

**UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE MEDICINA**

**MESTRADO EM MEDICINA DESPORTIVA
DISSERTAÇÃO**

EXERCÍCIO FÍSICO E LESÃO OXIDATIVA

RELAÇÃO COM A CAPACIDADE AERÓBIA

(AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA)

Paulo Cunha e Silva

1992

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE MEDICINA

MESTRADO EM MEDICINA DESPORTIVA
DISSERTAÇÃO

EXERCÍCIO FÍSICO E LESÃO OXIDATIVA
RELAÇÃO COM A CAPACIDADE AERÓBIA
(AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA)

Paulo Cunha e Silva

1992

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Alexandre Quintanilha que me orientou. Orientar é mostrar o Oriente, o sentido do percurso, e fazer luz sobre aquilo que parecia muito escuro.

Ao Prof. Dr. Nuno Grande que me ensinou e me mostrou como se ensina.

Ao Prof. Dr. Moradas Ferreira que desde sempre me abriu as portas da sua casa científica, o seu laboratório, onde balbuciei os primeiros "experimentos".

Ao Prof. Dr. Jorge Bento e ao Prof. Dr. António Marques pela consciência que têm que não há escola sem cultura. Ao Prof. Dr. José Soares pela consciência que tem que não há escola sem investigação. Aos três como representantes de uma Faculdade e um Gabinete onde me sinto bem e orgulho de pertencer.

Ao Prof. Dr. Falcão de Freitas e ao Prof. Dr. Ovídio Costa, respectivamente, como ex-Director e actual Director do Centro de Medicina Desportiva do Porto onde decorreu parte da investigação aqui apresentada.

Ao Prof. Dr. Sieuve Monteiro e à Dr. Alda de Sousa pela preciosa ajuda na procura de um sentido matemático para os resultados encontrados, mas com a convicção de que aqui a Biologia era rainha e a Matemática sua serva.

Ao Dr. Joaquim Armando que me ajudou a encontrar um suporte físico apresentável para os resultados e para as ideias.

A todos os alunos e atletas que por mim generosamente correram até à exaustão.

E por último, mas seguramente não em último, à Maria Strecht: pela solidariedade, pela inteligência, pela perspicácia, pela consciência da ciência, pela saudável ironia, pelo bom senso... enunciar toda a tua ajuda seria escrever uma outra tese, e como tenho de me limitar às escassas páginas regulamentares... Obrigado.

ÍNDICE:

1) RESUMO	4
2) INTRODUÇÃO	
2.1) O Problema do Oxigénio	5
2.2) O Desporto e o Oxigénio	6
2.3) O Eritrócito como Modelo Celular	8
2.4) A Peroxidação Lipídica	10
3) MATERIAL E MÉTODOS	
3.1) Caracterização da População	13
3.2) Exercício Experimental e Colheita de Sangue	14
3.3) Isolamento dos Eritrócitos (população total)	15
3.4) Isolamento dos Eritrócitos (fracções de densidade)	15
3.5) Avaliação da Peroxidação Lipídica	16
3.6) Análise Estatística	17
4) RESULTADOS	18
5) DISCUSSÃO	
5.1) As Vantagens da Fluorescência	23
5.2) Uma Relação entre o Consumo de Oxigénio e a Lesão Oxidativa (Papel do Treino)	24
5.3) Exercício Físico e Envelhecimento Eritrocitário	27
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1) RESUMO:

É sabido que o exercício físico, realizado em condições aeróbias, constitui um "stress oxidativo", na medida em que impõe aumentos do consumo de oxigénio até 1000% do valor de repouso, em humanos, levando a uma hiperprodução de radicais livres de oxigénio (RLO). A membrana do eritrócito é um alvo importante da agressão peroxidativa, provocada pelo ataque de radicais livres de oxigénio aos seus ácidos gordos poliinsaturados, e nesta medida pode fornecer uma boa visibilidade sobre a relação entre o consumo de oxigénio e a extensão da lesão oxidativa.

No nosso trabalho, a 10 indivíduos do sexo masculino com diferentes capacidades aeróbias, diferentes consumos máximos de oxigénio (VO_2 max), foram colhidas duas amostras de sangue, antes e imediatamente depois de um exercício progressivo até à exaustão realizado em cicloergómetro. Os eritrócitos foram isolados e separados num gradiente descontínuo de densidades. A lipoperoxidação da sua membrana foi avaliada, na população total e nas fracções de densidade, através da medição da fluorescência relativa no extracto lipídico.

Os resultados demonstraram um aumento da fluorescência de 15%, na média dos 10 indivíduos ($p < 0.01$), após o exercício e nas amostras correspondentes ao sangue total. Demonstraram ainda a existência de uma correlação exponencial altamente significativa ($p < 0.001$; $R^2 = 0.773$) entre a quantidade total de oxigénio consumida durante o exercício (VO_2T) e a percentagem do aumento dos níveis de lipoperoxidação. É de assinalar que este aumento acontece em flecha a partir de valores de VO_2T só atingidos por indivíduos muito bem treinados sob o ponto de vista aeróbio, como se este treino fornecesse condições fisiológicas para atingir níveis de consumo que escapam ao controlo antioxidante. Relativamente às fracções eritrocitárias (em que foi, por outros, demonstrada uma relação directa entre densidade e idade), só foram encontradas diferenças significativas entre os valores de peroxidação naquelas que correspondiam aos indivíduos pior treinados e colhidas antes do exercício. Para estes, depois do exercício, e para os melhor treinados antes e depois do exercício, deixou de se verificar um aumento significativo dos níveis de peroxidação como se o exercício e o treino alterassem a relação entre densidade e idade.

2) INTRODUÇÃO:

2.1) O PROBLEMA DO OXIGÉNIO

Com o aparecimento, na escala evolutiva, da respiração celular aeróbia, isto é, com a possibilidade da redução completa do oxigénio a água, revelaram-se as potencialidades energéticas dos compostos de carbono que os processos de fermentação (de respiração anaeróbia) tinham camuflado até aí. A biosfera ganhou uma grande mobilidade e os primitivos seres vivos adquiriram uma plasticidade que permitiu o aparecimento de seres multicelulares.

No entanto, o aproveitamento biológico do oxigénio depende da sua capacidade em assumir estados excitados através de uma alteração na configuração electrónica (1). É o conceito de "activação do oxigénio". De acordo com Michäelis cada oxidação ou redução só pode acontecer em degraus de oxidação ou redução univalente resultando os radicais livres (2). Os radicais livres de oxigénio formam-se através de um processo em que o dioxigénio sofre sucessivas reduções, ou seja, ganha electrões, um de cada vez, dando origem a fragmentos moleculares com um electrão desemparelhado na última orbital atómica (3,4). As orbitais atómicas são preenchidas, de acordo com o Princípio da Exclusão de Pauli, por dois electrões de números quânticos de *spin* opostos, antiparalelos, (+1/2, -1/2). O incompleto preenchimento da orbital de maior energia empresta ao radical uma grande reactividade, daí a sua toxicidade (5,6).

Embora só em 1954 Rebecca Gershman e Daniel L. Gilbert (7) tenham proposto que muitos dos efeitos lesivos do oxigénio pudessem ser atribuídos aos radicais livres, já desde a sua descoberta por Priestley (1775) e Scheele (1777) que se vinha acumulando evidência de natureza empírica acerca da sua toxicidade, reforçada a partir do momento em que se reconheceu ao oxigénio hiperbárico, ou em concentrações elevadas, utilidade terapêutica. O que passou a ser inquietante foi a constatação de que o oxigénio que consumimos naturalmente a 21% é, também ele, tóxico. E com a descoberta de uma metaloenzima, a superóxido dismutase (SOD), por McCord e Fridovich (8) em 1969, que removia um dos radicais, o superóxido, a importância deste tema não mais deixou de entusiasmar a Ciência Biomédica. Esta descoberta tem como consequência um duplo reconhecimento: o de que os radicais existem e se formam em condições biológicas e que por outro lado existe um sistema defensivo que os neutraliza (1). A evolução biológica passaria a ser entendida como o conjunto de soluções possíveis entre estas duas balizas. Importa neste momento dizer que além de terem consequências patológicas os radicais livres de oxigénio têm também

importância fisiológica e são usados como protagonistas de muitos processos biológicos, é o caso das reacções de destoxificação promovidas pelo sistema do citocromo P450, da fagocitose e da síntese de prostaglandinas (9,10).

Pode, então, questionar-se o facto de o oxigénio ter sido escolhido pela Natureza como o oxidante terminal da cadeia respiratória. Não haveria alternativas menos tóxicas? Não existiria uma fonte energética disponível com as mesmas virtudes mas sem as contrapartidas negativas deste? A esta pergunta respondeu cabalmente Gilbert em 1964. Para ser uma boa fonte terá que ser abundante; o oxigénio é o terceiro elemento mais abundante no Universo só sendo ultrapassado pelo hélio, que é quimicamente não reactivo e por isso não serve e pelo hidrogénio. A fonte deverá ser facilmente acessível; a menos que a temperatura seja inferior a -183 C , o oxigénio é um gaz. Outras substâncias com pontos de ebulição semelhantes são o hidrogénio, o nitrogénio, o monóxido de carbono, o metano. Por outro lado, a fonte de energia, para além de ter um alto potencial de oxidação, deve reagir de uma forma relativamente lenta. Há outros compostos que têm potenciais superiores como o fluor, o ozono, o oxigénio atómico, mas só o dióxido reage de uma forma suficientemente lenta para que as perdas de energia sejam mínimas. Por tudo isto o oxigénio é a fonte de energia, em termos biológicos, melhor qualificada do Universo (11).

2.2) O DESPORTO E O OXIGÉNIO

O consumo de oxigénio revelou-se, então, uma necessidade incontornável para todos os seres vivos com algum projecto evolutivo mais ambicioso que a unicelularidade. O praticante desportivo, como eucariota multicelular, é um consumidor de oxigénio e tem sobre os consumidores sedentários um suplemento de consumo que acarretará os seus custos. Durante um exercício de características aeróbias o consumo de oxigénio pode atingir um valor 10 vezes superior ao valor de repouso. Como afirma Jenkins, nunca na história da humanidade houve um envolvimento de tanta gente com doses tão elevadas de consumo de oxigénio durante uma porção tão grande das suas vidas (12). Daí que o recorrer-se ao exercício (em humanos) para melhor se tentar compreender a lesão oxidativa (em humanos), nosso propósito, não tenha só interesse metodológico, mas também porque estamos quase, ousaríamos dizer, perante um problema de saúde pública dada a quantidade crescente de pessoas praticando exercício físico. Ou seja, o exercício é um bom modelo para avaliar as consequências do consumo exagerado de oxigénio, mas é também uma situação que importa caracterizar sob o ponto de vista da extensão da lesão oxidativa.

