a 540nm e cujo coeficiente de extinção milimolar é 11,5 M⁻¹.cm⁻¹.

Grupamentos sulfidril totais no plasma

Os grupos sulfidril (SH) do plasma são estruturas associadas à proteína e, portanto, suscetíveis ao dano oxidativo. O método proposto por Faure e Lafond (1995) é baseado na redução do 5,5 ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), com leitura espectrofotométrica a 412 nm. A unidade final foi expressa em μ M.

Peroxidação lipídica

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (Yagi, 1987).

A amostra foi preparada de acordo com Yagi (1987), onde 20 μ L de plasma foram diluídos em 4 mL de H₂SO₄ (0,04M). Adicionamos a esta diluição 0,5 mL de ácido fosfotungstico 10% e aguardamos 5 minutos para a centrifugação a 3000 rpm por 10 min.

O sobrenadante foi descartado e suspendemos o precipitado em 2 mL de H₂SO₄ (0,04 mL), seguindo da adição de 0,3 mL de ácido fosfotungstico 10%. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, descartamos novamente o sobrenadante e dissolvemos o precipitado em 0,5 mL de H₂O deionizada. Adicionamos a essa mistura 1 mL da solução composta de ácido tiobarbitúrico 0,67% em ácido acético 50%. A amostra foi incubada em banho maria 90°C por 1 hora.

Após o resfriamento, foi efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com 5 mL de butanol. A medida da emissão da fluorescência da fase orgânica foi feita a 553 nm, enquanto que o comprimento da onda de excitação foi 515nm

(espectrofluorímetro modelo SPF-500CTM SLM Aminco - SLM Instruments, Inc). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva-padrão de tetraetoxipropano e os resultados expressos em nmol/mL de plasma.

Proteínas Carboniladas

Os alcenos insaturados, produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonal, podem reagir com os grupos sulfidril formando tioésteres, que possuem grupos carbonila. O método utilizado foi o proposto por Faure e Lafond (1995), onde o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) complexa-se com os grupos carbonila das proteínas, formando bases de Schiff que absorvem a 380 nm de comprimento de onda. As análises de proteínas carboniladas (PC) foram realizadas em amostras de plasma e os valores expressos em μ M.

Creatina Quinase

A concentração de CK no sangue reflete índices de lesão muscular. A dosagem deste parâmetro foi realizada espectrofotometricamente (Boehringer Mannheim MPR 3 kits CK NAC-activated), através de 50 μ L de plasma misturados com a solução reagente. A mistura foi incubada em banho maria por 1 minuto a 37° C, sendo feita a leitura das absorbâncias em 334 nm.

Creatinina e uréia

O teste de creatinina é feito para determinar o produto final do catabolismo muscular, enquanto que o de uréia permite estabelecer o produto final do metabolismo purínico. Para a realização dos dois marcadores, utilizaram-se o método cinético ou direto sem desproteinização (creatinina, *Laborlab*®, CAT N.0 01600, leitura a 510nm) e o método enzimático (ácido úrico, *Laborlab*®, CAT N.0 00100, leitura a 530nm) em amostras de plasma. Os valores foram calculados de acordo com as normas do fabricante, com unidade final expressa em mg/dL.

