

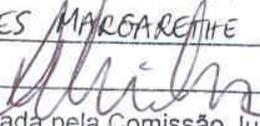
V i e w m e t a d a t a , c i t a t i b o r n o C u O
p r o v i d e d

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD



Agnes Margarethe Molnar

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E ESTRESSE OXIDATIVO MUSCULAR
INDUZIDOS POR UM TREINAMENTO FÍSICO: INFLUÊNCIA DO
EXERCÍCIO EXCÊNTRICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS
OMEGA-3**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
AGNES MARGARETHE MOLNAR

e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese em Cotutela apresentada ao
Instituto de Biologia para obtenção
do Título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular, na área de
Bioquímica.**

Orientador (Unicamp): Prof. Dra. Lucia Pereira da Silva

Orientador (Université Claude Bernard): Prof. Dr. Roland Favier

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M738a **Molnar, Agnes Margarethe**
Alterações mitocondriais e estresse oxidativo muscular induzidos por um treinamento físico: influência do exercício excêntrico e da suplementação com ácidos graxos Ômega-3 / Agnes Margarethe Molnar. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Lucia Pereira da Silva.

Co-orientador: Roland Favier.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. Exercício físico. 2. Mitocôndria. 3. Músculo. 4. Peróxido de hidrogênio. 5. Ácidos graxos Omega-3. I. Lucia Pereira da Silva. II. Roland Favier. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 8 de março de 2005

Banca Examinadora:

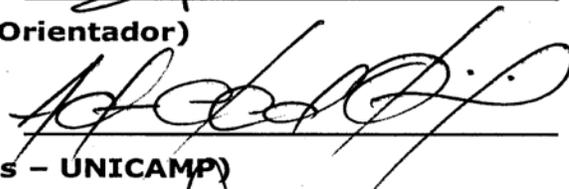
Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva
(IB – UNICAMP – Orientador)



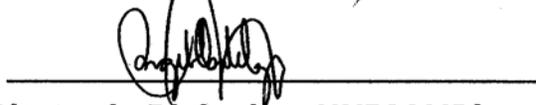
Prof. Dr. Roland Favier
(Université Claude Bernard – Lyon 1 - Orientador)



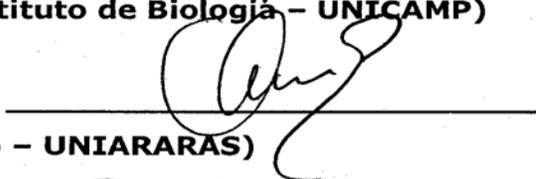
Prof Dr. Admar Costa de Oliveira
(Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP)



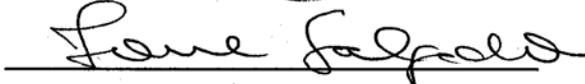
Prof Dr. Ângelo Cortelazzo
(Departamento de Biologia Celular - Instituto de Biologia – UNICAMP)



Prof Dr Armindo Antônio Alves
(Centro Universitário Hermínio Ormetto – UNIARARAS)



Prof Dra Ione Salgado
(Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia – UNICAMP)



Suplentes:

Prof Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch
(Departamento de Fisiologia – Instituto de Biologia – UNICAMP)



Prof Dra. Denise Vaz de Macedo
(Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia – UNICAMP)



***"Quando nada parece ajudar
eu vou ver o cortador de pedra martelando,
cortando sua rocha cem vezes,
sem que uma só rachadura apareça.
No entanto, na centésima primeira martelada
a pedra se abre em duas,
e eu sei que não foi aquela que conseguiu mas,
todas que vieram antes".***

(Jacob Rüs)

*Ao Clément,
qui m'a soutenu dans les moments difficiles et que j'aime tellement.*

Ao meu pai, Sandor Molnar Júnior (In Memorium)

*A minha mãe, Dalva de Paula Molnar,
a minha maior fonte de inspiração, energia e perseverança.*

*A minha irmã, Eva, e minha sobrinha, Malu,
razões de tantas preocupações e de tantas alegrias.*

A toda minha família, seja ela brasileira ou francesa.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores, Dr. Armindo Antônio Alves, Dra. Fernanda Ramos Gadelha e Dra. Denise Vaz de Macedo pela contribuição e sugestões no exame de qualificação.

Aos Professores, Dr. Admar Costa de Oliveira, Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo e Dra Ione Salgado por aceitarem participar da banca examinadora de tese.

A Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo pela co-orientação, pelas correções no final deste percurso e pela paciência durante esses longos 14 anos de UNICAMP.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva por aceitar a orientação deste trabalho nas dadas condições e pela contribuição na correção e Prof. Dr. Roland Favier “de m’avoir accepté au sein de son laboratoire sans connaître ma formation précédente et aussi de m’avoir fait confiance pendant ces 4 années. MERCI”

Aos Profs. Michel Guichardant, Michel Lagarde, Jacques Portoukalian e Iuliana Popa pela assistência na realização de todas as análises de composição lipídica.

Aos Profs. Claude Duchamp e Jean Marc Pequignot por terem disponibilizado os respectivos laboratórios para o término deste trabalho.

Ao Prof Xavier Bigard por ter disponibilizado a esteira rolante de seu laboratório num momento de apuro.

A Dominique Desplanches, Harry Koubi, Jean Louis Rouanet, Guy, Marie Helène Sornay pela recepção calorosa no laboratório e pela colaboração.

A Stephane Servais pela amizade, pelas infindáveis discussões científicas e pela companhia na bancada (GRAND MERCI)

Aos colegas da Faculdade de Medicina (Rockefeller): Jacqueline, Jean-Marie, Rose-Marie, Annick et Christophe pela colaboração.

Aos colegas do LBFA: Karine, Hervé, Blandine, Pascaline, Manu, Seb, Stéphane e todos aqueles que eu possa ter esquecido involuntariamente, un grand merci pelo companheirismo e pela convivência tão agradável e lúdica.

Aos colegas do 4° andar (batiment Raphael Dubois): Stephane, Brigitte, Caro, Marie Therèse, Benjamin, Maud e Yann pelo dinamismo, pelos momentos de convivência sempre agradáveis e é claro pelas profundas discussões científicas.

Aos colegas do LABEX: Daniel, Fernanda, Fernando, Lucas, Rodrigo, Paulo e outros pela colaboração.

A todos meus amigos e colegas do Departamento de Bioquímica - UNICAMP.

A Marina e Andréia, agradeço a amizade e a ajuda administrativa de todos os momentos.

Às sempre amigas, Thaís, Duda, Lígia, Silvinha, Giovana e Bila pelo carinho, pelos pensamentos positivos e pelo Reiki.

Ao meu grande amigo Joaquim (Netho), obrigada pela força em todos os momentos difíceis.

Ao Cláudio pelas profundas discussões científicas e pela amizade.

A Patrícia, Maristella, Daniel, Gláucia e outros, agradeço a sincera amizade e os bons momentos passados.

A todos aqueles que de alguma forma participaram deste trabalho por pensamento, através de palavras e que por um descuido não tenha citado aqui.

Aos meus amigos franco-brasileiros ou brasilio-franceses...Silene, Paul, Sidélia, Marcos, Luciana, Loic, Ana e Edmundo por todo carinho e pela amizade sincera.

A CAPES pelo financiamento para a realização deste trabalho e a oportunidade de realizar o estágio sanduíche.

Índice

Índice	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo.....	xi
Resumé.....	xii
Abstract	xiii
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
INTRODUÇÃO.....	5
OBJETIVOS	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
ESTUDO I	44
ESTUDO II	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE A TESE	97

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADP:	adenosina-5'-difosfato
AMP:	adenosina-5'-monofosfato
ANT:	adenina nucleotídeo translocase
AP-1:	proteína ativadora (AP)-1
ARA:	ácido araquidônico
ATP:	adenosina- 5'-trifosfato
BSA:	soro de albumina bovina
CAT:	catalase
CI:	controle interno
CK:	creatina quinase
CLM:	cadeia leve de miosina
CMC:	carboximetilcelulose
CCOX:	citocromo c oxidase
COX:	ciclooxigenase
CPM:	cadeia pesada de miosina
CR:	controle respiratório
CS:	citrato sintase
CTE:	cadeia de transporte de elétrons
Cu, Zn-SOD:	superóxido dismutase cobre-zinco dependente
DCFH:	2'-7'-diclorofluoresceína
DHA:	ácido docosahexaenóico
DNA:	ácido desoxirribonucléico
DO:	densidade óptica
DOM:	dor muscular tardia
DTNB:	ácido 5', 5-ditiobis (2-nitrobenzoico)
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etilenodiamina tetraacético
EE:	etiléster
EP:	erro padrão
EPA:	ácido eicosapentaenóico
EPR:	" <i>electron paramagnetic resonance</i> "- ressonância paramagnética eletrônica
ERN:	espécies reativas de nitrogênio
EROS:	espécies reativas de oxigênio
FAD(H₂):	flavina adenina dinucleotídeo oxidado (reduzido)
FMN:	flavina mononucleotídeo
GPx:	glutaciona peroxidase
GSH:	glutaciona reduzida
GPx-PH:	GPx fosfolipídeo-hidroperóxido
GSSG:	glutaciona oxidada
HPTLC:	" <i>high performance thin-layer chromatography</i> "
HSP:	" <i>heat shock protein</i> " - proteínas de estresse
HVA:	ácido homovanílico
IL-6:	interleucina-6
IMP:	inosina monofosfato

LDH:	lactato desidrogenase
MC:	massa corporal
MDA:	malondialdeído
Mn-SOD:	superóxido dismutase dependente de manganês
mtDNA:	ácido desoxirribonucléico mitocondrial
MUFA:	ácidos graxos monoinsaturados
NAD(H):	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (reduzido)
NADP(H):	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado (reduzido)
NF-κB:	fator nuclear kappa-B
NOS:	óxido nítrico sintase
OAA:	oxaloacetato
PBS:	<i>"phosphate buffered saline"</i>
PC:	fosfatidilcolina
PC:	fosfocreatina
PE:	fosfatidiletalona
PFK:	fosfocreatina quinase
PUFA:	ácidos graxos poliinsaturados
RNA_m:	ácido ribonucléico mensageiro
SDS-Page:	<i>"sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis"</i>
TBARS:	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TIM e TOM:	<i>complexos de transporte da membrana interna e externa das mitocôndrias</i>
TMPD:	tetrametil-p-fenilenodiamina
TNF-α:	fator de necrose tumoral
TRAP:	trietanolamina
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano
UCP:	<i>"uncoupling protein"</i> , proteínas desacopladoras
VO₂:	consumo de oxigênio
XDH:	xantina desidrogenase
XO:	xantina oxidase
ω-3:	ácidos graxos poliinsaturados omega-3 ou n-3

Resumo

Nosso trabalho consistiu em avaliar as alterações no funcionamento e estrutura de mitocôndrias de músculo de ratos (consumo de oxigênio, produção de H_2O_2 e composição lipídica) em diferentes situações de exercício físico (treinamento intermitente excêntrico ou concêntrico e/ou exercício agudo excêntrico) e após uma suplementação em ácidos graxos Ômega-3. Foram também analisadas as atividades de diferentes enzimas antioxidantes (catalase - CAT, glutathiona peroxidase - GPx e superóxido dismutase dependente de manganês - Mn-SOD) e o conteúdo em HSP72 muscular nestas mesmas situações. O treinamento físico excêntrico e concêntrico induziu aumento da atividade de enzimas oxidativas (citrato sintase - CS ou citocromo c oxidase - CCOX) o que também foi observado no consumo de oxigênio por mitocôndrias. Já a produção de H_2O_2 diminuiu ou tendeu a diminuir dependendo do tipo do treinamento e do substrato utilizado. A atividade das enzimas antioxidantes não foi alterada após os dois tipos de treinamento. Após o exercício agudo excêntrico observou-se também a diminuição na produção de H_2O_2 de mitocôndrias, porém sem alteração do consumo de oxigênio e com diminuição paralela da atividade da Mn-SOD. Após suplementação em Ômega-3 o funcionamento das mitocôndrias não foi alterado, apenas sua composição lipídica apresentou modificações. Quando a suplementação em Ômega-3 foi associada ao treinamento físico, apenas durante 15 dias, a concentração em proteínas das mitocôndrias apresentou-se 50% menor que nos demais grupos e os parâmetros respiratórios e de produção de H_2O_2 estavam diminuídos. Concluindo o mecanismo pelo qual a produção de H_2O_2 foi diminuída parecendo ser diferente após treinamento ou exercício agudo excêntricos. O primeiro parece estar relacionado com o desacoplamento das mitocôndrias e o segundo com a diminuição da atividade da Mn-SOD. A suplementação sozinha não produziu efeitos prejudiciais para o músculo, porém sua associação com uma situação onde a produção de EROS poderia estar elevada, o exercício físico, causou prejuízos.

Resumé

Dans ce travail nous avons étudié les altérations du fonctionnement des mitochondries de muscles de rats (consommation d'oxygène, production d' H_2O_2 et composition lipidique) dans différentes situations d'exercice (entraînement et/ou exercice aigu), ainsi qu'après une supplémentation en acides gras Omega-3. L'activité des enzymes antioxydants (catalase - CAT, glutathion peroxydase - GPx et superoxyde dismutase mitochondriale - Mn-SOD) et le contenu en HSP72 musculaires étaient aussi évalués. L'entraînement physique excentrique ou concentrique a induit une augmentation de la capacité oxydative à travers l'élévation de l'activité des enzymes oxydantes (citrate synthase - CS et cytochrome c oxydase - CCOX) parallèle à une augmentation de la consommation d'oxygène. La production d' H_2O_2 est diminuée ou tend à diminuer selon l'entraînement réalisé et le substrat utilisé. L'activité des enzymes antioxydants n'était pas changée après les deux entraînements. Après l'exercice aigu excentrique nous avons aussi observé une diminution de la production d' H_2O_2 parallèle à la diminution de l'activité de la Mn-SOD, cependant sans modification de la consommation d'oxygène. Dans une autre étude la supplémentation en acides gras Omega-3 n'a pas modifié le fonctionnement des mitochondries, seulement leur composition lipidique était modifiée. Après l'association de la supplémentation en Omega-3 avec l'entraînement physique, pendant 15 jours, la concentration en protéines était diminuée en 50% par rapport les autres groupes et les paramètres respiratoires et de production d' H_2O_2 étaient aussi diminués. En conclusion, le mécanisme par lequel la production d' H_2O_2 était diminuée après l'entraînement et l'exercice aigu semblerait être différent dans les deux cas. Le premier semble être lié à un léger découplage des mitochondries et le deuxième à la diminution de l'activité de la Mn-SOD. Dans la deuxième étude, la supplémentation toute seule n'a pas produit des effets délétères sur le muscle, tandis que son association avec l'exercice (entraînement), situation où la production de ROS peut être augmenté, était préjudicielle.

Abstract

The present study was designed to investigate modifications on mitochondrial function and structure (oxygen consumption, H_2O_2 production and fatty acid composition) in different situations of exercise and after Omega-3 fatty acid supplementation. Activities of antioxidant enzymes (catalase - CAT, glutathion peroxidase - GPx and manganese dependent superoxide dismutase - Mn-SOD) and HSP72 content level were also analysed of muscle in the same situations. Eccentric or concentric training induced elevation of oxidative enzymes (citrate synthase - CS and cytochrome c oxidase - CCOX) parallel to increased oxygen consumption. H_2O_2 production in mitochondria was diminished depending of the type of training and the substrat used. Antioxidant enzymes activities were not significantly changed after two types of training. Acute eccentric exercise induced decreased H_2O_2 production and reduced activity of Mn-SOD was also observed, however oxygen consumption was not modified. In the second study, Omega-3 fatty acid supplementation did not induce modification on mitochondrial function, however fatty acid composition was changed. After association of Omega-3 fatty acid supplementation with training, only for 15 days, mitochondria protein concentration was reduced in 50% compared to other groups, respiratory parameters and H_2O_2 production were paralleled diminished. In conclusion, mechanisms involved in H_2O_2 production after training and acute exercise seem to be different in theses two situations; in the first it seems to be related to mitochondria mild uncoupling and in the second to reduced Mn-SOD activity. Omega-3 fatty acid supplementation alone does not induce undesired effects on muscle mitochondria function, however when it was associated to training, a situation where ROS production could be elevated, it caused prejudice to muscle mitochondria.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. CÉLULAS MUSCULARES E SUAS CARACTERÍSTICAS

A musculatura esquelética representa grande parte 40% de nossa massa corporal, outros 5 a 10% correspondem às musculaturas lisa e cardíaca. Uma célula muscular simples é denominada fibra muscular (WILLMORE; COSTILL, 1999). As fibras musculares podem apresentar um diâmetro de 10 a 80 μm e se estendem por todo comprimento do músculo. Diversas fibras musculares podem ser inervadas por apenas um neurônio motor e esse conjunto constitui a unidade motora.

Cada fibra muscular é constituída de inúmeras miofibrilas, que são longos cilindros alongados no comprimento de cada célula. Uma miofibrila é composta de vários sarcômeros em série que se repetem entre as bandas Z. O sarcômero é a unidade funcional ou contráctil das miofibrilas, sendo essencial para a transmissão de força durante a contração muscular. Eles possuem estruturas menores chamadas miofilamentos, responsáveis pela contração muscular. Dentre eles temos o complexo troponina-tropomiosina e a actina, constituintes do filamento fino e a miosina, constituinte do filamento grosso (GUNNING; HARDEMAN, 1991). Existem ainda as proteínas citoesqueléticas, dentre elas a titina, desmina e distrofina, que estabilizam as proteínas contráteis e permitem a transmissão da tensão lateralmente e longitudinalmente (MORGAN; ALLEN, 1999). A manutenção da integridade do citoesqueleto é fundamental para contração muscular.

No interior do sarcoplasma estão presentes os túbulos transversos (Túbulos T), responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos do sarcolema para a miofibrila, o retículo sarcoplasmático, que contém um estoque do íon cálcio, indispensável para o mecanismo de contração muscular, além de outras organelas como as mitocôndrias.

1.1. Fibras musculares

Os músculos, apesar de serem constituídos de células com características gerais semelhantes apresentam diferenças morfológicas e funcionais que garantem sua alta plasticidade. Segundo Schiaffino e Reggiani (1994), a diversidade funcional e estrutural do músculo esquelético é reflexo da variedade de isoformas de miosina, tanto de cadeia pesada (CPM) quanto de cadeia leve (CLM). As isoformas de cadeia pesada possuem diferentes atividades ATPásicas. Desta forma, as CPM têm seu papel associado ao consumo de ATP e ao custo da tensão isométrica (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994). Já as isoformas CLM parecem ter um papel importante na velocidade máxima de encurtamento do músculo (THOMASON; BALDWIN; HERRICK, 1986).

As fibras musculares foram inicialmente classificadas em lentas ou rápidas, com base na reação histoquímica da ATPase da miosina (mATPase). Assim, a velocidade de hidrólise do ATP pode ser relacionada à atividade da mATPase e à velocidade de contração muscular (TALMADGE; ROY; EDGERTON, 1993; HARRISON; ROWLERSON; DAUNCEY, 1996). Atualmente, sabe-se que as fibras musculares, além de serem classificadas como lentas ou rápidas, podem apresentar diferenças na velocidade de encurtamento (PETTE, 2002). A Tabela I apresenta as principais características das diferentes fibras musculares.

Tabela I. Principais características funcionais e morfológicas dos dois tipos de músculos (THOMASON; BALDWIN; HERRICK, 1986).

	Músculo	
	Contração rápida	Contração lenta
Fenótipo	Branco	Vermelho
Funcionalidade	Movimentos rápidos de grande força e repetitivos	Movimentos lentos
Fonte de energia	Carboidratos	Carboidratos e lipídeos
Forma de produção de energia	Glicolítica (aeróbica e anaeróbica)	Oxidativa (aeróbica)
Tipo de fibra predominante	CPM IIa / CPM Iib/CPM Iix ou d	CPM I

Existem, também, fibras que coexpressam diferentes genes de CPMs. São fibras que contêm tanto CPM I quanto CPM IIa, CPM IIa e CPM Iix ou CPM Iix e CPMIib, sendo conhecidas como fibras híbridas ou intermediárias. Assim, no músculo extensor digital longo de ratos, por exemplo, pode-se encontrar 11% de fibras IIa puras, 26% de fibras Iix puras, 10% de fibras híbridas IIa/Iix e 20% de fibras híbridas Iix/Iib (DENARDI, et al., 1993; SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994). A proporção de fibras híbridas varia entre diferentes músculos, além de existir também uma grande variação entre indivíduos.

O fato de existirem várias isoformas de CPM da miosina possibilita a alteração das características fenotípicas das fibras musculares em resposta ao exercício, através da formação de novas miofibrilas que exprimem diferentes CPMs. Isso confere plasticidade aos músculos. Na década de 80, algumas publicações já mostravam evidências da transformação de tipo de fibras após trabalho muscular (BROWN; SALMONS; WHALEN, 1983). A transição entre os tipos de fibras com a atividade neuromuscular pode ser tanto de fibras rápidas para lentas quanto de lentas para rápidas, mas seguindo sempre uma mesma ordem, conforme mostrado na Figura 1 (BOOTH, et al., 1987; CAIOZZO; BAKER; BALDWIN, 1998; LARSSON, 1998; ANDERSEN, et al., 1999; FITTS; RILEY; WIDRICK, 2000).

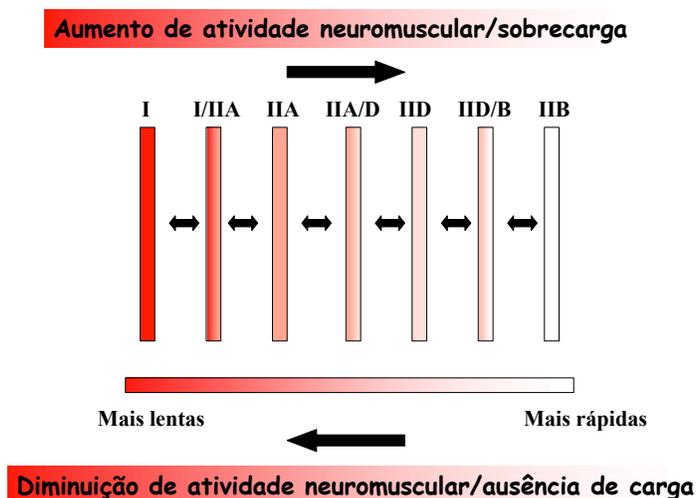


Figura 1. Representação esquemática de transição do tipo de fibras puras e híbridas segundo estímulo específico (PETTE, 2002).

1.2. Contração muscular

A contração muscular é mediada pela liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular, que permite a propagação do potencial de ação pelos túbulos T do sarcolema e a consequente liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol das fibras. Esses íons difundem-se pelas miofibrilas e ligam-se à troponina.

Em situação de repouso, o complexo troponina-tropomiosina ligado à actina, impede a interação da actina com a miosina, impedindo a contração muscular. Quando o íon cálcio se liga a troponina, o complexo troponina-tropomiosina sofre uma alteração conformacional que possibilita liberação do sítio de ligação da actina com a miosina, quando se estabelece uma ligação fraca entre essas duas proteínas.

A ligação da actina à ponte cruzada da miosina, estimula sua atividade ATPásica. A saída seqüencial de Pi e ADP da miosina possibilitam um tipo de interação forte com a actina e posterior mudança de ângulo, que tem como resultado o movimento da miosina em direção contrária à linha Z. Desta forma, os filamentos de actina deslizam sobre os filamentos de miosina. Para que a contração muscular prossiga, um novo ATP liga-se à ponte cruzada da miosina, estabelecendo novamente um tipo de interação fraca. Este ciclo de contração é repetido continuamente desde que a concentração de cálcio intracelular seja mantida elevada.

Em 1938, Hubbard e Statson estabeleceram que os músculos contraem-se em 3 diferentes condições, denominadas: miométrica, isométrica e pliométrica, utilizando os prefixos gregos: *mio* (curto), *iso* (idêntico), *plio* (longo) e o *metria* (forma de medida). Em uma condição de miometria, também conhecida como concêntrica, o músculo encurta-se

com tensão variável ao deslocar uma carga. Já em condição isométrica o músculo desenvolve tensão, mas não há mudança no comprimento do mesmo. Por último, temos a condição de pliometria ou contração excêntrica onde o músculo desenvolve tensão ao mesmo tempo em que sofre um alongamento. Dessa forma, o termo exercício excêntrico será utilizado para as ações onde predominam ações excêntricas. Normalmente, essa ação faz parte de atividades do dia-a-dia, como descer escadas ou abaixar um peso, com movimentos executados por um par de músculos agonista/antagonista. Ou seja, enquanto um músculo se encurta, o outro se alonga.

INTRODUÇÃO

1. FONTES DE ATP PARA O TRABALHO MUSCULAR

O músculo é um tecido essencial para a motricidade e utiliza somente ATP como fonte de energia. A hidrólise do ATP ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi} + \text{H}^+$) libera energia tanto para o processo de contração muscular “per se”, como para a condução dos impulsos nervosos e reações do metabolismo que, de uma forma sincronizada permitem o movimento.

O fornecimento constante de ATP para as células musculares vem de reservas que, dependendo da intensidade e duração da atividade realizada, podem ser metabolizadas na presença ou ausência de O_2 . Assim, existem três processos comuns produtores de energia para a formação do ATP nos músculos esqueléticos, dois anaeróbicos e um aeróbico (BOOTH; THOMASON, 1991). A contribuição de cada um desses processos está descrita na Tabela II.

Tabela II. Contribuição das fontes aeróbicas e anaeróbicas de ATP em diferentes cargas (FOX; BOWERS; FOSS, 1991).

	Fontes energéticas											
	Reserva					Anaeróbica/ Aeróbica		Aeróbica				
	ATP/PC e lactato					ATP/PC, lactato e Krebs/CTE		O_2 (Krebs /CTE)				
% aeróbico	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
% anaeróbico	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0	
	↑	↑	↑	↑		↑	↑		↑	↑	↑	
Distância (m)	100	200	400	800		1500	3200		5000	10000	42200	
Tempo (min:sec)	0:10	0:20	0:45	1:45		3:45	9:00		14:00	29:00	135:00	

1.1. Fontes anaeróbicas de ATP

Qualquer esforço maior do organismo em relação à condição de repouso como, por exemplo, no início de qualquer atividade física ou em exercícios intensos de curta duração (do tipo explosão) necessita de uma reposição rápida de ATP. Para isso, a principal reserva energética encontrada principalmente nos músculos esquelético e cardíaco, é a fosfocreatina (PC). Desta forma, o ATP é repostado através de uma única reação, reversível, catalisada pela enzima creatina quinase (CK):



Apesar desse sistema não ser capaz de prover grandes quantidades de energia, tem a capacidade de ressintetizar ATP de forma extremamente rápida, funcionando como um tampão energético, extremamente sensível às alterações nas concentrações intracelulares de ATP e ADP.

A outra via de ressíntese de ATP que não utiliza oxigênio é a glicólise anaeróbica. Durante esforços de alta intensidade e de curta duração a glicólise anaeróbica é responsável por até 80% do ATP necessário. A hidrólise de uma molécula de glicose proporciona a formação de 3 ATPs, produzindo também lactato no final do processo:



Até pouco tempo atrás se acreditava que a produção de lactato ocorria concomitante à produção de prótons (H^+), contribuindo para o abaixamento do pH intramuscular. No entanto, a partir do trabalho de Robergs (2001) ficou esclarecido que a principal via de produção de H^+ na musculatura é a hidrólise do próprio ATP e que a produção de lactato pela via glicolítica, através da ação da enzima lactato desidrogenase retira prótons do meio, desfazendo o mito de vilão do lactato intramuscular (ROBERGS, 2001).

1.2. Fonte aeróbica de ATP

A principal forma de produção de ATP pelos organismos vivos ocorre pelo metabolismo oxidativo, que utiliza como fonte energética os carboidratos e ácidos graxos. Nesse sistema, o ATP é formado nas mitocôndrias, a partir do acoplamento do funcionamento do ciclo de Krebs (CK), a β -oxidação e a cadeia de transporte de elétrons (CTE).

Mitocôndrias

As organelas responsáveis pela produção da energia aeróbica requerida por nossas células são as mitocôndrias. A mitocôndria é a única organela das células animais que possui seu próprio DNA (mtDNA), responsável pela codificação de treze polipeptídeos, dois RNAs ribossômicos e todos os tRNA transportadores necessários para tradução de seu RNA mensageiro (BENTLAGE, et al., 1995). Além da produção de ATP, estudos tem evidenciado seu envolvimento no processo de apoptose ou "morte celular programada" (BOVERIS; CADENAS, 1975; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; WALLACE, 1999).