O aumento do consumo de oxigénio imposto pelo exercício aeróbio deve-se ao

aumento do metabolismo celular, mas tem como consequência alguma perda da eficácia do controle respiratório mitocondrial com aumento do fluxo de prótons através da membrana interna (13). O acoplamento da fosforilação oxidativa deixa de se fazer de forma tão íntima, havendo um *déficit* de produção de ATP para a quantidade de oxigénio consumida ou, doutra forma, um excesso de consumo de oxigénio para a quantidade de ATP formada (14), podendo a energia assim desperdiçada dissipar-se sob a forma de calor e os produtos intermediários da redução do oxigénio, sobretudo o superóxido (O_2^-), formados em excesso, difundir para o citosol (12). Aqui poderiam encontrar quantidades suficientes de metais de transição, ferro e cobre, capazes de iniciarem a reacção de Haber-Weiss e catalisarem a produção do altamente reactivo hidroxilo ($HO\cdot$) (5,15,16). Ora estes produtos, radicais livres de oxigénio (RLO), que em situação de metabolismo basal seriam rapidamente neutralizados pelas defesas antioxidantes, numa situação de produção excessiva, podem ultrapassar os níveis de defesa originando uma descompensação do equilíbrio oxirreductor da célula conhecida pelo nome de "stress oxidativo". Que o exercício físico é um "stress oxidativo" parece já não restarem dúvidas. Acumula-se evidência experimental que denuncia um aumento directo da concentração de RLO (13) medido através do recurso à ressonância paramagnética electrónica (RPE) (17-20), ou um aumento indirecto medido através de produtos indicadores de agressão celular promovida pelos RLO como é o caso dos produtos de peroxidação lipídica (13,21-23), ou ainda através do gasto de substâncias tidas como antioxidantes, caso do glutatião reduzido (GSH) (24,25).

Sabendo que o exercício físico de características aeróbias é um indutor de "stress oxidativo" pelo aumento do consumo de oxigénio, será importante verificar de que forma o treino de resistência poderá modelar a resposta a essa situação. O treino de resistência, desenvolvendo a capacidade aeróbia, desenvolve a possibilidade de se realizarem trabalhos que exijam maior consumo de oxigénio. Em resposta a incrementos da quantidade de trabalho, tanto indivíduos treinados como não treinados aumentam o seu consumo de oxigénio. E a maior habilidade que os indivíduos treinados mostram para suportar uma carga elevada é devida ao facto de apresentarem um maior consumo máximo de oxigénio (maior VO_2 max) (14). O treino funciona, então, de uma forma perversa na medida em que, permitindo um maior VO_2 max, agravaria o fenómeno da produção de RLO.

Simplemente, o aspecto imediatamente visível do treino que é a melhoria das prestações, tem um suporte bioquímico que se manifesta, também, ao nível das defesas antioxidantes celulares. Ou seja, a capacidade da célula se defender da lesão oxidativa é passível de ser "treinada". Como os indicadores da lesão radical estão relacionados com a

intensidade do exercício medida em termos da percentagem do VO_2 max (22) é fácil admitir que a indivíduos bem treinados corresponda, para o mesmo exercício, um menor índice de lesão que a indivíduos mal treinados pois, para os primeiros, o mesmo exercício equivale a uma menor percentagem do seu VO_2 max. Na medida em que conseguem consumir mais oxigénio, os indivíduos com melhor capacidade aeróbia, têm que estar melhor apetrechados em termos de defesas antioxidantes. Isto foi constatado, em ratos, para as defesas enzimáticas ao nível muscular — superóxido dismutase e catalase (26,27), glutathione peroxidase e redutase (26) — e em humanos para a superóxido dismutase e catalase musculares (28). No eritrócito foi também demonstrado um aumento, com o treino, da actividade e concentração da catalase e da concentração da glutathione redutase em humanos (29) que se ajusta com a exibição de menores níveis de hemólise verificados em ratos treinados (26). Ao nível dos antioxidantes não enzimáticos, nomeadamente do glutatião, o treino reduz significativamente a depleção dos níveis de glutatião reduzido (GSH) que se verifica com o exercício físico (24), o que concorre para substantivar a ideia de que o treino de resistência protege do “stress oxidativo” através de um apuramento das defesas antioxidantes.

2.3) O ERITRÓCITO COMO MODELO CELULAR

Grande parte da atenção que recai sobre os efeitos da lesão oxidativa toma a célula muscular como modelo, como terreno excelente de investigação, sobretudo quando essa lesão é associada ao exercício físico. A célula muscular é, e com razão, uma célula mítica para o fisiologista do exercício, é a célula do exercício. Mas uma outra célula, de colheita muito mais fácil em humanos, não pode ser descurada, até pelas relações históricas (em termos de História Natural, bem entendido) que tem com o oxigénio. Estamos a falar, obviamente, do eritrócito. E se pretendermos construir um triângulo que tenha por vértices o exercício, o oxigénio e o envelhecimento, teremos que contar, necessariamente, com esta célula.

A relação do exercício físico com a alteração de parâmetros hematológicos (30,31), hemorreológicos (32,33) e, particularmente, dos índices globulares, nomeadamente o volume globular médio (34), apontam para o facto de o eritrócito se apresentar como um barómetro, um indicador sensível, das alterações fisiológicas sentidas pela sua vizinhança, o plasma, que por sua vez reflecte o que se passa em territórios mais distanciados.

Por outro lado, embora seja o músculo o executor do trabalho físico e, portanto, o principal consumidor de oxigénio, é o eritrócito quem o transporta. Além disso, sabendo que em condições fisiológicas 3% da oxihemoglobina sofre, diariamente, um processo de

autoxidação com formação de anião superóxido e metahemoglobina (35-37) é fácil vislumbrar a fonte de radicais no interior desta célula (38). Portanto, embora não tenha mitocôndria, não tenha cadeia transportadora de electrões, sobrevivendo com um metabolismo do tipo glicolítico, o eritrócito pode ser usado para estudar os efeitos da convivência celular com os radicais livres de oxigénio. Numa célula com esta simplicidade estrutural e funcional, é fácil planificar o quadro da lesão oxidativa. Os alvos preferidos dos radicais livres de oxigénio são, aqui, os ácidos gordos poliinsaturados da membrana celular e os grupos tiólicos (-SH) das proteínas (39-41). E os principais agentes antioxidantes são a SOD Cu/Zn — que neutraliza o anião O_2^- e depende do cobre e do zinco —, a glutatião peroxidase Se — que actua sobre o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e tem o selénio como cofactor —, a catalase — que actua também sobre o H_2O_2 em condições de sobrecarga oxidativa —, o glutatião reduzido (GSH) e finalmente a vitamina E — que se manifesta sobre os radicais peroxilo formados em zonas de grande concentração de ácidos gordos poliinsaturados como é o caso da membrana celular (42,43).

Numa célula sem núcleo e sem outros organelos, a membrana, no seu todo lipoproteico, apresenta-se como o território privilegiado da agressão radical (44,45), manifestando-o quer através de alterações na sua fluidez (46,47), quer através do comprometimento dos sistemas de transporte (48,49). A hemólise aparece como o último patamar da lesão oxidativa (50) sofrida pela membrana eritrocitária e só acontece quando o material peroxidado, resultante de agressão radical aos ácidos gordos poliinsaturados, atinge um nível crítico (51).

Ainda o facto de o eritrócito ser uma célula desnuclearizada, sem material genético, e conseqüentemente sem síntese proteica, faz com que o contingente enzimático do seu sistema antioxidante não seja repostado, se vá gastando, vá envelhecendo. Ou seja, o eritrócito nasce com uma bateria antioxidante particularmente vigilante, mas como nos seus 120 dias de vida não é substituída, vai perdendo eficácia no combate à agressão radical, instalando-se progressivamente uma situação de "stress oxidativo", assumindo que o estímulo oxidativo se mantém. É por isso que esta célula se apresenta, também, como o modelo celular de eleição para o estudo do envelhecimento celular na perspectiva da agressão radical (52-56). Após a separação dos eritrócitos por idades (57) foi possível constatar uma relação inversa com a actividade enzimática global (58) e com as enzimas mais directamente envolvidas na defesa antioxidante, como é o caso do sistema do glutatião, ao mesmo tempo que se verificava um aumento do glutatião oxidado (GSSG) e metahemoglobina (59), indicando um aumento do "stress oxidativo" com a idade celular. A diminuição

da actividade de enzimas antioxidantes eritrocitárias, não aconteceu só quando foram avaliadas fracções mais velhas de indivíduos (neste caso ratos) do mesmo grupo de idades, mas também quando fracções de indivíduos mais velhos o foram com fracções homólogas de indivíduos mais novos (60), como se o envelhecimento celular mimetizasse o envelhecimento do indivíduo.

Mas de que forma intervem o exercício físico na definição de um "stress oxidativo" e consequente precipitação do envelhecimento eritrocitário?

No exercício, um ritmo acelerado de desoxigenação e reoxigenação da hemoglobina proporciona uma oportunidade para a intensificação da produção de metahemoglobina e anião superóxido (61), podendo a bateria antioxidante do eritrócito ser insuficiente para o neutralizar cabalmente, nestas circunstâncias, ou reparar os seus estragos. Concorrendo para esta situação, a descida do pH plasmático, por aumento do lactato, e o aumento da temperatura, provocam um desvio da curva de dissociação da hemoglobina para a direita com diminuição da afinidade desta para o oxigénio (14) e aumento da possibilidade de formação de metahemoglobina e superóxido (37). Pelo que vimos, a extensão da agressão radical será função do estado das defesas, daí que, após o exercício, a diminuição da filterabilidade (por aumento da rigidez) afecte sobretudo os eritrócitos mais velhos, pois são aqueles cuja resistência metabólica ao "stress" está mais comprometida (62).

2.4) A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica é um processo complexo através do qual ácidos gordos poliinsaturados, reagindo com RLO, sofrem a subtracção de um átomo de hidrogénio, originando lipoperóxidos que podem, por sua vez, funcionar como radicais e iniciar uma reacção de propagação em cadeia (6,63,64). O local de maior concentração de ácidos gordos poliinsaturados são as membranas celulares, às quais conferem grande fluidez e flexibilidade, mas tornando-as, em contrapartida, alvo preferencial da agressão oxidativa (65).

