

U. PORTO

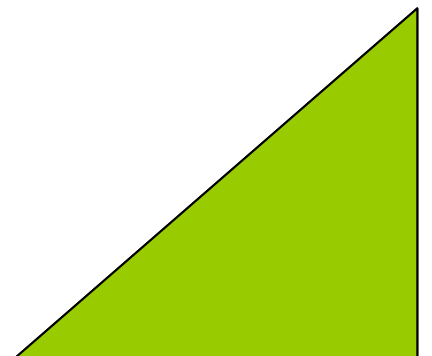


FACULDADE DE DESPORTO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Exercício Agudo e Oxidação Proteica do Tecido Muscular Esquelético

Simão Costa Carneiro

Porto, 2006



Exercício Agudo e Oxidação Proteica do Tecido Muscular Esquelético

Monografia realizada no âmbito da disciplina de Seminário do 5º ano da licenciatura em Desporto e Educação Física, na área de Recreação e Tempos Livres, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Ramos Duarte

Simão Costa Carneiro

Porto, 2006

Carneiro, S. C. (2006). *Exercício Agudo e Oxidação Proteica do Tecido Muscular Esquelético*. Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, Porto. Dissertação de licenciatura apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

PALAVRAS-CHAVE: EXERCÍCIO FÍSICO, RADICAIS LIVRES, ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO, ANTIOXIDANTES, STRESS OXIDATIVO, GRUPOS CARBONILO.

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho de investigação, várias pessoas contribuíram para que, através do meu esforço e dedicação, conseguisse “*chegar a bom porto*”. Assim, agradeço:

Ao Professor Doutor José Alberto Ramos Duarte, pelo acompanhamento, disponibilidade, orientação e incentivo, que desde o início foram determinantes para a realização deste trabalho.

À Dra. Rita e D. Celeste, pela paciência e ajuda que sempre demonstraram.

À Professora Doutora Paula Santos e restantes professores do gabinete, pela força, dedicação e amizade que transmitiram ao longo de todo o meu percurso académico.

Aos meus pais e avós, por todo o amor, apoio, incentivo e compreensão, que demonstraram não só ao longo da realização deste trabalho, mas também de todo o meu percurso académico.

À Rita, porque a tua energia, o teu sorriso e a tua companhia me deram uma força extra e conseguiram tornar tudo mais simples.

A todos os meus amigos que estiveram presentes e me deram apoio, força e boa disposição para ultrapassar alguns momentos mais difíceis.

Ao Dr. Pedro e restantes colegas da biblioteca da FADEUP, pelo esclarecimento, apoio e ajuda em alguns momentos de dúvidas.

A todos aqueles que não referi, mas que consciente ou inconscientemente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE QUADROS	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
RÉSUMÉ	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Radicais Livres e Espécies Reactivas.....	4
2.2. Sistema Antioxidante.....	8
2.3. Stress Oxidativo.....	12
2.3.1. Oxidação Proteica.....	13
2.3.2. Peroxidação Lipídica.....	13
2.3.3. Oxidação dos ácidos nucleicos	14
2.4. Exercício Físico e Stress Oxidativo.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Amostra	19
3.2. Procedimentos Metodológicos	19
3.3. Procedimentos Estatísticos	20
4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	23
5.1. Discussão da Metodologia	23
5.2. Discussão dos Resultados	24
6. CONCLUSÕES	27
7. BIBLIOGRAFIA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Reacções que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio (adaptado de Ames et al., 1993).....	6
Figura 2 – Valores individuais de densidade óptica dos animais do grupo experimental e controlo e respectivas bandas do <i>slot-blot</i> (na região inferior da figura).	21
Figura 3 – Valores individuais representativos da concentração de grupos carbonilos dos vários animais.	21
Figura 4 – Valores médios e desvios padrão das percentagens de variação das concentrações de grupos carbonilo no grupo experimental e controlo.	22

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Principais substâncias antioxidantes agrupadas de acordo com o modo de acção (adaptado de Koury e Donangelo, 2003).	9
--	---

RESUMO

Este trabalho teve como objectivo analisar, no músculo *soleus* do ratinho, a lesão proteica resultante do aumento de stress oxidativo, induzido por uma situação de exercício agudo. Para esta investigação foram utilizados 16 ratinhos Charles River CD1 machos, com 10-12 semanas de idade, que foram divididos em dois grupos, um experimental e outro de controlo. Os animais do grupo experimental realizaram uma corrida num tapete rolante, durante 60 minutos, a uma velocidade de 900 m/h, correspondente a cerca de 70% da velocidade máxima dos animais. Os do grupo de controlo não realizaram qualquer tipo de exercício físico durante o mesmo período. Logo após a finalização do protocolo experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Por *slot-blot*, foi determinado o teor de grupos carbonilo no músculo *soleus*, como indicador da oxidação proteica muscular esquelética, nos dois grupos. Os resultados obtidos foram apresentados em percentagem de variação relativamente ao grupo de controlo. No grupo experimental, imediatamente após uma hora de exercício físico, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0.001$) dos grupos carbonilo ($669 \pm 15\%$) comparativamente ao grupo controlo ($100 \pm 4\%$). Os resultados sugerem que mesmo em repouso há formação de grupos carbonilo resultante do fenómeno de stress oxidativo. Contudo, numa situação de exercício agudo há uma produção acrescida destes compostos, reflectindo assim uma significativa lesão proteica do tecido muscular esquelético.

Palavras-Chave: Exercício físico, Radicais livres, Espécies reactivas de oxigénio, Antioxidantes, Stress oxidativo, Grupos carbonilo.

ABSTRACT

The aim of this work was to analyse the protein damage as a result of the increase of the oxidative stress, induced by acute exercise, in the *soleus* muscle of the little mouse. Sixteen male Charles River CD1 mice, 10-12 weeks old, were used in this investigation. They were divided into two groups, an experimental group and a control one. The mice that belonged to the experimental group run in a rolling carpet during 60 minutes, 900 m/h, which corresponds to about 70% of the maximum speed the animals can run. The mice that belonged to the control group didn't do any kind of exercise during this lapse of time. As soon as the experimental register ended, all these mice were sacrificed by means of cervical dislocation. Through the *slot-blot* it was determined the carbonyl groups content in the *soleus* muscle as an indicator of the skeleton protein muscular oxidation in the tow groups. The results were presented in variation percentage according to the control group. In the experimental group and immediately after an hour of physical exercise, it was possible to observe a significant increase ($p < 0.001$) of the carbonyl groups ($669 \pm 15\%$) in comparison with the control group ($100 \pm 4\%$). The results suggest that even in rest, there is a formation of carbonyl groups as a result of the oxidative stress phenomenon. However, in a situation of acute exercise, there is an increased production of these compounds which reflects a significant protein damage in the skeleton muscular tissue.

Keywords: Physical exercise, Free radicals, Reactive oxygen species, Antioxidants, Oxidative stress, Carbonyl groups.

RESUME

Ce travail a eu l'objectif d'analyser, dans le muscle *soleus* de la petite souris, la lésion protéique résultant de l'augmentation du stress oxydatif, induit par une situation d'exercice brusque. Pour cette investigation il fut utiliser 16 petites souris Charles River CD1 avec l'âge de 10-12 semaines, qui ont été divisées en deux groupes, un groupe expérimental et un autre de contrôle. Les animaux du groupe expérimental ont fait une course sur un tapis roulant, pendant 60 minutes, à la vitesse de 900 m/h, correspondant à environ 70% de la vitesse maximum des animaux. Les groupes de contrôle n'ont fait aucun genre d'exercice physique pendant la même période. Tout de suite après la finalisation du protocole expérimental, les animaux ont été sacrifiés par déplacement cervical. Par *slot-blot*, il a été déterminé le teneur des groupes carbonyliques dans le muscle *soleus*, comme indicateur de l'oxydation protéinique musculaire squelette, dans les deux groupes. Les résultats obtenus ont été présentés en pourcentage de variation relativement au groupe de contrôle. Dans le groupe expérimental, tout de suite après une heure d'exercice physique, il a été possible d'observer une augmentation significative ($p < 0.001$) des groupes carbonyliques ($669 \pm 15\%$) comparativement au group de contrôle ($100 \pm 4\%$). Les résultats nous proposent que même en repos il ya une formation de groupes carbonyliques résultant du phénomène de stress oxydative. Cependant, dans une situation d'exercice brusque il y a une production ajoutée de ces composants, démontrant ainsi une lésion protéique significative du tissu musculaire squelettique.