Análises estatísticas

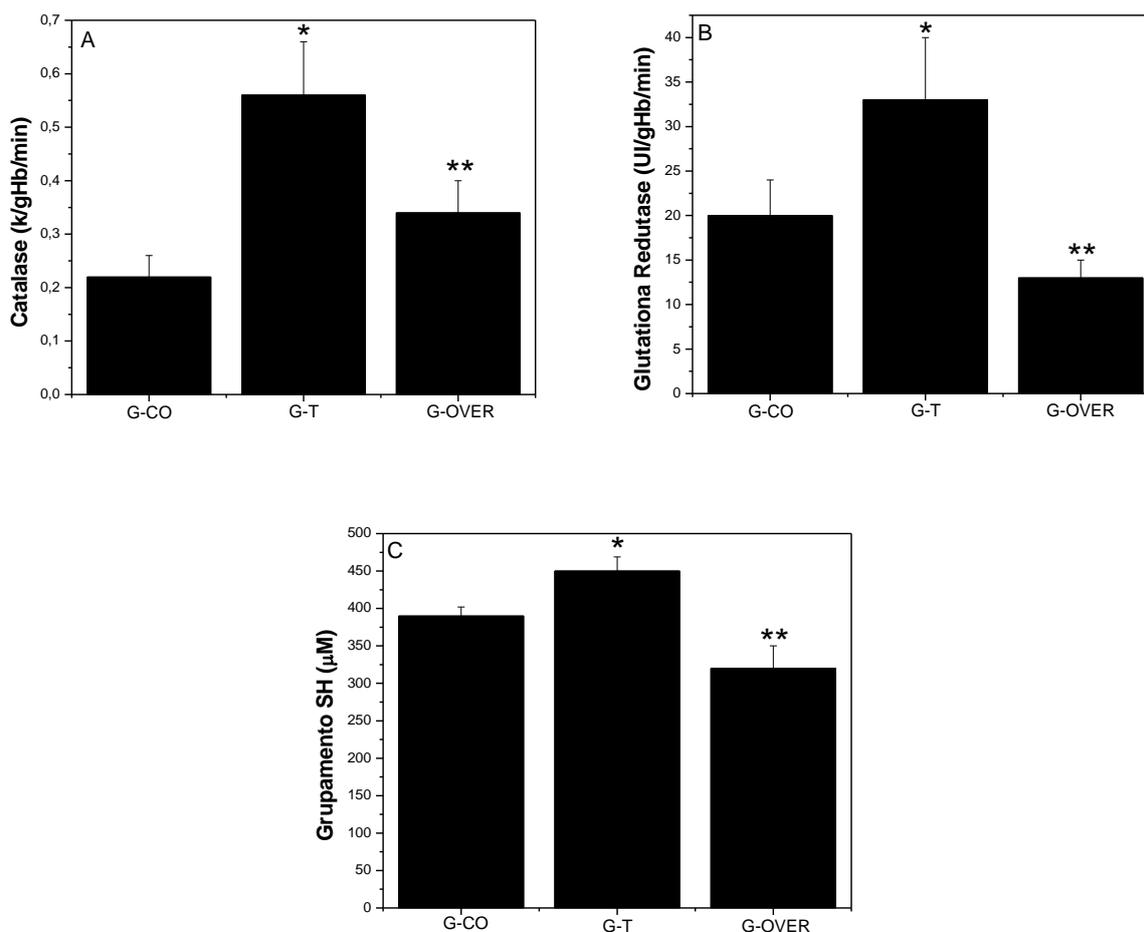
Os gráficos foram realizados pelo programa Origin 6.0 e o tratamento estatístico

por meio do programa GraphPad Instat® (San Diego, CA). Utilizamos o teste ANOVA para amostras pareadas e, como pós-teste, foi adotado o teste de Tukey. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. O teste de

correlação foi predito pelo coeficiente de correlação de Pearson.

RESULTADOS

Marcadores de Defesa Antioxidante



Legenda: A = * $p < 0.001$ em relação a G-CO, * $p < 0.01$ em relação a G-OVER, ** $p < 0.05$ em relação a G-CO; B = * $p < 0.001$ em relação a G-CO e G-OVER, ** $p < 0.01$ em relação a G-CO; C = * $p < 0.05$ em relação a G-CO, * $p < 0.001$ em relação a G-OVER, ** $p < 0.05$ em relação a G-CO.

Figura 1 - Atividade das enzimas catalase (A) e glutathione redutase (B) e concentração de grupamentos sulfidril totais (C) dos camundongos dos grupos controle (G-CO), treinamento (G-T) e overtraining (G-OVER).

A Figura 1A apresenta os valores obtidos para CAT: G-CO ($0,22 \pm 0,04$ k/gHb/min), G-T ($0,56 \pm 0,5$ k/gHb/min) e G-OVER ($0,34 \pm 0,06$ k/gHb/min).