Além de funcionarem como indicadores da lesão radical os lipoperóxidos tem vindo a ser implicados como causa directa de um número crescente de doenças, nomeadamente doenças do envelhecimento, (66) assumindo simultaneamente o estatuto de causa e consequência, de indicador e iniciador. A evidência de que um "estado de stress oxidativo" (OSS - *oxidative stress status*) está associado, senão a uma situação de doença, pelo menos a uma situação de risco (67,68) tem introduzido a discussão acerca da importância do doseamento rotineiro e não invasivo de indicadores deste estado, com clara vantagem para os produtos da peroxidação lipídica dado o facto, somando ao já dissemos, de serem

facilmente doseáveis no plasma ou sangue, na urina, no ar expirado o que reforça a sua acessibilidade (69).

Uma das primeiras investigações que associa exercício com peroxidação lipídica deve-se a Dillard e col. (21) que encontraram níveis elevados de pentano — juntamente com o etano é um dos dois alcanos produzidos na peroxidação sendo, pela sua volatilidade, doseável no ar expirado (70,71) — em humanos após um exercício a 50% do seu VO₂ max. Vimos também que a presença de produtos de peroxidação acompanhava o aumento do sinal radical (medido através de RPE) em ratos após exercício (13). Depois disso tem havido numerosa investigação nesta área mas os resultados permanecem algo controversos. Viinka não encontrou diferenças na concentração plasmática de produtos de reacção com o ácido tiobarbitúrico — o mais divulgado e doseado é o MDA (malondialdeído) e é também um produto da peroxidação lipídica (72) — em corredores antes e depois de 30min de um exercício fatigante e também quando comparados com sujeitos controle (72). Mas Lovlin e col. podem ter contribuído para clarificar esse aspecto quando demonstraram que um exercício submáximo inibia a peroxidação lipídica e um exercício máximo resultava num aumento de 26% do MDA plasmático (22). Relativamente ao treino verificou-se que ratos treinados, quando comparados com ratos controle, apresentam menor índice de lesão peroxidativa após um exercício até à exaustão, situação tanto verificável na fibras musculares do tipo 1 (de metabolismo oxidativo) como do tipo 2 (de metabolismo glicolítico) (12).

O eritrócito continua a ser um modelo de eleição para o estudo da peroxidação lipídica. As três condições que a favorecem — quantidade elevada de ácidos gordos poliinsaturados no contingente lipídico, altas concentrações de oxigénio molecular e a presença de metais de transição que podem funcionar como catalisadores — combinam-se aqui como em nenhuma outra célula (6). Contudo, apesar da sua membrana ser particularmente rica em ácidos gordos poliinsaturados está protegida por um sistema antioxidante muito eficaz, redundante até, como vimos (42,43). Daí que só um estímulo oxidativo muito forte ou um sistema antioxidante muito fragilizado teriam capacidade de induzir lipoperoxidação nos glóbulos rubros. Entender-se o exercício físico como um estímulo oxidativo forte pode ser uma generalização ligeira se esse mesmo exercício não for correctamente caracterizado sob o ponto de vista do consumo do oxigénio. Por outro lado a peroxidação lipídica eritrocitária agrava-se com o envelhecimento celular e acompanha o declínio da bateria antioxidante (60). O que impõe a necessidade da separação dos eritrócitos em gradientes de densidade para se ter uma maior visibilidade sobre as populações mais sensíveis à agressão oxidativa.

Por tudo isto a membrana eritrocitária afirma-se como um bom modelo para o estudo da lesão oxidativa associada ao exercício físico, o que é reforçado pela constatação de que, mesmo antes do aparecimento de quaisquer índices de peroxidação no plasma, se verifica um aumento da sua susceptibilidade à peroxidação lipídica (74). De que forma o exercício mimetiza ou acelera o envelhecimento? Tentar compreender o que se passa durante um "stress oxidativo" e de que forma níveis diferentes de capacidade oxidativa (disponibilidade para consumir oxigénio) condicionam a resposta a este "stress", passa, muito vantajosamente, pela caracterização da peroxidação da membrana eritrocitária e da sua correlação com o estado de treino aeróbio.

3) MATERIAL E MÉTODOS:

3.1) CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Cinquenta indivíduos do sexo masculino, de idade compreendida entre os 19 e os 24 anos, recrutados voluntariamente entre os alunos dos três primeiros anos dos cursos de Bioquímica e de Educação Física da Universidade do Porto, constituíram a amostra de partida para este estudo. Todos eles foram previamente informados do protocolo experimental a que seriam submetidos e de todas as eventuais consequências que poderiam decorrer. Foi-lhes feita um exame médico sumário e dirigido no sentido de despistar antecedentes ou patologia impeditiva. Indivíduos com história clínica ou outra evidência de problema médico que pudesse limitar um exercício máximo seriam excluídos deste estudo. No fim desta avaliação inicial todos se revelaram aptos o que não constituiu surpresa pois o grande contingente de voluntários (90%) eram praticantes desportivos regulares sendo, portanto, uma população autosseleccionada e submetida a exames médicos com regularidade.

No sentido de avaliar a capacidade aeróbia através da determinação do consumo máximo de oxigénio (VO_2 max) foi-lhes aplicado um protocolo de exercício em cicloergómetro que consiste em incrementos de carga de 20 W cada minuto partindo de uma carga inicial de também 20 W mantendo uma frequência pedalar de 60 rpm (rotações por minuto), tomando o critério de desistência na exaustão como ponto de finalização do exercício. Estando certos de que os resultados obtidos dependem, num grau de quantificação difícil, senão de todo impossível, da motivação do indivíduo este é, no entanto, um dos protocolos que parece receber um apoio mais consensual pelas suas características relacionadas com o incremento progressivo da carga e de duração do próprio exercício. Apesar disso, e de acordo com Martin e col. (32) foram tomados como critérios objectivos de esforço máximo: o alcance de um *plateau* na frequência cardíaca e no consumo de oxigénio e um quociente respiratório (R) maior que 1.

Embora exista alguma controvérsia relativamente à utilização do cicloergómetro *versus* tapete rolante para a determinação do VO_2 max, ora reportando a inexistência de diferenças entre os resultados obtidos (75) ora notando um aumento médio de 8% no valor dos resultados quando utilizado o tapete rolante (76,77), o certo é que a mesma controvérsia se torna irrelevante quando o nosso interesse na determinação dos VO_2 max é relativo (comparativo) e não absoluto e todos os indivíduos são sujeitos ao mesmo protocolo. Contudo, para assegurar que o mais alto consumo de oxigénio seja obtido em cada

protocolo, a inclinação deverá ser de 3 graus ou mais, no caso do tapete rolante, ou a frequência pedalar entre 60 e 70 rpm, no caso do cicloergómetro (76).

O consumo de oxigénio, juntamente com outros parâmetros respiratórios e calorimétricos, foi determinado através do recurso a um "2900 Energy Expenditure System" (SensorMedics Corp., Anaheim, USA). Durante o exercício cada indivíduo foi monitorizado sob o ponto de vista electrocardiográfico, através de cinco derivações precordiais, tendo-se preservado o registo da sua frequência cardíaca para, juntamente com os parâmetros supracitados, se avaliar do estado de esforço máximo.

Destes cinquenta indivíduos foram seleccionados dez no sentido de obter um grupo com grande diversidade de VO_2 max. As suas características físicas (idade, peso, altura), VO_2 max, consumo total de oxigénio durante a prova (VO_2 T), tempo de prova (TP) e capacidade máxima de trabalho na prova (WcP), estão registados na tabela 1.

Tabela 1
Características físicas e índices de capacidade

Indivíduo	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (cm)	VO_2 max (ml/min/kg)	VO_2 T (ml/kg)	TP (min)	WcP (W)
1	19	75	179	65.49	577.01	16	340
2	21	83	185	48.77	492.89	17	360
3	19	64	175	63.13	597.86	17	360
4	21	63	173	67.39	644.93	17	360
5	21	82	193	33.36	227.90	11	240
6	24	77	180	56.22	436.00	15	320
7	19	70	174	49.55	322.64	12	260
8	23	59	170	55.99	394.70	12	260
9	21	61	173	54.29	386.63	12	260
10	21	65	180	51.90	399.64	13	280
Média	21	70	178	54.61	448.03	14	304
SEM*	0.5	2.8	2.2	3.12	41.25	0.8	15.4

Legenda: VO_2 max: consumo máximo de oxigénio; VO_2 T: quantidade total de oxigénio consumida durante a corrida; TP: tempo de prova; WcP: capacidade máxima de trabalho na prova. *SEM: Erro-Padrão.

3.2) EXERCÍCIO EXPERIMENTAL E COLHEITA DE SANGUE

Estes dez indivíduos realizaram um exercício máximo de características idênticas ao usado na determinação do VO_2 max, com níveis de prestação semelhantes aos conseguidos anteriormente (mesmo TP e WcP), tendo-lhes sido colhida uma amostra de 10 ml de sangue

venoso por punção antebraquial imediatamente antes e imediatamente depois do mesmo exercício. As colheitas foram feitas na posição supina (em cima do cicloergómetro) para minimizar efeitos posturais sobre o volume sanguíneo e o sangue correspondente foi imediatamente colocado em tubos contendo EDTA potássico.

3.3) ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS (POPULAÇÃO TOTAL)

Depois de breve agitação, com o recurso a um agitador mecânico, cada uma das amostras foi filtrada através de uma suspensão de alfa-celulose anidra e celulose microcristalina anidra (Sigmacell type, Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) que remove leucócitos e plaquetas do sangue total (78). Os eritrócitos obtidos após filtração foram lavados três vezes (2500xg, 5 min) numa solução de NaCl 0.155M e finalmente ressuspensos a um hematócrito de 30% na mesma solução.