As mitocôndrias são organelas envoltas por duas membranas, uma externa e outra interna, que diferem entre si não só na composição lipídica e protéica, como principalmente na função exercida dentro da célula. Ambas possuem um alto grau de ácidos graxos poliinsaturados nos dois maiores grupos de fosfolípidos (fosfatidilcolina - PC e fosfatidiletanolamina - PE), que constituem cerca de 75% dos fosfolípidos totais. Em menor proporção aparece a cardiolipina com 20% e o colesterol com 3% (CULLIS; DE KRUIJFF, 1979; CULLIS; HOPE, 1988).

A cardiolipina ou difosfatidilglicerol é o único fosfolípido de estrutura dimérica que contém quatro moléculas de ácidos graxos poliinsaturados, dois grupamentos fosfato e uma carga negativa. Sua estrutura lhe confere propriedade altamente ácida e hidrofóbica. Cerca de 80% a 90% dos seus ácidos graxos são compostos pelo ácido linoléico (18:2 n-6) (FULLER; DUFFY; ARRIAGA, 2002; HAINES; DENCHER, 2002; ZHANG; MILEYKOVSKAYA; DOWHAN, 2002; MOYES; HOOD, 2003).

A membrana interna das mitocôndrias é rica em cardiolipina, que possui papel crucial na função bioenergética destas organelas e na atividade de seus respectivos complexos enzimáticos. A citocromo c oxidase (CCOX), por exemplo, recruta a cardiolipina da membrana interna das mitocôndrias acumulando 3 ou 4 moléculas por CCOX (GALLET, et al., 1999). Pesquisas recentes demonstram que uma diminuição no conteúdo deste fosfolípido pode estar relacionada com a liberação do citocromo c, sinalizando um dos primeiros eventos da morte celular programada ou apoptose (SHIDOJI, et al., 1999; NOMURA, et al., 2000; OSTRANDER, et al., 2001; PETROSILLO, et al., 2001; FERNANDEZ, et al., 2002; PARADIES, et al., 2002).

A membrana externa, altamente permeável, é rica em porinas, que somam cerca de 1% das proteínas mitocondriais totais. Ao contrário, a membrana interna é altamente seletiva, sendo permeável somente a pequenas moléculas solúveis em H₂O (ex: O₂, CO₂ e NH₃) ou a moléculas solúveis em lipídeos, que podem difundir-se diretamente ou passivamente através da membrana interna. Quaisquer outros metabólitos, para atravessar

a membrana interna e chegar à matriz mitocondrial necessitam de transportadores específicos (HAWORTH; HUNTER; BERKOFF, 1980).

Os componentes da cadeia respiratória das mitocôndrias e seu sistema de fosforilação oxidativa têm um papel fundamental na geração de ATP a partir dos macronutrientes. Dessa forma, carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos são oxidados, formando coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 , além de CO_2 e NH_3 (CRAMER; KNAFF, 1991; COOPER; MANN; SCHAPIRA, 1992). É na cadeia de transportes de elétrons que ocorre a reoxidação destas coenzimas reduzidas. Conforme mostrado na Figura 2, a cadeia de transporte de elétrons (CTE) é constituída de proteínas, coenzima Q (ubiquinona) e citocromos. Os componentes protéicos são separados em quatro complexos, sendo que três deles funcionam como uma bomba de prótons da matriz para o espaço intermembranar. Esse bombeamento de prótons para o espaço intermembranar forma potencial eletroquímico responsável por orientar o movimento de elétrons em direção a pares mais eletronegativos estabelecendo um gradiente eletroquímico ($\Delta\psi$) que impulsionará os prótons pela F_1F_0 -ATP sintase. Alguns autores incluem a enzima F_1F_0 -ATP sintase como um quinto complexo (COOPER; MANN; SCHAPIRA, 1992; ZERBETTO; VERGANI; DABBENI-SALA, 1997), embora este não participe do transporte de elétrons e sim da translocação de prótons para dentro da matriz mitocondrial.

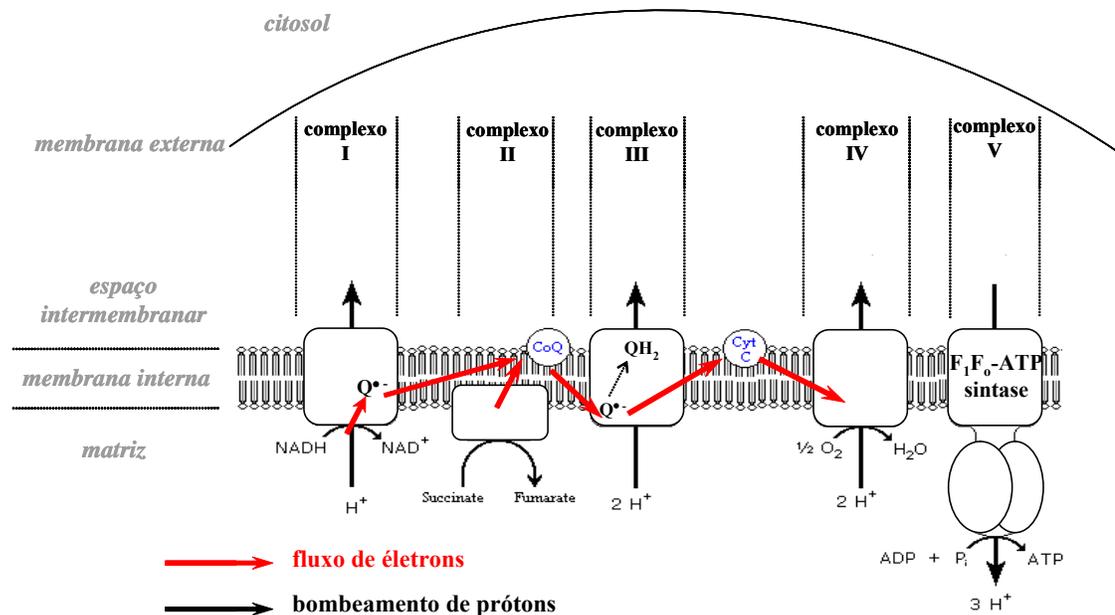


Figura 2. Cadeia de transporte de elétrons e F_1F_0 -ATP sintase na membrana interna da mitocôndria (SERVAIS, 2004).

Os complexos protéicos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial são:

➤ *Complexo I (NADH-CoQ oxidoreductase)*

É o maior componente protéico da membrana interna da mitocôndria, com uma massa molecular de aproximadamente 750 kDa (SCHAGGER; VON JAGOW, 1991). Contém cerca de 43 subunidades, sendo algumas codificadas pelo mtDNA (COOPER, et al., 1992). A oxidação do NADH fornece dois elétrons, que reduzem os componentes do complexo para então serem transferidos para a ubiquinona. Esta redução está acoplada ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar.

➤ *Complexo II (Succinato desidrogenase)*

O succinato é reoxidado a fumarato com a concomitante redução de FAD a FADH₂. O FADH₂ é reoxidado pelo *pool* de ubiquinona. A transferência de elétrons pelo complexo II não está acoplada ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar.

➤ *Complexo III (complexo bc₁ - ubiquinol-citocromo c reductase)*

As ubiquinonas reduzidas pelos complexos I e II são reoxidadas no complexo III. Os elétrons são então transferidos para o citocromo c. O citocromo c possui características em sua estrutura que permitem sua mobilidade através da membrana, ligando assim o complexo III ao complexo IV da CTE. Este processo está acoplado à ejeção de prótons para o espaço intermembranar, sendo o segundo sítio de acoplamento da mitocôndria.

➤ *Complexo IV (citocromo c oxidase)*

Este complexo catalisa a última reação de óxido-redução da cadeia de transporte de elétrons. A transferência de elétrons do citocromo c ao oxigênio é irreversível, ao contrário das transferências de elétrons que ocorrem nos complexos I, II e III. O fluxo de elétrons no complexo IV também está associado ao bombeamento de prótons, o que faz deste complexo o último sítio de acoplamento da mitocôndria.

➤ *Complexo V ou F₀F₁-ATP sintase*

A F₀F₁-ATP sintase acopla a difusão facilitada de prótons à síntese de ATP. O sítio catalítico é chamado F₁ e a subunidade F₀ (sensível a oligomicina) é constituída de um canal transmembranar de prótons. Este complexo permite a conversão, em um processo reversível, da diferença do potencial eletroquímico de prótons em energia química do ATP. O ATP produzido por este complexo é utilizado essencialmente no citosol e necessita de um transportador específico, já que as membranas mitocondriais são impermeáveis a esta molécula. Assim, o ATP gerado na mitocôndria é trocado pelo ADP citosólico através do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT).

2. ADAPTAÇÕES E RESPOSTAS METABÓLICAS INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício quando é realizado em apenas uma sessão provoca alterações do organismo conhecidas como “respostas” ao exercício agudo. Por outro lado, alterações mais generalizadas de células e sistemas fisiológicos, resultado de um treinamento físico, são chamadas adaptações. Booth e Thomason (1991) definem ainda adaptação como uma mudança semi-permanente que ocorre nas propriedades estruturais e funcionais das células, tecidos e/ou sistemas após várias semanas de repetidas sessões de exercício, que desaparecem após alguns dias se as sessões forem interrompidas totalmente. Para que possam ser consideradas as respostas e adaptações metabólicas que ocorrem em um organismo, vários fatores devem ser considerados, como o condicionamento prévio do indivíduo, a duração, intensidade e frequência do esforço, o tipo de treinamento (contínuo, intervalado e outros) além da especificidade da contração muscular (concêntrica, excêntrica ou isométrica) e do tipo de fibra muscular (FITTS, 1994).

O músculo esquelético é um dos tecidos que mais sofre mudanças metabólicas e estruturais como resultado de um treinamento e/ou exercício físico. Estas mudanças têm como objetivo, sobretudo, a otimização da *performance* do indivíduo com o adiamento do aparecimento de fadiga e a economia de substratos energéticos. Ou seja, todo sistema de fornecimento de ATP é susceptível a adaptações. Há mais de 30 anos, Holloszy e seu grupo mostraram adaptações ao nível mitocondrial após treinamento de *endurance* (HOLLOSZY, 1967; GOLLNICK; KING, 1969). Desde então, vários estudos confirmaram e esclareceram adaptações dos sistemas de fornecimento de ATP após diferentes tipos de treinamento, alguns exemplos podem ser observados na Tabela III.

Tabela III. Exemplos de adaptações envolvidas no melhoramento do fornecimento de ATP durante atividade física.

Tipo de atividade	Adaptação	Referência (Autor/ano)
Treinamento de endurance	↑ Atividade das enzimas Ciclo de Krebs	(HOLLOSZY, et al., 1970)
Treinamento de endurance	↑ Concentração de proteínas mitocondriais	(GOLLNICK; SALTIN, 1982)
Treinamentos de ≠ intensidades e durações	Adaptação fibra-dependente	(DUDLEY; ABRAHAM; TERJUNG, 1982)
Treinamento de endurance X Treinamento intervalado	↑ PFK e do conteúdo de glicogênio em ≠ músculos segundo treinamento utilizado	(VIRU, 1994)
Treinamento contínuo X Treinamento intermitente	≠ β-oxidação de ácidos graxos	(CHILIBECK, et al., 1998)
Treinamento de sprint	↑ Atividade da PFK, glicogênio fosforilase e LDH	(ROSS; LEVERITT, 2001)
Treinamento de endurance baixa intensidade	↑ β-oxidação de ácidos graxos e mudanças na expressão gênica	(SCHRAUWEN, et al., 2002)

Por outro lado, as respostas celulares e moleculares que permeiam uma sessão de exercício agudo (sem treinamento prévio e de intensidade elevada) normalmente contribuem para o aparecimento de fadiga, a qual é dependente do tipo, duração e intensidade do exercício (FITTS, 1994).

Os mecanismos que causam fadiga e posteriormente o dano muscular durante e após um exercício intenso e/ou agudo ainda precisam ser melhor esclarecidos, já que vários fatores podem estar envolvidos neste processo (GREEN, 1997; RASMUSSEN, et al., 2001). Sabe-se que um dos fatores prováveis para o aparecimento da fadiga é o desequilíbrio ou incapacidade no fornecimento de energia para contração muscular e as mitocôndrias podem desempenhar um papel primordial nesta situação. É importante lembrar que a ausência de respostas e adaptações ao nível mitocondrial e celular podem causar danos oxidativos deletérios ao organismo.

Neste contexto, Tonkonogi e grupo (1999) utilizaram um protocolo de exercício intermitente de alta intensidade em humanos para verificar a funcionalidade de mitocôndrias isoladas e fibras isoladas/permeabilizadas de músculo esquelético. Eles não notaram nenhuma disfunção no funcionamento mitocondrial, porém uma diminuição na sensibilidade ao ADP foi observada após o exercício, retornando aos níveis de repouso após

a recuperação. Estes resultados sugerem que o controle da respiração mitocondrial foi alterado após exercício intenso.

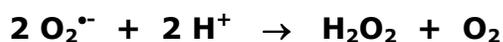
Rasmussen et al. (2001) também estudaram o efeito do exercício exaustivo de alta intensidade em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de humanos. Durante esse tipo de exercício as mitocôndrias estariam expostas a concentrações elevadas de lactato, prótons, fosfato e cálcio, que poderiam ocasionar a perda da funcionalidade. Entretanto, a quantidade de citocromos c e aa_3 , a permeabilidade da membrana aos prótons, as atividades das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase e citocromo oxidase não foram modificados após exercício exaustivo. Já as atividades das enzimas α -glicerolfosfato desidrogenase e NADH-oxidase aumentaram, o que pode ser atribuído a um aumento de íons Ca^{2+} ou de espécies reativas de oxigênio (EROS) no sarcoplasma. As atividades das enzimas ligadas a oxidação de NADH (piruvato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e glutamato desidrogenase) apareceram diminuídas após o exercício intenso, sugerindo perda de NAD das mitocôndrias. Apesar disso, os autores mostraram que as características gerais das mitocôndrias (consumo de oxigênio nos estados 3 e 4, controle respiratório, razão P/O) não foram alteradas após o exercício (RASMUSSEN, et al., 2001).

3. ESTRESSE OXIDATIVO CELULAR E EXERCÍCIO FÍSICO

Antes de definir estresse oxidativo é necessário definir o que são espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou radicais livres.

Um radical livre é toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Nesta definição podem-se incluir os átomos de metais de transição e também o oxigênio molecular (O_2). As EROS agrupam espécies radicalares (ânion superóxido, radical hidroxila etc) e espécies não radicalares (peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, etc).

O O_2 , no seu estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados de spins iguais. Devido a esta característica, para o O_2 oxidar outro átomo ou molécula, aceitando um par de elétrons, ambos devem ser de spins também iguais. A adição de um elétron à molécula de O_2 produz o radical *ânion superóxido* ($O_2^{\bullet -}$). Este, de fato, pode ser formado não enzimaticamente em praticamente todas as células aeróbicas, como resultado do vazamento de elétrons dos componentes da cadeia respiratória diretamente para o O_2 . Dois desses radicais dismutam-se espontaneamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase, conforme a reação:



Esta reação consome dois prótons e produz *peróxido de hidrogênio* (H₂O₂) que, como agente oxidante, é considerado fraco. Entretanto, o principal problema é que o H₂O₂ atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente de Fe²⁺ ou Cu⁺, origina o *radical hidroxila* (reações de Fenton e Haber-Weiss simplificadas).



O *radical hidroxila* (OH[•]), dentre as espécies radicalares de oxigênio conhecidas é uma das mais reativas e de alto poder deletério.

Além das EROS, existe ainda o *óxido nítrico* (NO[•]) que é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN). Além de participar como segundo mensageiro celular, reage rapidamente com o radical *ânion superóxido* (O₂^{•-}) formando *peroxinitrito* (ONOO⁻) e também com o radical peroxil formando *alquil peroxinitrito* (ROONO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROS (que aumenta o potencial oxidante) e o sistema de proteção antioxidante (sistema de eliminação dos radicais livres e EROS).

3.1. Sítios de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Mitocôndria

Embora a mitocôndria seja a organela responsável por aproximadamente 90% do consumo de oxigênio, cerca de 0,4 a 2% do oxigênio não é convertido em H₂O, devido ao vazamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (CTE), possibilitando assim a produção de radicais livres e/ou EROS (TURRENS, et al., 1991; RICHTER, et al., 1995; SUPINSKI, 1998; BARJA, 1999). De fato, durante a atividade física o VO₂ pode elevar-se cerca de 10 a 15 vezes acima dos níveis de repouso e postula-se que este aumento no consumo de oxigênio, com o concomitante aumento no fluxo de elétrons na CTE possibilitaria um vazamento maior de elétrons, aumentando assim a formação de EROS (DILLARD; LITOV; TAPPEL, 1978; DAVIES, et al., 1982; ALESSIO, 1993; HAYCOCK, et al., 1996).

Em 1982, Davies e colaboradores mostraram, pela primeira vez, a produção de radicais livres de oxigênio no músculo e no fígado de ratos após um exercício agudo, utilizando a técnica de EPR para a medida das EROS. Mais tarde, Reid e grupo (REID, et al., 1992) utilizaram a molécula de diclorofluoresceína (DCFH) para medir a produção de EROS em fibras isoladas de músculo. Eles mostraram um aumento na oxidação da DCFH, que foi relacionado com a produção de EROS após contrações repetitivas.

Durante o transporte de elétrons pela CTE o oxigênio pode sofrer uma redução univalente, com formação do radical *ânion superóxido* ($O_2^{\bullet-}$) (TURRENS; BOVERIS, 1980; MENEGHINI, 1987; AMBROSIO, et al., 1993; RAHA; ROBINSON, 2001). Esse vazamento de elétrons parece estar associado ao estado redox dos transportadores de elétrons e ao fluxo de elétrons. Ou seja, a produção de EROS parece ser maior quando a CTE está altamente reduzida, como no estado respiratório 4 em experimentos com mitocôndrias isoladas.

Por outro lado, a produção de EROS também parece ser dependente do potencial de membrana (KORSHUNOV; SKULACHEV; STARKOV, 1997). No estado respiratório 3 (após adição do ADP, em experimentos com mitocôndrias isoladas) a produção de EROS diminui significativamente devido à oxidação dos componentes da CTE que estavam altamente reduzidos no estado 4. Esse efeito da adição do ADP é semelhante àquele observado após adição de um desacoplador.

Experimentos utilizando mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos (fígado, músculo cardíaco e esquelético e cérebro) revelaram diversas variações na produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , dependendo dos substratos e dos inibidores utilizados, permitindo a identificação dos sítios de produção de EROS (HANSFORD; HOGUE; MILDAZIENE, 1997; BARJA, 1999; LIU, et al., 2000; ST-PIERRE, et al., 2002), conforme apresentado na Figura 3.

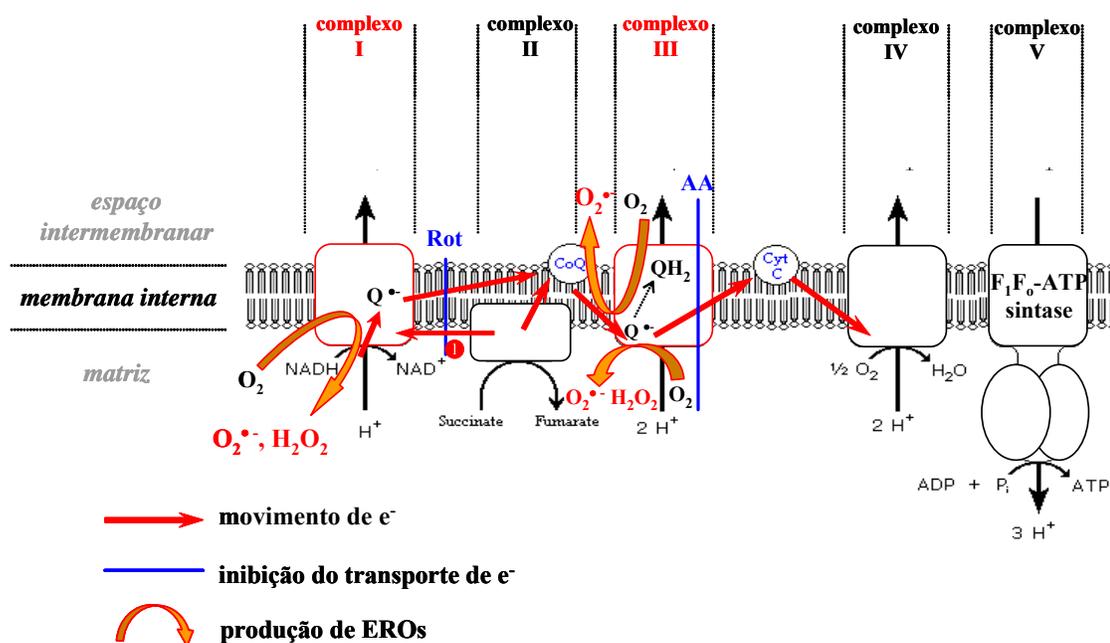


Figura 3. Produção de EROS na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Dois sítios de produção de $O_2^{\bullet-}$ são indentificados: o complexo I e o ciclo da quinona no complexo III. A utilização da rotenona (ROT) e da antimicina A (AA) permitiu a localização dos sítios de produção de EROS, além de colocar em evidência o fluxo reverso de elétrons do complexo II ao I (●).

Recentemente, num outro estudo, Barja (1999) sugeriu que o complexo I seria o único responsável pela produção de EROS nas mitocôndrias em estado ativo de respiração com produção de ATP (estado 3). Em concordância com esse autor, Servais et al. (2003), utilizando o ácido homovanílico como detector do H_2O_2 em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético observaram que em presença de substrato do complexo II (succinato) a produção de H_2O_2 no estado 3 era praticamente nula, enquanto que na presença de substrato do complexo I (piruvato/malato) a adição do ADP (estado 3) não anulava a produção de H_2O_2 . Esses autores mostraram ainda que na presença de piruvato/malato e rotenona (inibidor do complexo I) houve aumento na produção de H_2O_2 . Esses dados reforçam o envolvimento dos centros Fe-S e da flavina mononucleotídeo (FMN) do complexo I na produção de radicais através de sua autooxidação (HERRERO; BARJA, 1997; GENOVA, et al., 2001; LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002). Já na presença de succinato, a adição da rotenona bloqueou quase totalmente a produção de H_2O_2 , mostrando que grande parte dos radicais formados quando o substrato do complexo II é utilizado se dá pelo fluxo reverso de elétrons do complexo II (succinato) para o complexo I, e somente uma pequena parte é produzida pelo ciclo quinona/complexo III (KWONG; SOHAL, 1998; BARJA, 1999; LEEUWENBURGH; HEINECKE, 2001; VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2001; LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002).

Xantina Oxidase (XO)

Viña e seu grupo (2000) propuseram que a fonte de EROS durante o exercício físico é a xantina oxidase (XO). Baseado nos estudos de Chance et al. (1979) e de Barja (1999), eles propuseram que as mitocôndrias não seriam o principal sítio de produção de radicais livres, uma vez que nenhum aumento na produção de EROS foi verificado no estado 3 (estado ativo) comparado com aquela do estado 4 (repouso), logo a produção de EROS viria de outra fonte, por exemplo, a xantina oxidase.

A *xantina oxidase (XO)*, enzima que catalisa a conversão de hipoxantina a ácido úrico em situações em que a demanda de ATP é alta e o aporte de oxigênio deficitário, é também responsável pela produção de $O_2^{\cdot-}$. Nesta situação aumenta a atividade da *adenilato quinase*, que catalisa a produção de ATP e AMP a partir de 2 ADPs. O AMP é desaminado a IMP (inosina monofosfato) que é transformado em hipoxantina. Em situações normais a hipoxantina é degradada a ácido úrico pela ação da forma desidrogenase da enzima xantina (XDH), que utiliza $NADP^+$ como aceptor de elétrons. Porém, em baixas concentrações de O_2 e altas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , a enzima se converte sua forma oxidase (xantina oxidase – XO) e passa a utilizar o O_2 como aceptor de elétrons, com produção de $O_2^{\cdot-}$ no final do processo (MCCORD; ROY; SCHAFFER, 1985; THOMPSON; HESS, 1986; SJODIN; HELLSTEN WESTING; APPLE, 1990; JI, 1996).

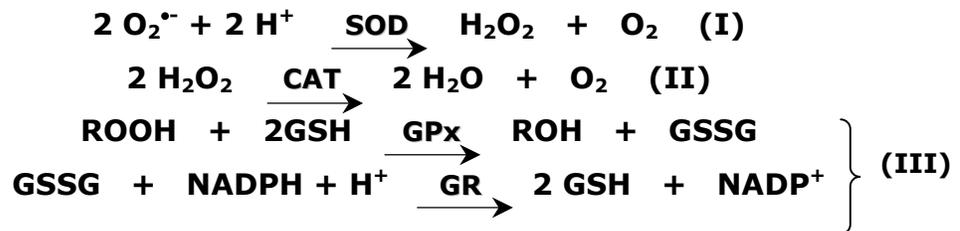
3.2. Sistemas antioxidantes

Antioxidantes biológicos desempenham um papel importante na proteção do nosso organismo. A deficiência ou depleção de vários sistemas antioxidantes aumentam a extensão dos danos em tecidos oxidativos. Os antioxidantes podem ser classificados em duas categorias, de acordo com sua estrutura química e função: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos

Uma maneira eficaz de lutar contra um aumento na produção de EROS induzida pelo exercício físico é através da regulação positiva das enzimas antioxidantes. Nesse sentido, vários fatores parecem desempenhar um papel na indução destas enzimas, tais como: o tipo de fibra muscular recrutado, a intensidade e duração do esforço, o estado nutricional etc.

Os antioxidantes enzimáticos são considerados a primeira linha de defesa do organismo contra as EROS. Algumas enzimas são capazes de converter espécies reativas de O_2 em espécies menos deletérias. As enzimas *superóxido dismutase* (SOD) (I), *catalase* (CAT) (II) e o ciclo redox da glutathiona (com as enzimas *glutathiona peroxidase* (GPx)/*glutathiona redutase* (GR)) (III) catalisam as seguintes reações, respectivamente:



A *superóxido dismutase* (SOD), como o próprio nome diz dismuta $O_2^{\cdot -}$, formando H_2O_2 e O_2 . Ela se apresenta em três isoformas, que diferem na sua localização celular e no cofator metálico ligado ao seu sítio ativo. São elas: a isoforma Cu, Zn-SOD (cobre-zinco dependente), a isoforma Mn-SOD (manganês dependente) e a isoforma extracelular (ecSOD) (MC CORD; FRIDOVICH, 1969; POWERS; LENNON, 1999; ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). A isoforma Cu, Zn-SOD está localizada predominantemente no citosol, enquanto que a isoforma Mn-SOD nas mitocôndrias.

A enzima *catalase* (CAT) é responsável pela quebra do H_2O_2 em H_2O e O_2 . Para manter sua atividade catalítica a CAT necessita de Fe^{3+} como cofator (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998). Esta enzima encontra-se em grandes concentrações nos peroxissomas e em menor quantidade no citosol (POWERS; LENNON, 1999).

O ciclo redox da glutatona é capaz de reduzir H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos, provindos da peroxidação lipídica, respectivamente a H_2O ou álcool. A enzima *glutathione peroxidase* (GPx) oxida a GSH (glutathione reduzida) a sua forma disulfídica GSSG (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998). Como a GSH é um agente redutor limitante na célula, ela precisa ser re-reduzida constantemente para que a GPx mantenha sua função; isso é permitido graças à ação da *glutathione reductase* (GR). A GR reduz a GSSG a GSH utilizando NADPH como doador de elétrons (SEN, et al., 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998). Em geral, a GPx intracelular compreende duas proteínas distintas: a GPx clássica e a GPx-PH (*glutathione peroxidase de hidroperóxidos fosfolipídicos*). Essas enzimas encontram-se essencialmente no núcleo, nas mitocôndrias e no citosol das células. Elas são membros de uma família de enzimas que possui uma selenocisteína no seu sítio ativo, assim como as TPx ou PRx (*thioredoxinas peroxidases ou peroxiredoxinas*) que reduzem o H_2O_2 a H_2O pela oxidação da tioredoxina (IMAI; NAKAGAWA, 2003).