Mots-clés: Exercice physique, Radicales libres, Espèces réactifs de oxygéné, Antioxydants, Stress oxydatif, Groupes carbonyliques.

LISTA DE ABREVIATURAS

HOCl	Ácido Hipocloroso
CAT	Catalase
ERO	Espécies Reactivas de Oxigénio
GPx	Glutathiona Peroxidase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
O ₂	Oxigénio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
HO•	Radical Hidroxilo
ROO•	Radical Peroxilo
O ₂ • ⁻	Radical Superóxido
SOD	Superóxido Dismutase

1. INTRODUÇÃO

Nos dias que correm, a presença do exercício físico no quotidiano do ser humano é cada vez mais evidente. As pessoas buscam uma melhoria da qualidade de vida, prevenindo as doenças e promovendo a saúde através do exercício físico regular (Ascensão et al., 2003; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001). Na verdade, e segundo os mesmos autores, inúmeros estudos apontam para o facto do exercício regular ser determinante na prevenção e controlo de várias doenças crónicas.

Contudo, o exercício físico, praticado de forma aguda ou crónica, possui também efeitos colaterais indesejáveis que poderão favorecer situações como o progresso de doenças cardiovasculares, cancro, envelhecimento e fragilidade do sistema imunológico (McArdle et al., 2002; Viitala et al., 2004). De facto, o inevitável aumento do consumo de oxigénio (O_2), provocado pelo exercício, irá induzir necessariamente uma maior produção de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (Aguiló et al., 2004; Chang et al., 2006).

Os radicais livres são substâncias químicas que contêm um ou mais electrões desemparelhados na sua órbita externa, conferindo-lhes uma grande instabilidade química (Clarkson e Thompson, 2000; Lawer e Powers, 1998; Vancini et al., 2005). Assim, estas substâncias podem reagir e alterar a estrutura de moléculas adjacentes importantes para o funcionamento celular, como o ADN, as proteínas, os lípidos e os hidratos de carbono (Evans, 2000; Koury e Donangelo, 2003; Vancini et al., 2005).

Apesar deste tipo de substâncias existir em abundância na natureza, é possível considerar algumas que, pela sua elevada toxicidade biológica, adquirem uma maior importância. Como tal, pode-se referir então o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxilo (HO^{\cdot}) (Beckman e Ames, 1998; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Mota et al., 2004).

Segundo os autores supracitados, para além dos radicais livres, existem outras substâncias, igualmente muito reactivas e tóxicas para o organismo, mas que, por não conterem electrões desemparelhados, não podem ser designadas como as primeiras. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o

ácido hipocloroso (HOCl), são exemplos destes compostos, que, apesar de reactivos, são ainda potenciais geradores de radicais livres. Tendo em consideração esta característica, estes compostos (radicais e não radicais) são habitualmente designados de espécies reactivas de oxigénio (ERO), e incluem não só estas moléculas altamente reactivas, sem electrões desemparelhados, como também os radicais livres de oxigénio (Ascensão et al., 2005; Ji, 1999).

Pelo facto destas substâncias terem efeitos nocivos, os organismos biológicos possuem sistemas de defesa orgânicos, para proteger as células das lesões celulares causadas pelas ERO (Di Meo e Venditti, 2001; Ji, 1999; Sen, 2001). Segundo aqueles autores, estes mecanismos de defesa antioxidante, permitem transformar as substâncias altamente reactivas em moléculas menos reactivas para as estruturas biológicas. Assim, a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), são exemplos de enzimas que desempenham funções determinantes dentro dos sistemas de defesa antioxidante (Gastell e Alejo, 2000; Mota et al., 2004; Sen, 2001).

O desequilíbrio entre a formação de ERO e a capacidade de acção dos sistemas de defesa antioxidante, favorecendo o primeiro, é denominado de stress oxidativo (Ceconi et al., 2003; Deaton e Marlin, 2003; Miranda et al., 2000). Para os mesmos autores, o stress oxidativo é então uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO, que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional, e comprometimento das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como o músculo, o fígado, o tecido adiposo e o cérebro.

São vários os factores biológicos e ambientais que influenciam a amplitude deste processo. Contudo, nesta investigação, aquele que assumiu uma posição de relevo foi o exercício agudo. Vários estudos apontam que o exercício vigoroso pode ser considerado prejudicial para o músculo esquelético, em virtude do stress oxidativo que induz inevitavelmente (Bejma e Ji, 1999; Vancini et al., 2005). Tal acontece uma vez que, numa situação de exercício agudo, há um inevitável incremento na oxidação dos substratos energéticos e consequente aumento do consumo de O₂ (Gomez-Cabrera et al.,

2006). Assim, e tal como já foi referido, um dos efeitos pejorativos desta situação poderá ser a oxidação ao nível das proteínas (Friguet, 2006).

É neste contexto que surge a pertinência do nosso estudo, uma vez que nos propomos analisar a lesão das proteínas no tecido muscular esquelético, decorrente do fenómeno de stress oxidativo, quantificada através da formação de grupos carbonilo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Radicais Livres e Espécies Reactivas

Por definição, radical livre é uma espécie química que possui um ou mais electrões desemparelhados na sua orbita externa (Clarkson e Thompson, 2000; Lawer e Powers, 1998). Apesar destas substâncias serem capazes de viver independentemente, os electrões desemparelhados fazem com que elas sejam extremamente reactivas (Ascensão et al., 2003; Vancini et al., 2005). Devido à sua grande reactividade, Sies em 1993 (para refs ver Rodríguez, 2005) refere que os radicais livres têm em média uma vida extremamente curta (o radical hidroxilo, por exemplo, tem um período de vida de cerca de 10^{-9} segundos).

Segundo Koury e Donangelo (2003), como estas substâncias procuram estabilidade, tendem a ligar o seu electrão desemparelhado a outros de estruturas próximas, podendo assim ceder um electrão (radicais reductores), ou captar um outro (radicais oxidantes). Como consequência destas reacções, estas substâncias podem alterar a homeostasia celular, pelo facto de provocarem alterações na estrutura de moléculas importantes (Sen, 2001; Vancini et al., 2005).

Quando um radical livre se liga a uma espécie não radical, há formação de um novo radical, dando assim início a uma reacção em cadeia, onde cada radical gera um novo radical, podendo este ser mais ou menos reactivo que o anterior (Mota et al., 2004). Segundo Liu (2000), este processo só terminará quando a extremidade radical que contém o electrão desemparelhado formar uma ligação covalente com o electrão desemparelhado de outro radical.

Segundo Leeuwenburgh e Heinecke (2001), apesar destas espécies existirem em abundância na natureza, aquelas que devido à sua elevada toxicidade biológica têm maior importância são os radicais livres de oxigénio, nos quais estão incluídos o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o hidroxilo (HO^{\bullet}).

A formação do radical $O_2^{\bullet-}$ é devida à redução do O_2 molecular, que adquire um único electrão (Ames et al., 1993; Rodríguez, 2005). Segundo os

mesmos autores, a sua principal fonte de produção é a cadeia transportadora de electrões, e a sua produção aumenta na proporção da concentração de O_2 . Os autores supracitados referem ainda que, apesar de ser muito menos reactivo que outros radicais livres de oxigénio, existem muitos alvos sensíveis a ele. Este radical pode desencadear reacções químicas com os ácidos gordos dos fosfolípidos, ocorrendo então a peroxidação lipídica e a perda da organização membranar, fundamental para o normal funcionamento celular (Evans, 2000). Apesar deste radical ter um período médio de vida relativamente grande e ser então pouco tóxico, é, através de várias reacções, uma importante fonte de produção de outras substâncias mais reactivas, como é o caso do radical HO^\bullet (Clarkson e Thompson, 2000; Ji, 1999).