3.4) ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS (FRACÇÕES DE DENSIDADE)

1 ml da população eritrocitária total foi guardado a 4 °C e o restante foi separado num gradiente descontínuo de densidades de arabinogalactano ("Larex-LO", Larex International Corp., Tacoma, WA, USA) em quatro fracções. Os gradientes descontínuos produzem bandas celulares distintas separadas por interfaces bem marcadas tornando mais fácil o isolamento de cada fracção quando comparados com os gradientes contínuos. Além disso os gradientes de arabinogalactano oferecem um compromisso aceitável entre a fidelidade dos gradientes de albumina e a simplicidade dos obtidos a partir de preparados macromoleculares (79). O objectivo da separação dos eritrócitos em gradientes de densidade é, mais do que separar densidades, separar idades, partindo da evidência de que existe uma correlação íntima entre estas duas variáveis (57). Se ultimamente tem havido alguma controvérsia e até relutância em aceitar esta correlação tal parece dever-se à proliferação de resultados que, obtidos em condições não isopícnicas, a contrariam. Daí que seja fundamental uma correcta definição e observação das condições de centrifugação em equilíbrio isopícnico (79). No presente trabalho prepararam-se três soluções com as seguintes densidades 1.100, 1.105, 1.110 e uma quarta de 1.200. 2.5 ml de cada uma foram colocados, por ordem decrescente de densidade e com cuidado para prevenir a ruptura das interfaces, num tubo de ultracentrífuga. (O objectivo da utilização da camada mais densa (1.200) é impedir a agregação dos eritrócitos contra o fundo do tubo). 2.5 ml de suspensão de eritrócitos com hematócrito a 30% foram colocados no topo do tubo. O gradiente foi centrifugado a 4 °C numa ultracentrífuga *IEC-M60*, a 20000 rpm durante 30 min, equipada

com um rotor SW-40. Quatro fracções eritrocitárias foram recolhidas, com uma pipeta Pasteur, em cada uma das amostras, correspondendo a mais leve às células situadas acima da camada de *Larex* de densidade 1.100 e a mais pesada às células colocadas imediatamente acima da camada de densidade 1.200. Cada fracção eritrocitária foi lavada três vezes, como já descrito para a população total, com o objectivo de remover o *Larex*. A concentração globular de cada uma das fracções, bem como da amostra previamente guardada e correspondente ao sangue total, foi determinada através de um contador Coulter electrónico.

3.5) AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica da membrana eritrocitária foi avaliada pelo método de Rose e Oklander (80) modificado por Jain (81). A fluorescência foi usada como indicador de peroxidação e medida nos extractos lipídicos das células vermelhas obtidos depois do tratamento com isopropanol-clorofórmio 3:2 (v:v).

Técnica: 0.4 ml de uma suspensão de eritrócitos de concentração globular determinada previamente e correspondendo a cada uma das fracções obtidas para cada indivíduo antes e depois do exercício foram colocados num tubo de ensaio de vidro. (Num estudo por nós efectuado previamente chegamos à conclusão que, para a técnica que estamos a descrever, a concentração globular não deverá ser inferior a 2.0×10^6 células/mm³ caso contrário a percentagem de fluorescência fornecida pelo espectrofluorómetro apresenta, surpreendentemente, um valor distorcido relativamente à quantidade de material peroxidado deixando de ser linear a relação entre estas duas grandezas). Adicionaram-se 3 ml de isopropanol a cada um dos tubos que foram agitados imediatamente. Logo de seguida adicionaram-se 2 ml de clorofórmio e fez-se nova agitação, como no caso da anterior, através de um vortex. Depois de 30 min de repouso à temperatura ambiente os tubos são agitados e centrifugados a 2000 rpm durante 15 min numa centrífuga refrigerada. Com o objectivo de eliminar partículas em suspensão que possam interferir com a leitura da fluorescência o sobrenadante de cada tubo foi cuidadosamente depositado noutra tubo que foi por sua vez submetido a nova centrifugação de 2000 rpm durante 5 min, também em centrífuga refrigerada. A fluorescência foi lida num Espectrofluorómetro Jasco (modelo FP-770) com um comprimento de onda de excitação de 400 nm e um comprimento de onda de emissão de 455 nm. Estes comprimentos de onda são característicos dos produtos resultantes das ligações entre os grupos aldeídicos do malonaldeído (MDA) e os os grupos amino da fosfatidilserina e fosfatidiletalolamina (81) e correspondem, também, ao valor mais alto do

espectro de fluorescência quando os eritrócitos são tratados com MDA exógeno (82) o que corrobora a especificidade e a vantagem deste método de avaliação da peroxidação lipídica quando comparado com outros métodos. Outros produtos fluorescentes decorrentes da peroxidação lipídica membranar podem também formar-se (83) mas com picos de leitura correspondentes a comprimentos de onda diferentes daqueles por nós utilizados. Os valores relativos de fluorescência apresentados correspondem aos que decorrem da leitura dos resultados com uma fenda de 10 nm e uma sensibilidade de 10% para o espectrofluorômetro Jasco nas condições experimentais acima descritas.

3.6) ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita, quando se compararam os efeitos do exercício na mesma população (não treinados ou treinados), através do teste *t* de Student para variáveis emparelhadas; e quando se compararam populações diferentes (não treinados e treinados) através do teste *t* de Student para variáveis desemparelhadas. Para a correlação entre variáveis (VO_2 max, VO_2 T e WcP) com a variação da fluorescência (ΔFT) recorreu-se a métodos de regressão simples.

4) RESULTADOS:

Os parâmetros antropométricos correspondentes aos dez indivíduos seleccionados foram já apresentados no capítulo MÉTODOS (Tab. 1).

A percentagem de fluorescência verificada em cada fracção de densidade eritrocitária e no sangue total foi dividida pela concentração globular que a respectiva amostra apresentava no momento em que lhe foi adicionado isopropanol-clorofórmio com o objectivo de corrigir diferenças causadas por diferente quantidade de material celular. Os resultados serão expressos em unidades arbitrárias (correspondendo estas à % fluorescência/ 1.0×10^6 células/ mm^3) e apresentados como a média \pm erro-padrão de 10 amostras eritrocitárias como consta da tabela 2. Os resultados obtidos foram para as quatro fracções de densidade

Tabela 2

% de fluorescência por concentração globular nas 4 fracções de densidade e no sangue total.

	Fracções de densidade				Sangue total
	1	2	3	4	
B.E.*	0.458 \pm 0.067	0.481 \pm 0.101	0.477 \pm 0.068	0.542 \pm 0.097	0.434 \pm 0.053
A.E.*	0.478 \pm 0.057	0.436 \pm 0.055	0.491 \pm 0.080	0.690 \pm 0.124	0.496 \pm 0.059

Nota: *: B.E. antes do exercício; A.E. após o exercício. Números nas fracções de densidade (1,2,3,4) significam densidade crescente. Os resultados são a média \pm o erro-padrão de 10 amostras eritrocitárias. As diferenças entre cada uma das fracções não são significativas quer quando comparadas horizontalmente isto é, diferentes fracções na mesma circunstância (B.E. ou A.E.), quer verticalmente, isto é, fracções homólogas (1 ou 2 ou 3 ou 4) antes e depois do exercício. Já as diferenças de fluorescência antes para o sangue total A.E. e D.E. são estatisticamente muito significativas ($p < 0.01$).

crescente e antes do exercício respectivamente: 0.458 \pm 0.067, 0.481 \pm 0.101, 0.477 \pm 0.068, 0.542 \pm 0.097; depois do exercício as mesmas fracções de densidade eritrocitária apresentavam os seguintes valores: 0.478 \pm 0.057, 0.436 \pm 0.055, 0.491 \pm 0.080, 0.690 \pm 0.124. Embora a olho nú (em termos estatísticos) pareça haver um aumento da percentagem de fluorescência com o aumento da densidade, quer antes quer após o exercício, e também um aumento da percentagem de fluorescência quando comparamos fracções homólogas (da mesma densidade) antes e após o exercício (excepto para a segunda fracção), tais diferenças, contudo, não são estatisticamente significativas quando as avaliamos através do teste *t* de Student. Como sugere a figura 1 tal ausência de significado estatístico pode dever-

se à grande dispersão dos resultados encontrados

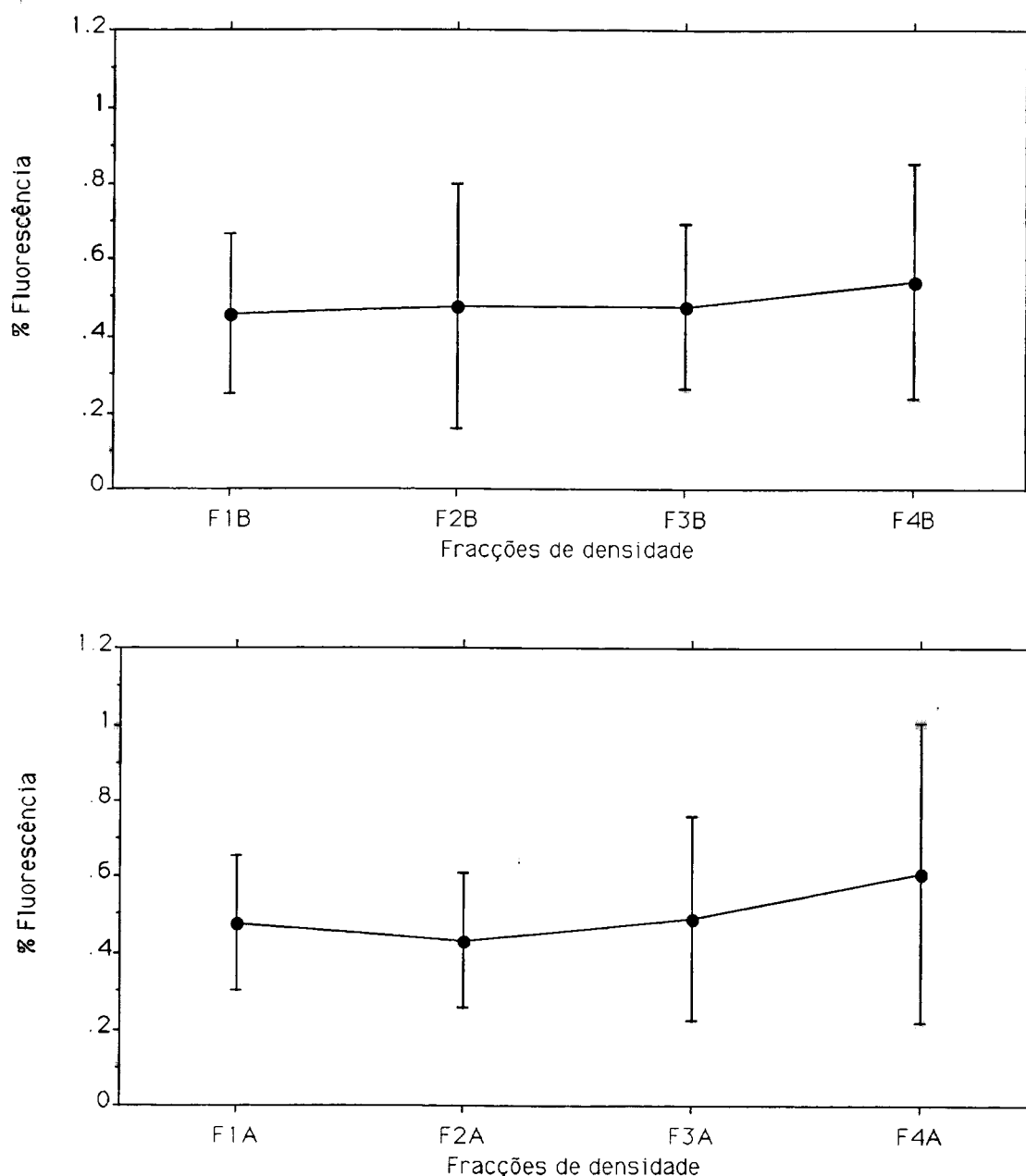


Figura 1. Percentagem de fluorescência por fração eritrocitária de densidade crescente (F1, F2, F3, F4). No gráfico de cima estão representadas as frações correspondentes à colheita anterior ao exercício físico e no de baixo as correspondentes à colheita posterior. Os traços verticais correspondem aos desvios-padrão. As diferenças não são estatisticamente significativas.