Houve aumento significativo para G-T em relação a G-CO ($p < 0,001$) e G-OVER ($p < 0,01$) e para G-OVER ($p < 0,05$) em relação

a G-CO. A Figura 1B mostra os valores para GR: G-CO (20 ± 4 UI/gHb/min), G-T (33 ± 7 UI/gHb/min) e G-OVER (13 ± 2 UI/gHb/min).

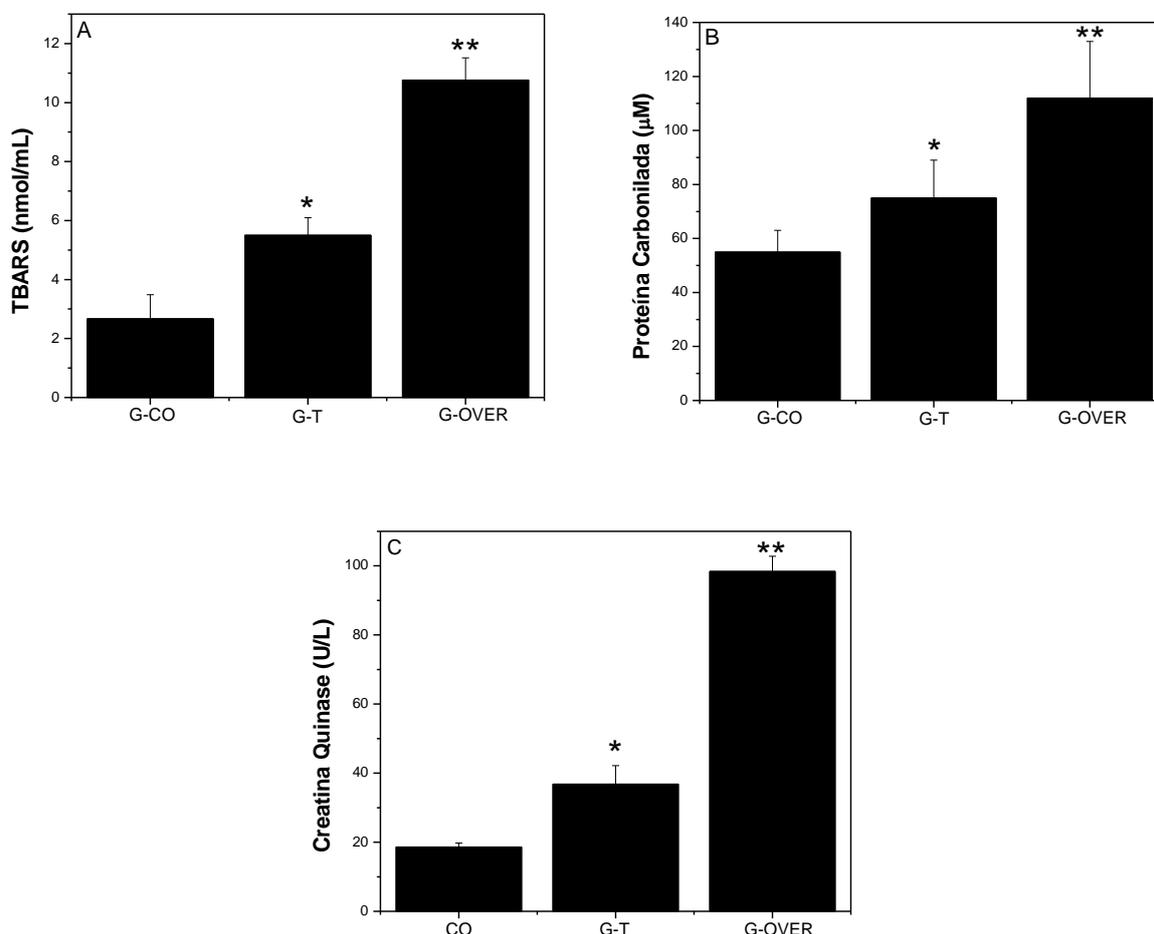
Houve aumento significativo para G-T ($p < 0,001$) em relação a G-CO e G-OVER e queda significativa para G-Over ($p < 0,01$) em relação a G-CO. A Figura 1C mostra os

valores para grupamentos SH: G-CO ($390 \pm 12 \mu\text{M}$), G-T ($450 \pm 19 \mu\text{M}$) e G-OVER ($320 \pm 30 \mu\text{M}$). Houve aumento significativo para G-T ($p < 0,05$) em relação a G-CO e G-OVER ($p < 0,001$) e queda significativa para G-OVER ($p < 0,05$) em relação ao G-CO.