O radical HO^\bullet é altamente reactivo e pode atacar todas as biomoléculas, originando reacções em cadeia, induzindo assim alterações estruturais nos sistemas biológicos (Pollack e Leeuwenburgh, 1999). Segundo este autor, devido à grande reactividade e toxicidade deste radical, geralmente considera-se que uma grande parte do dano oxidativo resultante da produção de radicais livres é da responsabilidade do radical HO^\bullet . Pelas suas características, este radical pode ser responsável por alterações estruturais nas moléculas de ADN, ao reagir com as bases purínicas e pirimídicas, por danos nas proteínas e por destruição das membranas, devido à sua reacção com os ácidos gordos insaturados, dando origem a uma série de reacções de peroxidação lipídica (Liu et al., 2000; Vancini et al., 2005).

Contudo, ao longo do tempo foram sendo progressivamente identificadas outras moléculas também reactivas e tóxicas para o organismo, derivadas das espécies anteriormente referidas, mas que não se enquadram na definição de radical livre por não ter nenhum electrão desemparelhado. Assim, compostos como o H_2O_2 e o $HOCl$ são exemplos de moléculas potenciais geradoras de radicais livres, devendo por isso considerar-se as suas repercussões orgânicas, fisiológicas e tóxicas (Pollack e Leeuwenburgh, 1999; Rodríguez, 2005).

Dada esta característica, estes compostos são frequentemente designados de espécies reactivas de oxigénio (ERO). Assim, nesta categoria

podemos incluir os radicais livres de oxigénio e também as outras moléculas altamente reactivas, que não possuem electrões desemparelhados, mas que são potenciais geradores desses mesmos radicais (Mota et al., 2004).

Apesar do O_2 ser um elemento imprescindível para a vida, ele possui também uma elevada toxicidade (Pérez e Muguercia, 2000; Yu e Chung, 2006). Quando há um aumento exagerado do seu consumo, inevitavelmente há também uma produção acrescida de ERO, uma vez que cerca de 2 a 5% do O_2 consumido pode resultar na produção destas substâncias extremamente reactivas (Ascensão et al., 2003; Rodríguez, 2005).

Em virtude da sua configuração electrónica, a molécula de O_2 tende a captar electrões, tornando-se assim uma molécula potencialmente oxidativa:

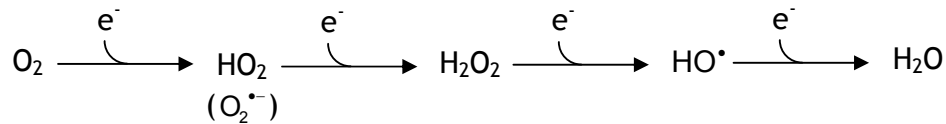


Figura 1 – Reacções que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio (adaptado de Ames et al., 1993)

Podemos então considerar que o O_2 é um mal necessário, uma vez que, apesar de não ser possível viver sem ele, o seu consumo induz inúmeras lesões, pela produção contínua de ERO, durante a redução da sua molécula. Consoante a redução de um, dois ou três electrões, o O_2 pode originar o radical $O_2^{\bullet -}$, o H_2O_2 , ou o radical HO^\bullet respectivamente (Beckman e Ames, 1998).

Apesar de se considerar a mitocôndria como a principal fonte de produção de ERO (Bejma e Ji, 1999), pelo facto de consumir a maior parte do O_2 utilizado pelo organismo (durante o processo de respiração celular), estes compostos podem também ser produzidos noutros organelos como o retículo endoplasmático, os lisossomas, as membranas, os peroxissomas e o citosol (Beckman e Ames, 1998; Lawer e Powers, 1998). Algumas destas fontes de ERO estão activas em condições fisiológicas normais, enquanto outras são activadas apenas em circunstâncias especiais, tais como situações de isquemia-reperfusão, administração de fármacos ou realização de exercício físico intenso (Pérez e Muguercia, 2000).

Nas células eucarióticas, o gradiente de concentração de O_2 diminui desde a membrana celular até à mitocôndria, pelo que a cadeia transportadora de electrões consome a maioria do O_2 utilizado pela célula (Ascensão et al., 2005). E como já foi referido, uma certa percentagem desse O_2 é transformado em ERO, nomeadamente nos complexos I e III dessa mesma cadeia (Di Mauro, 1999; Nohl et al., 2005).

Por seu lado, a acção destes oxidantes formados na cadeia transportadora de electrões, induz alterações nas mitocôndrias, podendo ter efeitos nefastos cumulativos nas suas funções, constatados pela alteração do seu número, características morfológicas e actividade enzimática (Barja, 2004; Cadenas e Davies, 2000). Assim, e segundo os autores citados anteriormente, todos os factores que induzem um aumento da formação de ERO poderão perturbar a homeostasia mitocondrial, contribuindo para o aumento de lesões e mutações neste organelo celular, com implicações ao nível da produção de energia e manutenção das funções vitais da célula.

2.2. Sistema Antioxidante

O organismo possui uma capacidade fantástica de adaptação a diferentes situações desfavoráveis, causadas por estímulos internos ou externos (Yu e Chung, 2006). Assim, quando o organismo é submetido a este tipo de situações, sofre adaptações no sentido de recuperar a homeostasia.

Quando o O₂ começou a ser utilizado no processo de respiração, ocorreu paralelamente o desenvolvimento de um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade deste gás, uma vez que, como já referido, o metabolismo aeróbio conduz à formação de ERO (Ascensão et al., 2003; Koury e Donangelo, 2003). Neste sentido, o organismo adaptou-se à quantidade de O₂ presente na atmosfera e conseqüente produção de ERO, desenvolvendo então um sistema de defesa antioxidante (Aguiló et al., 2004; Ehrenbrink et al., 2006).

Segundo McArdle et al. (2002) e Mota et al. (2004), o grau de lesão celular causada pelas ERO depende assim da capacidade de defesa dos antioxidantes, bem como da capacidade de reparação celular. Estes mecanismos de defesa protegem as células dos efeitos nocivos dos produtos do metabolismo oxidativo, uma vez que os transformam noutros produtos menos tóxicos ou então não tóxicos (Clarkson e Thompson, 2000).

De acordo com a definição apresentada por Halliwell e Gutteridge nos anos noventa (para refs ver Rodríguez, 2005), um antioxidante é uma substância que, mesmo em baixas concentrações relativamente às concentrações dos substratos oxidáveis, evita ou retarda significativamente a oxidação dos mesmos, pelas ERO. Tal acontece pelo facto destas substâncias fornecerem electrões às ERO, tornando-as espécies mais estáveis (Ji, 1999). Assim, e segundo o mesmo autor, a intercepção das ERO é efectuada pelos mecanismos antioxidantes, que protegem as células e tecidos dos seus efeitos maléficos.

De acordo com Koury e Donangelo (2003), estes mecanismos compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos, podendo ainda ser classificados segundo a sua origem e localização (antioxidantes exógenos e

endógenos). O mecanismo de acção dos antioxidantes permite ainda classificá-los como antioxidantes de prevenção (que impedem a formação de ERO), de intercepção (que impedem o ataque de ERO às células), e de reparação (que favorecem a remoção dos danos moleculares e a reconstituição das membranas celulares danificadas).

Quadro 1 – Principais substâncias antioxidantes agrupadas de acordo com o modo de acção (adaptado de Koury e Donangelo, 2003).

	Antioxidantes Exógenos	Antioxidantes Endógenos	
		Extracelulares	Intracelulares
Prevenção	Zinco Selénio	Albumina Bilirrubina Ceruloplasmina Ferritina Mioglobina Metalotioneína (zinco) Haptoglobina	Glutationa Peroxidase Superóxido Dismutase (zinco) Ácido Úrico Coenzima Q Catalases
Intercepção	Ácido Ascórbico Alfa-tocoferol Carotenoides	Ácido Ascórbico Alfa-tocoferol Carotenoides	Ácido Ascórbico Alfa-tocoferol Carotenoides
Reparação			Metaloenzimas (zinco)

O sistema de defesa antioxidante, constituído por estes mecanismos, é fundamental para a sobrevivência das células, e nele podemos considerar: os compostos enzimáticos, tais como a SOD, a CAT e a GPx; as moléculas que neutralizam os radicais no meio aquoso, como o ascorbato, o urato e a glutaciona reduzida (GSH); as moléculas que neutralizam os radicais no interior das membranas, como os tocoferóis, flavonoides, carotenoides e ubiquinol; as enzimas envolvidas na redução de formas oxidadas de pequenos antioxidantes moleculares (glutaciona redutase, dehidroascorbato redutase), ou dos responsáveis pela manutenção dos grupos tiol das proteínas (tioredoxina redutase); e os mecanismos celulares que mantêm um meio reduzido, como a

glucose-6-fosfato desidrogenase, que regenera o NADPH (Powers et al., 2004; Sen, 2001). Apesar de todos os antioxidantes referidos contribuírem para a homeostasia do organismo, é a SOD, a CAT e a GPx que possuem o papel mais importante, dentro dos sistemas de defesa antioxidante (Clarkson e Thompson, 2000).