Relativamente à diferença de fluorescência encontrada antes e após o exercício físico para os eritrócitos correspondentes ao sangue total, respectivamente 0.434 ± 0.053 e 0.496 ± 0.059 (aumento de 14%) ela é já estatisticamente muito significativa ($p < 0.01$) e os valores apresentam um menor grau de dispersão do que no caso das frações de densidade como se pode verificar na figura 2.

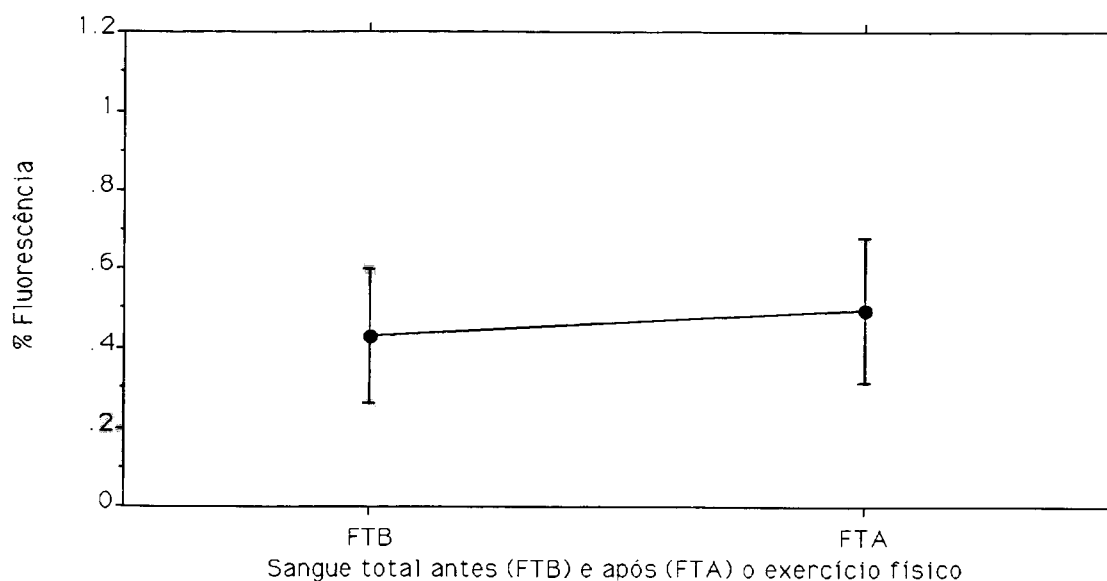


Figura 2. Percentagem de fluorescência nas amostra eritrocitárias de sangue total antes (FTB) e após (FTA) o exercício físico. Os traços verticais correspondem ao desvio-padrão. As diferenças entre o primeiro grupo de amostras (antes do exercício) e o segundo (depois do exercício) são estatisticamente muito significativas ($p < 0.01$)

Na tentativa de estabelecermos uma correlação entre este aumento significativo da fluorescência nos eritrócitos correspondentes ao sangue total após o exercício físico e algum dos parâmetros indicativos do estado de treino, avaliamos a variação da fluorescência para cada indivíduo com a capacidade máxima de trabalho (WcP) (Fig. 3), com o consumo máximo de oxigênio ($VO_2 \text{ max}$) (Fig. 4) e com o consumo total de oxigênio ($VO_2 \text{ T}$) (Fig. 5) ocorridos na respectiva prova.

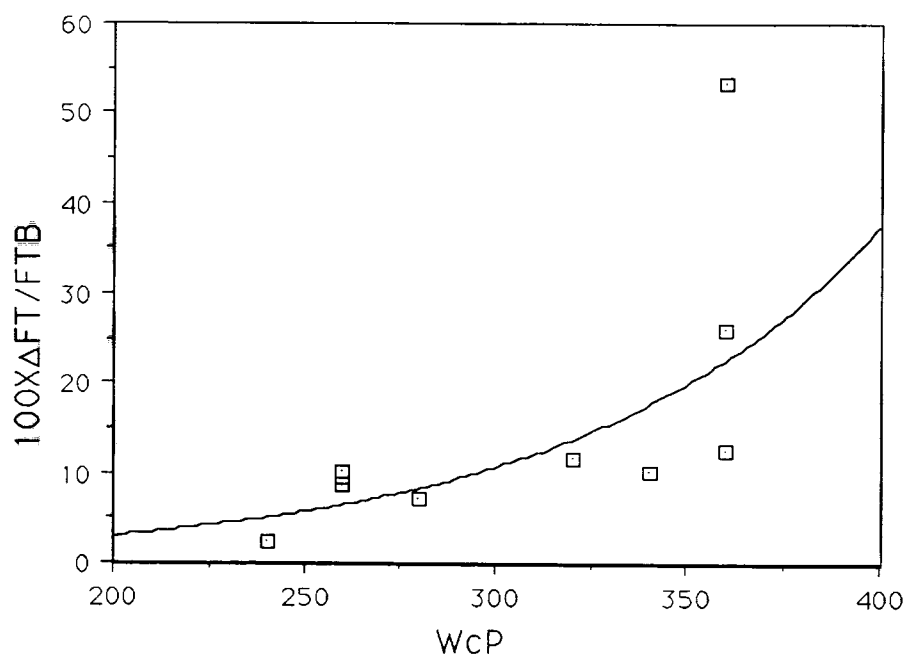


Figura 3. Correlação entre a capacidade máxima de trabalho (WcP) (watts) durante o exercício físico e o aumento relativo da fluorescência eritrocitária após o mesmo exercício ($\Delta FT/FTB$). Cada ponto representa um indivíduo diferente. $R=0.761$; $R^2=0.579$; $p < 0.05$.

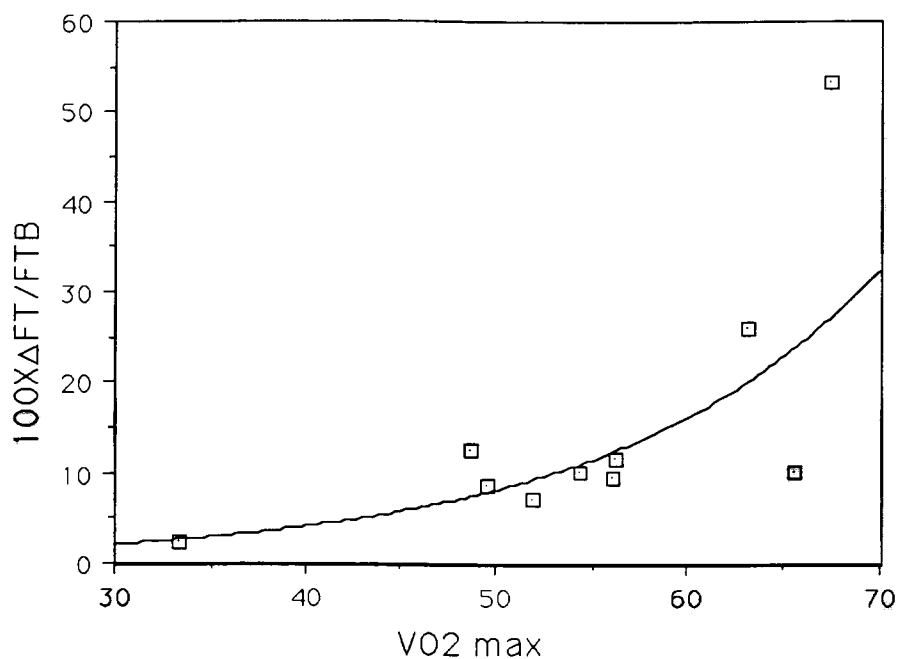


Figura 4. Correlação entre o consumo máximo de oxigênio (VO_2 max) (ml/kg/min) atingido durante o exercício físico e o aumento relativo da fluorescência eritrocitária após o mesmo exercício ($\Delta FT/FTB$). Cada ponto representa um indivíduo diferente. $R=0.845$; $R^2=0.713$; $p<0.01$.

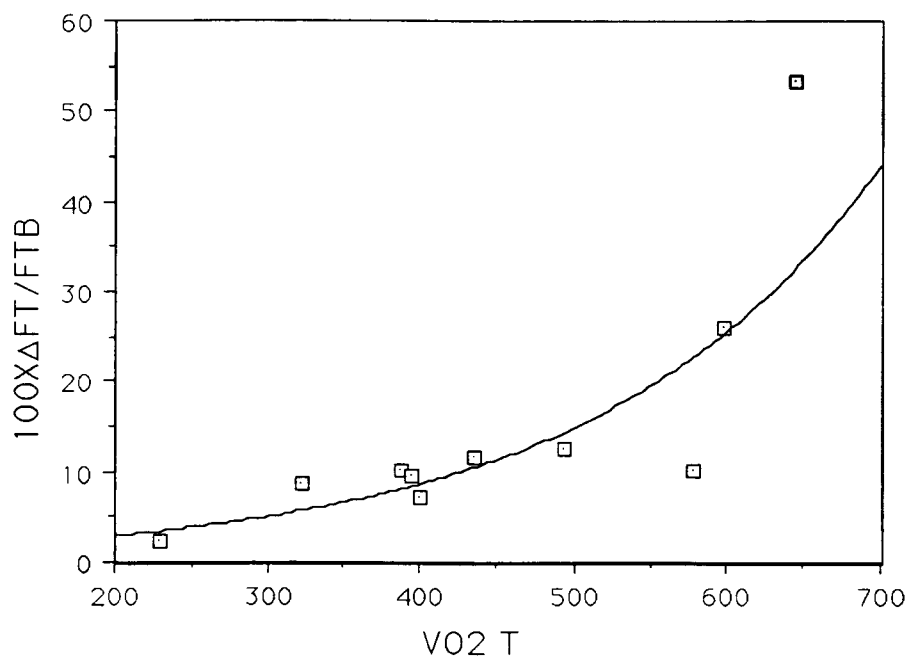


Figura 5. Correlação entre o consumo total de oxigênio (VO_2 T) (ml/kg) ocorrido durante o exercício físico e o aumento relativo da fluorescência eritrocitária ($\Delta FT/FTB$) após o mesmo exercício. Cada ponto representa um indivíduo diferente. $R=0.879$; $R^2=0.773$; $p<0.001$.