A Figura 2A mostra os níveis de concentração de TBARS no plasma: G-CO ($2,66 \pm 0,81 \text{ U/L}$), G-T ($5,5 \pm 0,6 \text{ nmol/mL}$) e G-OVER ($10,76 \pm 0,75 \text{ nmol/mL}$). A Figura 2B apresenta os níveis de concentração de PC: G-CO ($55 \pm 8 \mu\text{M}$), G-T ($75 \pm 14 \mu\text{M}$) e G-OVER ($112 \pm 21 \mu\text{M}$). A Figura 2C apresenta

os níveis de concentração da enzima CK no plasma: G-CO ($18,7 \pm 0,75 \text{ U/L}$), G-T ($36,8 \pm 5,35 \text{ U/L}$) e G-OVER ($98,4 \pm 4,39 \text{ U/L}$). Houve aumento significativo para G-T ($p < 0,01$) em relação a G-CO e para G-OVER ($p < 0,001$) em relação a G-T e G-CO tanto para TBARS, PC e CK. O índice de correlação entre os parâmetros de CK e TBARS ($r = 0,974$) e CK e PC ($r = 0,952$) demonstra elevada condição de que a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e microlesões induzidas (níveis de CK) pelo treinamento de natação podem ser avaliadas de forma linear.

Marcadores de Ataque Oxidativo



Legenda: A, B e C = * $p < 0,01$ em relação a grupo CO, ** $p < 0,01$ em relação a G-T, $p < 0,001$ em relação a G-CO.

Figura 2 - Concentrações de TBARS (A), proteínas carboniladas (B) e creatina quinase (C) em plasma dos camundongos dos grupos controle (G-CO), treinamento (G-T) e overtraining (G-OVER).

Marcadores de Alterações Celulares

Tabela 2 - Níveis plasmáticos de aspartato transaminase (AST), creatinina (CRE) e uréia (UR) em animais submetidos a treinamento de natação e ciclo de overreaching. Onde = * $p < 0.01$ em relação ao grupo CO; ** $p < 0.001$ em relação aos grupos CO e G-T.

	CO	G-T	G-OVER
AST (U/L)	11,50 ± 1,67	12,75 ± 0,63	35,58 ± 1,27 **
Creatinina (mg/dL)	2,15 ± 0,35	3,59 ± 0,15	5,16 ± 1,04 *
Uréia (mg/dL)	9,4 ± 1,27	10,61 ± 0,63	29,34 ± 3,65 **

DISCUSSÃO

Medidas para predição da condição física do atleta sempre foram executadas de acordo com os princípios da modalidade, muitas vezes sem um rigor metodológico que propicie elaboração de dados confiáveis para dosagem e estabelecimento de intervalos de referências confiáveis para monitoração e modulação das cargas de treinamento (Lazarim e colaboradores, 2009; Antunes Neto, Pereira-da-Silva e Macedo, 2005; Lehmann e colaboradores, 1988).

O princípio da sistematização do treinamento desportivo depende de multifatores para a manutenção de um planejamento ótimo de sequências de cargas de exercícios, de forma que há a necessidade constante de buscar a reorganização destas para a garantia de obtenção das respostas adaptativas desejadas (Fry, 1988; Hoopper, Mackinnon e Howard, 1995).

Desta forma, a utilização de animais em pesquisas que envolvem incremento progressivo e drástico de exercícios, em consonância com as políticas de ética experimental, tende a colaborar para a obtenção de condições mais seguras de determinação de uma sobrecarga ideal (Antunes Neto e colaboradores, 2006).