Além do papel específico de cada um destes mecanismos, também a cooperação entre os mesmos influencia a capacidade antioxidante do organismo, protegendo assim a célula dos potenciais efeitos agressivos das ERO (Sen, 2001).

Como já foi referido, os antioxidantes compreendem vários sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. Os primeiros são sistemas de defesa específicos e variados, presentes no local de produção das ERO, e que procuram mantê-las em baixas concentrações (Selman et al., 2002). Este grupo de enzimas inclui a SOD, a CAT, a GPx, a glutathione redutase e a glucose-6-fosfato desidrogenase (Pollack e Leeuwenburgh, 1999).

A SOD é o principal mecanismo de defesa para combater a toxicidade do O_2 , pelo que catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (Rodríguez, 2005). Este autor refere ainda que a actividade desta enzima é maior no fígado e nos rins, sendo que no cérebro, coração, pâncreas e músculo esquelético possui uma actividade mais moderada, e muito reduzida nos eritrócitos. Relativamente ao músculo esquelético, 15 a 35% da actividade da SOD verifica-se nas mitocôndrias, e a restante no citosol (Leeuwenburgh e Heinecke, 2001).

A CAT, cuja principal função é a de catalizar a decomposição do H_2O_2 em água e O_2 , existe em concentrações mais elevadas nos peroxissomas do que nas mitocôndrias e, tal como acontece com a SOD, é mais abundante nos tecidos predominantemente oxidativos (Ascensão et al., 2003).

A GPx é talvez a enzima mais importante na remoção do H_2O_2 , reflectindo assim um papel determinante no processo de remoção das ERO (Mota et al., 2004). Segundo estes autores, ela possui um papel fundamental na protecção celular das membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos, contra as ERO. Esta enzima utiliza a glutathione reduzida para reduzir o H_2O_2 a

glutathione oxidada e água (Venditti e Meo, 1996). Para que tal possa acontecer, as células terão necessariamente de possuir uma via de regeneração de glutathione reduzida. Ocorre então uma reacção, catalisada pela enzima glutathione redutase, que utiliza o NADPH como cofactor e agente redutor, transformando assim a glutathione oxidada novamente em glutathione reduzida (Ji, 1999; Rodríguez, 2005). A actividade da GPx também é maior nas fibras oxidativas comparativamente com as fibras glicolíticas, que possuem uma menor actividade desta enzima (Leeuwenburgh e Heinecke, 2001). Outra semelhança com a SOD é o facto desta enzima se localizar tanto no citosol como nas mitocôndrias (Ascensão et al., 2003). No músculo esquelético, aproximadamente 45% da actividade está presente no citosol e 55% na mitocôndria (Leeuwenburgh e Heinecke, 2001).

Para além dos sistemas enzimáticos existe ainda uma série de moléculas que eliminam as ERO e que constituem a segunda linha de defesa antioxidante, não enzimática. Segundo Clarkson e Thompson (2000) e Powers et al. (2004), estes mecanismos podem neutralizar as ERO no meio aquoso (vitamina C e glutathione) ou no interior das membranas (vitamina E, β -carotenos, ubiquinona, ubiquinol e flavonoides). Estes antioxidantes contribuem para a manutenção do equilíbrio do estado redox da célula, uma vez que procuram interceptar as ERO, convertendo-as em espécies menos reactivas. Por outro lado, eles participam também na reparação das alterações estruturais da célula causadas por este tipo de substâncias altamente reactivas (Aguiló et al., 2004; Sen, 2001).

2.3. Stress Oxidativo

Quando se verifica um desequilíbrio entre a acção dos agentes oxidantes e antioxidantes, favorecendo os primeiros, ocorre um fenómeno chamado stress oxidativo (Gastell e Alejo, 2000; Miranda et al., 2000). É então possível definir stress oxidativo como uma condição fisiológica de elevada concentração de ERO, que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo de funções vitais em diversos tecidos e órgãos, tais como o músculo, fígado, tecido adiposo e cerebral (Vancini et al., 2005). Contudo, segundo estes autores, o efeito prejudicial do stress oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta.

Uma situação de stress oxidativo representa então uma incapacidade de impedir ou reparar as repercussões prejudiciais das ERO sobre as estruturas celulares, e assume-se que ocorra em todos os seres biológicos, em situações de funcionalidade normal (Mota et al., 2004; Urso e Clarkson, 2003).

Hábitos de vida inapropriados, tais como o consumo de álcool, tabaco e uma dieta inadequada, assim como condições ambientais impróprias (como a exposição à radiação UV), poluição, humidade e temperatura elevadas, estados psicológicos que provocam stress emocional, o envelhecimento e o exercício físico realizado de forma extrema, são factores que estão directamente relacionados com o aumento do stress oxidativo (Liu et al., 2000; McArdle et al., 2002; Vancini et al., 2005). Além disso, os autores mencionados referem ainda que um aumento da taxa de produção de ERO, uma redução da capacidade antioxidante ou mesmo a conjugação destes dois factores, contribui obviamente para um aumento do stress oxidativo.

Em virtude do stress oxidativo provocar alterações em várias macromoléculas, o processo de lesão oxidativa pode acontecer através de diferentes fenómenos, tais como a oxidação proteica, a peroxidação lipídica e a lesão oxidativa do ADN (Golden e Melov, 2001; Nohl et al., 2005).

2.3.1. Oxidação Proteica

Devido à sua complexa estrutura e aos grupos funcionais oxidáveis dos aminoácidos, as proteínas são um alvo fácil para os oxidantes (Friguet, 2006). Assim, durante a oxidação proteica acontece uma série de modificações químicas nas proteínas, que podem produzir um dano na actividade biológica e alterações nas estruturas das mesmas (Çakatay et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2003).

Segundo Berlett e Stadtman (1997) e Linton et al. (2001), a modificação oxidativa das proteínas tem lugar mediante dois mecanismos diferentes: i) formação de ERO no local específico através da activação redox de metais de transição, que não estão fortemente ligados à proteína. Este dano é catalizado por iões metálicos, dando lugar à formação de grupos carbonilos; ii) ERO não dependentes de metais, que produzem oxidação de aminoácidos. Nestes processos ocorre dano directo aos aminoácidos, ou degradação oxidativa das proteínas por excisão do enlace peptido.

Uma vez que, em consequência do ataque das ERO, os aminoácidos são convertidos em derivados carbonilos, a formação destes compostos é um indicador da lesão resultante da oxidação proteica (Adams et al., 2001; Dalle-Donne et al., 2003).

O aumento de proteínas oxidadas nos tecidos depende então da produção de ERO, da eficiência da sua remoção pelas defesas antioxidantes, e da capacidade de remoção dessas mesmas proteínas lesadas (Friguet, 2006; Leeuwenburgh et al., 1999).

2.3.2. Peroxidação Lipídica

Uma segunda consequência do stress oxidativo é a peroxidação lipídica. Este fenómeno ocorre quando um ácido gordo, com um electrão desemparelhado, reage com o O_2 gerando um radical peroxilo (ROO^{\bullet}). Este produto é altamente reactivo e pode combinar-se com outros radicais semelhantes, podendo reagir com um outro ácido gordo polinsaturado, propagando o fenómeno de peroxidação lipídica (Rodríguez, 2005; Sen, 2001).