Uma das primeiras constatações em relação às adaptações dos sistemas antioxidantes e o exercício físico foi que estas enzimas são dependentes do tipo de fibra muscular predominante e do tecido estudado (JI; FU; MITCHELL, 1992; LAWLER, et al., 1993; POWERS, et al., 1994). Lawler et al. (1993) observaram uma variação na atividade das enzimas SOD e GPx dependente do tipo de fibra predominante dos músculos estudados (tipo I > tipo IIa > tipo IIb). A distribuição das diferentes isoformas da SOD também variou dependendo do tecido; no músculo esquelético, por exemplo, cerca de 65 a 85% da atividade total da SOD encontra-se no citosol enquanto 15 a 35% na mitocôndria (JI; FU; MITCHELL, 1992).

As respostas das enzimas antioxidantes que permeiam uma sessão de exercício agudo são muito variadas. Aparentemente, a intensidade do exercício (duração e velocidade), o momento de extração dos tecidos, o tipo de exercício (concêntrico ou excêntrico) influenciam as respostas das enzimas antioxidantes. Por exemplo, Ji et al. (1992) observaram diferenças nas atividades das enzimas GPx, GR, CAT e SOD após uma sessão de exercício agudo conforme o tipo de fibra dos músculos analisados. Eles observaram que no músculo sóleo o exercício agudo não induziu um aumento nas atividades destas enzimas; em contrapartida, mostraram um aumento na atividade das enzimas GPx, GR e CAT no músculo vasto lateral profundo. Na realidade, encontramos trabalhos mostrando aumento na atividade das enzimas antioxidantes após um exercício agudo (JI; FU, 1992; LAWLER, et al., 1993; CAILLAUD, et al., 1999), nenhuma alteração (LEEUEWENBURGH; JI, 1995; HOLLANDER, et al., 2001; KAYATEKIN, et al., 2002) ou diminuição na atividade enzimática (SMOLKA et al., 2000).

Já durante o exercício crônico ou treinamento de *endurance*, principalmente, as adaptações são também dependentes do tipo de fibra predominante no músculo, sendo que cada enzima antioxidante parece se adaptar de maneira diferente (JI; FU; MITCHELL, 1992; POWERS, et al., 1994; JI; LEICHTWEIS, 1997). A atividade da CAT é raramente alterada durante o treinamento, muito provavelmente devido sua localização subcelular (POWERS, et al., 1994; SMOLKA, et al., 2000) e sua afinidade pelo H₂O₂, que é menor (*K_m* 1mM) que a da GPx (*K_m* 1µM). Ou seja, o limiar de ativação da CAT deve ser muito maior do que o da GPx. De fato, resultados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram efeitos diferentes sobre a atividade das enzimas CAT e GR em jogadores de futebol, em função do nível de estresse induzido pelo campeonato (ZOPPI, et al., 2003). O aumento na atividade da GPx é extremamente dependente do tipo de fibra do músculo; além disso, a magnitude das adaptações parece depender mais da duração do esforço do que da intensidade (SEN, et al., 1992; POWERS, et al., 1994; JI; LEICHTWEIS, 1997). As adaptações das isoformas da SOD são muito variadas. Aparentemente as duas isoformas (Mn-SOD e Cu, Zn-SOD) são reguladas por mecanismos diferentes, sendo a Cu, Zn-SOD a isoforma mais ativada após exercício agudo (HIGUCHI, et al., 1985; GORE, et al., 1998; JI, 2002).

Alguns autores propõem também uma diferença nas adaptações das enzimas conforme o tipo de treinamento efetuado, se contínuo ou intermitente. Em geral, após um treinamento de *endurance* os danos oxidativos parecem diminuir e os sistemas de defesa antioxidantes aumentar (CRISWELL, et al., 1993; TESSIER, et al., 1995; RADAK, et al., 1999; SMOLKA, et al., 2000; VINA, et al., 2000; SVENSSON, et al., 2002). Criswell et al. (1993) não observaram nenhuma diferença na atividade da SOD após os dois tipos de treinamento. Já Smolka et al. (2000), estudando o efeito dos treinamentos contínuo e intermitente na atividade das enzimas GR e CAT e no conteúdo de HSPs72 do músculo sóleo de ratos observaram que o treinamento contínuo foi mais eficaz na indução das atividades das enzimas antioxidantes, enquanto que o treinamento intermitente foi mais eficaz na melhoria da capacidade oxidativa, porém menos eficaz na indução das enzimas antioxidantes.

Tem sido proposto que a produção de EROS durante o exercício físico parece ser o sinal celular que a longo prazo, durante um treinamento, induz a regulação gênica das enzimas antioxidantes e da biogênese mitocondrial (DAVIES, et al., 1982; CRISWELL, et al., 1993; MIRANDA, et al., 1999; HOOD, 2001; KRETZ-REMY; ARRIGO, 2002). Esta indução aparece associada às vias de sinalização que podem ser ativadas pelo estresse oxidativo, como as ligações do NF-κB (fator nuclear κB) e da AP-1 (proteína ativadora 1) aos sítios promotores dos genes das enzimas antioxidantes. Por um outro lado, as alterações observadas nas atividades das enzimas antioxidantes após uma sessão de exercício agudo

parecem estar relacionada com uma regulação pós-transcricional (HOLLANDER, et al., 2001; JI, 2002).

Antioxidantes não-enzimáticos

Nesta categoria de antioxidantes temos a *glutathiona reduzida* (GSH), as *vitaminas E* (*α-tocoferol*), *C* (*ácido ascórbico*) e um precursor da vitamina A (*β-caroteno*), a *ubiquinona*, além de outros componentes como *ácido lipóico*, *ácido úrico*, *bilirubina*, *selênio* etc. Há pouco tempo tem-se discutido as propriedades antioxidantes de outros compostos como os *polifenóis* e *licopenos* que são encontrados geralmente em legumes e frutas (CLARKSON, 1995; JI; LEICHTWEIS, 1997; PACKER, 1997; PACKER; TRITSCHLER; WESSEL, 1997; POWERS; LENNON, 1999).

Mais recentemente tem-se discutido também o papel antioxidante dos *plasmalógenos*. Os plasmalógenos são fosfolipídeos que possuem ligações éter ao invés de ligações éster, entre o primeiro carbono do glicerol e a cadeia alquila do ácido graxo. Além disso, eles possuem uma dupla ligação *cis* adjacente à ligação éter, formando uma ligação éter-vinil (NAGAN; ZOELLER, 2001). Estudos com diferentes linhagens celulares de animais mostraram que os plasmalógenos, em virtude de suas ligações éter-vinil, agiriam como antioxidantes endógenos protegendo membranas e células contra ataque de EROS (ZOELLER, et al., 1999). A oxidação das ligações éter-vinil previniria a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, sendo que o produto da oxidação destes plasmalógenos não propagaria as reações de peroxidação lipídica (ENGELMANN, 2004).

3.3. Estresse oxidativo

De maneira geral os mecanismos de defesa antioxidante são eficazes na eliminação das EROS. No entanto, um desequilíbrio entre a formação de EROS e a proteção dos sistemas antioxidantes, ou por um déficit de antioxidantes ou devido uma superprodução de EROS, pode gerar um estado de *estresse oxidativo*.

Os radicais livres estão presentes em mais de 90% das patologias humanas existentes, seja como causa ou como conseqüência do processo degenerativo (HOLMES; BERNSTEIN; BERNSTEIN, 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998). Sabe-se que concentrações intracelulares elevadas de EROS são responsáveis por danos oxidativos de diversos componentes celulares e como conseqüência é observada a perda das funções celulares que podem, em última instância ocasionar a morte celular.

Peroxidação lipídica

Um dos primeiros alvos das EROS são os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) que fazem parte das membranas celulares e intracelulares. Esses ácidos graxos são altamente

susceptíveis ao ataque oxidativo devido o alto grau de insaturações e uma vez oxidados eles podem propagar reações em cadeia que são denominadas lipoperoxidações ou peroxidações lipídicas (REMITA, 2001). A peroxidação lipídica ao nível das membranas pode induzir uma modificação da fluidez, da permeabilidade e da excitabilidade das mesmas. E ainda, as proteínas, que fazem parte destas membranas, podem ter suas atividades alteradas ou mesmo serem oxidadas pelos peróxidos lipídicos (TAPPEL, 1973; MENEGHINI, 1987; JI, 1996; SUPINSKI, 1998).

As mitocôndrias, além de produzirem EROS, são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, característica que as torna o principal alvo de ataques oxidativos. De fato, os fosfolipídeos das membranas mitocondriais são os mais afetados numa situação de produção elevada de EROS (PETROSILLO, et al., 2001; GARCIA FERNANDEZ, et al., 2002).

Oxidação de proteínas

De maneira comparável às oxidações dos lipídeos, as proteínas também são susceptíveis aos ataques oxidativos. Algumas modificações indicam danos oxidativos das proteínas, tais como a oxidação dos grupamentos sulfidrilas e dos resíduos de aminoácidos além da nitrosilação de seus resíduos de tirosina (BECKMAN; AMES, 1998; SUPINSKI, 1998; RADAK, et al., 2000). Uma vez oxidadas as proteínas são sensíveis à degradação pela ação das proteases. Apesar disso, a oxidação das proteínas pode ser um sinal para a ativação e indução das "proteínas de estresse" conhecidas por seu papel citoprotetor (MC ARDLE; JACKSON, 2000; LEEUWENBURGH; HEINECKE, 2001).

3.4. Papel das proteínas de estresse (HSPs)

As *Heat Shock Proteins (HSPs)* surgem na literatura como uma das classes de proteínas de estresse melhor estudadas. Elas são de fundamental importância para a sobrevivência da célula, não apenas em condições de estresse, onde se vê o seu aumento sendo dirigidas para reparação de danos celulares, mas também em eventos de transporte e *fold*ing de proteínas recém traduzidas (MORIMOTO, 1993; LIU; STEINACKER, 2001). Elas ainda, estão intimamente relacionadas com o direcionamento e transporte de novas proteínas sintetizadas no citosol até a matriz mitocondrial, isso graças a dois complexos situados nas membranas interna e externa das mitocôndrias (TIM e TOM) (LILL; NEUPERT, 1996; HOOD, 2001).

Células do organismo respondem a uma variedade de condições estressantes através de uma rápida transcrição e subsequente tradução destas proteínas altamente conservadas (LOCKE; NOBLE; ATKINSON, 1990). Hoje, já se conhece que a "resposta heat shock" ou a resposta ao estresse ocorre em todas as células, seja em condição de hipertermia ou demais estados de alteração homeostática, tais como: aumento de concentração de cálcio

celular, diminuição de glicose, infecções virais e bacterianas, exposição a metais pesados etc (WELCH, 1992; KREGEL, 2002). No entanto, os mecanismos moleculares que regulam sua indução e regulação não foram ainda completamente elucidados (LIU; STEINACKER, 2001). Existem evidências que permitem pensar que os radicais livres poderiam participar como iniciadores da síntese de HSPs (WELCH, 1992).

Essas proteínas são divididas em diversos grupos ou famílias segundo seus tamanhos e funções. O músculo esquelético, devido à sua alta plasticidade e por possuir um complexo metabolismo energético, pode sintetizar HSPs que chegam a constituir cerca de 20% do total de proteínas celulares em condição de estresse (KHASSAF, et al., 2001; LIU; STEINACKER, 2001). As HSPs da família 70 apresentam-se em quantidades pequenas nas células em condição de não estresse, porém em condição de estresse elas podem ser sintetizadas rapidamente.

Essig e Nosek (1997) sugeriram que a síntese de HSPs poderia complementar as capacidades de defesa antioxidante do organismo numa situação em que as proteínas intracelulares são danificadas pelos EROS. Alguns estudos mostraram que ratos submetidos a um exercício agudo exaustivo em esteira rolante apresentam um aumento na síntese de proteínas de stress HSPs70 nos músculos e outros tecidos (LOCKE; NOBLE; ATKINSON, 1990, 1991; SALO; DONOVAN; DAVIES, 1991; SAMELMAN, 2000). Resultados do nosso laboratório também mostraram que o conteúdo de HSPs72 está aumentado em ratos sedentários após uma sessão de exercício exaustivo, em paralelo com uma diminuição na atividade das enzimas GR e CAT (SMOLKA, et al., 2000). Khassaf e colegas (2001) observaram um aumento do conteúdo de HSPs60/70 e da atividade da SOD em músculo esquelético de humanos mesmo após um exercício não exaustivo. Outros trabalhos mostraram que o conteúdo de HSPs70 está aumentado após um treinamento, porém este aumento parece depender da intensidade (LIU, et al., 2000; LIU; STEINACKER, 2001).

Marcadores do estresse oxidativo

Diversos estudos utilizam os produtos das oxidações como marcadores indiretos do estresse oxidativo. Dentre eles podemos encontrar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonal (4-HNE), o isoprostano (marcadores da peroxidação lipídica); as proteínas carboniladas e oxidação dos grupamentos sulfidrilas (marcadores da oxidação de proteínas), e ainda o 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo) (marcador da oxidação do DNA). A medida do status antioxidante (atividade das enzimas antioxidantes, glutathione total, etc) é freqüentemente utilizada para avaliar a intensidade do estresse oxidativo.

Os danos oxidativos podem variar conforme o tipo de exercício efetuado e também segundo a magnitude das adaptações e respostas dos sistemas de defesa antioxidantes e

do sistema de reparação (RADAK, et al., 1999; RADAK, et al., 2000). Isso pode ser observado no estudo realizado por Alessio e seu grupo (2000) comparando os marcadores de estresse oxidativo em sangue de sujeitos que realizaram dois diferentes tipos de esforço (um exercício exaustivo aeróbico e um exercício isométrico). Os marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e proteínas carboniladas) apareceram aumentados após os dois tipos de exercício, porém os lipídeos parecem mais susceptíveis à oxidação durante o exercício aeróbico enquanto que as proteínas após o exercício isométrico.

Dentre todos os estudos que concernem o estresse oxidativo muscular durante e após o exercício físico raramente encontram-se trabalhos que utilizam o exercício excêntrico, mesmo sabendo que este tipo de exercício é conhecido por causar alterações musculares, principalmente quando é feito até a exaustão (THOMPSON, et al., 2001; FEASSON, et al., 2002).

4. EXERCÍCIO EXCÊNTRICO E DANO MUSCULAR

Quando o exercício possui um componente excêntrico (alongamento enquanto o músculo se contrai) a dor e a diminuição da força são quase imperceptíveis. (ALLEN, 2001; ASKLING; KARLSSON; THORSTENSSON, 2003). No entanto, quando o exercício é executado reforçando sua parte excêntrica repetidamente e sem adaptação prévia, a perda de força aparece tanto durante quanto logo depois de sua execução. Dor e o inchaço aparecem mais tardiamente, entre 24 -72 horas após a execução do esforço (ALLEN, 2001). Os sintomas mais utilizados para avaliação não invasiva do dano muscular são a dor muscular tardia (DOMS) e a perda de força e de amplitude do movimento (ALLEN, 2001; LEE, et al., 2002). Existem também alguns sintomas clínicos associados com o dano muscular, como o aparecimento no sangue de algumas enzimas (creatina quinase e lactato desidrogenase) e proteínas intramusculares (mioglobina) (DOLEZAL, et al., 2000; FRIDEN; LIEBER, 2001; TAKEKURA, et al., 2001; SAYERS, et al., 2003).

Em 1990, ARMSTRONG, analisando o dano muscular em ratos submetidos a um exercício excêntrico, identificou 4 fases implicadas no processo do dano muscular:

- *iniciadora*: eventos que iniciam o processo degenerativo;
- *autogênica*: período imediatamente após os eventos iniciadores, caracterizado pela sinalização dos sistemas proteolíticos e lipolíticos com ativação de proteases dependentes de Ca^{2+} ;
- *fagocítica*: de 4-6 horas após início da degeneração até 2-4 dias, marcado principalmente pelo processo inflamatório;
- *regenerativa*: 4-6 dias, regeneração das fibras musculares.

Durante o processo inflamatório são produzidas citocinas (IL-6, TNF- α etc) pelo tecido muscular e pelas células inflamatórias (macrófagos, monócitos). A produção de citocinas está associada à formação de EROS que são a causa dos danos oxidativos de lipídeos, proteínas e DNA (MCARDLE; JACKSON, 2000).

A maioria dos estudos que abordam o papel das EROS no dano muscular após exercício excêntrico refere-se à fase fagocítica (ou seja, ao processo inflamatório) através da migração de neutrófilos e macrófagos para o músculo esquelético (CHILDS, et al., 2001; LEE, et al., 2002). As mitocôndrias, sendo consideradas como um dos principais sítios de formação de EROS nas células, poderiam também estar relacionadas com os danos musculares e estresse oxidativo após exercício excêntrico. Porém o funcionamento e a colaboração das mitocôndrias no dano muscular após exercício excêntrico são pouco estudados. Nesse sentido, Walsh e colegas (2001) não verificaram nenhuma desordem no processo de fosforilação oxidativa e na disponibilidade do oxigênio utilizando fibras isoladas de músculo esquelético. Thompson e seu grupo (2001 e 2003) também estudaram o efeito de um exercício excêntrico na indução de proteínas de estresse, HSPs, em humanos. Eles observaram que o conteúdo de HSPs70 estava aumentado 48 horas após a sessão de exercício.

O processo inflamatório e o estresse oxidativo causados pelo exercício físico podem ser atenuados através da utilização de uma dieta alimentar específica. Já foi demonstrado que uma suplementação com antioxidantes não-enzimáticos, vitaminas C e E, pode diminuir o estresse oxidativo em humanos (CLARKSON, 1995). Porém um aporte alimentar deficiente em antioxidantes facilitaria o estresse oxidativo, então a fadiga e a perda de *performance*, nessa situação, uma suplementação com antioxidantes poderia ser benéfica para o organismo (SEN, 1995). O processo inflamatório causado pelo exercício pode ser também minimizado através de uma suplementação em óleos de peixe ricos em omega-3, porém os efeitos positivos destes óleos são ainda controversos, já que eles são muito sensíveis à peroxidação lipídica.

5. ÓLEOS DE PEIXE (OMEGA-3): UM PROTETOR CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO MUSCULAR?

Um ácido graxo é designado conforme o número de átomos de carbono, o número de ligações duplas (insaturações) e a localização da primeira dupla ligação mais próxima do grupamento metila terminal (CH₃). Esta última é definida pelas letras ω ou n , seguida de um número indicando a localização da primeira insaturação. Por exemplo, o ácido linolênico, 18:3 n -3, possui 18 carbonos, três ligações duplas e pertence à família do n -3, pois sua primeira ligação dupla localiza-se no terceiro carbono depois do grupo metila terminal (DACOSTA, 1998). Os principais ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) são apresentados na Tabela IV.

Tabela IV. Principais ácidos graxos poliinsaturados

Ácido Graxo	Nome	Família
18:2	Linoléico	n -6
18:3	γ -linolênico	n -6
18:3	α -linolênico	n -3
20:4	Araquidônico (ARA)	n -6
20:5	Eicosapentaenóico (EPA)	n-3
22:5	Docosapentaenóico	n -3
22:6	Docosahexaenóico (DHA)	n-3

O ser humano é capaz de sintetizar ácidos graxos das famílias n -7 e n -9, mas não aqueles das famílias n -3 e n -6; logo, esses ácidos graxos devem vir de nossa alimentação e são denominados ácidos graxos essenciais. Os ácidos linoléico (n -6) e linolênico (n -3) são precursores de outros ácidos graxos encontrados no organismo. Os ácidos graxos insaturados podem apresentar configurações *cis* e *trans* em suas duplas ligações. As mais abundantes no estado natural são as configurações *cis* (DACOSTA, 1998).

5.1. Papel dos ácidos graxos Omega-3 no organismo

A importância dos ácidos linoléico e araquidônico (um dos derivados do ácido linoléico) para multiplicação das células animais e como constituintes dos fosfolípídeos membranares já é bem conhecida. No entanto, a importância dos ácidos graxos poliinsaturados da série n -3 e seu caráter essencial vieram a ser descobertas tardiamente, entre os anos 70 e 80 (DACOSTA, 1998). Estudos epidemiológicos mostraram os efeitos protetores dos óleos de

peixe, contendo altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA n-3) em pacientes com câncer e doenças de coração (ANDO, et al., 2000; DAS, 2000).

O óleo de peixe é o nome genérico das preparações de óleo extraído de tecidos de peixes de água fria, como atum, salmão, sardinhas ou bacalhau. Esse óleo é rico em ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3), ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5 n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3) (DACOSTA, 1998; KELLEY, 2001).

Esses ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (n-3) são conhecidos pela sua potente ação antiinflamatória (CALDER, 2001). Em uma situação normal, o ácido araquidônico (ARA, ω -6) induz a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios como as prostaglandinas (PG), os tromboxanos (TX) e os leucotrienos (LT). A presença destes eicosanóides inicia a reação inflamatória. Os PUFA ω -3, em particular o EPA entra em competição com o ARA permitindo a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias com favorecimento da produção de citocinas anti-inflamatórias (Figura 4). Nesse sentido durante uma alimentação rica em óleos de peixe o EPA é incorporado nos fosfolipídeos das células inflamatórias, reduzindo assim a utilização do ARA para produção de citocinas pró-inflamatórias e intermediários eicosanóides (IL-1, IL-2, e α -TNF) (BABCOCK; HELTON; ESPAT, 2000; DAS, 2000; KELLEY, 2001).

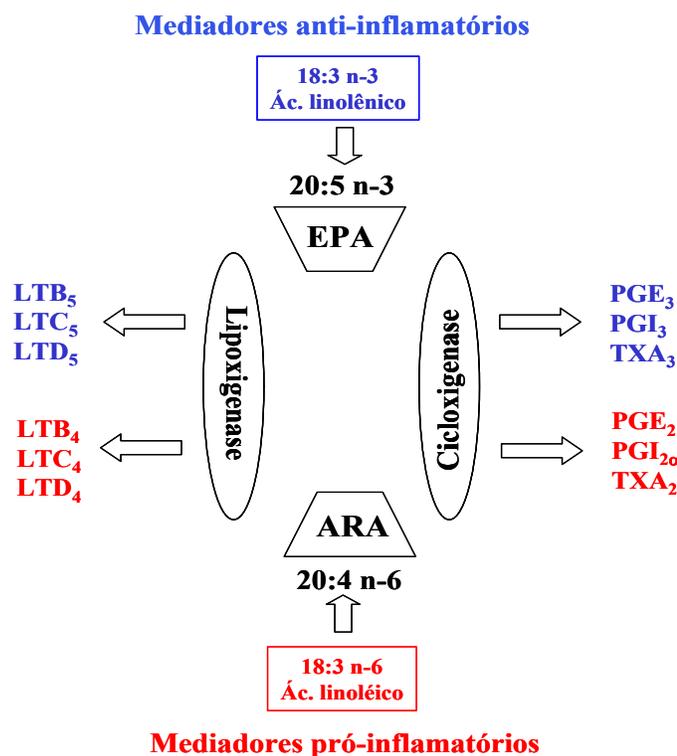


Figura 4. Eicosanóides derivados do EPA e do ARA (adaptado de FURST; KUHN, 2000).

ARA - ácido araquidônico; EPA - ácido eicosapentanóico; LT - leucotrienos; PG - prostaglandinas; TX - tromboxanos.

Além disso, esses compostos são conhecidos por reduzirem os níveis de triglicerídeos no plasma, por aumentarem a fluidez da membrana e por diminuírem a produção de plaquetas (FURST; KUHN, 2000; KELLEY, 2001). Estes PUFAs também parecem ser incorporados de forma seletiva nas membranas das mitocôndrias, podendo aumentar a β -oxidação em mitocôndrias e peroxissomas (FROYLAND, et al., 1997; OSMUNDSEN, et al., 1998; HALVORSEN, et al., 2001).

Por outro lado, eles podem ser facilmente oxidados devido o alto grau de insaturação, que facilita a propagação de reações de peroxidação lipídica (ATALAY, et al., 2000; KELLEY, 2001; REMITA, 2001). De Craemer e colaboradores (1994) mostraram que os óleos de peixe podem induzir a β -oxidação dos peroxissomas com a concomitante produção de peróxido de hidrogênio. No entanto, Ando et al. (2000) não mostraram evidências de aumento dos níveis de hidroperóxidos lipídicos e TBARS em diversos órgãos de ratos após uma suplementação com óleo de peixe (1,3% *n*-6 e 26,5% *n*-3). Calviello e grupo (1997) também mostraram que doses baixas de PUFA ω -3 são capazes de mudar a composição lipídica de membranas de diversos tecidos (eritrócitos, fígado, rins), porém sem aumentar a susceptibilidade ao estresse oxidativo.

As mitocôndrias podem apresentar sua composição lipídica modificada após uma suplementação com óleos de peixe ricos em PUFA ω -3 e isso pode ocasionar uma modificação no seu funcionamento. Mc Millin e colegas (1992) mostraram um aumento no conteúdo de PUFA ω -3 nos fosfolipídeos das mitocôndrias após suplementação com óleos de peixe, porém o funcionamento das mitocôndrias não foi alterado. Em um outro estudo, Herrero e colaboradores (2001) analisaram a influência do grau de insaturação dos ácidos graxos das mitocôndrias de coração na produção de H_2O_2 por essas organelas. Os autores mostraram que o aumento no grau de insaturação das mitocôndrias aumentou o dano oxidativo dos lipídeos e proteínas, e que a produção de H_2O_2 foi elevada apenas em situações em que o grau de redução do complexo III era maior que o normal.

Se os PUFAs ω -3 podem alterar o funcionamento das mitocôndrias com uma diminuição no controle respiratório paralelo a um aumento da permeabilidade aos prótons e perda do potencial de membrana, isso poderia também estar relacionado com uma alteração na produção de EROS (STILLWELL, et al., 1997; BRAND, et al., 2003).

5.2. Omega-3 e exercício físico

Alguns estudos sugerem que os óleos de peixe diminuem os níveis de citocinas pró-inflamatórias nos homens (HUERTAS, et al., 1994; TOFT, et al., 2000; LENN, et al., 2002). Toft e seu grupo (2000) observaram que 6 semanas de suplementação com óleos de peixe

(3,6 g de PUFAs ω -3, dos quais 53% de EPA e 31% de DHA) modificou a composição lipídica de leucócitos de atletas. Isso reforça que os PUFAs ω -3 poderiam estar sendo incorporados no lugar do ARA; porém, esta suplementação não modificou a resposta aguda das citoquinas após um exercício agudo exaustivo.

Todavia, os estudos que concernem os PUFAs ω -3 e o estresse oxidativo muscular após o exercício físico não são numerosos. A suplementação com PUFAs ω -3 sozinha induziu um aumento da atividade da CAT, e em alguns casos da GPx e da SOD em diferentes tecidos (ATALAY, et al., 2000; VENKATRAMAN; LEDDY; PENDERGAST, 2000). Quando o exercício é associado a uma suplementação com óleos de peixe (PUFAs ω -3) é possível observar um aumento na atividade das enzimas antioxidantes em diversos tecidos, seguido ou não de um aumento dos marcadores de danos oxidativos, como TBARS etc (OOSTENBRUG, et al., 1997; VENKATRAMAN, et al., 1998; REDDY AVULA; FERNANDES, 1999; ATALAY, et al., 2000). Por exemplo, Lenn e colaboradores (2002) não verificaram nenhuma alteração na dor muscular tardia (DOMS) e nos marcadores de dano muscular (CK, TBARS etc) de indivíduos submetidos a 50 flexões isocinéticas máximas do cotovelo após 30 dias de suplementação com 1,8 g/dia de PUFAs ω -3. De fato, um aporte adequado de vitamina E paralelo a suplementação em PUFAs ω -3 parece ser primordial para evitar os efeitos deletérios da peroxidação lipídica (ANDO, et al., 2000; VENKATRAMAN; LEDDY; PENDERGAST, 2000).

Estudos recentes mostram ainda que estes dois ácidos graxos, o EPA e o DHA, apresentam papéis diferentes no metabolismo lipídico. O EPA seria o principal responsável pela diminuição da hipertrigliceridemia e pelos efeitos imunomodulatórios dos óleos de peixe, sendo metabolizado nas mitocôndrias. Enquanto que o DHA é metabolizado nos peroxissomas (OSMUNDTSEN, et al., 1998; MADSEN, et al., 1999b; COLQUHOUN; RAMOS; SCHUMACHER, 2001). Aparentemente o EPA tem a propriedade de induzir proliferação das mitocôndrias enquanto que o DHA dos peroxissomas (FROYLAND, et al., 1997; TOTLAND, et al., 2000).

Até hoje não se sabe se a proliferação mitocondrial devido uma suplementação em EPA poderia ser um fator ergogênico durante o exercício físico. E ainda, o papel destes dois ácidos graxos, o EPA e o DHA, numa situação de estresse oxidativo muscular e na produção de EROS por mitocôndrias isoladas após o exercício físico necessita de melhores esclarecimentos.