O consumo total de oxigênio foi calculado somando os consumos parcelares de oxigênio fornecidos pelo oxímetro. Estes três valores para cada indivíduo constam da tabela 1. A percentagem da variação da fluorescência foi calculada dividindo a diferença

entre a fluorescência após e antes o exercício (ΔFT) pela fluorescência antes do exercício (FTB) ($\Delta FT/FTB$). As melhores correlações encontradas são do tipo exponencial, e por uma questão de leitura gráfica multiplicamos o valores em ordenada por 100.

As correlações encontradas apresentaram, como consta das legendas das respectivas figuras, um coeficiente R^2 de 0.579 para a WcP, 0.713 para o $VO_2 \text{ max}$ e 0.773 para o $VO_2 T$, a que corresponde respectivamente um $p < 0.05$, um $p < 0.01$ e um $p < 0.001$. Por outra palavras a correlação entre a variação da fluorescência é estatisticamente significativa com a WcP, muito significativa com o $VO_2 \text{ max}$ e é altamente significativa com o $VO_2 T$. Confrontados com a diferença de significado estatístico entre a correlação do $VO_2 T$ e do $VO_2 \text{ max}$ com a variação da fluorescência fomos verificar a correlação entre os dois primeiros indicadores e verificamos que, apesar de ser alta ($R^2=0.79$; $p < 0.001$), não é total (Figura 6).

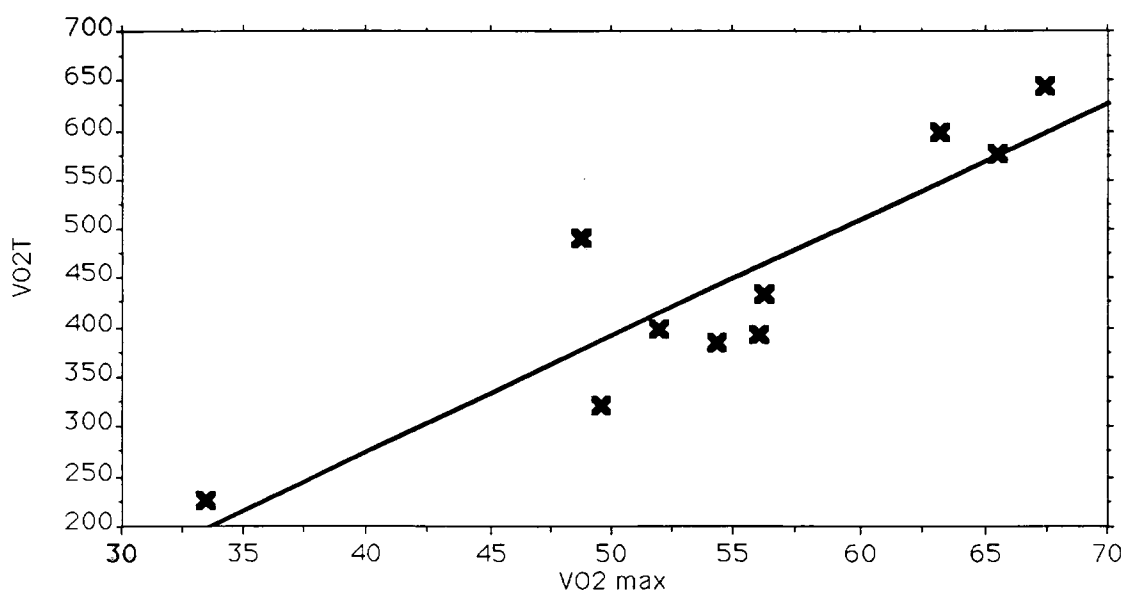


Figura 6. Correlação entre o consumo máximo de oxigênio ($VO_2 \text{ max}$) (ml/kg/min) durante o exercício físico e o consumo total de oxigênio ($VO_2 T$) (ml/kg) ocorrido no mesmo exercício. Cada ponto representa um indivíduo diferente. $R=0.889$; $R^2=0.790$; $p < 0.001$.

Ou seja estes dois parâmetros não podem ser usados indistintamente pois têm significados diversos. E isso é particularmente vivo quando na figura encontramos para valores muito próximos de consumo máximo de oxigênio valores substancialmente diferentes de consumo total.

5) DISCUSSÃO:

5.1) AS VANTAGENS DA FLUORESCÊNCIA

Os nossos resultados confirmam, através do recurso à técnica de fluorescência (ver MÉTODOS), resultados já obtidos com métodos diferentes(13,21,22), isto é, o exercício físico induz um "stress oxidativo" que leva à peroxidação lipídica das membranas biológicas. Mas este método tem sobre os outros as vantagens da especificidade e da facilidade.

Quanto à determinação do pentano no ar expirado (13), embora este seja, juntamente com o etano, um hidrocarboneto volátil originável da peroxidação dos ácidos gordos poliinsaturados das membranas celulares, tem sobre o etano a desvantagem de ser metabolizado no fígado dificultando assim a avaliação do verdadeiro significado da sua concentração (70). O doseamento dos alcanos (etano e pentano) tem a vantagem de ser não invasivo, não requerendo a extracção de tecidos nem o uso de marcadores internos (como é o caso dos marcadores de spin para o RPE) e, na medida em que a avaliação da sua concentração é imediata, eliminam a possibilidade da peroxidação que se mede ser, em grande parte, consequência da manipulação laboratorial das amostras de tecido recolhido. Mas, em contrapartida, o facto de serem produtos laterais e formados em muito pequenas quantidades impede o estabelecimento de uma relação quantitativa directa com os níveis de peroxidação, por um lado, e a existência de um limiar de prova em muitas situações, por outro lado (71). Além disso a exequibilidade deste método em humanos está comprometida pelas dimensões que a câmara de recolha de gases deveria ter.

Quanto ao chamado "teste do TBA" (13,22), ele é sem dúvida o método mais divulgado e usado para determinação da peroxidação lipídica e pressupõe uma reacção de adição nucleofílica entre o MDA (malondialdeído — um produto final da peroxidação lipídica) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) gerando um complexo corado, o 1:2 MDA-TBA que tem um máximo de absorvância a 532 nm (72). Acontece que este teste é intrinsecamente não específico para o MDA. A lista de moléculas não lipídicas que reagem com o TBA originando complexos com a absorvância máxima no mesmo comprimento de onda do MDA-TBA, vai desde os pigmentos biliares, aos aminoácidos, passando pelos alcoóis, os açucars, etc. Daí que só forneça um janela estreita sobre o entendimento do processo complexo que é a peroxidação e nunca poderá ser visto como um sinal diagnóstico da ocorrência e da extensão da agressão oxidativa associada a este processo (84). Por outro lado o facto de o malondialdeído (MDA) ser um composto muito reactivo implica que

grande parte do que se forma reaja com grupos químicos disponíveis, sobretudo grupos amina, ficando pouca quantidade livre e disponível para reagir com o TBA como o demonstrou Jain (81) quando, comparando a lesão peroxidativa nos eritrócitos através da medição da fluorescência nos extractos lipídicos (método por nós usado) com o "teste do TBA" nas mesmas amostras, verificou que não encontrava alterações para o TBA enquanto a fluorescência denunciava um alteração significativa do padrão de peroxidação.

Devemos confessar que chegamos a montar a técnica do MDA-TBA e a aplicá-la no início do nosso trabalho, mas a morosidade da mesma, pois implica o isolamento prévio de membranas celulares, sem qualquer vantagem adicional e com todas as desvantagens supracitadas sobre a medição da fluorescência nos extractos lipídicos, cedo nos levou a trocá-la.

5.2) UMA RELAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE OXIGÉNIO E A LESÃO OXIDATIVA (PAPEL DO TREINO)

O marcador universal da capacidade aeróbia tem sido o VO_2 max e quando se correlacionam parâmetros indicadores do estado oxidativo com o nível de treino toma-se o VO_2 max como a melhor medida deste (25,28,74). No entanto a existência de indivíduos que num exercício até à exaustão, apresentam consumos totais de oxigénio muito diferentes para um consumo máximo semelhante (Fig. 6), deve fazer-nos rever a pertinência da utilização do VO_2 max quando procuramos uma correlação entre a lesão oxidativa e a quantidade de oxigénio consumida e disponibilizada pelo nível de treino aeróbio. E de facto a melhor correlação que obtivemos entre a lesão oxidativa — aqui medida através do aumento de produtos fluorescentes na membrana do eritrócito — e o parâmetro associado à intensidade do exercício (WcP /Fig. 3, VO_2 max/Fig. 4, VO_2 T/Fig. 5) foi com o VO_2 T, o que é compreensível se pensarmos que este é a medida directa da quantidade de agente tóxico, oxigénio. Importa reforçar a ideia de que embora todos os indivíduos tenham feito um esforço até à exaustão esta é diferente, em termos de consumo de oxigénio, tempo de prova e trabalho realizado, para indivíduos com diferentes níveis de treino, isto é, com diferentes possibilidades de consumo de oxigénio.

Embora não conheçamos estudos que correlacionem a lesão oxidativa com a quantidade de oxigénio consumida, eles existem para a intensidade de exercício medida como % do VO_2 max. Lovlin e col. (22) encontraram para um exercício máximo (100% do VO_2 max) um aumento de 26% do MDA plasmático, medido através do TBA, enquanto que a 40% e 70% do VO_2 max os níveis são inferiores aos valores de repouso. Explicam-no

dizendo que o exercício submáximo, na medida em que promove uma utilização/consumo do lactato pela célula muscular com produção de equivalentes redutores (NADH/NADPH), estimularia a actividade das enzimas antioxidantes e atenuaria o processo de peroxidação lipídica. Isto atribui à intensidade do exercício um papel regulador da agressão radical através da modelação da concentração de NADH/NADPH via lactato, o que é corroborado pela descrição de uma correlação altamente significativa ($p < 0.001$) entre a concentração de lactato e a de MDA para pequenos períodos de exercício intermitente com intensidade variável. Paradoxalmente Gohil e col. (28) demonstram que é justamente para exercícios submáximos (65% do VO_2 max) que se encontra, no sangue total, maior comprometimento do sistema do glutatião (o principal sistema antioxidante eritrocitário), com uma descida significativa do glutatião reduzido (60% do controlo) e um aumento também significativo do glutatião oxidado (100% do controlo), enquanto que num exercício até à exaustão (100% do VO_2 max) não verificam alterações significativas quer do glutatião reduzido, quer do total. Estes resultados sugerem que o exercício submáximo seria um estímulo mais agressivo em termos oxidativos do que o exercício máximo, na medida em que o desgaste do sistema protector (oxidação do glutatião reduzido) acontece na primeira modalidade. Simplesmente trata-se de dois tipos diferentes de exercício feitos pelos mesmos indivíduos em tempos diferentes e com durações diferentes: o exercício submáximo a 65% do VO_2 max teve a duração constante de 90 min e o exercício máximo terminou voluntariamente na exaustão mas, como acontece estarmos perante indivíduos com capacidades aeróbias moderadas (média do VO_2 max \pm erro-padrão: 47.82 ± 2.73), o valor do consumo total de oxigénio (VO_2 T) terá sido muito maior no exercício submáximo, do que no máximo. Esta observação está de acordo com a intensidade de "stress oxidativo" avaliada através do consumo de glutatião reduzido e reforça a importância da medição do VO_2 T.