Os autores mencionados referem ainda que o facto do O_2 ser bastante mais solúvel em meio não polar que em meio polar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de O_2 , pelo que este terá mais potencial para danificar os ácidos gordos polinsaturados da membrana. Assim, esta será então a estrutura mais susceptível à desnaturação provocada pela peroxidação lipídica.

Segundo Sen (2001), estas ERO são transportadas pelo sangue para alvos distantes, podendo iniciar nova lesão oxidativa. O autor refere ainda que se não houver interrupção, esta reacção em cadeia poderá levar a um dano extensivo dos lípidos dessa membrana. Como consequência, a peroxidação lipídica da membrana irá alterar a sua permeabilidade, comprometendo assim a integridade desta barreira (Selman et al., 2002).

Como os lípidos são facilmente oxidados, a reacção propaga-se em cadeia, uma vez iniciada (Polidori et al., 2000). Assim, pelo menos teoricamente, a oxidação de uma molécula lipídica poderia levar à destruição de todos os lípidos do organismo (Rodríguez, 2005). No entanto, existem diferentes antioxidantes capazes de reduzir este fenómeno, sendo o mais conhecido e eficaz a Vitamina E (Chang et al., 2006). Segundo o autor, esta molécula é considerada como um dos principais antioxidantes da natureza, e que elimina rapidamente os radicais ROO^{\bullet} .

Em virtude dos resultados obtidos em vários estudos, é possível afirmar que o exercício físico intenso pode provocar peroxidação lipídica em diversos tecidos tais como o músculo esquelético, o coração, o fígado, os eritrócitos e o plasma (Packer, 1997; Sen, 2001).

2.3.3. Oxidação dos ácidos nucleicos

Um terceiro alvo do stress oxidativo são os ácidos nucleicos. Uma situação de stress oxidativo pode induzir uma lesão significativa do ADN através da modificação das suas bases (Remmen et al., 2003). Segundo estes autores, o radical HO^{\bullet} é o principal causador deste tipo de lesão oxidativa.

Como estes danos do ADN parecem estar relacionados com a taxa metabólica, torna-se pertinente estudar o efeito do exercício nas modificações oxidativas dos ácidos nucleicos (Parise et al., 2005; Selman et al., 2002).

2.4. Exercício Físico e Stress Oxidativo

O exercício físico é aceite como uma componente vital na manutenção da saúde e prevenção de várias doenças crónicas (Ascensão et al., 2003; Viña et al., 2001). Assim, ele é constantemente referido como um factor importante na extensão e qualidade de vida.

Contudo, ao longo das últimas duas décadas tem-se demonstrado que o exercício aumenta a produção de ERO nos tecidos, especialmente no músculo esquelético e no coração (Gomez-Cabrera et al., 2006). Por isso, os seus efeitos parecem ser em parte paradoxais, devido a esta produção acrescida de ERO, principalmente devido ao exponencial aumento do consumo de O₂ pelos tecidos activos (Yu e Chung, 2006).

A maior parte do O₂ consumido é utilizada na mitocôndria para a fosforilação oxidativa, onde é reduzida a água (Melov, 2002). Contudo, uma pequena fracção, porém significativa do O₂ consumido, pode “escapar” da cadeia transportadora de electrões, e originar ERO (Di Meo e Venditti, 2001; Tonkonogi et al., 2000). Segundo Urso e Clarkson (2003) e Viña et al. (2001), estima-se que cerca de 2 a 5% do O₂ utilizado pela mitocôndria é de facto convertido em ERO.

Como nos refere Bourg (2001), durante uma situação de stress oxidativo, os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, protectores da célula, não conseguem controlar o equilíbrio, comprometendo deste modo a homeostasia da célula. Como consequência, os alvos da acção oxidativa são os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos (Çakatay et al., 2003; Parise et al., 2005; Viitala et al., 2004).

Sendo essencialmente na mitocôndria que as ERO são produzidas, a cadeia transportadora de electrões é considerada a principal fonte de oxidantes no músculo esquelético, durante a realização de exercício agudo prolongado (Bejma e Ji, 1999; Chang et al., 2006).

O stress oxidativo provocado pelo exercício induz diferentes tipos de resposta, que parece estar relacionada com o tipo de tecido estudado e com os níveis de antioxidantes (Vancini et al., 2005). Estes autores referem ainda

que os danos associados ao stress oxidativo, induzidos pelo exercício intenso, estão relacionados com a diminuição do desempenho físico e com a fadiga e danos musculares, podendo mesmo chegar a atingir o síndrome de sobre-treino, provocando alterações no sistema imunológico e na performance dos indivíduos. De facto, sabe-se que o sobre-treino é lesivo para o organismo e pode resultar em lesão muscular, devido a um descontrolo da respiração mitocondrial, a um aumento dos marcadores de oxidação proteica e a uma perda da integridade estrutural do retículo sarcoplasmático (Pollack e Leeuwenburgh, 1999).

De uma forma geral, os danos musculares causados pelo stress oxidativo são mais acentuados em indivíduos pouco treinados, que realizam exercícios com intensidade e duração acima do seu nível de condição física (Deaton e Marlin, 2003; Ji, 2002). Por outro lado, a adaptação a esse treino físico pode também ser em parte modulada pela geração de ERO (McArdle et al., 2001). Foi observado por Miyazali et al. em 2001 (para refs ver Vancini et al., 2005) que o stress oxidativo ocasionado pelo exercício agudo intenso pode ser minimizado pela realização de um treino com sobrecargas progressivamente ajustadas, antes dos indivíduos serem submetidos ao stress agudo de alta intensidade.

Por seu lado, o exercício crónico, de intensidade moderada, altera positivamente a homeostasia das células e tecidos, uma vez que diminui os níveis basais de danos oxidativos, e aumenta a resistência ao stress oxidativo, traduzindo assim um grande benefício para a saúde (Di Meo e Venditti, 2001; McArdle et al., 2002). De facto, o exercício regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante (tal como o aumento da actividade da enzima antioxidante SOD), protegendo assim as células contra os efeitos prejudiciais do stress oxidativo, prevenindo danos celulares subsequentes (Gomez-Cabrera et al., 2006; Watson et al., 2005). Assim, e como referem Vancini et al. (2005) e Viña et al. (2001), indivíduos fisicamente activos terão vantagens em comparação aos inactivos, já que o exercício crónico resulta então no aumento da actividade de enzimas antioxidantes e consequentemente do *status* antioxidante.

Concluindo, um grande número de estudos sugere, em conformidade, que a produção de ERO está fortemente relacionada com o exercício intenso, pelo que os seus mecanismos dependem em grande parte da elevação do consumo de O₂. Como consequência, as ERO irão causar danos lipídicos, de proteínas e ADN, entre outros constituintes celulares. Por seu lado, o exercício moderado regular parece proteger o organismo dos efeitos nefastos daquelas substâncias, pelo facto de aumentar a capacidade antioxidante celular, sendo então bastante benéfico para a saúde.

Neste sentido, à parte de todos os benefícios que o exercício crónico poderá acarretar, com este estudo procuramos analisar a magnitude da lesão oxidativa, através da oxidação proteica, induzida por uma situação de exercício agudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra

A amostra foi constituída por 16 ratinhos Charles River CD1 machos, com 10-12 semanas de idade.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com uma temperatura média de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo invertido, tendo acesso livre a água e alimento.

Os 16 animais foram divididos em dois grupos, um experimental e outro de controlo.

Os do grupo experimental realizaram uma corrida num tapete rolante, durante 60 minutos, a uma velocidade de 900 m/h, correspondente a cerca de 70% da velocidade máxima dos animais.

Os do grupo de controlo não realizaram qualquer tipo de exercício físico durante o mesmo período.

3.2. Procedimentos Metodológicos

Logo após a finalização do protocolo experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e sujeitos a todos os procedimentos habituais para a recolha das amostras desejadas.