OBJETIVOS

Este trabalho de tese teve como objetivo geral a melhor compreensão do nível de estresse oxidativo muscular induzido pelo treinamento em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de ratos. Para isso nós dividimos o trabalho em 2 estudos com objetivos mais específicos.

No estudo I os objetivos foram analisar os efeitos de um treinamento de 8 semanas e de uma única sessão de exercício agudo até a exaustão, ambos com predominância excêntrica, no funcionamento das mitocôndrias e no sistema antioxidante de músculos de ratos.

O estudo II teve como objetivo analisar os efeitos de uma suplementação rica em ácidos graxos poliinsaturados ω -3 no funcionamento das mitocôndrias e no sistema antioxidante de músculos de ratos sedentários e treinados em um protocolo com predominância concêntrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS E CUIDADOS

Os experimentos foram realizados seguindo as recomendações da “European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Scientific purposes (Council of Europe N° 123, Strasbourg, 1985)”.

Ratos machos, livres de quaisquer agentes patogênicos (“specific-pathogen free”) da linhagem Wistar, de aproximadamente 6 semanas foram fornecidos pela HARLAN (Gannat, França). Durante o período de treinamentos os ratos foram mantidos em ambiente controlado (temperatura entre 22-25 °C e fotoperíodo de 12:12 horas), sendo providos de ração (AO3, UAR Villemoisson, France) e água *ad libitum*.

2. ESTUDO I

Após uma semana de aclimação ao biotério do laboratório, os ratos passaram por uma semana de adaptação à esteira rolante (Figura 5).

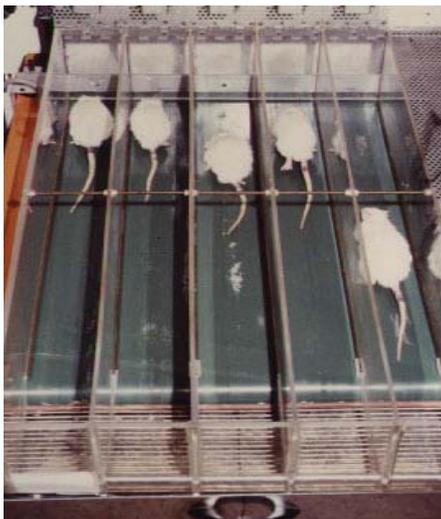


Figura 5. Foto da esteira rolante utilizada para os diferentes protocolos.

A metade dos animais ($n = 16$) realizou um protocolo de treinamento com predominância excêntrica durante 8 semanas. Ao final das 8 semanas de treinamento cada grupo, sedentário e treinado foi dividido em grupo repouso e grupo exercício agudo (Figura 6).

Para o estudo I, nós analisamos os efeitos de um exercício excêntrico crônico ou agudo no funcionamento mitocondrial (consumo de oxigênio e produção de H₂O₂) e o estresse oxidativo muscular (atividade das enzimas antioxidantes). Os animais que não realizaram a sessão de exercício agudo foram denominados S e T (sedentários e treinados, respectivamente) e aqueles submetidos à sessão de exercício agudo foram denominados SE e TE. Os animais treinados em repouso não submetidos ao exercício agudo foram eutanasiados 48 horas após o término do treinamento, no mesmo momento que seus homólogos sedentários. Os animais submetidos à sessão de exercício agudo foram eutanasiados imediatamente após o término do exercício.

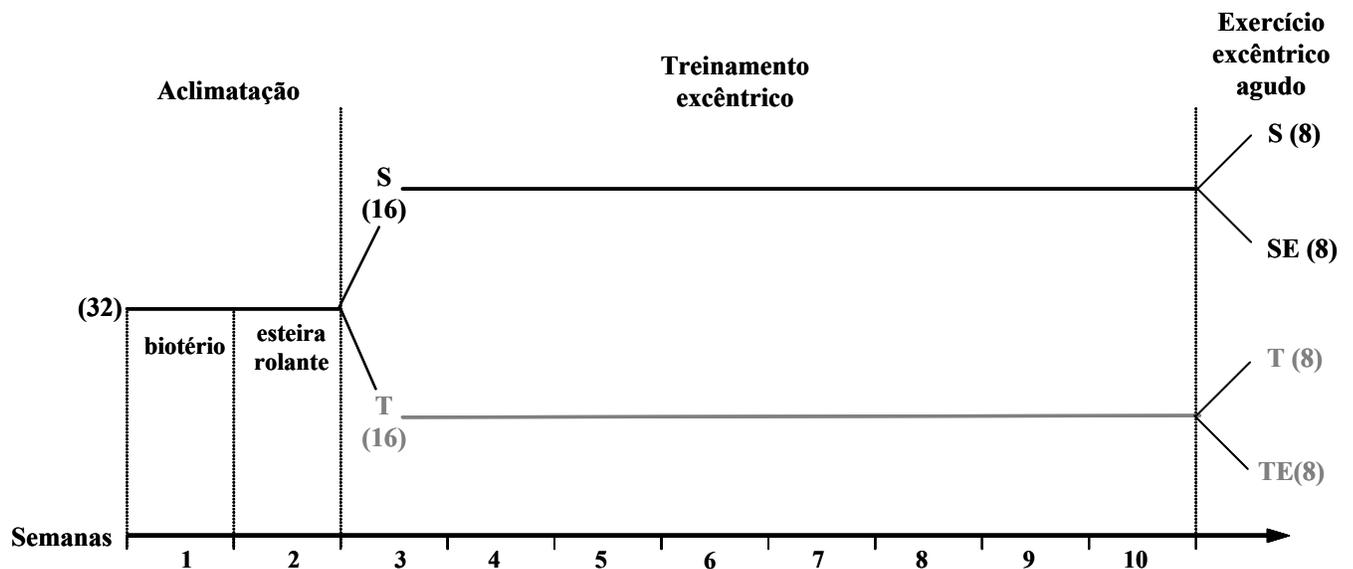


Figura 6. Esquema de divisão dos animais para os protocolos de treinamento e de exercício agudo excêntricos.

(n): números de animais por grupo. S: sedentários. T: treinados. SE e TE: sedentários e treinados + exercício agudo.

2.1. Protocolo de treinamento ao exercício excêntrico intermitente

Os animais do grupo treinado realizaram 8 semanas de treinamento com predominância excêntrica, conforme detalhado na Tabela V. O treinamento foi efetuado em esteira rolante numa inclinação negativa de 7°.

Tabela V. Protocolo de treinamento (- 7° de inclinação)

Semana	Velocidade (m/min)	Duração (min)	Pausa (min)	Número de repetições	Duração total (min)	Distância (m/semana)
1	20	5	2	4	20	2000
2	30	2,5	1	4	10	1500
3	32.5	2,5	1	6	15	2437,5
4	35	2,5	1	6	15	2625
5 - 8	35	2,5	1	6	15	2625

2.2. Protocolo de exercício agudo excêntrico

Ao final das 8 semanas de treinamento, uma parte dos grupos sedentário e treinado realizou uma sessão de exercício excêntrico exaustivo cujas características (variação de velocidade e duração do protocolo) estão detalhadas na Tabela VI. Após 62 minutos, a variação na velocidade e duração do exercício foi controlada da seguinte forma: 4 minutos a 30m/min e 1 minuto a 40m/min consecutivamente até a exaustão. O limite para indicar a exaustão dos animais era quando os mesmos se recusavam a correr, tocando mais de 3 vezes por minuto a parte de trás da esteira rolante.

Tabela VI. Protocolo de exercício agudo excêntrico (-7° de inclinação)

Tempo (min)	Velocidade (m/min)
0-5	8
6-11	12
12-25	15
26-32	12
33-37	15
38-52	20
53-62	25
63-66	30
67	40

3. ESTUDO II

Na segunda série de experimentações, os animais são: ou treinados (T) ou sedentários (S) durante 8 semanas, após 2 semanas de aclimação (biotério e esteira rolante). Durante as duas últimas semanas do protocolo a metade dos animais sedentários e treinados foi suplementada com óleos de peixe ricos em EPA e DHA (ver Figura 7), sendo nominados nos seguintes grupos S, T, S ω 3 e T ω 3.

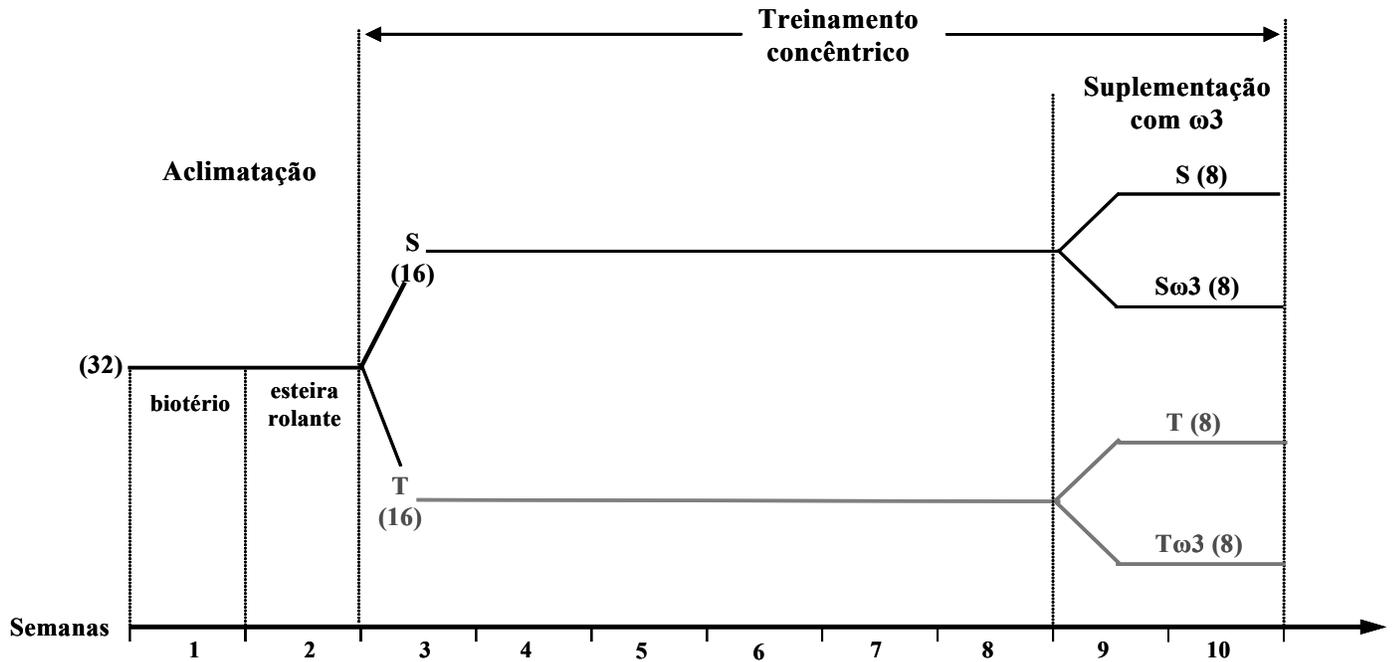


Figura 7. Esquema de divisão dos animais para os protocolos de treinamento, de exercício agudo e de suplementação em óleos de peixe.

(n): números de animais por grupo. S: sedentários. T: treinados. S ω -3: sedentários + óleos de peixe. T ω -3: treinados + óleos de peixe.

Para o estudo II, nós analisamos os efeitos de uma suplementação com óleos de peixe no consumo de oxigênio e na produção de H₂O₂ de mitocôndrias de músculo, assim que nos sistemas de luta contra o estresse oxidativo em ratos sedentários e treinados. Os animais dos grupos T e T ω 3 foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de treinamento ao mesmo tempo que seus homólogos sedentários, S e S ω 3.

3.1. Treinamento ao exercício concêntrico intermitente

O protocolo de treinamento foi realizado durante 8 semanas em uma esteira rolante sem inclinação e com pausas ativas, conforme tabela abaixo:

Tabela VII. Protocolo de treinamento (sem inclinação)

Semana	Velocidade (m/min)	Duração (min)	Pausa (min)	Velocidade Pausa (m/min)	Número de repetições	Duração total (min)	Distância (m/semana)
1	20	5	2	10	4	33	2800
2	30	2,5	1	15	4	16,5	1725
3	32,5	2,5	1	16	6	20	2837,5
4	35	2,5	1	17,5	6	20	3062,5
5 - 8	35	2,5	1	17,5	6	20	3062,5

3.2. Suplementação com óleos de peixe

Durante as duas últimas semanas antes do final do treinamento metade dos animais, dos dois grupos, sedentário e treinado, recebeu uma suplementação rica em óleos de peixe.

Os animais receberam uma suplementação especial rica em óleos de peixe (EPAX 7010 EE) produzida por PRONOVA Biocare (Sandefjord, Noruega) e comercializada por POLARIS (Pleuven, França); sua composição exata está descrita na Tabela VIII abaixo:

Tabela VIII. Composição do óleo de peixe EPAX7010 (EE)

Ácido Eicosapentaenóico (EPA)	70%
Ácido Docosahexaenóico (DHA)	13,5%
Total ácidos graxos ω -3	87,7%
Ácidos graxos saturados	0%
Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)	2%
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)	96%
α -tocoferol (vitamina E)	2,0-3,0mg/g

A suplementação foi realizada por gavagem orogástrica e consistia em 1500mg (EPAX 7010) por Kg de massa corporal. O óleo de peixe foi administrado em veículo 0,5% CMC (carboximetilcelulose) enquanto que os ratos controle receberam CMC, 0,5% durante o mesmo período.

4. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO TECIDO MUSCULAR

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os músculos foram extraídos rapidamente através de um procedimento cirúrgico simples. O músculo quadríceps foi cuidadosamente imergido no tampão de isolamento e imediatamente utilizado para extração de mitocôndrias. O músculo gastrocnêmio foi pesado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para então serem estocados a -80°C . Esse músculo foi posteriormente utilizado para as dosagens de atividade das enzimas antioxidantes e da citrato sintase, e para quantificação de proteínas de estresse (HSP72) por *western blotting*, esta última somente no Estudo II.

5. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DO MÚSCULO QUADRÍCEPS

O isolamento das mitocôndrias é baseado no princípio de centrifugação diferencial. Os músculos quadríceps, de ambas as patas, foram removidos e rapidamente submersos em meio de isolamento a 4°C contendo sacarose 100 mM, KCl 50 mM, EGTA 5 mM and Tris/HCl 50 mM, pH 7,4. Os músculos foram separados dos tecidos adiposo extracelular e conectivo, cortados em pequenos pedaços e homogeneizados em homogeneizador Potter-Elvehjem. O homogenato é incubado por 5 minutos com uma protease (Nagarse, 1 mg/g de peso de músculo), em seguida diluído 1:2 com o mesmo tampão. Os núcleos e partículas celulares foram eliminados por uma centrifugação a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante contendo as mitocôndrias foi recuperado e filtrado, para então ser centrifugado novamente a 10000 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 40 mL de meio de isolamento e centrifugado pela última vez a 10000g por 10 minutos. Finalmente o sedimento contendo as mitocôndrias foi ressuspenso em meio de estoque contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e Tris/HCl 20 mM, pH 7,4. Após a medida da concentração de proteínas, pelo método de Biureto utilizando soro de albumina bovina (BSA) como padrão, as mitocôndrias foram diluídas na concentração de 20 mg/mL em meio de estoque. Todas as centrifugações foram efetuadas a 4°C .

5.1. Medida do consumo mitocondrial de O_2 por oxigrafia

O consumo de oxigênio foi medido em um oxígrafo (Gilson 5/6H) equipado com um eletrodo sensível ao oxigênio Clark, em cuba de vidro de volume de 1,5 mL, temperatura controlada a 30°C e agitação constante. O tampão de incubação, saturado com ar ambiente, era constituído de sacarose 200 mM, fosfato de potássio tribásico 10 mM e Tris/HCl 20 mM, pH 7,4. Neste tampão foram adicionados BSA livre de ácidos graxos em

uma concentração final de 0,1% (1 mg/mL), Pi 10 mM et 0,2 mg de proteínas/mL de mitocôndrias.

Nestas condições a concentração de oxigênio diluído no tampão de incubação é de 440 nanoátomos de oxigênio por mL (nátomo/mL).

Vários substratos respiratórios, em concentrações saturantes, foram utilizados a fim de estudar os sítios de acoplagem da cadeia de transporte de elétrons. Os seguintes substratos foram utilizados conforme os objetivos de cada experimento:

- Para o complexo I: piruvato/malato (5mM/2,5mM) ou glutamato/malato (5mM/2,5mM). O piruvato gera NADH na matriz mitocondrial através do complexo piruvato desidrogenase, e o malato gera NADH por intermédio da malato desidrogenase. O malato gera NADH na matriz via malato desidrogenase, e é associado ao glutamato para permitir o funcionamento da lançadeira malato-aspartato.
- Para o complexo II: succinato (5mM) na presença de rotenona (5 μ M). O succinato é reduzido em fumarato pela succinato desidrogenase formando FADH₂. A rotenona inibe o fluxo reverso de elétrons via complexo I.
- Para complexos I e II: glutamato/malato/succinato (5mM/2,5mM/5mM), gerando NADH e FADH₂.
- Para o complexo IV (citocromo c oxidase): TMPD (N,N,N',N' tetrametil-1,4-fenilenidiamina) (1mM) e ascorbato (5mM). O ascorbato doa elétrons ao TMPD que reduz o citocromo c, substrato da citocromo c oxidase.

Num primeiro momento as mitocôndrias são incubadas na presença dos diferentes substratos, mas na ausência de ADP, ou seja, consumo de oxigênio correspondente ao estado não-fosforilante (estado 2). A adição de 100 μ M ADP iniciou o estado fosforilante (estado 3) e ao final da utilização do ADP as mitocôndrias voltam a respirar em estado não-fosforilante, desta vez após adição de ADP, também chamado de estado 4.

A eficiência do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial pode ser medida através de dois parâmetros: a razão ADP/O, que mede a eficiência do sistema de fosforilação oxidativa e o controle respiratório (CR) que consiste na razão entre consumo de oxigênio em presença de ADP (estado 3) e após o consumo do ADP adicionado (estado 4). No Estudo II somente o CR foi utilizado para avaliar a eficiência do processo de fosforilação, pois a utilização da oligomicina 1,25 μ M (inibidora da F₀F₁-ATP sintase) não permitiu a medida da razão ADP/O. A oligomicina foi utilizada com o objetivo de medir o fluxo não-específico de prótons pela membrana interna da mitocôndria.

5.2. Medida da produção mitocondrial de H₂O₂ por fluorimetria

A medida de produção mitocondrial de H₂O₂ já é utilizada no laboratório em outras experimentações e é baseada no método descrito por Barja (1999). Este método utiliza o ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-methoxi-fenilacético, HVA) que reage com o H₂O₂ em presença da peroxidase de raiz forte (HRP) formando um dímero altamente fluorescente (λ_{ex} 312 nm e λ_{em} 420 nm). As medidas foram realizadas nas mesmas condições que aquelas utilizadas na oxigrafia (30°C, agitação constante e mesmo tampão). Após adição de mitocôndrias 0,2 mg/mL de proteínas, HVA (0,1mM) e HRP (6U/mL), nenhum aumento de fluorescência foi observado. Em seguida os substratos são adicionados, os mesmos utilizados nas medidas de consumo de O₂, e a fluorescência foi detectada em fluorímetro SFM-25 (Kontron, France). Na presença do succinato a adição de rotenona (5 μ M) provoca uma redução drástica do sinal de fluorescência.

Uma curva padrão de concentração foi realizada a partir de uma solução de H₂O₂ (30%, v/w). Não houve aumento de fluorescência na ausência dos substratos ou mitocôndria. Após adição de catalase observa-se uma queda da fluorescência dose-dependente da concentração de H₂O₂.

5.3. Separação da Cardiolipina por HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography)

Mitocôndrias isoladas em volume correspondente a 4mg de proteínas foram adicionadas à solução clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) e armazenadas a -80°C para análises posteriores.

No momento das análises as amostras foram descongeladas e 1mL de metanol foi adicionado. Agitou-se e as amostras permaneceram em banho-maria 37°C por 40 minutos. Após nova agitação, os tubos foram centrifugados a 500 g por 5 minutos apenas para separar proteínas. O sobrenadante foi recuperado e foram adicionado 4mL de clorofórmio/metanol e 1,4 mL de PBS (diluído 1/10). Uma nova centrifugação a 500 g é realizada para separar as duas fases (aquosa e orgânica). A fase orgânica é recuperada e evaporada a 37°C, sendo após ressuspendida em 500 μ L de clorofórmio. Para a separação de todos os lipídeos foram utilizadas colunas Supelco LC-NH₂ (géis de sílica com grupamentos amina) pré-condicionadas com 5mL de hexano. O processo de separação é dividido em diversas fases para eluição dos diferentes lipídeos (tabela IX). A cardiolipina sendo um fosfolipídio carregado (carga -2) necessita de etapas suplementares para separação, conforme tabela a seguir:

Tabela IX. Separação e purificação de lipídeos.

Frações (F)	Solventes de eluição	Volume do solvente
Condicionamento da coluna Supelco LC-NH2	Hexano	5mL
Aplicação da amostra	Clorofórmio	500µL
F1 -lipídeos neutros	Éter etílico (1:1)	2mL
F2- ceramidas livres e moglicerídeos	Clorofórmio/Metanol (23:1)	3mL
F3- ácidos graxos livres e hidrolisados	Diisopropilester/Ácido acético (98:4)	2mL
F4- Glicolipídeos neutros e bases esfingóides livres	Acetona/Metanol (9:1)	4mL
F5-Fosfolipídeos neutros	Clorofórmio/Metanol (2:1)	3mL
F6- Fosfolipídeos e glicolipídeos ácidos	Metanol + Acetato de amônia 0,2M	4mL
Liberação dos grupos NH ₂ Condicionamento da coluna Envi-Chrom P-C18	Metanol/PBS (1:1)	5mL
Aplicação da amostra	Amostra + H ₂ O	3mL
Lavagem de sais e açúcares	H ₂ O	3mL
Eluição da cardiolipina	Metanol Clorofórmio/Metanol (1:1)	3mL 4mL

Após recuperação da cardiolipina o solvente é evaporado a 37°C. O sedimento é recuperado e ressuspendido em 100µL de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) e então aplicado na placa de sílica gel (SILICA GEL 60, MERCK). A migração foi efetuada em solvente clorofórmio/metanol/H₂O (64:25:4) durante 1 hora. Ao final da migração a placa foi secada. A banda correspondente a cardiolipina de cada amostra foi identificada a partir do padrão de cardiolipina (100µL equivalente a 0,7mg/mL) que foi migrado concomitantemente com as amostras. Cada banda, correspondente a cada amostra, foi raspada e recuperada em clorofórmio/metanol (1:1, v:v) para análise da composição lipídica. Este procedimento foi utilizado somente para mitocôndrias isoladas de músculo esquelético do Estudo II.

5.4. Análise da composição em ácidos graxos

Os lipídeos das mitocôndrias foram extraídos por transmetilação segundo método de Morrison e Smith (1964). Foram adicionados às amostras etanol (3:1, v/v) e clorofórmio (6:1, v/v). Após agitação vigorosa a mistura foi centrifugada a 500g, e a fase inferior foi recuperada e evaporada a seco a 37°C, na presença de nitrogênio.

O sedimento foi então ressuspendido em 250µL de tolueno/metanol (2:3, v/v) e 250µL de reativo BF₃ (trifluoreto de boro). Após agitação, levou-se em banho seco por 90 minutos

a 100° C. Imediatamente após incubação, colocaram-se os tubos em gelo para bloquear a reação e então adicionaram-se 750µL de K₂CO₃ 10%. Foi adicionado 1mL de isooctano para extrair os ácidos graxos. Agitou-se novamente e recentrifugou-se a 800g por 10 minutos, recuperando a fase orgânica que foi evaporada a seco a 37°C e ressuspensa em isooctano (200µL para a análise de lipídeos totais e 50µL para a análise da cardioplipina).

Em seguida, a amostra (1µL) é injetada em cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 possuindo coluna capilar revestida de SP2380 (Supelco- 60m X 0.25mm X 0.25µm). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A injeção de entrada foi mantida a 230°C e o detector a 250°C (mantido com fluxo de ar a 280mL/min e de hidrogênio a 30mL/min). A análise foi iniciada a 57°C durante 2 minutos, e então elevada em 20°C/min até 150°C e em seguida de 4°C/min até 250°C. Ao final a temperatura permanece a 250°C por 4 minutos. Os tempos de retenção de cada ácido graxo foram identificados em comparação com padrões comercialmente disponíveis. Os resultados foram expressos em % do total de ácidos graxos identificados. Todos os procedimentos foram realizados em tubos de vidro e sempre na presença de nitrogênio para evitar a oxidação dos ácidos graxos.

6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

6.1. Enzimas antioxidantes

A preparação das amostras para dosagem de enzimas antioxidantes foi efetuada da seguinte forma: uma porção do músculo, ainda congelado, foi cortada, pesada e imediatamente homogeneizada em um Potter Elvehjem a 4°C em tampão 100mM KH₂PO₄, 1mM DTT e 2mM EDTA, pH 7,4. Após uma centrifugação a 3000g por 5 minutos, o sobrenadante foi recuperado para os ensaios enzimáticos. A medida da SOD foi realizada no mesmo dia, enquanto que as dosagens da CAT e da GPx foram realizadas na semana que seguinte a homogeneização.

Catalase (EC. 1.11.1.6)

O método utilizado é baseado na propriedade da CAT em eliminar o peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). O desaparecimento do H₂O₂ foi medido por espectrofotometria a 240 nm conforme a reação seguinte:



As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 0°C com 2µL de etanol 95%. Em seguida 2µL de Triton 1% foram adicionados. Os homogenatos foram então centrifugados a

5000g durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram então recuperados e utilizados para os ensaios enzimáticos. Os ensaios foram conduzidos em tampão KH_2PO_4 40 mM, HNa_2PO_4 60mM, pH 7,4. A absorbância foi medida na presença do homogenato sozinho, para medida do "branco". 50 μL de H_2O_2 (180 mM) foram adicionados para iniciar a reação.

O cálculo da atividade da catalase foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (\log A1/A2)$, sendo A1 o valor da absorbância no tempo inicial (t1) e A2 o valor da absorbância no tempo final (t2), de ambas as absorbâncias foi subtraído o valor do branco. O Δt é a variação do tempo do ensaio (30 segundos). Os resultados foram expressos em U/100 mg de proteínas totais.

Glutathione Peroxidase (EC. 1.11.1.9)

A atividade da GPx foi determinada via a formação da glutathione oxidada (GSSG) a partir da glutathione reduzida (GSH) (TAPPEL, 1978). O sistema necessita da presença de um oxidante (hidróxido de cumeno) e da glutathione redutase (GR) que reduz o GSSG em GSH através da oxidação do NADPH em NADP.



O ensaio consiste em medir o desaparecimento do NADPH por espectrofotometria. A reação foi monitorada a 340nm, na temperatura de 37° C e em 1 mL de meio de reação contendo GSH 0,25mM, NADPH 0,12mM, GR 1U/mL e NaCN 10mM e tampão Tris 50mM/EDTA 0,1mM pH 7,6. Uma primeira medida (branco) é realizada em presença do meio de reação e do cumênio- H_2O_2 . Em seguida a amostra de músculo é adicionada e a absorbância registrada. Para o cálculo da atividade foi utilizada a formula: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$; onde A é a absorbância da amostra, $\epsilon = 6220 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$, c é a concentração de NADP e l é o caminho óptico da cubeta. A atividade foi expressa em U/100 mg de proteínas totais.

Superóxido dismutase (EC.1.15.1.1)

O método espectrofotométrico utilizado possibilita a medida da atividade da SOD de forma indireta, utilizando o sistema xantina/xantina oxidase, como produtor de $\text{O}_2^{\cdot-}$, e o citocromo c (FLOHE; OTTING, 1984). A redução do citocromo c pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ é monitorado a 550nm. A SOD das amostras musculares entra em competição para utilização do $\text{O}_2^{\cdot-}$ limitando assim a redução do citocromo c, conforme Figura 8.