O objetivo deste trabalho foi compreender como as alterações das variáveis “carga de esforço” e “tempo de recuperação” atuavam na modulação dos níveis de estresse oxidativo e, conseqüentemente, por meio de análise indireta sanguínea, no estado redox da célula muscular.

A Figura 1 apresenta um quadro interessante de interferências nos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Duas situações podem ser vistas considerando as análises de CAT (Figura 1A) e, em conjunto, o sistema GR/grupamento SH (Figura 1B e Figura 1C, respectivamente). Os

valores observados para G-T reforçam a premissa de que o treinamento sistematizado pode elevar a atividade antioxidante de sistemas enzimáticos e não-enzimáticos (Smolka e colaboradores, 2000; Selamoglu, 2000; Zoppi e colaboradores, 2006), uma vez que a produção de EROs ocorrerá em um limiar propício para o desencadeamento de eventos adaptativos moleculares.

No caso da CAT, uma enzima atuante na detoxificação de EROs, mais especificamente no controle dos níveis de H₂O₂ intracelular, viu-se manter sua atividade elevada em G-OVER, indicando que a produção de possíveis espécies radiculares continuava severa. Powers, Ji e Leeuwenburgh (1999) ainda descrevem que a atividade da CAT atinge sua velocidade máxima em altas concentrações de H₂O₂.

Três hipóteses podem ser lançadas quanto à resistência da CAT na condição estressora imposta em G-OVER: a) há uma evidência de que, em requerimento funcional agudo, níveis elevados do radical ânion superóxido (O₂⁻) induzam interações diretas com a própria estrutura protéica da CAT (regulação alostérica) (Tauler e colaboradores, 1999), mantendo sua atividade elevada; b) outra hipótese para o aumento da atividade da CAT estaria na redução de Fe³⁺ para Fe²⁺ presente no grupamento heme de sua molécula (Hawkins e colaboradores, 1992), o que a deixaria mais ativa quando reduzida; c) uma possibilidade seria o Km da CAT para os peróxidos, o que, assim, justificaria o seu valor elevado de atividade para G-OVER, período em que a produção de EROs estaria mais alta (vide os resultados de TBARS e PC) e a capacidade de detoxificação intracelular saturada (mas não diminuída) (Powers, Ji e Leeuwenburgh, 1999).

Tal potencial agressivo do estresse imposto para G-OVER confirma-se ao

analisarmos a diminuição funcional significativa do mecanismo integrado entre GR e grupamento SH. A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto por grupos SH e que atua como doador de elétrons nas reações catalisadas por outra enzima antioxidante, a glutatona peroxidase (GPx).

Quando GSH é oxidada pela reação da GPx, há a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, com formação de glutatona oxidada (GSSG).

Queda nos níveis de GSH podem prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica das EROs. As células íntegras mantêm uma razão GSH/GSSG alta. Para isso, a GSSG formada é reduzida novamente a GSH, às custas de NADPH, pela ação da GR (Powers, Ji e Leeuwenburgh, 1999; Ji e Mitchell, 1992).

A GR possui uma distribuição similar a GPx. Embora não seja considerada uma das enzimas principais do sistema enzimático antioxidante, ela é fundamental para a atuação normalizada da GPx (Ji e Mitchell, 1992).

Portanto, níveis diminuídos de GR e grupamentos SH refletem a severidade do quadro de overtraining induzido pelo nosso protocolo.

A Figura 2 contribui para a compreensão das possibilidades antioxidantes em combate aos eventos oxidativos instalados pela situação de overtraining. A queda significativa dos valores vistos no mecanismo GR/GSH para G-OVER propiciou simultaneamente a elevação dos parâmetros de ataque oxidativo. Tanto as concentrações plasmáticas de TBARS (Figura 2A) e PC (Figura 2C) mostraram a mesma tendência de aumento para G-T e G-OVER.

A literatura mostra evidências de que o estresse oxidativo induzido pelo exercício é fonte de relevante colaboração com os mecanismos lesivos nas células musculares, retículo sarcoplasmático, estruturas de membranas e, principalmente do DNA (Duarte, Carvalho e Bastos, 1994).