Posteriormente, e com base no protocolo descrito por Robinson et al. (1999), um determinado volume de homogeneizado de músculo (V) contendo 20 μg de proteína foi derivatizado com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Com essa finalidade, às amostras foi adicionado um volume (1V) de 12% de SDS e dois volumes (2V) de 20mM de DNPH preparada em 10% TFA (ácido trifluoracético), seguindo-se a sua incubação no escuro. Após este período, procedeu-se à neutralização com 1,5 volumes (1,5V) de 2 M de Tris e 18% de β -mercaptoetanol. Um controlo negativo foi simultaneamente preparado para cada amostra. Após a diluição das amostras numa solução de TBS de forma a

obter uma concentração final de $0.001\mu\text{g}/\mu\text{L}$, transferiu-se um volume de $100\mu\text{L}$ por *slot-blot* para uma membrana de Hybond-PVDF. Procedeu-se ao bloqueamento dos locais de ligação não específica com uma solução de 5% leite em pó magro em TBS-T (tampão de Tris 100 mM pH 8,0 com NaCl 1,5 mM e 0,5% de Tween 20) durante toda a noite a 4°C , seguindo-se a incubação da membrana com o anticorpo primário rabbit policlonal anti-DNP (1:2000; n° de catálogo V0401; DakoCytomation) durante 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a membrana com TBS-T afim de retirar o anticorpo não ligado covalentemente e procedeu-se à sua incubação com anticorpo secundário anti-rabbit IgG-Peroxidase (1:2000; Amersham Pharmacia Biotech) por um período de 2 horas. Após novas lavagens com TBS-T, a membrana foi tratada com reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL; Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante, e exposta a um filme de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma).

Depois de revelado, o filme foi digitalizado e analisado no software ImageJ 1.36. Os resultados de densidade óptica foram expressos como percentagem de variação acima dos dados do grupo de controlo.

3.3. Procedimentos Estatísticos

A análise dos resultados compreendeu o cálculo das médias e respectivos desvios padrão, para cada um dos grupos de animais.

Após verificada a normalidade da amostra, realizou-se o teste t de medidas emparelhadas, procurando retirar conclusões sobre as diferenças entre o grupo experimental e grupo de controlo. O nível de significância foi fixado em 5%.

Os resultados foram obtidos em percentagem de variação relativamente ao grupo de controlo (o qual correspondeu a 100%).

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa SPSS 14.0 para o Windows.

4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

As figuras 2 e 3 ilustram as densidades ópticas individuais, nos animais do grupo experimental e controlo, obtidas através da análise das bandas resultantes do *slot-blot*. Estes dados pretendem demonstrar a variação da concentração de grupos carbonilo entre os dois grupos.

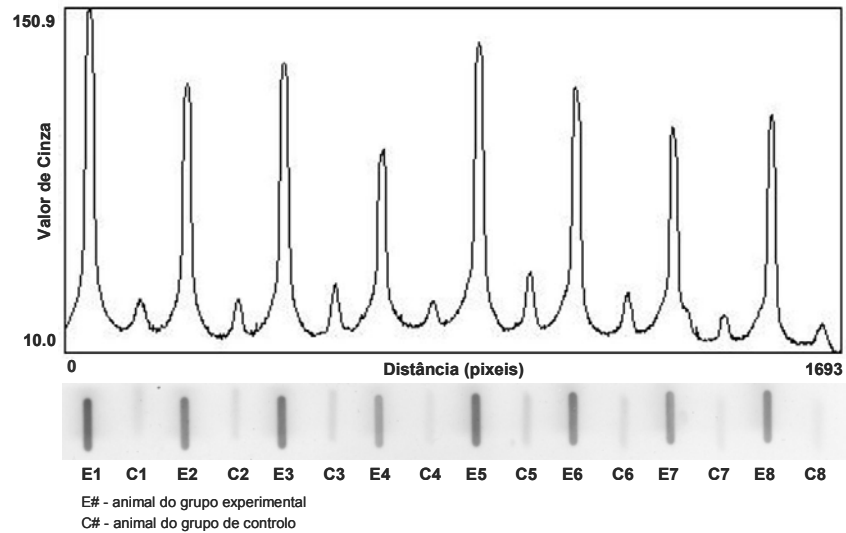


Figura 2 – Valores individuais de densidade óptica dos animais do grupo experimental e controlo e respectivas bandas do *slot-blot* (na região inferior da figura).

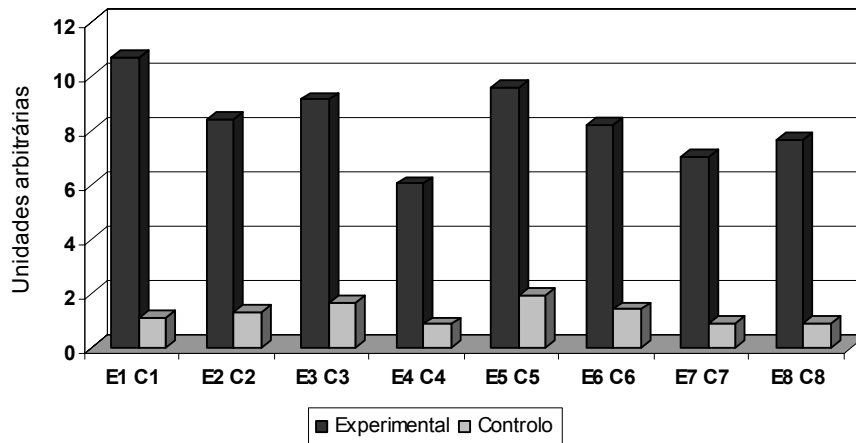


Figura 3 – Valores individuais representativos da concentração de grupos carbonilos dos vários animais.

Através de uma breve observação é possível verificar que de facto existe uma variação muito acentuada da concentração de grupos carbonilo

entre os grupos, pelo que os animais que foram sujeitos ao exercício agudo apresentam indícios de lesão oxidativa significativamente superiores aos do grupo de controlo.

Para uma melhor percepção das diferenças entre a oxidação proteica no músculo *soleus* dos dois grupos de animais, a figura 4 ilustra os valores médios da quantificação das concentrações dos grupos carbonilo, expressas nas bandas resultantes do *slot-blot*.

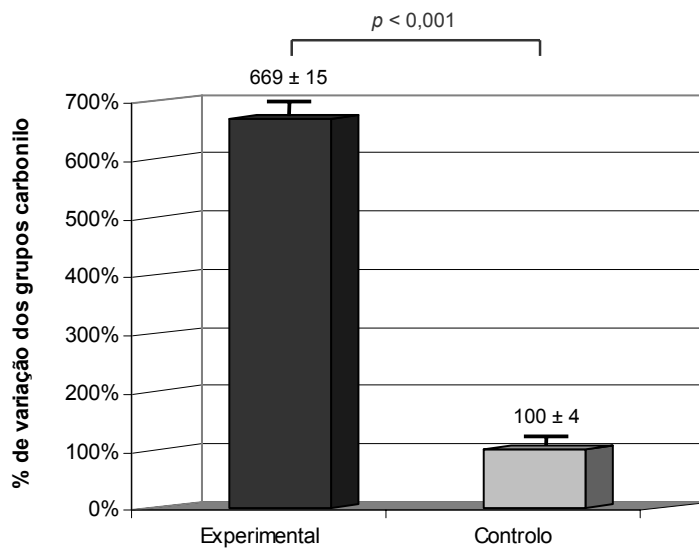


Figura 4 – Valores médios e desvios padrão das percentagens de variação das concentrações de grupos carbonilo no grupo experimental e controlo.

Após uma comparação em termos médios, pode verificar-se que de facto há uma diferença bastante considerável entre a concentração de grupos carbonilo dos dois grupos. Isto significa que a situação de exercício agudo induziu realmente uma grande lesão de proteínas nos animais que o realizaram.

Através do teste t de medidas emparelhadas foi possível verificar que estas diferenças apresentaram um valor de p inferior a 0,001. Assim, pode afirmar-se que a situação de exercício a que os animais foram sujeitos induziu um stress oxidativo tal que foi capaz de provocar uma significativa lesão de proteínas no tecido muscular esquelético.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objectivo analisar, no músculo *soleus* dos animais, a lesão proteica resultante do aumento de stress oxidativo, induzido por uma situação de exercício agudo. Neste sentido, o estudo pretende auxiliar a compreensão sobre a forma como o exercício pode induzir, de forma aguda, a oxidação de proteínas dos seres vivos, nomeadamente no tecido muscular esquelético.