O "stress oxidativo" é tanto maior quanto maior for a quantidade de oxigénio consumida. E isto terá repercussões não só nos indicadores directos de lesão ou no gasto das defesas, mas também nas concentrações catiónicas eritrocitárias, tendo sido demonstrado, durante um exercício progressivo, que a 60% do VO_2 max não havia alteração nos valores do potássio enquanto a 80% havia uma descida significativa (49); e ainda no volume globular médio que regista variações durante o exercício, diminuindo para exercícios submáximos e aumentando para máximos (34), levantando a possibilidade de uma alteração dos mecanismos de transporte celular.

A melhor correlação por nós encontrada é do tipo exponencial, o que indica um crescimento abrupto dos indicadores de lesão oxidativa acima de determinados valores de

consumo e sugere a falência dos agentes antioxidantes primários na contenção desta agressão suplementar. E à primeira vista esta verificação entra em conflito com os dados da literatura que responsabilizam o treino pela aquisição de um sistema antioxidante eritrocitário mais eficaz (27,29) com protecção contra a hemólise (26). São de facto os indivíduos com melhores níveis de treino aeróbio, com melhor capacidade aeróbia, aqueles a apresentarem maiores índices de lesão peroxidativa provavelmente porque durante o esforço máximo eram os que estavam mais disponíveis, em termos fisiológicos, para consumir oxigénio, tendo apresentado maiores $VO_2 T$. E se dividirmos a meio a nossa amostra considerando que os cinco indivíduos de menor $VO_2 T$ serão os pior treinados e os cinco com maior $VO_2 T$ serão os melhor treinados encontramos, como consta da tabela 3, um aumento muito significativo ($p < 0.01$) da variação da fluorescência (ΔFT) com o exercício quando comparamos o grupo bem treinado (em que se verifica um aumento de 18%) com o mal treinado (aumento de 7%), o que reforça a ideia de que o treino proporciona condições para uma maior agressão oxidativa.

Tabela 3
Relação entre a fluorescência e o nível de treino aeróbio

	$VO_2 T$	FTB	FTA	ΔFT
NT (5)	346.3±32.7	0.326±0.023	0.350±0.021	0.024±0.00
T (5)	549.7±37.6	0.542±0.079	0.642±0.066	0.100±0.01
	$p < 0.001$			$p < 0.01$

Legenda: $VO_2 T$: consumo total de oxigénio durante a prova (ml/kg). FTB: fluorescência correspondente ao sangue total antes do exercício. FTA: fluorescência correspondente ao sangue total depois do exercício. NT: indivíduos menos treinados (com menor capacidade aeróbia). T indivíduos mais treinados (com maior capacidade aeróbia)

Os valores são a média ± o erro-padrão de cinco amostras eritrocitárias para ambos os grupo. Os valores da significância (p) são os que constam da tabela.

O consumo de oxigénio seria, assim, o parâmetro determinante da agressão oxidativa, sobrepondo-se aos mecanismos protectores induzidos pelo treino, que se revelariam insuficientes para lidar com a quantidade de oxigénio por este disponibilizada. O praticante desportivo teria um ónus a pagar pela sobrecarga oxidativa que lhe permite melhores prestações desportivas.

Contudo, se procurarmos uma curva que se aproxime melhor dos mesmos pontos da figura 5, ela sugere que o incremento nos níveis de peroxidação após o exercício se mantém grosseiramente estacionário até um valor que se situaria pelos 575 ml/kg de consumo de

oxigénio, disparando em flecha a partir deste valor (Fig. 7). Estes dados reafirmam o papel do treino na aquisição de um sistema antioxidante mais eficaz, pois para consumos de oxigénio muito superiores, indivíduos com níveis de treino relativamente altos, apresentam um grau de lesão aproximado ao de indivíduos pior treinados.

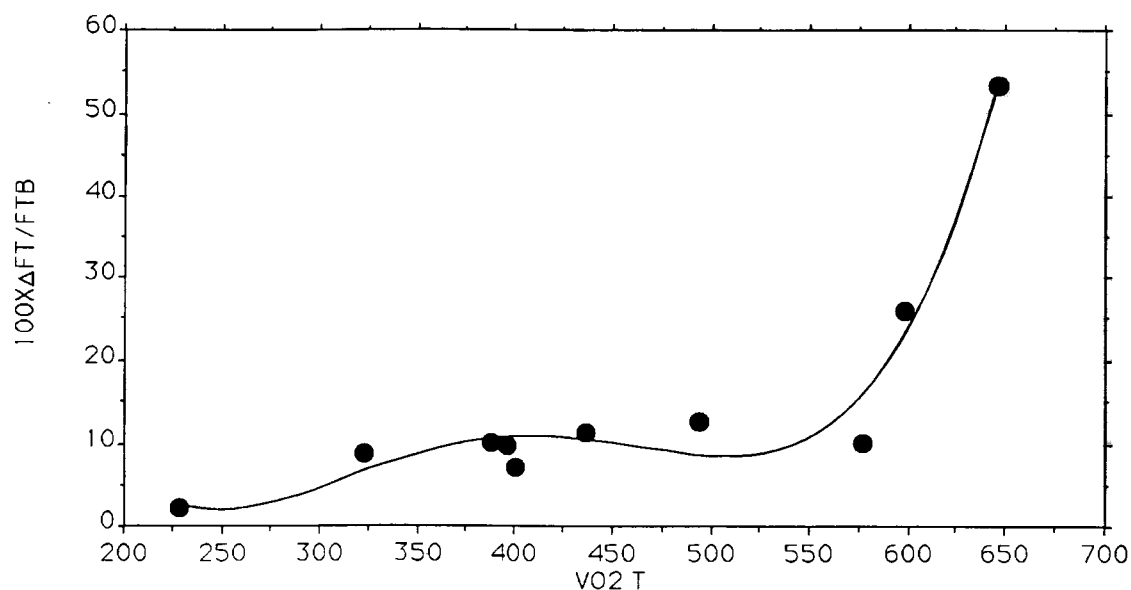


Figura 7. Correlação entre o consumo total de oxigénio ($VO_2 T$) (ml/kg) ocorrido durante o exercício físico e o aumento relativo da fluorescência eritrocitária ($\Delta FT/FTB$). Cada ponto representa um indivíduo diferente. A curva é um polinómio de grau 4 com $R=0.98$, $R^2=0.959$ e $p<0.01$.

Assim sendo, volta a haver acordo com a observação, feita por outros, de um menor índice de peroxidação lipídica quando se compararam fibras musculares de ratos treinados e não treinados após o exercício (12), e com a observação de que para a mesma corrida os ratos treinados apresentaram valores mais baixos de glutatião oxidado (GSSG) no plasma e no fígado (85). No entanto, o gráfico continua a demonstrar que para valores muito altos de consumo (acima de 600 ml/kg) deixa de se manifestar a protecção antioxidante induzida pelo treino e sobrevém uma situação de "stress oxidativo" com os níveis da peroxidação a subirem dramaticamente.

5.3) EXERCÍCIO FÍSICO E ENVELHECIMENTO ERITROCITÁRIO.

Embora pareça haver um aumento dos níveis de peroxidação lipídica com o aumento da densidade eritrocitária quer para as amostras colhidas antes quer para aquelas colhidas depois do exercício, bem como para as fracções de densidade homóloga após o exercício (Tab. 2), estas diferenças não são, contudo, estatisticamente significativas. Mas se continu-

armos a considerar os cinco indivíduos com menor VO_2T os pior treinados e os cinco com maior VO_2T os melhor treinados, ou seja, se subdividirmos o nosso grupo inicial em dois grupos com estados de treino aeróbios diferentes, já a situação se altera (Tab. 4).

Tabela 4.

Relação entre o treino, o exercício e a fluorescência em cada fracção de densidade

	NT		T	
	B	A	B	A
F1	0.280±0.016	0.338±0.012	0.636±0.064	0.618±0.067
F2	0.316±0.015	0.316±0.019	0.646±0.178	0.556±0.079
F3	0.366±0.031	0.312±0.016	0.588±0.117	0.670±0.130
F4	0.386±0.021	0.378±0.026	0.698±0.173	0.840±0.206

Legenda: F1, F2, F3 e F4 representam a fluorescência nas fracções eritrocitárias de densidade crescente. NT: indivíduos pior treinados. T: indivíduos melhor treinados. B: antes do exercício. A: após o exercício. Os valores são a média ± o erro-padrão de cinco amostras eritrocitárias para ambos os grupos.

As diferenças que agora se verificam para as fracções de densidade são muito significativas ($p < 0.01$) quando comparamos fracções não contíguas (F1 com F3, F1 com F4 e F2 com F4) dos indivíduos pior treinados antes do exercício físico, assinalando-se um aumento de 38% do valor da fluorescência entre F1 e F4. Estes dados estão de acordo com as observações feitas por outros que, usando eritrócitos de ratos (60) ou humanos (81), demonstraram também um aumento dos produtos de peroxidação lipídica com a idade do eritrócito acompanhado de um adormecimento do sistema protector antioxidante (60).

Mas o facto de estas diferenças entre fracções de densidade deixarem de ser significativas após o exercício, não nos permite afirmar que este actuaria promovendo uma aceleração do envelhecimento eritrocitário com maior expressão nas células mais densas (mais velhas) e com remoção preferencial destas (62). Além disso, quando comparamos as diferenças de fluorescência entre camadas homólogas para os indivíduos pior treinados antes e após o exercício, elas são significativas para F1, para F3, mas nunca para F4, justamente a camada mais densa (mais velha). Ou seja, se assumimos que há uma correspondência entre densidade e idade (ver MÉTODOS) e que a idade se acompanha de um aumento dos produtos de peroxidação lipídica, não podemos (com os nossos resultados) imputar ao exercício um papel na eliminação das células mais velhas, no rejuvenescimento celular, como outros fizeram (62).