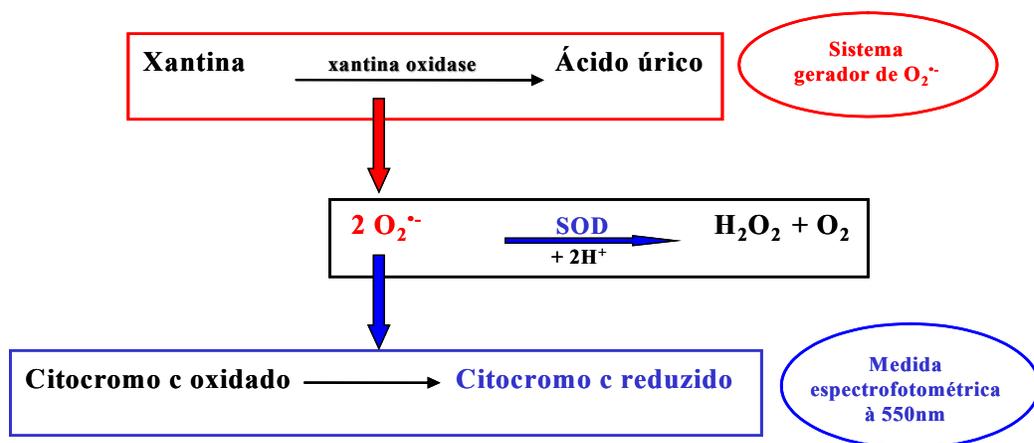


Figura 8. Sistema utilizado para detecção da atividade SOD.

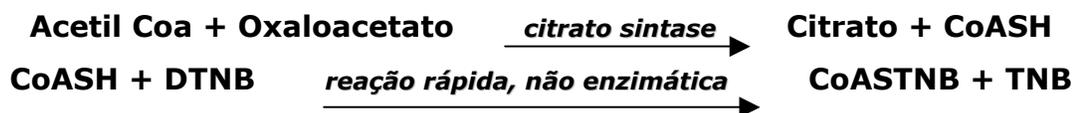
A medida é efetuada em 1 mL de tampão contendo xantina 0,5mM, citocromo c 0,2mM, KH_2PO_4 50mM, EDTA 0,1mM, pH 7,8 e 20 μL de homogenato de músculo a 25° C. Um volume de xantina oxidase (0,01 U/mg) é adicionado para iniciar produção de ânion superóxido que reduzirá o citocromo c.

A isoforma cupro-zinco dependente da enzima (Cu, Zn-SOD) tem a particularidade de ser inibida pelo cianeto (NaCN 1mM). Assim, pode-se distinguir as duas isoformas pela medida em presença e em ausência de cianeto; o que não afeta a isoforma manganês dependente (Mn-SOD). Logo, subtraímos o valor da atividade da SOD total, sem adição do cianeto, do valor da Mn-SOD, com adição do cianeto; e assim obtivemos os valores da Cu, Zn-SOD. Uma curva padrão de SOD é efetuada nas mesmas condições. E a unidade de atividade da SOD é definida com a quantidade de enzima para inibir em 50% a redução do citocromo c oxidado. A atividade foi expressa em U/100 mg de proteínas totais.

6.2. Citrato Sintase (EC.4.1.37)

A citrato sintase é uma enzima que se encontra na matriz mitocondrial. Ela inicia a síntese do citrato a partir do oxaloacetato (OAA) e do acetil-CoA. A medida da atividade desta enzima é freqüentemente utilizada como marcador do potencial oxidativo celular (SRERE, 1969). A atividade da enzima citrato sintase foi medida em extrato de mitocôndrias.

O meio de reação continha 0,1mM DTNB (5,5'-ditio-bis-[2-nitrobenzoato]), 1mM Acetil-CoA e a amostra (extrato de mitocôndrias). A reação foi iniciada acrescentando-se 1mM OAA. O DTNB reage com o CoA-SH produzindo TNB. A formação de TNB foi seguida a 412nm em espectrofotômetro, segundo as seguintes reações:



O cálculo da velocidade foi realizado segundo a lei de Beer-Lambert, cujo coeficiente de extinção molar do TNB é $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas mitocondriais.

6.3. Creatina quinase plasmática (CK) (EC 2.7.3.2)

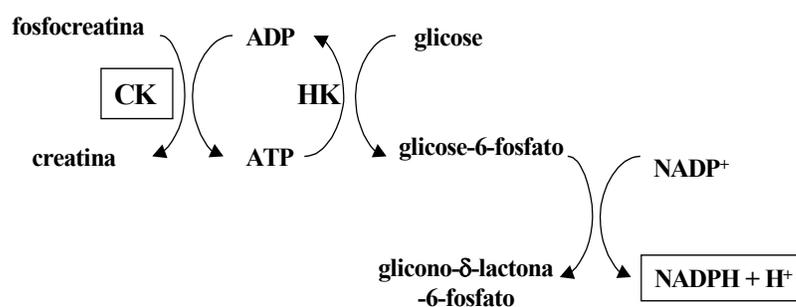
Para a medida da atividade da CK, o sangue foi recuperado, imediatamente após o sacrifício, em tubos contendo anticoagulante (heparina) e centrifugado a 3000 g durante 15 minutos e o plasma recuperado é então congelado a -80°C .

A medida da atividade da creatina quinase plasmática é utilizada como marcador de danos musculares. Esta enzima encontra-se no citosol e sua presença no plasma pode indicar danos nas membranas celulares. A creatina quinase catalisa a reação reversível entre a fosfocreatina e o ADP, formando creatina e ATP (OLIVER, 1955).

A atividade da enzima foi medida através da monitoração indireta da reação:



Por intermédio indireto das reações catalisadas pelas enzimas hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi possível medir a produção de NADPH que é diretamente proporcional à atividade da creatina quinase.



O ensaio foi conduzido adicionando-se 40mM D-glicose, 1mM NADP⁺, 7mM ADP, 10mM MgCl₂, 10 μL de amostra (plasma), 3 U/mL de hexokinase e 1,5 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase em tampão TRAP (trietanolamina) 0,1M pH 7,0. Após leitura do branco foi adicionada 4mM fosfocreatina para início da reação e a redução de NADP⁺ foi seguida espectrofotometricamente a 340 nm a 25°C. Para o cálculo da atividade da enzima

foi utilizada a lei de Beer-Lambert cujo coeficiente de extinção molar do NADPH é $\epsilon = 6220$ M⁻¹.cm⁻¹. As atividades são expressas em U/L de plasma.

7. ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP 72)

Os músculos utilizados para a análise de conteúdo de HSPs foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4. Após homogeneização, 200 μ L do homogenato foram adicionados a 200 μ L de tampão de amostra contendo 40 mM Tris, 1% SDS, 6% glicerol, 1% β -mercaptoetanol e 0,1 μ M azul de bromofenol, pH 6.8. Essa mistura foi então armazenada a -70°C.

Para a quantificação das HSPs72 foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de um "immunoblotting". O método de determinação do conteúdo de HSP72 já é freqüentemente utilizado no laboratório apresentando grande sensibilidade e especificidade (ECOCHARD, et al., 2000; SERVAIS, et al., 2003).

Após descongeladas, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min, e então diluídas e aplicadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que consistia em um gel de empacotamento de 5% ("stacking gel") e um gel de separação de 12,5% ("running gel"). A migração foi realizada em três etapas: 30 minutos 50V, 2 horas 100V e 2 horas 125V.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose durante um período de 12 horas (25V, voltagem constante). Após a transferência os sítios de fixação dos anticorpos foram saturados durante 2 horas na presença de leite em pó desnatado (5%) diluído em tampão Tris 20mM, NaCl 0,13M e Tween 0,1%, pH 7,6. As membranas foram enxaguadas e então incubadas por 2 horas com anticorpo monoclonal específico para HSP72 (SPA 810, StressGen, TEBU, diluição 1:1000). Em seguida as membranas foram enxaguadas 3 vezes durante 10 minutos em tampão TBS-Tween 0,1% para então serem incubadas com anticorpo secundário « Goat anti-mouse immunoglobulin G conjugado com horseradish peroxidase » (Bio-Rad, diluição 1:16000) por 1 hora em temperatura ambiente. O último passo antes da imunorevelação, foi o enxágüe das membranas: 2 vezes durante 10 minutos em tampão TBS-Tween 0,1% e uma vez em tampão TBS sozinho.

A imunodeteção foi realizada utilizando um kit EDL (Enhanced Chemiluminescence, RPN 2106, Amershan). Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com papel fotográfico sensível (Kodak). A quantificação das bandas foi feita por densitometria óptica (DO) utilizando o programa (Kodak 1D). Os valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Para evitar a variabilidade entre os géis os resultados foram expressos pela razão entre as DO das bandas do experimento e a DO de uma banda controle obtida de amostras de

músculo sóleo de ratos previamente submetidos a choque térmico (38°C) e físico (natação) por 45 minutos (ECOCHARD et al., 2000).

8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para os cálculos das atividades das diversas enzimas os valores foram expressos pela concentração de proteínas. As dosagens de proteínas para os cálculos de atividade enzimática e separação das HSPs foram feitas através do método de Lowry (1951). Enquanto que os cálculos para dosagem de proteínas mitocondriais para experimentos de consumo de oxigênio e produção de H₂O₂ foram feitos pelo método de Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram expressos como média e E.P. (Erro Padrão). No Estudo I o teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*, para comparação não-pareada dos grupos. Enquanto que no Estudo II a análise estatística foi realizada através de um teste de variância ("two-way ANOVA") seguido do teste *post-hoc* Fischer.

O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$. O programa STATVIEW foi utilizado para as análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDO I

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos crônico e agudo de um exercício excêntrico, no funcionamento e na produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas de músculo, assim como na composição lipídica mitocondrial e atividade de algumas enzimas antioxidantes. Ambos os grupos de animais, sedentários e treinados foram submetidos a uma sessão aguda de exercício excêntrico exaustivo, usado também como indicador de *performance*. Os animais sedentários e treinados que permaneceram em repouso foram denominados S e T, enquanto que os animais que realizaram exercício agudo foram denominados SE e TE.

Para obtermos uma quantidade suficiente de mitocôndrias realizamos a extração de mitocôndrias do músculo quadríceps. Para o restante dos experimentos utilizamos o músculo gastrocnêmio. Os músculos quadríceps e gastrocnêmio são similares nas suas composições de fibras (fibras tipo IIa) e nas suas características oxidativas (DELP; DUAN, 1996; LEEUWENBURGH, et al., 1999; SERVAIS, et al., 2003).

RESULTADOS

Efeitos do treinamento sobre a performance

A massa corporal dos animais antes do início do treinamento era em média de $234,3 \pm 3$ g. Após 8 semanas de treinamento, a massa corporal dos animais treinados ($366,2 \pm 7$ g) estava significativamente menor que aquela dos animais sedentários ($397,3 \pm 7$ g) ($P < 0,01$).

Os resultados da Figura 9 mostram que houve uma melhora significativa no tempo de exaustão dos ratos treinados, quando submetidos ao exercício agudo (TE, 89 ± 3 minutos) comparados com os do grupo sedentário nessas mesmas condições (SE, 61 ± 2 minutos).

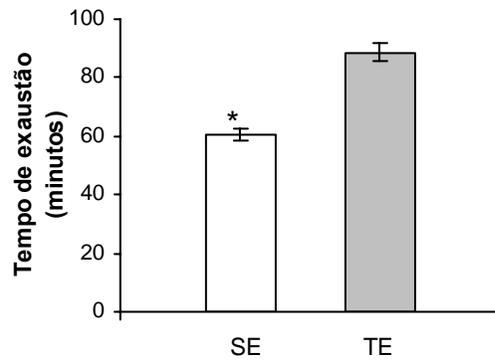


Figura 9. Tempo decorrido até exaustão.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8 / grupo). SE: sedentário + exercício agudo; TE: treinado + exercício agudo. * $P = 0,001$ efeito do treinamento.

Como o exercício agudo foi exaustivo para ambos os grupos, sedentário e treinado, nós resolvemos analisar os parâmetros propostos apenas no grupo sedentário submetido ao exercício agudo até exaustão.

A atividade da enzima citrato sintase após treinamento ou após uma única sessão de exercício agudo com predominância excêntrica está mostrada na Figura 10.

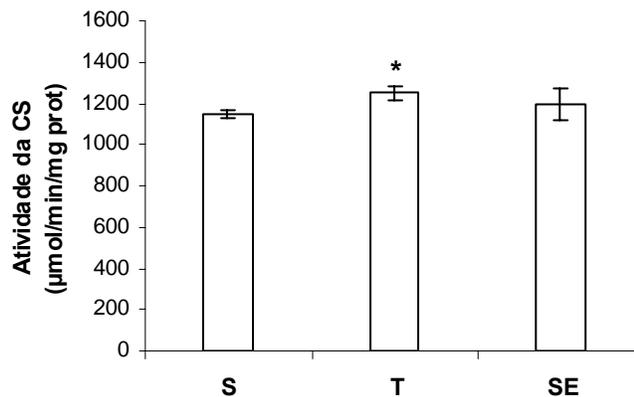


Figura 10. Atividade da enzima citrato sintase em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; T: treinado; SE: sedentário + exercício agudo. * $P < 0,05$ efeito crônico ou do treinamento.

Podemos observar uma atividade significativamente aumentada no grupo treinado ($P < 0,02$, S vs. T). Por outro lado, a atividade da citrato sintase não foi alterada significativamente após a sessão de exercício agudo.

A atividade da CK plasmática não foi significativamente modificada após o treinamento excêntrico (S: 1818 ± 180 U/L e T: 1680 ± 235 U/L), embora apresente valores médios ligeiramente diminuídos para o grupo T. Imediatamente após a sessão de exercício agudo a

atividade da enzima sofreu um ligeiro aumento em comparação aos grupos em repouso, porém não significativo (SE: 1920±161 U/L e TE:1967±121 U/L).

Efeitos do treinamento e do exercício agudo sobre mitocôndrias isoladas

O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas do músculo quadríceps nos três grupos de ratos foi determinado utilizando piruvato/malato e succinato como substratos respiratórios. O controle respiratório e a razão ADP/O foram calculados para cada grupo e estão apresentados na Tabela X (A e B).

Tabela X. Efeito do exercício excêntrico crônico e agudo nos parâmetros respiratórios de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético com piruvato/malato e succinato.

Os valores são médias ± E.P. (n = 8/grupo), expressos em nátomos de O/min/mg proteínas. S: sedentário; T: treinado; SE: sedentário + exercício agudo. Estado 4, estado respiratório controle. Estado 3, estado respiratório ativo (com ADP). CR (controle respiratório) é a razão entre estado 3 e 4. Razão ADP/O foi calculada pela medida do consumo total de oxigênio durante a fosforilação de ADP. * $P < 0,05$, S vs. T., # $P < 0,05$ S vs. SE, § $P < 0,05$ T vs. SE.

A) Piruvato/Malato

Parâmetros respiratórios	S	T	SE
Estado 4	19,9 ± 0,7	22,7 ± 1,0*	19,85 ± 0,5
Estado 3	162,2 ± 3,6	168,8 ± 6,8	173,3 ± 9,3
CR	8,18 ± 0,14	7,47 ± 0,18*	8,71 ± 0,31§
ADP/O	2,29 ± 0,09	2,34 ± 0,12	2,18 ± 0,08

B) Succinato + rotenona

Parâmetros respiratórios	S	T	SE
Estado 4	77,0 ± 3,3	79,4 ± 4,3	83,1 ± 6,4
Estado 3	341,7 ± 12,3	333,9 ± 11,5	352,6 ± 19,4
CR	4,46 ± 0,12	4,24 ± 0,12	4,34 ± 0,29
ADP/O	1,34 ± 0,03	1,36 ± 0,04	1,24 ± 0,03#§

Notamos um aumento significativo no consumo de oxigênio após o treinamento apenas na presença do substrato respiratório piruvato/malato. Não observamos nenhuma modificação no consumo de oxigênio no estado 3 em nenhuma das situações de exercício, com ambos os substratos.

O controle respiratório (CR) foi significativamente menor no grupo T comparado com os grupos S e SE apenas na presença de piruvato/malato. A razão ADP/O não foi modificada após o treinamento; no entanto, diminuiu após o exercício agudo na presença de succinato como substrato (SE vs. S e T, $P < 0,05$).

A Figura 11 mostra um traçado fluorimétrico dos efeitos da adição de ADP e ROT sobre a produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas na presença de substratos respiratórios do complexo I (piruvato ou glutamato+ malato) e complexo II (succinato).

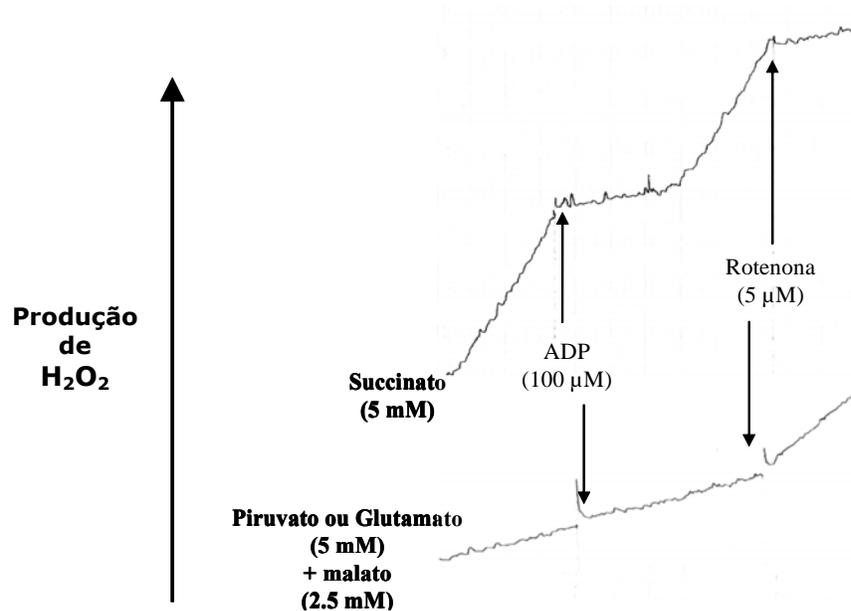


Figura 11. Efeito da adição de ADP e rotenona sobre a produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas de músculo em presença de substratos do complexo I (glutamato ou piruvato + malato) e do complexo II (succinato)

Observamos ainda que a produção de H_2O_2 no músculo esquelético é dependente do substrato utilizado. Em condições não fosforilantes (estado 4) a produção bruta de H_2O_2 na presença de piruvato/malato (ou glutamato/malato) é bem menor que aquela apresentada na presença de succinato.

Na Tabela XI mostramos a produção mitocondrial de H_2O_2 em condições fosforilantes (estado 3) e não fosforilantes (estado 4) na presença de piruvato/malato (A) e de succinato (B) como substratos respiratórios com e sem rotenona após os dois tipos de exercícios, crônico e agudo.

Na presença de piruvato/malato, a adição de ADP (estado 3) resulta em uma ligeira diminuição na *produção bruta de H_2O_2* . Já na presença de substrato do complexo II (succinato) a *produção bruta de H_2O_2* é fortemente inibida após a adição de ADP, não sendo

mais mensurável. Verificamos ainda que a produção de H₂O₂ na presença de piruvato/malato é significativamente aumentada após adição de rotenona, enquanto que na presença de succinato ela é drasticamente diminuída.

Tabela XI. Efeito do exercício excêntrico crônico e agudo na produção de H₂O₂ em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético com piruvato/malato e succinato.

Os valores são médias ± E.P. (n = 8/grupo), expressos em pmol H₂O₂/min/mg de proteínas mitocondriais. S: sedentário; T: treinado; SE: sedentário + exercício agudo. * P<0,05, S vs. T., # P<0,05 S vs. SE, § P<0,05 T vs. SE.

A) Piruvato/Malato

Produção de H ₂ O ₂	Estado da respiração	S	T	SE
pmol H ₂ O ₂ /min/mg prot	4	83,5 ± 6,9	64,0 ± 6,4*	63,1 ± 6,4#
	3	62,0 ± 5,7	53,0 ± 5,0	44,2 ± 8,4
	Rot	333 ± 30	274 ± 29	269 ± 27
pmol H ₂ O ₂ /ng átomo O consumido	4	4,3 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,25 ± 0,5
	3	0,39 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,29 ± 0,06

B) Succinato

Produção de H ₂ O ₂	Estado da respiração	S	T	SE
pmol H ₂ O ₂ /min/mg prot	4	698,3 ± 53,0	529,0 ± 46,4*	575,6 ± 41,1
	Rot	35,1 ± 8,6	39,9 ± 12,7	7,8 ± 15,5 #
pmol H ₂ O ₂ /ng átomo O consumido	4	9,2 ± 0,5	6,6 ± 0,5*	6,9 ± 0,8#

Podemos observar ainda que no estado 4 a *produção bruta de H₂O₂* é menor no grupo T comparado ao grupo S na ausência de rotenona. Esta diminuição é significativa na presença dos dois substratos utilizados sem rotenona. A *produção bruta de H₂O₂* também apresenta diminuída na presença de piruvato/malato após o exercício agudo (SE), sendo observada apenas uma tendência de diminuição na presença de succinato (P = 0,12). O aumento da produção de H₂O₂ em presença de piruvato/malato e rotenona mostra a capacidade do complexo I em produzir EROS, que não foi diferente entre os grupos estudados. Já em presença do succinato e rotenona a produção de H₂O₂ caiu drasticamente

mostrando que a produção de EROS quando as mitocôndrias são incubadas com succinato se dá primordialmente pelo fluxo reverso de elétrons para o complexo I.

Na presença de piruvato/malato, a adição de ADP (estado 3) resultou em uma ligeira diminuição da produção bruta de H_2O_2 , de cerca 20 a 30% em todos os grupos. Porém, nenhuma diferença foi verificada após exercício crônico ou agudo. Já na presença de substrato do complexo II (succinato) a produção bruta de H_2O_2 após a adição de ADP foi fortemente inibida, não sendo mais mensurável.

A partir desses dados nós pudemos determinar a *produção de H_2O_2 por unidade de oxigênio consumido*, uma vez que as medidas de consumo de oxigênio e produção de H_2O_2 foram realizadas nas mesmas condições. Podemos observar diminuição na produção de H_2O_2 após as oito semanas de treinamento com predominância excêntrica. O exercício agudo também induziu uma diminuição na produção de H_2O_2 por oxigênio consumido na presença de succinato no grupo sedentário submetido ao exercício exaustivo. Na presença de piruvato/malato nós observamos a mesma tendência, porém as diferenças não foram significativas.

Efeito do treinamento e do exercício agudo sobre a composição em ácidos graxos dos lipídeos totais das mitocôndrias

As Tabelas XII e XIII mostram a composição lipídica de mitocôndrias isoladas de músculo quadríceps de ratos submetidos a um treinamento e/ou exercício agudo excêntrico.

Tabela XII. Efeito de um exercício excêntrico crônico e agudo nos valores totais de ácidos graxos saturados, MUFAs, PUFAs, n-3 e n-6 de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; T: treinado; SE: sedentário + exercício agudo. MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados. Plasmalógenos: 16:0DMA e 18:0DMA. PUFA : Ácidos graxos poliinsaturados. * $P < 0,05$, S vs. T. § $P < 0,05$ T vs. SE.

Ácidos graxos	S	%	
		T	SE
Saturados	36,24 \pm 0,21	35,67 \pm 0,14*	36,12 \pm 0,31
Plasmalógenos	4,27 \pm 0,05	4,02 \pm 0,08*	4,42 \pm 0,11§
MUFAs	6,67 \pm 0,12	6,99 \pm 0,12	7,16 \pm 0,32
PUFAs	52,83 \pm 0,26	53,49 \pm 0,29	52,30 \pm 0,357§
PUFA/Sat.	1,46 \pm 0,015	1,50 \pm 0,01	1,45 \pm 0,02§
MUFA/PUFA	0,13 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,14 \pm 0,01
18:1 n-9/16:0	0,156 \pm 0,04	0,172 \pm 0,05*	0,168 \pm 0,07
20:4 n-6/18:2 n-6	0,59 \pm 0,01	0,54 \pm 0,02	0,59 \pm 0,02
Σn-3	9,52 \pm 0,15	9,78 \pm 0,21	9,41 \pm 0,21
Σn-6	42,96 \pm 0,25	43,37 \pm 0,43	42,68 \pm 0,40
Σn-6/Σn-3	4,52 \pm 0,08	4,43 \pm 0,10	4,55 \pm 0,12

De maneira geral, a composição lipídica das mitocôndrias não foi modificada pelo exercício agudo excêntrico. Porém, observamos um efeito significativo do exercício crônico (treinamento) no conteúdo total de alguns ácidos graxos. Nota-se que o conteúdo de ácidos graxos saturados está significativamente diminuído após treinamento ($P < 0,05$), assim como o dos plasmalógenos.

Uma tendência de aumento no conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e na razão PUFA/Saturados (ácidos graxos poliinsaturados/saturados) ($P = 0,08$ e $P = 0,06$, respectivamente) também pode ser observada.

Tabela XIII. Efeito do exercício excêntrico crônico e agudo na composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; T: treinado; SE: sedentário + exercício agudo. * $P < 0,05$, S vs. T. # $P < 0,05$ S vs. SE. § $P < 0,05$ T vs. SE.

Ácidos graxos	%		
	S	T	SE
14:0	0,19 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,20 \pm 0,015
16:0	19,23 \pm 0,23	18,83 \pm 0,26	19,38 \pm 0,32
18:0	16,79 \pm 0,20	16,67 \pm 0,22	16,51 \pm 0,14
16:1 n-7 + n-9	0,70 \pm 0,051	0,68 \pm 0,093	0,85 \pm 0,105
18:1 n-7 + n-9	5,80 \pm 0,10	6,14 \pm 0,07*	6,20 \pm 0,22
18:2 n-6	25,96 \pm 0,41	26,91 \pm 0,63	25,45 \pm 0,53
18:3 n-3	0,16 \pm 0,005	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,003
20:2 n-6	0,18 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,28 \pm 0,05
20:3 n-6	0,41 \pm 0,01	0,39 \pm 0,0	0,46 \pm 0,013#§
20:4 n-6	15,18 \pm 0,21	14,39 \pm 0,29*	14,86 \pm 0,32
20:5 n-3	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00	0,12 \pm 0,01
22:4 n-6	0,46 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	0,46 \pm 0,03
22:5 n-6	1,11 \pm 0,11	1,10 \pm 0,09	1,26 \pm 0,08
22:5 n-3	1,70 \pm 0,04	1,59 \pm 0,03*	1,67 \pm 0,08
22:6 n-3	7,37 \pm 0,22	7,95 \pm 0,20	7,48 \pm 0,22

Observa-se um aumento no conteúdo dos ácidos vacênico e oléico (18:1 n-7 e n-9), paralelamente a uma diminuição do conteúdo do ácido araquidônico (20:4 n-6) e dos plasmalógenos nos animais treinados.

Efeito do treinamento e do exercício agudo sobre a capacidade antioxidante

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) após o treinamento e/ou exercício agudo estão apresentadas na Figura 15.

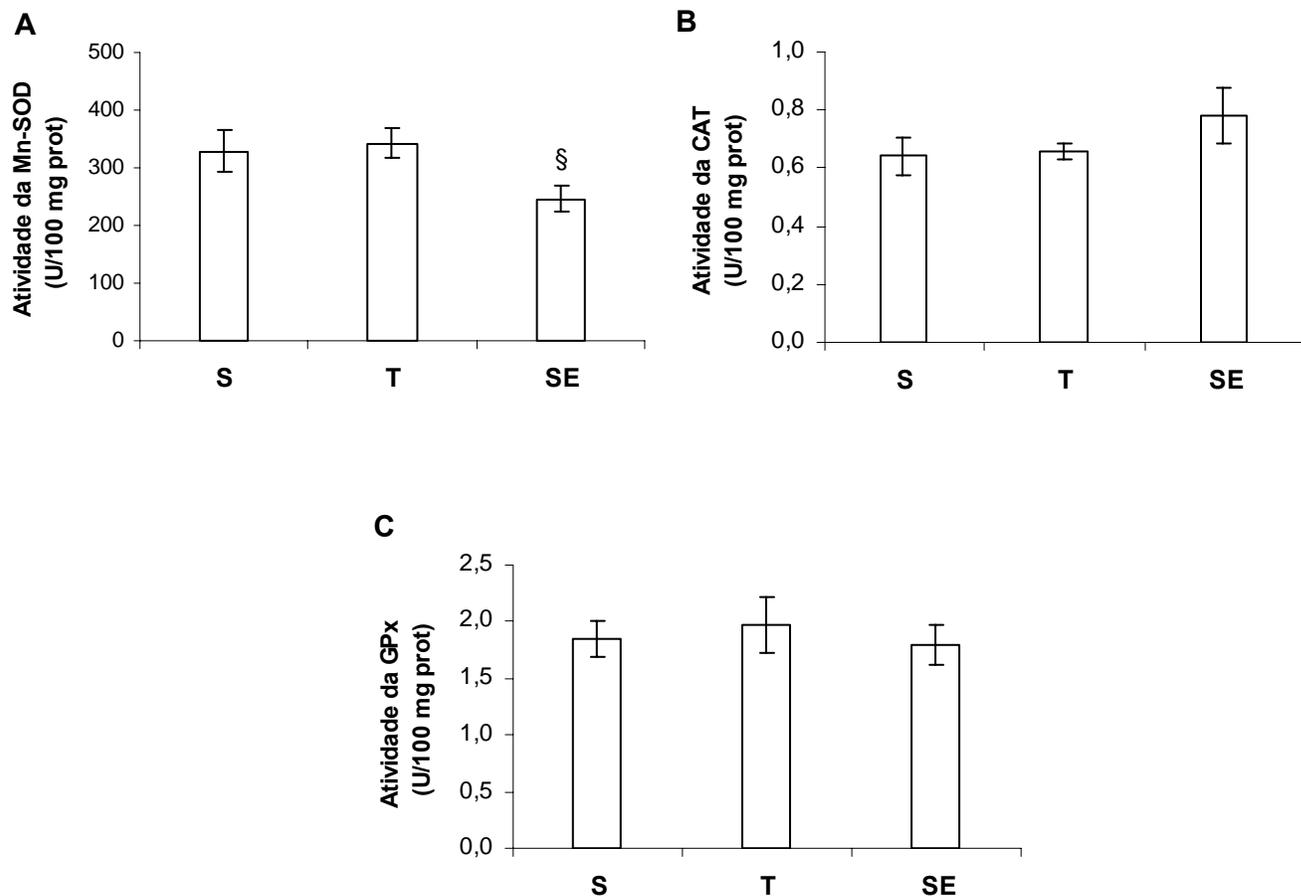


Figura 12. Atividade das enzimas **(A)** Mn-SOD, **(B)** CAT e **(C)** GPx. em homogenato de músculo de ratos após treinamento e exercício agudo.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; T: treinado; SE: sedentário + exercício agudo. § $P < 0,05$ T vs. SE.