5.1. Discussão da Metodologia

Foram utilizados animais do mesmo sexo, tanto para o grupo experimental como de controlo, para garantir a homogeneidade da amostra. O facto de todos eles serem do sexo masculino está relacionado com a baixa concentração de estrogénios, uma vez que elevadas concentrações desta hormona podem oferecer alguma resistência à formação de ERO (Baba et al., 2005; Viitala et al., 2004), nomeadamente do H_2O_2 , o que poderia influenciar os resultados do nosso estudo.

Seleccionámos a corrida para a realização deste estudo, uma vez que estes animais possuem relativa facilidade em fazê-lo, e também porque é uma metodologia que já foi utilizada com sucesso por vários autores em diferentes estudos (Bejma e Ji, 1999; Duarte et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2006; Liu et al., 2000).

Para investigar o significado do stress oxidativo e das ERO na agressão ao organismo, é necessário a utilização dos indicadores mais adequados a cada situação. Quando se pondera utilizar os lípidos, o ADN ou as proteínas para analisar o dano induzido pelo stress oxidativo, a natureza das ERO terá um significado importante, até porque determinadas ERO são mais susceptíveis de induzir lesão oxidativa do ADN ou peroxidação lipídica, do que propriamente modificação de proteínas. Contudo, como os produtos resultantes da lesão oxidativa das proteínas são relativamente estáveis, e

existem metodologias rigorosas para a sua detecção, eles são considerados bons marcadores de lesão oxidativa (Çakatay et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2003).

A utilização dos grupos carbonilo como marcadores de stress oxidativo é vantajosa devido à sua estabilidade química, que faz com que sejam elementos apropriados para medições laboratoriais, sendo ainda fácil de armazenar as amostras, para posterior utilização e estudo (Dalle-Donne et al., 2003). Segundo os autores referidos, bem como Çakatay (2003), Chang et al. (2006) e Wei et al. (2006), apesar dos grupos carbonilo não serem específicos de um certo aminoácido, os seus níveis têm sido frequentemente utilizados como indicadores gerais de lesão proteica.

Para a determinação e quantificação das proteínas oxidadas, utilizámos o método de *slot-blot* que, segundo Dalle-Donne et al. (2003) e Robinson et al. (1999), é adequado para o fazer de forma experimental. Segundo os mesmos autores, uma das vantagens deste método é o facto de não ser muito dispendioso em termos de equipamento e ser bastante rigoroso e fiável. Contudo, como desvantagem temos o facto de que não fornece qualquer informação relativa à extensão dos danos oxidativos a uma determinada proteína em particular (Dalle-Donne et al., 2003).

Ao nível da estatística inferencial foi utilizado o teste t de medidas emparelhadas, com a finalidade de comparar as diferenças de concentração de grupos carbonilo entre o grupo experimental e o de controlo.

Apesar da amostra ter um n inferior a 25, verificou-se a sua normalidade, pelo que foi aplicada esta medida paramétrica para analisar os resultados.

5.2. Discussão dos Resultados

Tal como referimos na revisão da literatura, devido ao aumento do consumo de O₂, uma situação de exercício agudo induz uma produção acrescida de ERO, capaz de provocar no organismo uma situação de stress

oxidativo (Aguiló et al., 2004; Ji, 2002; Mota et al., 2004; Nohl et al., 2005; Vancini et al., 2005; Yu e Chung, 2006). Por sua vez, este fenómeno irá traduzir lesão ao nível do ADN, dos lípidos e das proteínas (Dalle-Donne et al., 2003; Friguet, 2006; Linton et al., 2001; Remmen et al., 2003; Selman et al., 2002). Assim, e de acordo com a revisão realizada, os resultados deste estudo apontam então para o facto de uma situação de exercício agudo aumentar os níveis de produção das ERO, devido a uma maior oxidação dos substratos energéticos e consequente aumento do consumo de O₂.

De facto, as diferenças obtidas neste estudo revelam que apenas uma hora de exercício induz adaptações agudas capazes de provocar uma grande lesão ao nível das proteínas do tecido muscular esquelético.

Os resultados que obtivemos vão ao encontro do que está referido pela maioria dos autores consultados, como Aguiló et al. (2004), Berlett e Stadtman (1997), Çakatay et al. (2003), Dalle-Donne et al. (2003), Ehrenbrink et al. (2006), Friguet (2006), Linton et al. (2001), McArdle et al. (2002) e Radák et al. (2000a), que referem que situações de stress induzem um aumento no nível de lesão de proteínas. Outros autores como Chang et al. (2006), Ji (2002), Liu et al. (2000), Radák et al. (2000b) e Urso e Clarkson (2003), entre outros, foram mais além e compararam também estes efeitos com as adaptações crónicas resultantes da prática regular de exercício físico. Assim concluíram que, se a nível agudo o exercício provoca uma grande agressão no organismo, ao mesmo tempo, se for praticado regularmente, irá induzir adaptações crónicas capazes de minimizar essa mesma agressão. Gomez-Cabrera et al. (2006) chegaram mesmo a afirmar que os animais sujeitos a um treino regular mostraram um dano oxidativo menor, após uma situação de exercício intenso, do que os animais que não treinaram.

Segundo Dalle-Donne et al. (2003), Ehrenbrink et al. (2006) e Friguet (2006), actualmente, um dos maiores desafios na pesquisa sobre stress oxidativo diz respeito à identificação específica das proteínas oxidadas em determinada doença. Para os autores referidos, tal facto justifica-se porque os danos oxidativos conduzem frequentemente à perda da função específica das proteínas.

A relação entre oxidação proteica, disfunção proteica e doença, permanece ainda muito incerta. Contudo, sabe-se que as modificações oxidativas das enzimas e da estrutura das proteínas podem ter um papel significativo na etiologia das doenças (Dalle-Donne et al., 2003).

Segundo o autor supracitado, o progresso rápido na identificação específica das proteínas oxidadas e elucidação dos mecanismos de oxidação proteica forneceria conhecimentos adicionais sobre a importância do stress oxidativo nas doenças humanas.

Com o objectivo de aprofundar um pouco mais o conhecimento nesta área de investigação, seria interessante realizar um estudo com pressupostos e objectivos semelhantes a este, mas que incluísse mais dois grupos de animais treinados – um sujeito a uma situação de exercício agudo e outro não. Assim, seria possível comparar as respostas agudas de indivíduos sedentários e treinados, fazendo deste modo um paralelismo entre as adaptações agudas e crónicas do exercício, procurando então saber se ao nível da lesão de proteínas as diferenças são ou não significativas.

6. CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos, é possível retirar as seguintes conclusões:

- Mesmo em repouso há formação de grupos carbonilo, e portanto lesão de proteínas, resultante do fenómeno de stress oxidativo;
- Numa situação de exercício agudo há uma produção acrescida de grupos carbonilo, reflectindo assim uma significativa lesão de proteínas do tecido muscular esquelético.

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, S., GREEN, P., CLAXTON, R., SIMCOX, S., WILLIAMS, M., WALSH, K., e LEEUWENBURGH, C. (2001). Reactive Carbonyl Formation by Oxidative and Non-Oxidative Pathways. *Frontiers in Bioscience*, 6, 17-24.

AGUILÓ, A., TAULER, P., FUENTESPINA, E., TUR, J., CÓRDOVA, A., e PONS, A. (2004). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*, 84, 1 –7.

AMES, B., SHIGENAGA, M., e HAGEN, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915-7922.

ASCENSÃO, A., MAGALHÃES, J., SOARES, J., FERREIRA, R., NEUPARTH, M. J., APPELL, H., e DUARTE, J. (2005). Cardiac Mitochondrial Respiratory Function and Oxidative Stress: The Role of Exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 26, 258-267.

ASCENSÃO, A., MAGALHÃES, J., SOARES, J., OLIVEIRA, J., e DUARTE, J. (2003). Exercício e Stress Oxidativo Cardíaco. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 22(5), 651-678.

BABA, T., SHIMIZU, T., SUZUKI, Y.-i., OGAWARA, M., ISONO, K.-i., KOSEKI, H., KUROSAWA, H., e SHIRASAWA, T. (2005). Estrogen, Insulin, and Dietary Signals Cooperatively Regulate Longevity Signals to Enhance Resistance to Oxidative Stress in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16417–16426.