O aumento da concentração de cálcio no interior celular ativa classes de fosfolipases – sobretudo fosfolipase A2 – e de proteases, desencadeando eventos em cascata de degradação de demais estruturas celulares, até, por fim, em estado extremo, conduzir a instalação da apoptose (morte celular).

O extravazamento da enzima CK (Figura 2C) é um dos eventos mais

conhecidos nestas condições degenerativas (Byrd, 1992).

A correlação positiva entre aumento nas concentrações plasmáticas de TBARS e PC e liberação de CK permite ter um quadro propício para compreender que as alterações moleculares induzidas pelo estresse oxidativo afetam de forma drástica a permeabilidade da membrana celular.

A instalação de processos inflamatórios localizados na célula, em virtude das microlesões celulares, aumenta ainda mais a liberação de CK do músculo e induz que as células fagocitárias liberem fatores geradores de EROS, atacando, em uma fase praticamente simultânea, estruturas lipídicas e protéicas das membranas celulares (Janero, 1990; Tiidus, 1998). O aumento em permeabilidade resultante potencializa ainda mais o quadro de estresse oxidativo já deflagrado (Duarte, Carvalho e Bastos, 1994).

Como mostrado por Antunes Neto e colaboradores (2006), as respostas moleculares (índices de CK, PC e TBARS) precedem as respostas fisiológicas (sobretudo, CRE e UR) na instalação de um quadro de estresse oxidativo, podendo dar indícios do efeito do treinamento sobre o organismo. Os dados apresentados na Tabela 2 confirmam tal premissa, pois houve aumento significativo de AST, CRE e UR apenas para G-OVER.

O aumento nos níveis de CRE indica elevação da degradação das bases purínicas, do mesmo modo que a concentração de UR no plasma confirma uma condição de catabolismo protéico para o G-Over. O maior valor de UR pode advir de um provável ataque oxidativo sobre as proteínas estruturais e de uma deficiência do “turnover” protéico, uma vez que o processo de ressíntese dos aminoácidos é feito no fígado, e tal órgão poderia se encontrar em deficiência pelo fato da exaustão.

Esta condição poderia explicar os valores aumentados da AST, que é uma enzima com grande concentração neste órgão. Pelo fato das maiores precipitações de AST, CRE e UR terem ocorrido em condição de overreaching, reforça-se a idéia de que tais marcadores podem ser úteis para confirmação da instalação de um quadro lesivo mais grave.

CONCLUSÃO

Concluindo, as análises integradas de marcadores de defesa antioxidante e ataque oxidativo permitem a visualização ampla das alterações induzidas pelo aumento da formação de EROs em condição de estresse orgânico extremo, tal como a induzida pelo protocolo de overtraining.

A utilização dos marcadores apresentados delimita o potencial de estresse oxidativo e surge como uma estratégia para modulação de cargas de treinamento. O fato importante do estudo foi mostrar que os níveis de CK sofrem precipitação em consonância com as dosagens de TBARS e PC.

A CK localiza-se próxima ao sarcolema, de forma que qualquer alteração nas propriedades de membrana pode levar a uma extravasamento desta para meio extracelular.

A utilização da dosagem de CK plasmática, que se faz por estratégias mais facilitadoras em relação à TBARS e PC, surge como um instrumento de avaliação da carga de treinamento, necessitando estudos posteriores para delimitação de um índice ou limiar de estresse muscular.

Conflito de Interesses

Não há conflitos de interesses, por parte dos autores supracitados, quanto à publicação dos dados desta pesquisa na Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício.