Observamos que a atividade da Mn-SOD aparece significativamente diminuída no grupo SE comparado com o grupo T. Por outro lado, as atividades CAT e GPx não foram modificadas após o treinamento e tampouco após o exercício agudo excêntricos.

DISCUSSÃO

Diversos autores mostraram que, especialmente os exercícios de regime excêntrico podem causar dor muscular, diminuição na capacidade de desenvolver força, aumento na atividade de enzimas citossólicas musculares no plasma, particularmente da enzima CK, disfunção neuromuscular, ruptura ultraestrutural, inflamação e aumento na atividade de enzimas proteolíticas (ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983; MORGAN; ALLEN, 1999; ALLEN, 2001). Redução na tensão, principalmente em baixas frequências de estímulo e aumento no comprimento ótimo para a geração de tensão são as alterações iniciais que se instalam após uma única sessão de exercício excêntrico. Alterações mais tardias incluem aumento nos níveis plasmáticos de proteínas musculares, inchamento, rigidez, inflamação e dor.

Por outro lado, também já está bem estabelecido na literatura que se o mesmo tipo de exercício for aplicado subsequente, os indicadores de dano muscular diminuem, devido ao efeito da repetição do esforço (SCHWANE; ARMSTRONG, 1983; PADDON-JONES; ABERNETHY, 2001). As respostas adaptativas ocorrem entre 48 e 72 h após o exercício inicial, com trabalhos mostrando recuperação em até 24h (LINDSTEDT, et al., 2002). O efeito adaptativo positivo permite que uma atividade excêntrica idêntica, que no início causaria sérios danos teciduais, em pouco tempo não exerça mais nenhum efeito maléfico.

A natureza intramuscular dessa adaptação ainda não é totalmente conhecida. Há sugestões de que haveria redução no grupo de fibras mais frágeis e sensíveis ao estresse após o primeiro boot de exercício, enquanto as fibras mais fortes sobreviveriam e forneceria o efeito protetor. É possível também que o efeito protetor seja externo ao músculo e mediado neurologicamente, levando a um recrutamento diferencial de fibras musculares especificamente adaptadas a contrações musculares excêntricas. Uma outra possibilidade é que o músculo/tendão se torne mais denso funcionalmente, permitindo uma maior absorção de trabalho mecânico sem sofrer dano. Alguns autores reportaram que o treinamento com característica excêntrica produz um músculo locomotor menos complacente, enquanto outros notaram um efeito elástico maior nos indivíduos treinados do que naqueles não treinados (LINDSTEDT, et al., 2002).

Níveis elevados de estresse oxidativo têm sido correlacionados com danos musculares induzidos por uma sessão de exercício agudo e sem treinamento prévio. A magnitude deste estresse oxidativo é frequentemente associada à natureza do exercício, ao tipo de fibra do músculo estudado, assim como aos níveis dos antioxidantes endógenos (POWERS, et al., 1994). No entanto, a maior parte dos estudos que concernem o estresse oxidativo muscular durante o exercício físico e o treinamento utilizam protocolos de exercício com

predominância concêntrica. O funcionamento mitocondrial e sua relação com o aumento nos níveis de estresse oxidativo muscular após um exercício excêntrico agudo ou crônico ainda é pouco estudado (CAILLAUD, et al., 1999; WALSH, et al., 2001).

Uma das formas de discriminar o principal sítio de formação de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas nas nossas condições experimentais é através do uso de substratos para o complexo I (piruvato/malato) ou II (succinato), na presença ou ausência de rotenona. Os traçados mostrados na Figura 11 comprovam que a produção de H_2O_2 na presença somente de succinato é muito maior que aquela com piruvato/malato (LAMBERT; BRAND, 2004). Porém, na presença de rotenona a resposta passa a ser dependente do substrato respiratório utilizado. Ou seja, a adição de rotenona induz um grande aumento na produção de H_2O_2 na presença de piruvato/malato e uma drástica diminuição na produção de H_2O_2 na presença de succinato, em todos os grupos: S, T ou SE. Estes resultados indicam que o complexo I produz H_2O_2 em grandes quantidades quando está altamente reduzido e inibido pela rotenona. Por outro lado, a produção de H_2O_2 é pequena quando o complexo I não está inibido pela rotenona.

Todos esses dados reforçam o papel do fluxo reverso de elétrons do complexo II ao complexo I como o principal sítio de produção mitocondrial de H_2O_2 (BARJA, 1999; SERVAIS, et al., 2003).

Efeitos do exercício crônico excêntrico (treinamento)

Os dados apresentados nesse trabalho mostram que o nosso protocolo de treinamento com predominância excêntrica adaptou positivamente os animais. O grupo treinado exibiu aumento na atividade da enzima citrato sintase, indicando melhoria da capacidade oxidativa. Dessa forma, o grupo treinado conseguiu executar o protocolo de exercício agudo por muito mais tempo que o grupo sedentário.

Após 8 semanas de treinamento houve diminuição na produção mitocondrial de H_2O_2 no estado 4, mesmo quando expressa por unidade de oxigênio consumido, independente do substrato respiratório utilizado. Até hoje, os efeitos do treinamento na produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas de músculo esquelético foram pouco estudados (VENDITTI; MASULLO; DI MEO, 1999; SERVAIS, et al., 2003). Em concordância com nossos dados Venditti et al. (1999) mostraram que 10 semanas de treinamento de natação diminuiu a produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas de músculo. Porém, Servais et al. (2003) não verificaram mudanças na produção de H_2O_2 após 5 meses de exercício espontâneo em roda de atividade.

A discrepância de resultados nestes dois estudos após o exercício crônico foi explicada por um aumento importante no conteúdo de proteínas mitocondriais após o exercício

forçado (natação) (VENDITTI; MASULLO; DI MEO, 1999), enquanto que o mesmo não foi observado após exercício em roda de atividade (SERVAIS, et al., 2003). Obviamente, com o conteúdo aumentado de mitocôndrias e o maior número de cadeias de transporte de elétrons há uma diminuição no consumo de oxigênio de cada mitocôndria e de cada CTE para atingir o mesmo consumo total de oxigênio. No entanto, esta hipótese deve ser descartada em nosso estudo, pois embora a atividade da CS esteja aumentada e a produção de H₂O₂ diminuída após o treinamento, a atividade da CS foi medida em mitocôndrias isoladas e expressa na mesma concentração de proteínas.

A influência do treinamento na atividade das enzimas antioxidantes tem sido vastamente estudada (JI; STRATMAN; LARDY, 1988; CRISWELL, et al., 1993; GORE, et al., 1998). Curiosamente, não observamos alterações nas atividades das enzimas antioxidantes Mn-SOD, CAT ou GPx após 8 semanas de treinamento que pudessem explicar a diminuição na produção mitocondrial de H₂O₂.

A literatura aponta que a produção de EROS é altamente dependente do gradiente de prótons através a membrana interna das mitocôndrias (LAMBERT; BRAND, 2004). Então, sugeriu-se que mudanças no potencial de membrana mitocondrial devido a adição de um agente desacoplador ou alterações na expressão gênica de proteínas desacopladoras (UCPs- « *uncoupling proteins* ») poderiam afetar a produção de EROS das mitocôndrias (NEGRE-SALVAYRE, et al., 1997). Neste contexto, um estudo recente mostrou um aumento de RNAm das UCP3 em músculo plantar 48 horas após o término de um exercício agudo excêntrico intermitente com pausas passivas de 2 a 4 minutos (BRYNER, et al., 2004). Entretanto, é importante notar que aumentos na expressão do RNAm de UCPs, embora sejam sempre utilizados como referência para aumento da expressão gênica, não garantem que esteja ocorrendo aumento das proteínas codificadas pelo gene e a expressão gênica de UCP3 muscular e seu conteúdo em condições de exercício e treinamento é ainda controversa.

Boss et al. (1998) e Russel et al. (2003) mostraram uma diminuição na expressão de proteínas UCP3 após treinamento de *endurance*, enquanto Tsuboyama-Kazaoka et al. (1998) e Jones et al. (2003) observaram o contrário. Não determinamos o RNAm da UCP3 no nosso estudo, porém uma avaliação preliminar indicou que o conteúdo em UCP3 aparentemente não foi modificado nem pelo treinamento nem pelo exercício agudo (dados não mostrados).

Por outro lado, nossos dados mostram aumento no consumo de oxigênio no estado 4, paralelo a diminuição na produção de H₂O₂ após o treinamento, sugerindo que o treinamento com predominância excêntrica possa ter causado um ligeiro desacoplamento mitocondrial, que seria responsável pela diminuição na formação de EROS na ausência de

alterações significativas nos conteúdos do RNAm e proteínas UCP3 (TONKONOJI, et al., 2000). Essa hipótese é confirmada pelo efeito inibitório na produção de EROS quando pequenas quantidades de desacopladores (dinitrofenol) são adicionadas às mitocôndrias antes mesmo de serem detectadas mudanças no potencial de membrana (Batandier C., *comunicação não publicada do grupo do "Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée" – Grenoble/France*).

Um outro fator importante para a produção de H₂O₂ mitocondrial é o grau de fluidez da membrana que está relacionada com sua composição lipídica. Sugere-se que uma modificação da composição lipídica pode desempenhar um papel importante no processo de fosforilação oxidativa, e mesmo na produção de EROS (ARMSTRONG, et al., 2003). Alguns trabalhos mostraram que a fluidez da membrana é aumentada quando o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados é elevado, e isso pode ocorrer após o exercício físico ou um regime alimentar específico (ANDERSSON, et al., 1998; HERRERO, et al., 2001).

É importante observar que o treinamento modificou a composição lipídica das mitocôndrias. Nossos resultados corroboram com os estudos recentes de Helge et al. (1999) e de Andersson et al. (1998) que verificaram um aumento no conteúdo de ácido oléico (18:1 n-9) e uma diminuição de ácido araquidônico (20:4 n-6) em músculos de humanos após treinamento. Em nosso trabalho nós observamos um aumento na razão 18:1 n-9/16:0 no grupo de animais treinados. Andersson et al. (1998) já havia sugerido que um aumento na razão 18:1 n-9/16:0 poderia indicar aumento na fluidez da membrana e por consequência modificar a produção de EROS, mesmo se que esta razão envolva apenas um ácido graxo monoinsaturado. Um outro dado primordial é a diminuição do conteúdo de plasmalógenos que são conhecidos por seu papel antioxidante. A oxidação destes fosfolipídeos, e por consequência os ácidos graxos que nele estão contidos, é a primeira a ocorrer, protegendo assim os ácidos graxos poliinsaturados da propagação da peroxidação lipídica. A diminuição nestes ácidos graxos contidos nos fosfolipídeos plasmalógenos (18:0 DMA e 20:4 n-6) observada em nossos experimentos sugerem uma proteção contra oxidação de PUFAs, que estão ligeiramente aumentados nessa situação de treinamento excêntrico.

O ligeiro desacoplamento observado em nosso estudo pode estar implicado com a modificação da composição lipídica das mitocôndrias. Por outro lado essa mudança da natureza lipídica das membranas poderia causar ativação de algumas proteínas, devido a presença de alguns ácidos graxos, contudo sem observarmos modificação no conteúdo das mesmas mas modificando o acoplamento das mitocôndrias.

Efeito do exercício excêntrico agudo

O treinamento com predominância excêntrica durou 8 semanas e os animais foram exercitados 5 vezes por semana, sendo que no final do protocolo as sessões de treinamento tinham uma duração de cerca de 15 minutos. Diferentemente da sessão de exercício agudo, que durou cerca de 60 minutos. Apesar destas diferenças os resultados obtidos imediatamente após o exercício agudo excêntrico também mostraram diminuição na produção de H_2O_2 mitocondrial. No entanto, esta produção reduzida após o exercício agudo não parece estar relacionada com um leve desacoplamento ("mild uncoupling") como após o treinamento, pois não detectamos alterações no consumo de oxigênio e nem modificações na composição lipídica mitocondrial. Perez et al. (2003) verificaram aumento na fluidez da membrana mitocondrial após um exercício excêntrico agudo, paralelo a uma elevação na oxidação de proteínas (conteúdo de proteínas carboniladas), sugerindo que o exercício agudo poderia modificar a composição lipídica das membranas, o que estaria supostamente relacionado com mudanças na produção de H_2O_2 . Porém, nossos resultados não mostram mudanças na composição lipídica das mitocôndrias após uma única sessão de exercício agudo excêntrico.

Recentemente, Walsh et al. (1999) estudaram a fosforilação oxidativa mitocondrial em músculo após exercício excêntrico e concluíram que este tipo de exercício não provocava a perda das funções oxidativas das mitocôndrias, em concordância com nossos resultados.

Uma outra explicação para a diminuição da produção de H_2O_2 nas mitocôndrias seria alterações induzidas pelo exercício na atividade das enzimas antioxidantes. De fato, mostramos diminuição significativa na atividade da enzima mitocondrial Mn-SOD após o exercício agudo, a qual poderia estar relacionada com a diminuição na produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas, já que esta enzima localiza-se próxima ao sítio de produção de ânion superóxido.

Itoh et al. (2004) já mostraram que após uma restrição de cálcio associada a um exercício agudo de 60 minutos, a atividade da Mn-SOD e da Cu-Zn-SOD estava diminuída. Nessa situação, o nível de cálcio intracelular parece estar muito aumentado, o que faz ativar as vias de produção dos radicais livres (ex. fosfolipase A2) (ITOH, et al., 2004). Da mesma forma, o exercício de caráter excêntrico parece aumentar fortemente os níveis de cálcio intracelular (FRIDEN; LIEBER, 2001; PROSKE; MORGAN, 2001). Assim, nossos resultados nos permitem supor que o caráter excêntrico do exercício agudo é provavelmente a causa da diminuição da atividade da Mn-SOD (SALO, et al., 1990; ITOH, et al., 2004). A hipótese de um aumento na atividade da CAT e/ou da GPx, indicando uma maior eliminação do H_2O_2 ficou descartada pelos nossos resultados e estão de acordo com dados encontrados na

literatura, que não mostraram mudanças na atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx imediatamente após o término de uma sessão de exercício agudo (LAWLER, et al., 1993; CAILLAUD, et al., 1999; JI, 2002).

CONCLUSÃO

O treinamento efetuado com predominância excêntrica foi eficaz no aumento da performance (aumento do tempo de esforço até atingir a exaustão e da capacidade oxidativa medida pela atividade da citrato sintase).

Apesar da diferença de duração das sessões de exercício nós observamos uma diminuição na produção de H_2O_2 mitocondrial nos dois casos (treinamento e exercício agudo); as causas, no entanto parecem ser diferentes. Após o treinamento o aumento do consumo de oxigênio no estado 4 e a diminuição da produção de H_2O_2 sugere um ligeiro desacoplamento mitocondrial que parece estar relacionado com a alteração na composição lipídica, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes analisadas não foi alterada, descartando assim seu envolvimento na diminuição dos níveis de H_2O_2 mitocondrial. Imediatamente após o exercício agudo, contrariamente ao treinamento, a diminuição da produção de H_2O_2 foi associada com uma diminuição na atividade da Mn-SOD. Nestes animais o ligeiro desacoplamento não foi observado já que o consumo de oxigênio não apareceu alterado, além da composição lipídica das mitocôndrias não estar alterada.

ESTUDO II

No presente estudo nós avaliamos os efeitos de uma suplementação rica em ácidos graxos poliinsaturados (ω -3) e sua associação com um treinamento físico nos mesmos parâmetros respiratórios analisados no Estudo I, tais como consumo de oxigênio, produção de H_2O_2 e composição lipídica de mitocôndrias isoladas de músculo, assim como nas atividades de algumas enzimas antioxidantes e no conteúdo de HSPs72 muscular. Nesse estudo submetemos os animais a um treinamento de oito semanas com predominância concêntrica. A suplementação foi feita nas duas últimas semanas do treinamento (7/7 dias) no grupo sedentário (S ω -3) e treinado (T ω -3), conforme mostrado na sessão Materiais e Métodos.

RESULTADOS

Massa corporal dos animais

Antes do início do treinamento o peso dos animais era de cerca 245 ± 3 g. Após 8 semanas de treinamento, a massa corporal média dos animais treinados foi de 366 ± 6 g, enquanto que aquela dos animais sedentários foi de 389 ± 6 g ($P < 0,05$). É importante ressaltar que ao final das duas semanas de suplementação, os animais sedentários e treinados suplementados com óleos de peixe (S ω -3 e T ω -3) não apresentaram massa corporal diferente daquela dos animais não suplementados (S e T).

Efeitos do treinamento e/ou suplementação com ω -3 sobre a performance

A Tabela XIV mostra os efeitos da suplementação, do treinamento e do treinamento com suplementação sobre a atividade das enzimas citrato sintase (CS) e citocromo c oxidase (CCOX), esta última quantificada por medidas no oxígrafo, na presença de TMPD/Ascorbato.

Tabela XIV. Efeito do treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3) nas atividades das enzimas citrato sintase e citocromo c oxidase em mitocôndrias isoladas de músculo quadríceps.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). CS (citrato sintase) medida por espectrofotometria (μ mol/min/mg de proteínas mitocondriais). CCOX (citocromo c oxidase) medida na presença de TMPD/ascorbato por oxigrafia (nátomos de O/min/mg de proteínas mitocondriais). S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. * $P < 0,05$ efeito do treinamento. # $P < 0,05$ efeito da suplementação com óleos de peixe (ω -3). ns: não significativo.

	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
					T	ω -3	Tr+ ω -3
CS	928,6 \pm 48,9	1028,6 \pm 47,8	1225,0 \pm 87,0*	727,0 \pm 76,2*#	ns	< 0,01	< 0,001
CCOX	259,2 \pm 20,6	286,4 \pm 17,3	502,8 \pm 51,2*	156,2 \pm 8,9*#	ns	< 0,001	< 0,001
CCOX/C S	0,27 \pm 0,02	0,28 \pm 0,01	0,41 \pm 0,03*	0,23 \pm 0,02#	< 0,001	< 0,05	< 0,001

Podemos observar que somente a suplementação com ω -3 não alterou a capacidade oxidativa mitocondrial. Já o treinamento, foi eficaz em aumentar significativamente a capacidade oxidativa mitocondrial. Curiosamente, os animais do grupo treinado, quando suplementados com ω -3 mostraram uma capacidade oxidativa diminuída ao final das 8 semanas, principalmente quando analisamos a atividade das enzimas isoladamente. A análise da razão CCOX/CS sugere que a suplementação impediu os efeitos positivos do treinamento e que o efeito do treinamento foi maior ao nível da CCOX do que da CS.

Efeitos do treinamento e/ou suplementação com ω -3 sobre parâmetros mitocondriais

O extrato de mitocôndrias isoladas do músculo quadríceps do grupo T ω -3 era visivelmente diferente daquele do mesmo músculo dos outros grupos de animais, exibindo um aspecto gelatinoso/gorduroso. A Tabela XV mostra a concentração de proteínas mitocôndrias totais imediatamente após o isolamento das mitocôndrias.

Tabela XV. Concentração de proteínas mitocondriais após isolamento.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8 /grupo). S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. * $P < 0,05$ efeito do treinamento. # $P < 0,05$ efeito da suplementação com óleos de peixe (ω -3).

	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
					T	ω -3	Tr+ ω -3
Proteínas (mg/mL)	28,5 \pm 2,5	30,5 \pm 2,1	35,2 \pm 2,5	15,6 \pm 1,4*#	<0,02	<0,001	<0,001

Os dados mostram que a concentração de proteínas mitocondriais totais do grupo treinado suplementado (T ω -3) foi significativamente menor (-50%) daquelas obtidas com mitocôndrias isoladas do músculo dos demais grupos estudados. Embora não seja significativa, podemos notar uma tendência de aumento na concentração de proteínas mitocondriais totais após o treinamento. Esses dados não explicam, no entanto o efeito sobre a atividade das enzimas CS e CCOX, pois aqueles ensaios foram feitos utilizando a mesma concentração de proteína mitocondrial.

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas foi medido na presença de vários substratos respiratórios: glutamato/malato (complexo I), succinato (complexo II) e glutamato/malato/succinato (complexos I e II), e está apresentado na Tabela VIII (A, B e C).

Observa-se que após o treinamento, o consumo de oxigênio nos estados 4 e 3 estava significativamente aumentado na presença de succinato e de glutamato/malato/succinato, mas não na presença do glutamato/malato sozinho. Mensuramos também a respiração na presença de oligomicina. Esta respiração é considerada como a verdadeira respiração no estado 4, não acoplada à fosforilação oxidativa. Também nesse caso podemos observar aumento na velocidade de consumo mitocondrial de O₂ após o treinamento (S vs. T).

A suplementação com óleo de peixe (ω -3) não modificou os parâmetros respiratórios estudados, independente do substrato utilizado (S vs. S ω -3). Novamente os dados mostram um efeito diferente quando os animais treinados foram suplementados com ω -3. Ou seja, a associação do treinamento com a suplementação rica em ω -3 foi acompanhada de uma forte diminuição no consumo de oxigênio nos estados 4 e 3 (T vs. T ω -3), o mesmo acontecendo com o consumo de O₂ na presença de oligomicina.

O controle respiratório (CR) não apresentou alterações significativas após o treinamento, e nem após suplementação sozinha (S vs. S ω -3). No entanto, no grupo T ω -3 observa-se uma tendência para valores menores em relação ao grupo não suplementado (T) na presença de glutamato/malato e succinato separadamente, sendo que esta diminuição torna-se significativa na presença dos substratos dos complexos I e II conjuntamente (glutamato/malato/succinato).

É importante ressaltar que todos esses experimentos foram realizados com a mesma concentração de proteína mitocondrial (0,2 mg/mL).

Tabela XVI. Efeito do treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3) nos parâmetros respiratórios de mitocôndrias isoladas de músculo na presença dos substratos glutamato/malato, succinato, glutamato/malato/succinato.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8 /grupo), expressos em nátomos de O/min/mg de proteínas. S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. Estado 4, estado respiratório controle. Estado 3, estado respiratório ativo (com ADP). Oligomicina, respiração na presença do inibidor da F₀F₁ ATP-sintetase. CR (controle respiratório): razão entre estado 3 e 4. * $P < 0,05$ efeito do treinamento. # $P < 0,05$ efeito da suplementação com óleos de peixe (ω -3). ns: não significativo.

A) Glutamato/Malato

Parâmetros Respiratórios	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
					T	ω -3	Tr + ω -3
Estado 4	26,5 \pm 3,35	31,6 \pm 1,8	30,6 \pm 2,0	17,5 \pm 1,8#	ns	ns	< 0,01
Estado 3	343,6 \pm 25,0	370,3 \pm 31,4	407,1 \pm 38,2	167,4 \pm 26,8#	< 0,05	< 0,01	< 0,01
v ₄ + Oligomicina	20,2 \pm 2,0	18,4 \pm 2,0	33,2 \pm 5,2*	14,4 \pm 1,1#	< 0,01	ns	< 0,01
CR	13,76 \pm 1,03	11,61 \pm 0,61	13,59 \pm 1,44	9,49 \pm 1,17	ns	< 0,01	ns

B) Succinato + rotenona

Parâmetros Respiratórios	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
					T	ω -3	Tr + ω -3
Estado 4	88,3 \pm 9,8	90,5 \pm 9,0	139,3 \pm 18,2*	53,8 \pm 7,0*#	ns	< 0,01	< 0,01
Estado 3	318,4 \pm 27,2	349,2 \pm 16,9	502,3 \pm 66,3*	170,3 \pm 16,2*#	ns	< 0,01	< 0,01
V ₄ + Oligomicina	70,9 \pm 5,2	82,5 \pm 6,8	104,5 \pm 19,7*	44,0 \pm 7,1#	ns	< 0,05	< 0,02
CR	3,72 \pm 0,24	3,72 \pm 0,22	3,61 \pm 0,06	3,26 \pm 0,21	ns	ns	ns

C) Glutamato/Malato/Succinato

Parâmetros Respiratórios	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
					T	ω -3	Tr + ω -3
Estado 4	94,3 \pm 7,6	98,7 \pm 8,1	131,0 \pm 13,4*	59,1 \pm 11,7*#	ns	< 0,01	< 0,01
Estado 3	463,9 \pm 42,2	459,5 \pm 38,9	754,0 \pm 123,6*	233,3 \pm 53,0*#	ns	< 0,01	< 0,01
V ₄ + Oligomicina	75,4 \pm 5,8	77,1 \pm 4,3	120,2 \pm 17,9*	47,6 \pm 8,5*#	ns	< 0,01	< 0,01
CR	4,89 \pm 0,22	4,7 \pm 0,26	5,64 \pm 0,29	4,02 \pm 0,55#	ns	< 0,02	< 0,05

Efeitos do treinamento e/ou suplementação com ω -3 sobre produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas do músculo quadríceps

A produção de H_2O_2 por mitocôndrias isoladas foi avaliada no estado respiratório 4 e 3, na presença dos mesmos substratos utilizados anteriormente. Os resultados encontram-se descritos na Tabela XVII (A, B e C).

Como já observado no Estudo I, a produção de H_2O_2 parece ser muito dependente do substrato utilizado quando em condições não fosforilantes. Dessa forma, observamos uma produção elevada na presença de succinato, e uma produção diminuída na presença de glutamato/malato/succinato, que é ainda menor na presença de glutamato/malato.

No estado respiratório 3, condição fosforilante, a produção de H_2O_2 bruta ou por oxigênio consumido *in vitro* é ainda muito controversa. Nossos dados mostram que na presença de succinato ela é praticamente nula, pois não é mensurável. Já na presença de glutamato/malato ela não é modificada, e quando colocamos estes três substratos juntos, em condições mais próximas às fisiológicas, a produção é diminuída. Conforme já mostrado no estudo I, a adição da rotenona praticamente suprime a produção de H_2O_2 na presença de succinato e/ou glutamato/malato/succinato. Na presença do glutamato/malato a produção de H_2O_2 aumenta.

Observamos que a *produção bruta de H_2O_2* no estado respiratório 4 não foi alterada após o treinamento, independente do substrato utilizado. Quando a produção de H_2O_2 é expressa por oxigênio consumido notamos uma ligeira tendência de diminuição na presença de glutamato/malato/succinato (S vs. T, $P=0,18$). No estado 3, nem a produção bruta de H_2O_2 nem aquela expressa por oxigênio consumido foram modificadas.

A suplementação rica em ω -3 também não modificou a *produção bruta de H_2O_2* ou a *produção de H_2O_2 expressa por oxigênio consumido* nos estados 4 e 3 na presença dos substratos de complexo I e II separadamente. Curiosamente, quando os substratos do complexo I e II são fornecidos conjuntamente *produção de H_2O_2 expressa por oxigênio consumido* no estado 3 é significativamente maior no grupo S ω -3 comparado ao grupo S.