Barja, G. (2004). Free Radicals and Aging. *Trends in Neurosciences*, 27(10), 595-600.

- BECKMAN, K., e AMES, B. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Review*, 78(2), 547-581.
- BEJMA, J., e Ji, L. (1999). Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 87(1), 465-470.
- BERLETT, B., e STADTMAN, E. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- BOURG, É. (2001). Oxidative Stress, Aging and Longevity in *Drosophila Melanogaster*. *FEBS Letters*, 498, 183-186.
- CADENAS, E., e DAVIES, K. (2000). Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 222-230.
- ÇAKATAY, U., AYSEGÜL, T., KAYALI, R., TEKELI, F., AKÇAY, T., e SIVAS, A. (2003). Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clinical Biochemistry*, 36, 51-55.
- CECONI, C., BORASO, A., CARGNONI, A., e FERRARI, R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 420, 217-221.
- CHANG, C.-K., HUANG, H.-Y., TSENG, H.-F., HSUUW, Y.-D., e Tso, T. (2006). Interaction of vitamin E and exercise training on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscles. *Journal of Nutrition Biochemistry*.
- CLARKSON, P., e THOMPSON, H. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinic Nutrition*, 72, 637S-646S.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., e COLOMBO, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38.

DEATON, C., e MARLIN, D. (2003). Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(3), 278-291.

DI MAURO, S. (1999). Exercise intolerance and the mitochondrial respiratory chain. *Italian Journal of Neurological Sciences*, 20, 387-393.

DI MEO, S., e VENDITTI, P. (2001). Mitochondria in Exercise-Induced Oxidative Stress. *Biol Signals Recept*, 10, 125-140.

DUARTE, J., LEÃO, A., MAGALHÃES, J., ASCENSÃO, A., BASTOS, M., AMADO, F., VILARINHO, L., QUELHAS, D., APPELL, H., e CARVALHO, F. (2005). Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle damage in mice. *Toxicology*, 206, 349-358.

EHRENBRINK, G., HAKENHAAR, H., SALOMON, T., PETRUCCI, A., SANDRI, M., e BENFATO, M. (2006). Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. *Experimental Gerontology*, 1-4.

EVANS, W. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American Journal of Clinic Nutrition*, 72, 647S-657S.

FRIGUET, B. (2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Letters*.

GASTELL, P., e ALEJO, J. (2000). Métodos para Medir el Daño Oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198.

GOLDEN, T., e MELOV, S. (2001). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 1577–1589.

GOMEZ-CABRERA, M.-C., DOMENECH, E., JI, L., e VIÑA, J. (2006). Exercise as an antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. *Science & Sports*, 21, 85-89.

Ji, L. (1999). Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. 222.

Ji, L. (2002). Exercise-induced Modulation of Antioxidant Defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 82-92.

KOURY, J., e DONANGELO, C. (2003). Zinco, estresse oxidativo e actividade física. *Revista de Nutrição*, 16(4), 433-441.

LAWER, J., e POWERS, S. (1998). Oxidative stress, antioxidant status, and the contracting diaphragm. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 23(1), 23-55.

LEEUWENBURGH, C., HANSEN, P., HOLLOSZY, J., e HEINECKE, J. (1999). Hydroxyl Radical Generation During Exercise Increases Mitochondrial Protein Oxidation and Levels of Urinary Dityrosine. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 186-192.

LEEUWENBURGH, C., e HEINECKE, J. (2001). Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 829-838.

LINTON, S., DAVIES, M., e DEAN, R. (2001). Protein Oxidation and Ageing. *Experimental Gerontology*, 36, 1503-1518.

LIU, J., YEO, H., OLIVERVIK-DOUKI, E., HAGEN, T., DONIGER, S., CHU, D., BROOKS, G., e AMES, B. (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of Applied Physiology*, 89, 21-28.

MCARDLE, A., PATTWELL, D., VASILAKI, A., GRIFFITHS, R., e JACKSON, J. (2001). Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptative responses. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280, C621-C627.

MCARDLE, A., VASILAKI, A., e JACKSON, M. (2002). Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 1, 79–93.

MELOV, S. (2002). Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *The Internation Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 1395-1400.

MIRANDA, E., CAPOTE, K., JANER, N., e MARTÍ, N. (2000). Un acercamiento a la teoria de los radicales librés y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Revista Cubana de Investigacion Biomédica*, 19(3), 186-190.

MOTA, M., FIGUEIREDO, P., e DUARTE, J. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 4(1), 81-110.

NOHL, H., GILLE, L., e STANIEK, K. (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 69, 719–723.

Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal of Sports Sciences*, 15, 353-363.

PARISE, G., BROSE, A., e TARNOPOLSKY, M. (2005). Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. *Experimental Gerontology*, 40, 173–180.

PÉREZ, D., e MUGUERCIA, H. (2000). Medicina Crítica y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana de Investigacion Biomédica*, 19(3), 196-198.

POLIDORI, M., MECOCCI, P., CHERUBINI, A., e SENIN, U. (2000). Physical Activity and Oxidative Stress During Aging. *International Journal of Sports Medicine*, 21, 154-157.

POLLACK, M., e LEEUWENBURGH, C. (1999). Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise, Part X*(Chapter 30), 881-923.

POWERS, S., DERUISSEAU, K., QUINDRY, J., e HAMILTON, K. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22, 81-94.

RADÁK, Z., SASVÁRI, M., NYAKAS, C., PUCSOK, J., NAKAMOTO, H., e GOTO, S. (2000a). Exercise Preconditioning Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Proteins of Rat Myocardium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(2), 248-251.

RADÁK, Z., SASVÁRI, M., NYAKAS, C., TAYLOR, A., OHNO, H., NAKAMOTO, H., e GOTO, S. (2000b). Regular Training Modulates the Accumulation of Reactive Carbonyl Derivates in Mitochondrial and Cytosolic Fractions of Rat Skeletal Muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(1), 114-118.

REMMEN, H., HAMILTON, M., e RICHARDSON, A. (2003). Oxidative Damage to DNA and Aging. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 31(3), 149–153.

ROBINSON, C., KESHAVARZIAN, A., PASCO, D., FROMMEL, T., WINSHIP, D., e HPLMES, E. (1999). Determination of Protein Carbonyl Groups by Immunoblotting. *Analytical Biochemistry*, 266, 48-57.

RODRÍGUEZ, M. (2005). *El ejercicio físico moderado como reductor de la formación de radicales libres consecuencia del estrés*. Universidad de Cádiz.

SELMAN, C., MCLAREN, J., COLLINS, A., DUTHIE, G., e SPEAKMAN, J. (2002). Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401, 255-261.

SEN, C. (2001). Antioxidants in Exercise Nutrition. *Sports Medicine*, 31(13), 891-908.

TONKONOJI, M., WALSH, B., SVENSSON, M., e SAHLIN, K. (2000). Mitochondrial function and antioxidant defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *Journal of Physiology*, 528(2), 379-388.

URSO, M., e CLARKSON, P. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189, 41-54.

VANCINI, R., LIRA, C., ABOULAFIA, J., e NOUAILHETAS, V. (2005). Radical livre, estresse oxidativo e exercício. *Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Paulo*.

VENDITTI, P., e MEO, S. (1996). Antioxidants, Tissue Damage, and Endurance in Trained and Untrained Young Male Rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331(1), 63-68.

VIITALA, P., NEWHOUSE, I., LAVOIE, N., e GOTTARDO, C. (2004). The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids in Health and Disease*, 3(14), 1-9.

VIÑA, J., GOMEZ-CABRERA, M.-C., LLORET, A., MARQUEZ, R., MIÑANA, J., PALLARDÓ, F., e SASTRE, J. (2001). Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. *IUBMB Life*, 50, 271-277.

WATSON, T., MACDONALD-WICKS, L., e GARG, M. (2005). Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 15(2), 131-146.

WEI, Q.-Y., CHEN, W.-F., ZHOU, B., YANG, L., e LIU, Z.-L. (2006). Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochimica et Biophysica, Acta* 1760, 70-77.

YU, B., e CHUNG, H. (2006). Adaptative mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127, 436-443.