REFERÊNCIAS

- 1-Aebi, H. Catalase. In: Packer, L. organizer. *Methods in enzymology*. Florida. Academic Press. 1984.
- 2-Antunes Neto, J. M. F.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. Vol. 13. Núm. 2. p.73-79. 2005.
- 3-Antunes Neto, J. M. F.; Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Boschero, A. C.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. Circulating leukocyte heat shock protein 70(hsp70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress*. Vol. 9. Núm. 2. p.107-115. 2006.
- 4-Beutler, E. *Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods*. 2nd ed. New York: Grune & Stratton Publishers, 1975.
- 5-Byrd, S. K. Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 24. Núm. 5. p.531-536. 1992
- 6-Duarte, J. A.; Carvalho, F.; Bastos, M. L. Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *European Journal of Applied Physiology*. Vol. 68. Núm. 1. p.48-53. 1994.
- 7-Eichener, E. R. Overtraining: consequences and prevention. *Journal of Sports and Science*. Vol. 13. p.S41-S48. 1995.
- 8-Faure, P.; Lafond, J. L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A. E. organizer. *Analysis of free radicals in biological systems*. Verlag, Boston: Verlag, 1995. p.237-248.
- 9-Fry, A. C. The role of training intensity in resistance exercise-overtraining and overreaching. In: Kreider, R. B, organizer. *Overtraining in sport*. Champaign. Human Kinetics. 1988. p.107-130.
- 10-Hawkins, P. T.; Poyner, D. R.; Jackson, T. R.; Letchner, A. J.; Lander, D. A.; Irvine, R. F. Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. *Biochemistry Journal*. Vol. 294. p.929-934. 1993.
- 11-Hoopper, S. L.; Mackinnon, L. T.; Howard, A. Markers for monitoring overtraining and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 27. Núm. 1. p.106-112. 1995.
- 12-Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative

tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 09. Núm. 6. p.515-540. 1990.

13-Ji, L. L.; Mitchell, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 73. p.1854-1858. 1992.

14-Kreher, J. B.; Scharz, J. B. Overtraining syndrome: a practical guide. *Sports Health*. Vol. 04, Núm. 2. p.128-138. 2012.

15-Kuipers, H. Training and overtraining: an introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 30. Núm. 7. p.1137-1139. 1990.

16-Kuipers, H.; Keizer, H. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. *Sports Medicine*. Vol. 06. Núm. 4. p.79-82. 1988.

17-Lazarim, F. L.; Antunes Neto, J. M. F.; Silva, F. C. O.; Nunes, L. A. S.; Bassani-Cameron, A.; Cameron, L. C.; Alves, A. A.; Brenzikofer, R.; Macedo, D. V. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *Journal of Science and Medicine in Sports*. Vol. 12. Núm. 1. p.85-90. 2009.

18-Lehmann, M.; Foster, C.; Dickhuth, H. H.; Gastmann, U. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 30. Núm. 7. p.1140-1148. 1988.

19-Powers, S. K.; Criswell, D.; Lawler, J.; Ji, L. L.; Martin, D.; Herb, R. A.; Dudley, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*. Vol. 266. p.R375-380. 1994.

20-Powers, S. K.; Ji, L. L.; Leeuwenburgh, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 31. Núm. 7. p.987-997. 1999.

21-Schneider, C. D.; Oliveira, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico.

Revista Brasileira de Medicina do Esporte. Vol. 10. Núm. 4. p.308-313. 2004.

22-Selamoglu, S.; Turgay, F.; Kayatekin, B. M.; Gonenc, S.; Yslengen, C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiologica Hungarica*. Vol. 87. p.267-273. 2000.

23-Smolka, M. B.; Zoppi, C. C.; Alves, A. A.; Silveira, L. R.; Marangoni, S.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology*. Vol. 279. p.R1539-R1545. 2000.

24-Smith, I. K.; Vierheller, T. L.; Thorne, C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*. Vol. 175. p.408-413. 1988.

25-Tauler, P.; Gimeno, I.; Aguiló, A.; Guix, M. P.; Pons, A. Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflügers Archiv*. Vol. 438. p.782-787. 1999.

26-Tiidus, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 76. Núm. 5. p.533-538. 1998.

27-Yagi, K. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*. Vol. 45. Núm. 24. p. 337-351, 1987.

28-Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. Vol. 74. p.139-162. 2004.

29-Zoppi, C. C.; Hohl, R.; Silva, F. C. O.; Lazarim, F. L.; Antunes Neto, J. M. F.; Stancanneli, M.; Macedo, D. V. Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. Vol. 3. Núm. 2. p.37-44. 2006.

Recebido para publicação 24/11/2015
Aceito em 17/04/2016