No entanto, a associação do treinamento com a suplementação com ω -3 (T ω -3) diminuiu a *produção bruta de H_2O_2* no estado respiratório 4 e 3 na presença de succinato e de glutamato/malato/succinato. Já na presença do substrato do complexo I sozinho (glutamato/malato) a produção bruta não aparece modificada em relação aos grupos S ω -3 e T. Quando a *produção de H_2O_2 é expressa por oxigênio consumido* a diminuição observada no estado bruto perde sua significância em condições não fosforilativas (estado 4) em presença do succinato e glutamato/malato/succinato; e no estado 3 ela aparece aumentada em presença de substrato do complexo I e diminuída em presença de

glutamato/malato/succinato conjuntamente. É importante lembrar que estas medidas, mesmo tendo sido realizadas com a mesma quantidade de proteínas, foram efetuadas em mitocôndrias que, desde o início tinham características diferenciadas (apresentavam uma concentração de proteínas muito diminuída).

A adição da rotenona parece aumentar a produção de H_2O_2 dos animais suplementados em relação aos seus homólogos não suplementados na presença do substrato do complexo I, porém as diferenças não atingiram níveis de significância. Quando os substratos glutamato/malato/succinato foram utilizados conjuntamente nós observamos que os animais sedentários suplementados (S ω -3) apresentavam produção de H_2O_2 significativamente maior do que os animais sedentários não suplementados (S).

Tabela XVII. Efeito do treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3) na produção de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético com glutamato/malato, succinato e glutamato/malato/succinato.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. * P <0,05 efeito do treinamento. # P <0,05 efeito da suplementação com óleos de peixe (ω -3). ns: não significativo

A) Glutamato/Malato

Produção de H_2O_2	Estado da respiração	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
						T	ω -3	Tr+ ω -3
pmol H_2O_2 /min/mg prot	4	29,1 \pm 4,5	38,3 \pm 6,8	30,8 \pm 5,8	32,1 \pm 4,5	ns	ns	ns
	3	29,3 \pm 5,3	36,7 \pm 7,2	29,7 \pm 5,6	38,7 \pm 4,8	ns	ns	ns
pmol H_2O_2 /ng átomo O consumido	Rot	72,2 \pm 10,0	97,2 \pm 10,5	80,3 \pm 9,0	107,1 \pm 11,6	ns	< 0,05	ns
	4	1,38 \pm 0,36	1,23 \pm 0,24	1,14 \pm 0,14	1,27 \pm 0,28	ns	ns	ns
	3	0,13 \pm 0,04	0,11 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,29 \pm 0,06*#	ns	< 0,05	< 0,01

B) Succinato

Produção de H_2O_2	Estado da respiração	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
						T	ω -3	Tr+ ω -3
pmol H_2O_2 /min/mg prot	4	885,2 \pm 109,4	1109,4 \pm 44,4	1053,4 \pm 109,4	449,6 \pm 64,2*#	< 0,02	< 0,05	< 0,001
	Rot	52,1 \pm 15,8	54,3 \pm 7,9	72,1 \pm 4,9	56,7 \pm 15,4	ns	ns	ns
pmol H_2O_2 /ng átomo O consumido	4	10,4 \pm 1,0	12,1 \pm 1,3	8,5 \pm 1,5	8,6 \pm 1,2	< 0,05	ns	ns

Tabela XVII. Efeito do treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3) na produção de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético com glutamato/malato, succinato e glutamato/malato/succinato.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. * P <0,05 efeito do treinamento. # P <0,05 efeito da suplementação com óleos de peixe (ω -3). ns: não significativo

C) Glutamato/Malato/Succinato

Produção de H_2O_2	Estado da respiração	S	S ω -3	T	T ω -3	Two-way ANOVA		
						T	ω -3	Tr+ ω -3
pmol H_2O_2 /min/mg prot	4	748,9 \pm 85,0	948,7 \pm 106,7	771,7 \pm 64,3	252,0 \pm 49,2*#	< 0,001	< 0,05	< 0,001
	3	396,9 \pm 40,9	535,6 \pm 73,3	493,5 \pm 41,9	111,8 \pm 26,8*#	< 0,01	< 0,05	< 0,01
	Rot	56,7 \pm 7,1	91,3 \pm 11,5#	167,4 \pm 56,9	65,1 \pm 10,1	ns	ns	< 0,05
pmol H_2O_2 /ng átomo O consumido	4	8,01 \pm 0,8	9,66 \pm 0,76	6,29 \pm 0,89	7,20 \pm 2,52	< 0,01	ns	ns
	3	0,86 \pm 0,06	1,65 \pm 0,11#	0,75 \pm 0,14	0,66 \pm 0,19*	< 0,05	ns	ns

Composição de ácidos graxos das mitocôndrias isoladas de músculo quadríceps

A Tabela XVIII mostra a composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de mitocôndrias isoladas após treinamento e/ou suplementação com óleos de peixe (ω -3). Observamos um efeito do treinamento nos conteúdos totais de diversos ácidos graxos, com uma diminuição dos plasmalógenos, n-6 e nas razões MUFA/PUFA, 20:4n-6/18:2n-6 e n-6/n-3. Paralelamente os conteúdos dos PUFA e da razão PUFA/Sat. apareceram aumentados.

O grupo de animais sedentários suplementados com ω -3 também mostraram uma diminuição nos conteúdos dos ácidos graxos saturados, n-6 e das razões 20:4n-6/18:2n-6, n-6/n-3 e um aumento dos PUFA, n-3 e da razão PUFA/Sat. Já a associação entre o treinamento e a suplementação com ω -3 potencializou os efeitos observados somente com o treinamento. Algumas alterações foram marcantes, como a proporção total dos plasmalógenos, muito menor nos animais treinados que foram suplementados (-35%, T vs. T ω -3). O aumento na proporção de ácidos graxos n-3 também foi significativo quando os animais foram suplementados (+32%, T vs. T ω -3).

Tabela XVIII. Efeito do treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3) nos valores totais de ácidos graxos saturados, MUFAs, PUFAs, n-3 e n-6 de mitocôndrias isoladas de músculo.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. MUFA – Ac. graxos monoinsaturados. PUFA – Ac. graxos poliinsaturados. ns: não significativo. * $P < 0,05$ efeito do treinamento # $P < 0,05$ efeito da suplementação em óleos de peixe (ω -3).

Ácidos graxos	%				Two-way ANOVA		
	S	S ω -3	T	T ω -3	Tr	ω -3	Tr+ ω -3
Saturados	35,56 \pm 0,09	35,31 \pm 0,14	35,67 \pm 0,18	34,78 \pm 0,31#	ns	< 0,01	ns
Plasmalógenos	4,35 \pm 0,05	4,37 \pm 0,05	3,98 \pm 0,12*	2,61 \pm 0,04*#	< 0,001	< 0,001	< 0,001
MUFA	7,91 \pm 0,21	6,97 \pm 0,16#	6,72 \pm 0,13*	7,40 \pm 0,33	ns	ns	< 0,01
PUFA	52,33 \pm 0,29	53,29 \pm 0,28#	53,63 \pm 0,32*	55,09 \pm 0,45*#	< 0,001	< 0,01	ns
PUFA/S	1,46 \pm 0,01	1,50 \pm 0,02#	1,50 \pm 0,02*	1,56 \pm 0,02	< 0,01	< 0,01	ns
MUFA/PUFA	0,15 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00#	0,13 \pm 0,00*	0,13 \pm 0,01	< 0,05	ns	< 0,01
18:1n-9/16:0	0,34 \pm 0,01	0,32 \pm 0,00	0,31 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01*#	ns	ns	< 0,001
20:4n- 6/18:2n-6	0,59 \pm 0,02	0,51 \pm 0,02#	0,53 \pm 0,03	0,45 \pm 0,01*#	< 0,001	< 0,01	ns
n-3	12,20 \pm 0,12	15,57 \pm 0,33#	13,83 \pm 0,28*	18,96 \pm 0,36*#	< 0,001	< 0,001	< 0,001
n-6	40,13 \pm 0,24	37,72 \pm 0,43#	39,80 \pm 0,42	36,13 \pm 0,35*#	< 0,02	< 0,001	ns
n-6/n-3	3,26 \pm 0,02	2,43 \pm 0,08#	2,89 \pm 0,08*	1,91 \pm 0,04*#	< 0,001	< 0,001	ns

Na Tabela XIX estão descritos os conteúdos de todos os ácidos graxos identificados nos quatro grupos de animais.

Tabela XIX. Efeito do treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3) na composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de mitocôndrias isoladas do músculo.

Os valores são médias \pm E.P. (n = 8/grupo). S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3. ns: não significativo. * $P < 0,05$ efeito do treinamento # $P < 0,05$ efeito da suplementação em óleos de peixe (ω -3).

Ácidos graxos	%				Two-way ANOVA		
	S	S ω -3	T	T ω -3	Tr	ω -3	Tr+ ω -3
14:0	0,26 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01*	0,19 \pm 0,01*	<0,001	ns	ns
16:0	19,72 \pm 0,04	19,48 \pm 0,27	18,62 \pm 0,31*	17,89 \pm 0,42*	<0,001	ns	ns
18:0	15,67 \pm 0,14	15,76 \pm 0,14	16,85 \pm 0,23*	16,06 \pm 0,35*	<0,001	ns	ns
16:1 n-7 + n-9	0,89 \pm 0,05	0,75 \pm 0,05	0,58 \pm 0,10*	0,57 \pm 0,03*	<0,01	ns	ns
18:1 n-7 + n-9	6,69 \pm 0,14	5,95 \pm 0,09#	6,07 \pm 0,05*	6,45 \pm 0,23	ns	ns	<0,001
20:1 n-9	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00*#	<0,01	<0,01	<0,05
18:2 n-6	23,94 \pm 0,34	23,95 \pm 0,42	24,86 \pm 0,74	24,01 \pm 0,11	ns	ns	ns
18:3 n-3	0,27 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01*	0,31 \pm 0,02#	<0,001	ns	ns
18:3 n-6	0,07 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01*#	<0,01	<0,001	<0,01
20:2 n-6	0,30 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01#	0,32 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01#	ns	<0,001	ns
20:3 n-6	0,51 \pm 0,01	0,47 \pm 0,03	0,47 \pm 0,01	0,41 \pm 0,02#	<0,02	<0,01	ns
20:4 n-6	14,17 \pm 0,42	12,22 \pm 0,27#	13,11 \pm 0,33	10,78 \pm 0,28*#	<0,001	<0,001	ns
22:4 n-6	0,48 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01#	0,42 \pm 0,02	0,07 \pm 0,04*#	<0,001	<0,001	<0,01
22:5 n-6	0,70 \pm 0,04	0,48 \pm 0,02#	0,52 \pm 0,02*	0,39 \pm 0,02*#	<0,001	<0,001	ns
20:5 n-3	0,15 \pm 0,01	1,55 \pm 0,04#	0,15 \pm 0,01	1,54 \pm 0,04#	ns	<0,001	ns
22:5 n-3	2,13 \pm 0,07	3,21 \pm 0,05#	2,15 \pm 0,03	3,58 \pm 0,14*#	<0,02	<0,001	<0,05
22:6 n-3	9,65 \pm 0,16	10,51 \pm 0,33#	11,29 \pm 0,30*	13,41 \pm 0,31*#	<0,001	<0,001	<0,05

Individualmente, os conteúdos de diversos ácidos graxos também sofreram modificações após treinamento e suplementação com ω -3. Podemos observar que os conteúdos dos ácidos graxos saturados 14:0 e 16:0 diminuíram após o treinamento, enquanto que o do ácido graxo 18:0 aumentou. O conteúdo do ácido linoléico (18:2 n-6) não foi alterado pelo treinamento, enquanto os conteúdos dos ácidos linolênico (18:3 n-3) e araquidônico (20:4 n-6) foram diminuídos ($P < 0,05$ e $P = 0,068$, respectivamente). O

conteúdo do ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3) se apresentou 16% aumentado após o treinamento.

Os conteúdos dos ácidos graxos poliinsaturados foram os mais afetados pela suplementação com óleos de peixe (ω -3), com um aumento na proporção dos ácidos graxos n-3, paralelamente a uma diminuição dos ácidos graxos n-6, indicando uma provável substituição dos n-6 pelos n-3, o que era esperado após uma suplementação rica em Ômega-3. O conteúdo do ácido araquidônico (20:4 n-6) diminuiu significativamente após suplementação tanto nos animais sedentários quanto nos animais treinados (-14%, S vs. S ω -3 e -18%, T vs. T ω -3). O conteúdo do ácido linolênico (18:3 n-3) foi aumentado após suplementação, mas apenas nos animais treinados (T vs. T ω -3). Os ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA, principais constituintes do óleo de peixe utilizado na suplementação, tiveram seus conteúdos significativamente aumentados após a suplementação.

Nós analisamos também a composição lipídica das cardiolipinas das mitocôndrias, uma vez que uma modificação na composição lipídica poderia alterar o funcionamento mitocondrial (PETROSILLO, et al., 2001). Os resultados não estão apresentados, pois não verificamos nenhuma alteração na composição lipídica destes fosfolídeos. Talvez outros fosfolídeos como a fosfatidiletalona ou a fosfatidilcolina tenham tido seus conteúdos modificados, mas esta análise não foi efetuada.

Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de HSP72 em homogenato de músculo gastrocnêmio

Na Figura 13 encontram-se apresentados os resultados das atividades das enzimas antioxidantes CAT, GPx e Mn-SOD.

As atividades da CAT e GPx não foram alteradas significativamente em nenhum dos grupos estudados.

A suplementação rica em ω -3 tende a aumentar a atividade da isoforma mitocondrial (Mn-SOD) ($p = 0,062$).

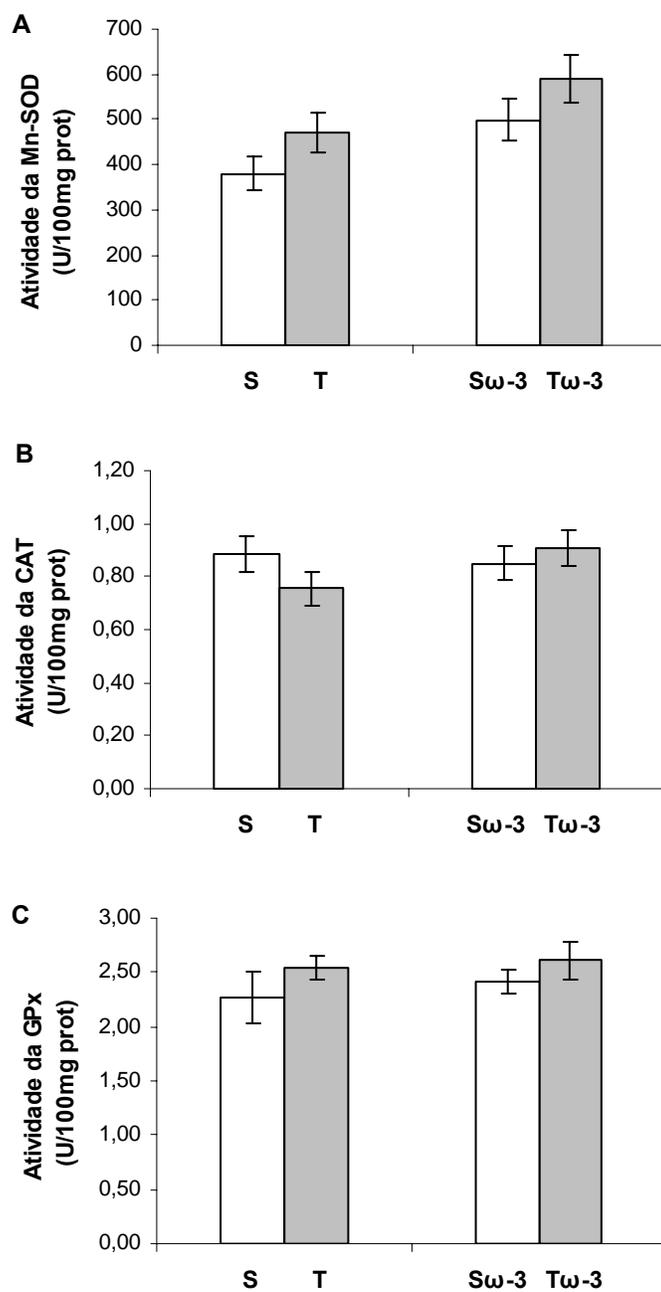


Figura 13. Atividade das enzimas **(A)** Mn-SOD, **(B)** CAT e **(C)** GPx em homogenato de músculo de rato após treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3).

Os valores são médias e E.P. ($n = 8/\text{grupo}$). S: sedentário; Sw-3: sedentário + ω -3; T: treinado; Tw-3: treinado + ω -3.

Na Figura 14 estão mostrados os conteúdos de HSPs72 no músculo gastrocnêmio dos diferentes grupos de animais. Observa-se que o treinamento não foi acompanhado de nenhuma alteração detectável no conteúdo de HSPs72. No entanto, após a suplementação sozinha o conteúdo de HSPs72 estava significativamente diminuído (S vs. Sw-3). Esta

redução foi totalmente abolida quando o treinamento foi associado à suplementação com óleos de peixe (ω -3). Nesse caso, observamos que o conteúdo em HSPs72 estava duas vezes maior no grupo T ω -3 quando comparado com o grupo S ω -3 ($P < 0,05$).

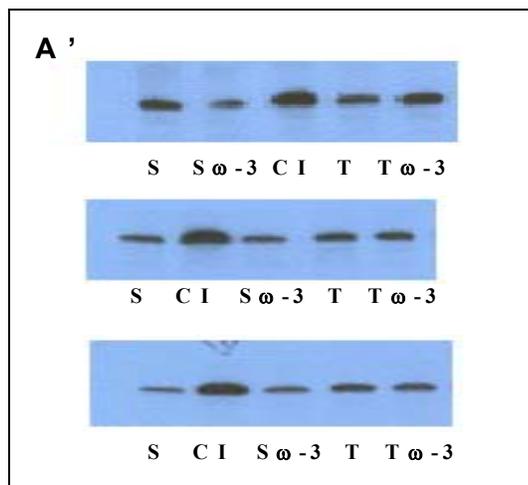
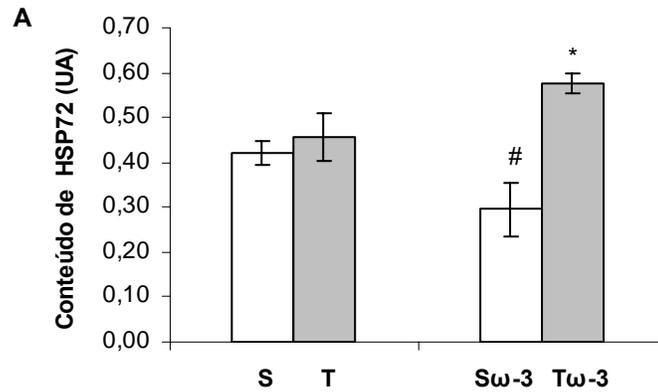


Figura 14. Conteúdo de HSPs72 em homogenato de músculo de rato após treinamento e da suplementação com óleos de peixe (ω -3).

A. Músculo gastrocnêmio. * $P < 0,05$ S ω -3 vs. T ω -3; # $P < 0,05$ S vs. S ω -3. **A'.** Western blots representativos mostrando conteúdo de HSPs. Os valores são médias e E.P. ($n = 8$ /grupo). CI: controle interno. UA: unidades arbitrárias. S: sedentário; S ω -3: sedentário + ω -3; T: treinado; T ω -3: treinado + ω -3.

DISCUSSÃO

Avaliamos nesse trabalho o efeito de uma suplementação rica em EPA e DHA no funcionamento das mitocôndrias e no sistema de proteção antioxidante associada ou não a um treinamento físico, uma vez que a literatura aponta benefícios induzidos pelos ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA em algumas patologias, além de exercerem um papel na proliferação de mitocôndrias e peroxissomas (MADSEN, et al., 1999b; DAS, 2000). Não temos conhecimento de trabalhos que já tenham analisado os efeitos de uma suplementação com óleos de peixe ricos em ácidos graxos poliinsaturados (EPA 70% e DHA 10%) nos parâmetros respiratórios, na produção de H₂O₂ e na composição lipídica de mitocôndrias isoladas de músculo de animais com ou sem treinamento.

Num primeiro momento, nós imaginamos que a suplementação rica em ω -3 associada ao exercício físico poderia otimizar o funcionamento das mitocôndrias. Estudos mostraram que o EPA estimula a proliferação mitocondrial e a β -oxidação, daí o possível efeito hipotrigliceridêmico deste ácido graxo; enquanto que o DHA tem como alvo mais específico os peroxissomas (FROYLAND, et al., 1997; MADSEN, et al., 1999a). Assim, a dose utilizada no nosso estudo, de 1500 mg de óleo de peixe por Kg de massa corporal por dia foi escolhida baseada nesses estudos. Além disso, utilizamos uma proporção elevada de EPA (70%) em relação ao DHA (10%) devido ao fato do EPA ser o ácido graxo responsável pela proliferação mitocondrial. Por outro lado, também queríamos determinar se a associação de uma suplementação rica em ácidos graxos ω -3 com situações conhecidas pelo aumento da produção de EROS poderia ser nocivo para o organismo, pois o alto grau de insaturação destes ácidos graxos pode aumentar sua susceptibilidade à oxidação.

Efeitos do treinamento

Nossa primeira observação neste estudo foi o aumento nas atividades da citocromo c oxidase e citrato sintase após o treinamento. É sabido que as adaptações metabólicas seguidas de um exercício dependem da natureza deste, e variam conforme sua duração e intensidade (GOLLNICK, et al., 1973; MOLE, et al., 1973; VENDITTI; MASULLO; DI MEO, 1999; MITCHELL, et al., 2002). Na literatura, vários estudos mostraram um aumento das capacidades oxidativas após treinamento de *endurance*, porém os protocolos utilizados foram de exercício contínuo (GOLLNICK, et al., 1973; MOLE, et al., 1973; DUDLEY; ABRAHAM; TERJUNG, 1982; MITCHELL, et al., 2002), enquanto que em nosso estudo nós utilizamos o exercício intermitente.

Paralelo ao aumento na capacidade oxidativa, nós observamos um aumento no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de músculo na presença do succinato e do

glutamato/malato/succinato, em condições fosforilantes e não fosforilantes ($P < 0,05$, S vs. T). É importante notar que no Estudo I, utilizando exercícios intermitentes com predominância excêntrica também notamos aumento tanto no consumo de oxigênio quanto na atividade da enzima citrato sintase após o treinamento.

Analisamos a velocidade de consumo de O_2 na presença de oligomicina, a fim de avaliar uma possível volta de prótons pela cadeia de transporte de elétrons (*proton leak* ou *slip*), que não estivesse associada a fosforilação do ATP. Nossos dados comprovam que no grupo treinado a respiração estava menos inibida na presença de oligomicina que a do grupo sedentário, sugerindo um maior *leaking* ou *slipping* de prótons após o treinamento. Brookes e colegas (1998) sugeriram que membranas mitocondriais com conteúdo maior de MUFAs tendem a apresentar um *leaking* de prótons diminuído. No nosso caso, o treinamento induziu uma diminuição no conteúdo de MUFAs (-15%), que poderia estar relacionado com um *leaking* aumentado de H^+ e uma produção de H_2O_2 diminuída, embora a produção de H_2O_2 tenha apresentado apenas uma tendência de diminuição.

Por outro lado, nosso protocolo de treinamento foi eficaz em melhorar a capacidade oxidativa, aparentemente sem aumentar o nível de estresse oxidativo. Ou seja, a *produção de H_2O_2 expressa por unidade de oxigênio* pelas mitocôndrias isoladas praticamente não se alterou, embora tenha sido verificada uma tendência de diminuição após o treinamento no estado não-fosforilativo, independente do substrato utilizado. Da mesma forma não observamos nenhum efeito do treinamento na atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx, apenas uma tendência de aumento na atividade da Mn-SOD ($P = 0,06$). Além disso, o conteúdo de HSPs72 também não aumentou após o treinamento.

Criswell et al. (1993) já haviam testado o efeito de dois tipos de treinamento (contínuo e intermitente) na atividade de enzimas oxidativas e antioxidantes. Esses autores mostraram que as atividades da succinato desidrogenase, 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase e da SOD não se alteraram, independente do treinamento ser intermitente ou contínuo; porém a atividade da GPx estava aumentada no músculo sóleo após treinamento intermitente. Num outro trabalho Smolka e colegas (2000) analisaram o efeito de dois tipos de treinamento (contínuo e intermitente) nas atividades de algumas enzimas antioxidantes (CAT e GR), da citrato sintase e no conteúdo de HSP72. Eles verificaram que o treinamento intermitente, apesar de ser muito eficaz na indução da capacidade oxidativa foi menos eficaz na indução das atividades das enzimas antioxidantes, embora tenha induzido um aumento da atividade da CAT e da GR.

A diferença entre nosso protocolo de treinamento e aqueles de Criswell (1993) e Smolka (2000) foram as pausas ativas utilizadas em nosso estudo, que poderiam explicar uma adaptação positiva na capacidade oxidativa sem alterar a atividade das enzimas

antioxidantes. É importante salientar que o conteúdo de HSP72 também não foi alterado no nosso estudo, reforçando que o treinamento não elevou significativamente o nível de estresse dos animais, embora os conteúdos totais de plasmalógenos (-8,5%) estivessem diminuídos após o treinamento. A diminuição do conteúdo total de plasmalógenos, paralela a uma tendência de diminuição no conteúdo do ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6) ($P = 0,06$) sugere que os fosfolípidos plasmalógenos foram alvo de um ataque oxidativo, induzido possivelmente pelo aumento na produção de EROS com o treinamento. A diminuição das razões MUFA/PUFA e 18:1n-9/16:0 ($P = 0,05$, S vs. T) também poderia indicar que estes animais são mais susceptíveis à peroxidação lipídica e a uma diminuição da fluidez, como já havia sido relatado por Mataix e colegas (1998). A diminuição no conteúdo de plasmalógenos foi maior no Estudo II que no Estudo I, o que reforça a possibilidade destes animais estarem sujeitos a um estresse maior que aquele apresentado pelos animais treinados no protocolo do Estudo I, mesmo que sem atingir níveis deletérios. Sabe-se que a oxidação dos plasmalógenos não é propagadora de peroxidação lipídica, agindo de maneira preventiva, pois evita a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (ENGELMANN, 2004).

Efeito da suplementação com óleos de peixe rica em Ômega-3

Analisando inicialmente a suplementação rica em óleos de peixe (ω -3), não associada ao exercício físico (S vs. S ω -3) verificamos que a mesma modificou a composição lipídica das mitocôndrias, com um aumento no conteúdo total dos ácidos graxos n-3 e PUFA em geral, paralelo a uma diminuição no conteúdo de MUFA, n-6 e na razão n-6/n-3, embora não tenha alterado o conteúdo de plasmalógenos. Nós também analisamos a composição lipídica das cardiolipinas das mitocôndrias, uma vez que modificações na composição lipídica deste fosfolípido poderiam estar relacionadas com alterações no processo de fosforilação oxidativa e produção de EROS. Porém, nenhuma alteração foi constatada após a suplementação com ω -3 (não mostrado).

Notamos ainda que a suplementação com óleos de peixe (ω -3) não causou modificações nos parâmetros respiratórios das mitocôndrias (consumo de oxigênio, CR) e tampouco na produção mitocondrial de H₂O₂ bruta ou expressa por oxigênio consumido no estado 4 e 3, com os substratos sendo utilizados separadamente, contrariamente ao estudo de Yamaoka e colegas (1988) onde esses autores haviam mostrado uma diminuição nos parâmetros respiratórios e na atividade da citocromo c oxidase em mitocôndrias de coração de animais suplementados com óleos de peixe (YAMAOKA; URADE; KITO, 1988). Entretanto neste estudo, Yamaoka e colegas utilizaram uma dosagem de 0,929 g de EPA e 0,391 g de DHA por dia durante 10 e/ou 30 dias de suplementação, enquanto que em nosso estudo nós

utilizamos uma dosagem de cerca 0,315 g de EPA e 0,045 g de DHA por dia durante 15 dias. Ainda naquele estudo, os autores analisaram a composição lipídica de diferentes tecidos (coração, fígado e cérebro) de ratos suplementados durante 10 dias, e mostraram que esse curto período de suplementação já era suficiente para modificar a composição lipídica, porém eles não realizaram as medidas de respiração mitocondrial dos animais suplementados durante 10 dias.