Por outro lado a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as fracções de densidade para os indivíduos melhor treinados, quer antes quer após o exercício, quer quando comparamos fracções homólogas antes e após o exercício, não nos permite estabelecer um perfil de distribuição característico do treino. Ao contrário de Mairbaurl e col. (86) que demonstraram que o treino induzia uma translacção unidireccional das densidades celulares no sentido das células menos densas, ou seja, que os indivíduos melhor treinados apresentavam um maior número de eritrócitos jovens, faltando os eritrócitos mais velhos.

Com os nossos resultados é de acreditar que o exercício e o treino intervêm na redistribuição das diferentes populações eritrocitárias, mas não de uma forma linear promovendo uma translacção simples no sentido das células mais velhas ou das mais jovens. Haveria a perda das relações entre densidade e idade que foram observadas para os indivíduos pior treinados antes do exercício, como se tudo fosse novamente baralhado exigindo do investigador uma atenção suplementar.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

1. Fridovich, I. (1978) *Science* **201**, 875-880
2. Michaelis, L. (1946) *Am. Sci.* **34**, 573-579
3. Pryor, W. A. (1986) *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 657-667
4. Naqui, A., Chance, B. & Cadenas, E. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 137-166
5. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1984) *Biochem. J.* **219**, 1-14
6. Slater, T. F. (1984) *Biochem. J.* **222**, 1-15
7. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. & Fenn, W. O. (1954) *Science* **119**, 623-629
8. McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055
9. White, R. E. & Coon, M. J. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 315-356
10. Badwey, J. A. & Karnovsky, M. L. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 695-726
11. Gilbert, D. L. (1960) *Perspect. Biol. Med.* **4**, 58-71
12. Jenkins, R. R. (1988) *Sports Med.* **5**, 156-170
13. Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. & Packer, L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1198-1205
14. Brooks, G. A. & Fahey, T. D. (eds.) (1985) *Exercise Physiology: Human Bioenergetics and its Applications* MacMillan Pub. Comp., New York
15. Miller, D. M., Buettner, G. R. & Aust, S. D. (1990) *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 95-108
16. Thomas, C. E. & Aust, S. D. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol. 1* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 37-48, CRC Press, Florida
17. Forman, A. & Borg, D. C. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol. 3* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 167-186, CRC Press, Florida
18. McCay, P. B. & Poyer, J. L. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol. 3* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 187-192, CRC Press, Florida
19. Augusto, O. (1989) in *Handbook of Free radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol. 3* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 193-208, CRC Press, Florida
20. Jackson, M. J. & Johnson, K. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol. 3* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 209-214, CRC Press, Florida

21. Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E. & Tappel A. L. (1978) *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **45**, 927-932
22. Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M. & Belcastro, A. N. (1987) *Eur. J. Appl. Physiol.* **56**, 313-316
23. Kanter, M. M., Lesmes, G. R., Kaminsky, L. A., La Ham-Saeger, J. & Nequin, N. D. (1988) *Eur. J. Appl. Physiol.* **57**, 60-63
24. Lew, H., Pyke, S. & Quintanilha, A. T. (1987) *Bioelectrochem. Bioenerg.* **18**, 231-246
25. Gohil, K., Viguié, C., Stanley, W. C., Brooks, G. A. & Packer, L. (1988) *J. Appl. Physiol.* **64**, 115-119
26. Quintanilha, A. T. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 403-404
27. Kanter, M. M., Hamlin, R. L., Unverferth, D. V., Davis, H. W. & Merola, A. J. (1985) *J. Appl. Physiol.* **59**, 1298-1303
28. Jenkins, R. R., Friedland, R. & Howald, H. (1984) *Int. J. Sports Med.* **5**, 11-14
29. Ohno, H., Yahata, T., Sato, Y., Yamamura, K. & Taniguchi N. (1988) *Eur. J. Appl. Physiol.* **57**, 173-176
30. Seiler, D., Nagel, D., Franz, H., Hellstern, P., Leitzmann, C. & Jung, K. (1989) *Int. J. Sports Med.* **10**, 357-362
31. Vogelaere, P., Brasseur, M., Leclercq, R. & Qiron, A. (1988) *Can. J. Sports Sci.* **13**, 43-49
32. Martin, D. G., Ferguson, E. W., Wigutoff, S., Gawne, T. & Schoemaker, E. B. (1985) *J. Appl. Physiol.* **59**, 348-353
33. Myhre, L. G., Hartung, G. H., Nunneley, S. A. & Tucker, D. M. (1985) *J. Appl. Physiol.* **59**, 559-563
34. Van Beaumont, W., Underkofler, S. & Van Beaumont, S. (1981) *J. Appl. Physiol.* **50**, 1255-1262
35. Wallace, W. J., Maxwell J. C. & Caughey, W. S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **57**, 1104-1110
36. Wallace, W. J., Maxwell, J. C. & Caughey, W. S. (1974) *FEBS Lett.* **43**, 33-36
37. Gibson, Q. H. (1948) *Biochem. J.* **42**, 13-23
38. Mira, M. L. (1988) *Arquivos Portugueses das Ciências Biológicas* **22**, 43-48
39. Heller, K. B., Jahn, B. & Deuticke, B. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **901**, 67-77
40. Deuticke, B., Heller, K. B. & Haest, C. W. M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **899**, 113-124
41. Van der Zee, J., Van Steveninck, J., Koster, J. F. & Dubbelman, T. M. A. R. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **980**, 175-180

42. Hochstein, P. & Cohen, G. (1963) *Biochem.* **2**, 1420-1428
43. Winterbourn, C. C., French, J. K. & Claridge, R. F. C. (1979) *Biochem. J.* **3**, 665-673
44. Zs.-Nagy, I. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol 1* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 199-208, CRC Press, Florida
45. Van der Zee, J., Dubbelman, T. M. A. R. & Van Steveninck, J. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol 3* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 81-92, CRC Press, Florida
46. Watanabe, H., Kobayashi, A., Yamamoto, T., Suzuki, S., Hayashi, H. & Yamazaki (1990) *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 507-514
47. Rice-Evans, C., Hochstein, P. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **100**, 1537-1542
48. Maridonneau, I., Braquet, P. & Garay, R. P. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3107-3113
49. Hespel, P., Lijnen, P., Fiocchi, R., Denys, B., Lissens, W., M'Buyamba-Kabangu & Amery, A. (1986) *J. Appl. Physiol.* **61**, 37-43
50. Chan, T. K., Chan, W. C. & Weed, R. I. (1982) *Brit. J. Haematol.* **50**, 575-582
51. Fernandes, A., Mira, M. L., Azevedo, M. S. & Manso, C. F. (1988) *Free Rad. Res. Comm.* **4**, 291-298
52. Clark, M. R. (1988) *Physiol. Rev.* **68**, 503-554
53. Bartoz, G. (1991) *Gerontol.* **37**, 33-67
54. Dannon, D. & Marikovsky, Y. (1988) *Blood Cells* **14**, 7-15
55. Landaw, S. L. (1988) *Blood Cells* **14**, 47-59
56. Bosman, G. J. C. G. M. & Kay, M. B. (1988) *Blood Cells* **14**, 19-35
57. Piomelli, S., Lurinsky, G. & Wasserman, L. R. (1967) *Blood Cells* **14**, 69-75
58. Beutler, E. (1988) *Blood Cells* **14**, 69-75
59. Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T. & Takino, T. (1985) *Mech. Age. Develop.* **32**, 57-62
60. Glass, G. A. & Gershon, D. (1984) *Biochem. J.* **218**, 531-537
61. Åstrand, P. -O., Cuddy, T. E., Saltin, B. & Stenberg, J. (1964) *J. Appl. Physiol.* **19**, 268-274
62. Reinhart, W. H., Staubli, M. & Straub, W. (1983) *J. Appl. Physiol.* **54**, 827-830
63. Slater, T. F. (1984) *Meth. Enzymol.* **105**, 283-293
64. Emerit, J. & Chaudiere, J. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol 1* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 177-186, CRC Press, Florida

65. Lippman, R. D. (1989) in *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol 1* (Miquel, J., Quintanilha, A. T. & Weber, H., eds.), pp. 187-198, CRC Press, Florida
66. Yagi, K. (1987) *Chem. Phys. Lipids* **45**, 337-351
67. Pryor, W. A. & Godber, S. S. (1991) *Free Rad. Biol. Med.* **10**, 173
68. Messina, M. J. (1991) *Free Rad. Biol. Med.* **10**, 175-176
69. Pryor, W. A. & Goyer S. S. (1991) *Free Rad. Biol. Med.* **10**, 177-184
70. Muller, A. & Sies, H. (1984) *Meth. Enzymol.* **105**, 311-319
71. Lawrence, G. D. & Cohen, G. (1984) *Meth. Enzymol.* **105**, 305-311
72. Bird, R. P. & Draper, H. H. (1984) *Meth. Enzymol.* **105**, 299-305
73. Viinkka, L. Vuori, J. & Ylikorkala, D. (1984) *Med. Sci. Sports Exerc.* **16**, 275-277
74. Duthie, G. G., Robertson, J. D., Maughan, R. J. & Morrice, P. C. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **282**, 78-83
75. Åstrand, P. -O. & Saltin, B. (1961) *J. Appl. Physiol.* **16**, 977-981
76. Hermansen, L. & Saltin, B. (1969) *J. Appl. Physiol.* **26**, 31-37
77. Glassford, R. G., Baycroft, G. H. Y., Sedgwick, A. W. & Macnab, R. B. J. (1965) *J. Appl. Physiol.* **20**, 509-503
78. Beutler E. (1985) *Red Cell Metabolism* 2nd. ed. Grune & Stratton, New York
79. Corash, L. (1986) in *Methods in Hematology* , Vol. 16 (E. Beutler, ed.) pp. 90-107, Churchill-Livingstone Press, London
80. Rose, H. G. & Oaklander, M. J. (1965) *J. Lipid Res.* **6**, 528-531
81. Jain, S. K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **937**, 205-210
82. Jain, S. K. & Hochstein, P. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 247-254
83. Esterbauer, H., Koller, E., Slezacek, R. G. & Kostner, J. F. (1986) *Biochem. J.* **239**, 405-409
84. Janero, D. R. (1990) *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 515-550
85. Lew, H. & Quintanilha, A. (1991) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* **16**, 59-68
86. Mairbaur, H., Humpeler, E., Schwaberg, G. & Pessenhofer, H. (1983) *J. Appl. Physiol.* **55**, 1403-1407