Parece que a dose de EPA e DHA utilizada durante a suplementação tem um papel mais relevante nas alterações do funcionamento mitocondrial que a duração da suplementação, sendo que a dose de EPA e DHA utilizada no no nosso estudo não modificou o funcionamento mitocondrial. Em concordância com nossos dados, McMillin e colaboradores (1992) mostraram que uma suplementação com óleo de peixe rico em ácidos graxos poliinsaturados durante 60 semanas (0,030 g de EPA/DHA) não causou alteração nos parâmetros respiratórios de mitocôndrias isoladas de coração de cães, apesar da modificação na composição lipídica destas organelas. Stillwell e grupo (1992) também mostraram que uma suplementação rica em ácidos graxos poliinsaturados (EPA 16% e DHA 16%) durante 3 semanas modificou a composição lipídica de mitocôndrias de fígado de camundongos, sem alterar o funcionamento das mesmas. Esses autores mostraram também que os conteúdos dos ácidos graxos EPA e DHA estavam aumentados nas mitocôndrias dos animais suplementados, enquanto que o conteúdo do ARA estava diminuído. Em nosso estudo o conteúdo de EPA foi significativamente mais alterado que aquele do DHA, provavelmente devido ao tipo de suplementação utilizada, que continha uma quantidade de EPA elevada (EPA 70% e DHA 10%). Outros estudos também relataram a mesma variação na composição lipídica em diferentes tecidos (fígado, coração, eritrócitos, rim etc) após suplementação com óleos de peixe, com uma diminuição dos conteúdos de ARA e um aumento dos ácidos graxos EPA e DHA (CALVIELLO et al., 1997; ANDO et al. 2000).

Apesar dos prováveis efeitos benéficos destes ácidos graxos no tratamento de algumas patologias, existem sugestões de que possam causar uma maior susceptibilidade das membranas à peroxidação lipídica, o que provocaria um aumento nos níveis de estresse oxidativo. Entretanto, Calviello et al. (1997) e Ando et al. (2000) mostraram que uma suplementação rica em óleos de peixe foi capaz de modificar as composições lipídicas dos tecidos, sem aumentar a susceptibilidade ao estresse oxidativo. Nesse sentido, Ando e colaboradores. (2000) sugeriram a necessidade de uma suplementação com ω -3 vir acompanhada de vitamina E, para evitar os efeitos deletérios de um ataque oxidativo.

Em nosso estudo, o aporte diário de vitamina E foi de cerca 3,0 mg por grama de óleo de peixe suplementado, ou seja ~1,75 mg/dia, enquanto que no estudo de Ando o aporte de

vitamina E foi de 4,3 mg por grama de óleo de peixe. Aqui nesse estudo não mensuramos diretamente os níveis de peroxidação lipídica, porém a ausência de modificação no conteúdo de plasmalógenos do grupo ω -3 e a diminuição no conteúdo de HSPs72 sugere que não houve um aumento nos níveis de estresse oxidativo. Apesar de notarmos que a produção mitocondrial de H_2O_2 por oxigênio consumido no estado 3 na presença de substratos do complexo I e II conjuntamente, ou seja, em condições mais próximas às fisiológicas, estava aumentada apenas nestas condições.

A diminuição do ARA pode ser explicada ou pela inibição exercida pelos ácidos graxos n-3 na sua formação, a partir do 18:2 n-6 na fase Δ 6-desaturação, ou ainda pela competição do EPA pela posição sn-2 do ARA dos fosfolipídeos da membrana. Outra possibilidade para uma diminuição do ARA seria a oxidação dos fosfolipídeos plasmalógenos, já que eles contêm, muitas vezes, na sua posição sn-2 o ARA. Calviello et al. (1997) mostraram que em coração de ratos a diminuição do ARA estava mais fortemente ligada à competição do EPA pelo ARA, uma vez que neste tecido a Δ 6-desaturação parece limitada e o conteúdo de 18:2 n-6 permaneceu constante. Nós observamos uma diminuição do ARA sem uma concomitante diminuição do ácido linoléico (18:2 n-6) ou no conteúdo de plasmalógenos. Esses dados sugerem que a diminuição do conteúdo de ARA também esteja relacionada com a competição do EPA pelo ARA na posição sn-2 dos fosfolipídeos.

As atividades das enzimas antioxidantes CAT e GPx não foram alteradas, embora tenhamos notado uma tendência de aumento na atividade da Mn-SOD ($P = 0,06$) após suplementação rica em ω -3. Muitos estudos mostraram um aumento da atividade de enzimas antioxidantes após suplementação rica em ω -3 em diferentes tecidos (REDDY AVULA; FERNANDES, 1999; ATALAY, et al., 2000; BHATTACHARYA, et al., 2003; WANG, et al., 2003; CHOI-KWON, et al., 2004). Atalay et al. (1999) verificaram um aumento na atividade da CAT e da GST em músculo gastrocnêmio vermelho de ratos após 8 semanas de suplementação rica em óleos de peixe (35% EPA e 26% DHA). Nos estudos de Venkatraman e grupo (1998) também foi observado um aumento na atividade da CAT, concomitantemente com a diminuição da SOD e da GPx-Ph em fígado de ratos após 2 meses de suplementação com óleos de peixe (13% EPA e 9% DHA) comparado com uma suplementação com óleo de milho durante o mesmo período. Este aumento da CAT no estudo de Venkatraman foi atribuído a um possível aumento na produção de H_2O_2 pelos peroxissomas. Já em um outro estudo, Reddy-Avula e Fernandes (1999) observaram um aumento das atividades da CAT, SOD e da GPx-Ph em homogenato de baço de ratos após suplementação com óleos de peixe (15,5% EPA e 13,6% DHA), paralelo a um aumento de TBARS.

Nossos dados indicam que a dosagem utilizada em nosso protocolo não causou um aumento nos níveis de estresse oxidativo. A diminuição significativa no conteúdo de HSPs72 no grupo S ω -3 comparado com o grupo S reforça essa interpretação. O período de suplementação (15 dias, 7/7 dias) e a dosagem utilizada poderiam explicar esses dados, mesmo com a composição lipídica das mitocôndrias já modificada após essas 2 semanas de suplementação.

Efeito da associação da suplementação com óleos de peixe rica em Ômega-3 e o treinamento físico

A associação do exercício (treinamento) com a suplementação parece não ser positiva para o músculo, pelo menos ao nível mitocondrial. Nessas condições, obtivemos mitocôndrias isoladas com uma concentração de proteínas diminuída em cerca de 50%, quando comparada com as mitocôndrias isoladas dos outros grupos de animais. Nossos resultados mostraram que mesmo efetuando as medidas de consumo de oxigênio e produção de H₂O₂ com a mesma concentração final de proteínas dos demais grupos, os vários parâmetros respiratórios se encontravam diminuídos nos animais treinados após suplementação (T ω -3). Dessa forma, observamos diminuição no consumo de oxigênio nos estados 3 e 4, independente do substrato utilizado, paralelo a uma diminuição na produção bruta de H₂O₂ no estado 4, que parece ser, no entanto um reflexo de todos os parâmetros respiratórios diminuídos.

As atividades da CS e da CCOX também estavam diminuídas nos animais treinados que receberam 2 semanas de suplementação. A CCOX pareceu menos ativa que a CS, sugerindo que a quantidade de proteínas da cadeia de transporte de elétrons está diminuída em relação à concentração de proteínas mitocondriais totais, ou que a modificação da composição lipídica das mitocôndrias foi tão drástica que afetou o funcionamento da CCOX. Yamaoka et al. (1988) também mostraram uma diminuição na atividade da CCOX após 30 dias de suplementação rica em ω -3, porém nesse estudo a diminuição foi atribuída à diminuição do conteúdo do ácido linoléico (18:2 n-6) das cardiolipinas. Em nosso estudo não notamos alterações do conteúdo do ácido linoléico das cardiolipinas e dos lipídeos totais após suplementação e/ou treinamento.

Nossos dados contrariam também o estudo de Quiles et al. (2001), que mostraram que a atividade física associada a uma suplementação com óleo de girassol (55% PUFA) modificou a composição lipídica de mitocôndrias de músculo, aumentando paralelamente a atividade da CCOX, assim como o conteúdo de proteínas mitocondriais e da coenzima Q. A principal diferença entre esse estudo e o nosso foi que o conteúdo de PUFA no óleo de

girassol consiste de 54% de ácido linoléico (18:2n-6), enquanto que no óleo de peixe nós encontramos majoritariamente os PUFA n-3 (EPA e DHA).

Em relação à composição lipídica das mitocôndrias observamos um aumento significativo nos conteúdos totais dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 nos animais T ω -3 comparados com os animais T, enquanto que o conteúdo de ácidos graxos n-6 diminuiu. O conteúdo total de plasmalógenos também foi fortemente diminuído (-29%) nos ratos treinados suplementados (T vs. T ω -3), enquanto que após o treinamento sem suplementação o conteúdo diminuiu apenas 9% (S vs. T). Esta diminuição drástica no conteúdo de plasmalógenos poderia indicar níveis elevados de peroxidação lipídica.

Em um trabalho realizado por Atalay e grupo (2000) foi mostrado que o conteúdo de glutathiona total estava diminuído após exercício exaustivo e suplementação com óleos de peixe no músculo gastrocnêmio de ratos. Eles consideraram que a diminuição da glutathiona total era um índice de estresse oxidativo. A diferença entre este estudo e o nosso é que os autores analisaram o efeito do exercício agudo após suplementação, enquanto nós estudamos o efeito de um exercício crônico.

Venkatraman et al. (1998) mostraram que após 16 semanas de suplementação com dieta rica em ácidos graxos ω -3 e 8 semanas de treinamento, a atividade da CAT no fígado estava aumentada nos animais treinados suplementados em relação aos animais treinados não suplementados. Em um outro estudo, Reddy-Avula e Fernandes (1999) observaram um aumento da atividade da GSH-Px no baço de ratos treinados suplementados. Nesses estudos, a duração da suplementação foi de 16 semanas, diferentemente de nosso estudo, onde a suplementação durou apenas 2 semanas. No entanto, nossos dados mostram que o conteúdo de HSPs72 aumentou ($P = 0,068$) nos animais treinados suplementados em relação aos animais treinados não suplementados. Esse aumento poderia ser um índice de aumento nos níveis de estresse oxidativo, embora as enzimas antioxidantes ainda não tivessem sido induzidas.

Resumindo, nossos resultados mostram que a associação do treinamento com uma suplementação rica em ω -3 não traz benefícios, nem ao nível das mitocôndrias isoladas de músculo nem para o sistema enzimático de proteção antioxidante muscular. Ao contrário, estes animais perderam a melhoria da capacidade oxidativa obtida pelo treinamento, além de estarem submetidos a um nível de estresse maior.

CONCLUSÃO

Neste estudo nós utilizamos um treinamento intermitente concêntrico com pausas ativas. Mostramos que o nosso protocolo foi eficaz na indução da capacidade oxidativa (aumento da citrato sintase, da CCOX e do consumo de oxigênio), sem no entanto alterar as atividades das principais enzimas antioxidantes. Observamos também que a produção mitocondrial de H₂O₂ não foi modificada. Além disso, o treinamento alterou a composição lipídica das mitocôndrias, indicando uma situação favorável para peroxidação lipídica, sem atingir, contudo níveis deletérios.

Nossos resultados mostraram ainda que a suplementação com óleos de peixe ricos em Ômega-3 sozinha, numa dose de 1500 mg/Kg/dia não provocou aumento da peroxidação lipídica, além de não influenciar o funcionamento mitocondrial e as atividades das enzimas antioxidantes. Provavelmente o aporte suficiente de vitamina E, a dose-duração da suplementação e a ausência de condições pró-oxidantes fizeram com que nós não observássemos efeito da suplementação nos parâmetros estudados, embora tenha sido eficiente em alterar a composição lipídica das mitocôndrias isoladas.

Todavia, numa situação em que a produção de EROS poderia estar elevada, como durante o exercício físico (apenas 25 minutos por dia, 5 dias por semana durante as 2 semanas de suplementação) nós observamos uma alteração na composição lipídica das mitocôndrias com uma drástica mudança de seu funcionamento. Além disso, as adaptações oxidativas adquiridas pelo treinamento foram perdidas quando o treinamento foi associado à suplementação. Esse fato parece estar relacionado com uma diminuição das proteínas da cadeia de transporte de elétrons em comparação aos lipídeos totais, uma vez que todos os parâmetros estudados variaram da mesma forma (diminuição do consumo de oxigênio, da produção de H₂O₂ e das atividades da CS e da CCOX). Finalmente, a composição lipídica destas mitocôndrias foi modificada com uma forte diminuição dos plasmalógenos enquanto que o conteúdo de HSPs72 tendeu a aumentar, indicando que esses animais estão expostos a um nível de estresse maior quando treinados e suplementados.

Sugerimos que o forte efeito antiinflamatório desses ácidos graxos poliinsaturados não seriam benéficos para as adaptações positivas induzidas pelo treinamento ao nível muscular, uma vez que elas requerem a instalação de um processo inflamatório brando para ocorrerem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, v.25 (n.2), p.218-224, 1993.

ALESSIO, H. M.; HAGERMAN, A. E.; FULKERSON, B. K.; AMBROSE, J.; RICE, R. E.; WILEY, R. L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.32 (n.9), p.1576-1581, 2000.

ALLEN, D. G. Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta Physiol. Scand.*, v.171, p.311-319, 2001.

AMBROSIO, G.; ZWEIER, J. L.; DUILIO, C.; KUPPUSAMY, P.; SANTORO, G.; ELIA, P. P.; TRITTO, I.; CIRILLO, P.; CONDORELLI, M.; CHIARIELLO, M.; ET AL. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem*, v.268 (n.25), p.18532-18541, 1993.

ANDERSEN, J. L.; GRUSCHY-KNUDSEN, T.; SANDRI, C.; LARSSON, L.; SCHIAFFINO, S. Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.86 (n.2), p.455-460, 1999.

ANDERSSON, A.; SJODIN, A.; OLSSON, R.; VESSBY, B. Effects of physical exercise on phospholipid fatty acid composition in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.274 (n.3 Pt 1), p.E432-438, 1998.

ANDO, K.; NAGATA, K.; YOSHIDA, R.; KIKUGAWA, K.; SUZUKI, M. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. *Lipids*, v.35 (n.4), p.401-407, 2000.

ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.54 (n.1), p.80-93, 1983.

ARMSTRONG, V. T.; BRZUSTOWICZ, M. R.; WASSALL, S. R.; JENSKI, L. J.; STILLWELL, W. Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem Biophys*, v.414 (n.1), p.74-82, 2003.

ASKLING, C.; KARLSSON, J.; THORSTENSSON, A. Hamstring injury occurrence in elite soccer players after preseason strength training with eccentric overload. *Scand J Med Sci Sports*, v.13 (n.4), p.244-250, 2003.

- ATALAY, M.; LAAKSONEN, D. E.; KHANNA, S.; KALISTE-KORHONEN, E.; HÄNNINEN, O.; SEN, C. K. Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.32 (n.3), p.601-607, 2000.
- BABCOCK, T.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory omega-3 fat with potential clinical applications. *Nutrition*, v.16 (n.11-12), p.1116-1118, 2000.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.*, v.31 (n.4), p.347-367, 1999.
- BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, v.78 (n.2), p.547-581, 1998.
- BENTLAGE, H.; DE COO, R.; TER LAAK, H.; SENGERS, R.; TRIJBELS, F.; RUITENBEEK, W.; SCHLOTE, W.; PFEIFFER, K.; GENCIC, S.; VON JAGOW, G.; ET AL. Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 1. Decreased amounts of assembled oxidative phosphorylation complexes in mitochondrial encephalomyopathies. *Eur J Biochem*, v.227 (n.3), p.909-915, 1995.
- BHATTACHARYA, A.; LAWRENCE, R. A.; KRISHNAN, A.; ZAMAN, K.; SUN, D.; FERNANDES, G. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. *J Am Coll Nutr*, v.22 (n.5), p.388-399, 2003.
- BOOTH, F. W.; BABIJ, P.; THOMASON, D. B.; WONG, T. S.; MORRISON, P. R. Adaptation of muscle gene expression to changes in contractile activity. *Adv Myochem*, v.1, p.205-216, 1987.
- BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev*, v.71 (n.2), p.541-585, 1991.
- BOSS, O.; SAMEC, S.; DESPLANCHES, D.; MAYET, M. H.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J. P. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *FASEB J.*, v.12, p.335-339, 1998.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*, v.54 (n.3), p.311-314, 1975.
- BRAND, M. D.; TURNER, N.; OCLOO, A.; ELSE, P. L.; HULBERT, A. J. Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J*, v.376 (n.Pt 3), p.741-748, 2003.
- BROOKES, P. S.; BUCKINGHAM, J. A.; TENREIRO, A. M.; HULBERT, A. J.; BRAND, M. D. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v.119 (n.2), p.325-334, 1998.

BROWN, W. E.; SALMONS, S.; WHALEN, R. G. The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long term electrical stimulation. *J Biol Chem*, v.258 (n.23), p.14686-14692, 1983.

BRYNER, R. W.; DONLEY, D. A.; CUTLIP, R. G.; WIRTH, O.; ALWAY, S. E. Effects of downhill treadmill running on uncoupling protein 3 mRNA expression. *Int J Sports Med*, v.25 (n.6), p.433-437, 2004.

CAILLAUD, C.; PY, G.; EYDOUX, N.; LEGROS, P.; PREFAUT, C.; MERCIER, J. Antioxidants and mitochondrial respiration in lung, diaphragm, and locomotor muscles: effect of exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, v.26 (n.9-10), p.1292-1299, 1999.

CAIOZZO, V. J.; BAKER, M. J.; BALDWIN, K. M. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol*, v.85 (n.6), p.2237-2248, 1998.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, v.36 (n.9), p.1007-1024, 2001.

CALVIELLO, G.; PALOZZA, P.; FRANCESCHELLI, P.; BARTOLI, G. M. Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues. *Lipids*, v.32 (n.10), p.1075-1083, 1997.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, v.59 (n.3), p.527-605, 1979.

CHILDS, A.; JACOBS, C.; KAMINSKI, T.; HALLIWELL, B.; LEEUWENBURGH, C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med*, v.31 (n.6), p.745-753, 2001.

CHILIBECK, P. D.; BELL, G. J.; FARRAR, R. P.; MARTIN, T. P. Higher mitochondrial fatty acid oxidation following intermittent versus continuous endurance exercise training. *Can J Physiol Pharmacol*, v.76 (n.9), p.891-894, 1998.

CHOI-KWON, S.; PARK, K. A.; LEE, H. J.; PARK, M. S.; LEE, J. H.; JEON, S. E.; CHOE, M. A.; PARK, K. C. Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res Dev Brain Res*, v.152 (n.1), p.11-18, 2004.

CLARKSON, P. M. Micronutrients and exercise: anti-oxidants and minerals. Antioxidants and physical performance. *J Sports Sci*, v.13 (n.1-2), p.11-24, 1995.

COLQUHOUN, A.; RAMOS, K. L.; SCHUMACHER, R. I. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid effects on tumour mitochondrial metabolism, acyl CoA metabolism and cell proliferation. *Cell Biochem Funct*, v.19 (n.2), p.97-105, 2001.

- COOPER, J. M.; MANN, V. M.; KRIGE, D.; SCHAPIRA, A. H. Human mitochondrial complex I dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, v.1101 (n.2), p.198-203, 1992.
- COOPER, J. M.; MANN, V. M.; SCHAPIRA, A. H. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol Sci*, v.113 (n.1), p.91-98, 1992.
- CRAMER, W. A.; KNAFF, D. B. *Energy Transduction in Biological Membranes.*, Berlin: Springer-Verlag, 1991.
- CRISWELL, D.; POWERS, S.; DODD, S.; LAWLER, J.; EDWARDS, W.; RENSHLER, K.; GRINTON, S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc*, v.25 (n.10), p.1135-1140, 1993.
- CULLIS, P. R.; DE KRUIJFF, B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, v.559 (n.4), p.399-420, 1979.
- CULLIS, P. R.; HOPE, M. J. *Lipid polymorphism, lipid asymmetry and membrane fusion*, S. (OHKI, DOYLE, D., FLANAGAN, T.D., HUI, S.W. & MAYHEW, E., EDS),, In *Molecular Mechanisms of Membrane Fusion*, New York, USA.: Plenum Press, 1988.
- DACOSTA, Y. *La supplémentation nutritionnelle par les acides gras oméga-3*, Paris: Yves Dacosta, 1998.
- DAS, U. N. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.63 (n.6), p.351-362, 2000.
- DAVIES, K. J.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, v.107 (n.4), p.1198-1205, 1982.
- DE CRAEMER, D.; VAMECQ, J.; ROELS, F.; VALLEE, L.; PAUWELS, M.; VAN DEN BRANDEN, C. Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets. *J Lipid Res*, v.35 (n.7), p.1241-1250, 1994.
- DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol*, v.80 (n.1), p.261-270, 1996.
- DENARDI, C.; AUSONI, S.; MORETTI, P.; GORZA, L.; VELLECA, M.; BUCKINGHAM, M.; SCHIAFFINO, S. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol*, v.123 (n.4), p.823-835, 1993.
- DILLARD, C. J.; LITOV, R. E.; TAPPEL, A. L. Effects of dietary vitamin E, selenium, and polyunsaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentane production. *Lipids*, v.13 (n.6), p.396-402, 1978.

- DOLEZAL, B. A.; POTTEIGER, J. A.; JACOBSEN, D. J.; BENEDICT, S. H. Muscle damage and resting metabolic rate after acute resistance exercise with an eccentric overload. *Med Sci Sports Exerc*, v.32 (n.7), p.1202-1207, 2000.
- DUDLEY, G. A.; ABRAHAM, W. M.; TERJUNG, R. L. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.53 (n.4), p.844-850, 1982.
- ECOCHARD, L.; LHENRY, F.; SEMPORE, B.; FAVIER, R. Skeletal muscle HSP72 level during endurance training: influence of peripheral arterial insufficiency. *Pflugers Arch.*, v.440 (n.6), p.918-924, 2000.
- ENGELMANN, B. Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans*, v.32 (n.Pt 1), p.147-150, 2004.
- ESSIG, D. A.; NOSEK, T. M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol*, v.22 (n.5), p.409-428, 1997.
- FEASSON, L.; STOCKHOLM, D.; FREYSSINET, D.; RICHARD, I.; DUGUEZ, S.; BECKMANN, J. S.; DENIS, C. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*, v.543 (n.Pt 1), p.297-306, 2002.
- FERNANDEZ, M. G.; TROIANO, L.; MORETTI, L.; NASI, M.; PINTI, M.; SALVIOLI, S.; DOBRUCKI, J.; COSSARIZZA, A. Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth & Differentiation.*, v.13, p.449-455, 2002.
- FITTS, R. H. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev*, v.74 (n.1), p.49-94, 1994.
- FITTS, R. H.; RILEY, D. R.; WIDRICK, J. J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.89 (n.2), p.823-839, 2000.
- FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, v.105, p.93-104, 1984.
- FOX, E. L.; BOWERS, R. W.; FOSS, M. L. *Bases fisiológicas da Educação Física e dos Desportos.*, 4ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- FRIDEN, J.; LIEBER, R. L. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand*, v.171 (n.3), p.321-326, 2001.
- FROYLAND, L.; MADSEN, L.; VAAGENES, H.; TOTLAND, G. K.; AUWERX, J.; KRYVI, H.; STAELS, B.; BERGE, R. K. Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *J Lipid Res*, v.38 (n.9), p.1851-1858, 1997.
- FULLER, K. M.; DUFFY, C. F.; ARRIAGA, E. A. Determination of the cardiolipin content of individual mitochondria by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, v.23 (n.11), p.1571-1576, 2002.

- FURST, P.; KUHN, K. S. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? *Clin Nutr*, v.19 (n.1), p.7-14, 2000.
- GALLET, P. F.; ZACHOWSKI, A.; JULIEN, R.; FELLMANN, P.; DEVAUX, P. F.; MAFTAH, A. Transbilayer movement and distribution of spin-labelled phospholipids in the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta*, v.1418 (n.1), p.61-70, 1999.
- GARCIA FERNANDEZ, M.; TROIANO, L.; MORETTI, L.; NASI, M.; PINTI, M.; SALVIOLI, S.; DOBRUCKI, J.; COSSARIZZA, A. Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ*, v.13 (n.9), p.449-455, 2002.
- GENOVA, M. L.; VENTURA, B.; GIULIANO, G.; BOVINA, C.; FORMIGGINI, G.; PARENTI CASTELLI, G.; LENA Z, G. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett*, v.505 (n.3), p.364-368, 2001.
- GOLLNICK, P. D.; KING, D. W. Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, v.216 (n.6), p.1502-1509, 1969.
- GOLLNICK, P. D.; ARMSTRONG, R. B.; SALTIN, B.; SAUBERT, C. W. T.; SEMBROWICH, W. L.; SHEPHERD, R. E. Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.34 (n.1), p.107-111, 1973.
- GOLLNICK, P. D.; SALTIN, B. Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin Physiol*, v.2 (n.1), p.1-12, 1982.
- GORE, M.; FIEBIG, R.; HOLLANDER, J.; LEEUWENBURGH, C.; OHNO, H.; JI, L. L. Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol*, v.76 (n.12), p.1139-1145, 1998.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret. *J. Biol. Chem.*, v.177, p.751 - 766, 1949.
- GREEN, H. J. Mechanisms of muscle fatigue in intense exercise. *J Sports Sci*, v.15 (n.3), p.247-256, 1997.
- GUNNING, P.; HARDEMAN, E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *Faseb J*, v.5 (n.15), p.3064-3070, 1991.
- HAINES, T. H.; DENCHER, N. A. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, v.528 (n.1-3), p.35-39, 2002.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3, Oxford Science Publications, 1998.
- HALVORSEN, B.; RUSTAN, A. C.; MADSEN, L.; RESELAND, J.; BERGE, R. K.; SLETNES, P.; CHRISTIANSEN, E. N. Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. *Ann Nutr Metab*, v.45 (n.1), p.30-37, 2001.

HANSFORD, R. G.; HOGUE, B. A.; MILDAZIENE, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr*, v.29 (n.1), p.89-95, 1997.

HARRISON, A. P.; ROWLERSON, A. M.; DAUNCEY, M. J. Selective regulation of myofiber differentiation by energy status during postnatal development. *Am J Physiol*, v.270 (n.3 Pt 2), p.R667-674, 1996.

HAWORTH, R. A.; HUNTER, D. R.; BERKOFF, H. A. The isolation of Ca²⁺-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol*, v.12 (n.7), p.715-723, 1980.

HAYCOCK, J. W.; JONES, P.; HARRIS, J. B.; MANTLE, D. Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage: a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)*, v.92 (n.4), p.331-340, 1996.

HELGE, J. W.; AYRE, K. J.; HULBERT, A. J.; KIENS, B.; STORLIEN, L. H. Regular exercise modulates muscle membrane phospholipid profile in rats. *J. Nutr.*, v.129 (n.9), p.1636-1642, 1999.

HERRERO, A.; BARJA, G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev*, v.98 (n.2), p.95-111, 1997.

HERRERO, A.; PORTERO-OTIN, M.; BELLMUNT, M. J.; PAMPLONA, R.; BARJA, G. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.*, v.122 (n.4), p.427-443, 2001.

HIGUCHI, M.; CARTIER, L. J.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J. O. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol*, v.40 (n.3), p.281-286, 1985.

HOLLANDER, J.; FIEBIG, R.; GORE, M.; OOKAWARA, T.; OHNO, H.; JI, L. L. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.*, v.442 (n.3), p.426-434, 2001.

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, v.242 (n.9), p.2278-2282, 1967.

HOLLOSZY, J. O.; OSCAI, L. B.; DON, I. J.; MOLE, P. A. Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, v.40 (n.6), p.1368-1373, 1970.

HOLMES, G. E.; BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutat Res*, v.275 (n.3-6), p.305-315, 1992.

HOOD, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.90 (n.3), p.1137-1157, 2001.

- HUBBARD, A. W.; STETSON, R. H. An experimental analysis of human locomotion. *J. Physiol.*, v.266, p.300-313, 1938.
- HUERTAS, J. R.; MATAIX, F. J.; MANAS, M.; BARGOSSO, A. M.; BATTINO, M. Dietary polyunsaturated fatty acids and peroxidative risks in sport practice. *Alternatives. J Sports Med Phys Fitness*, v.34 (n.2), p.101-108, 1994.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, v.34 (n.2), p.145-169, 2003.
- ITOH, M.; OH-ISHI, S.; HATAO, H.; LEEUWENBURGH, C.; SELMAN, C.; OHNO, H.; KIZAKI, T.; NAKAMURA, H.; MATSUOKA, T. Effects of dietary calcium restriction and acute exercise on the antioxidant enzyme system and oxidative stress in rat diaphragm. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.287 (n.1), p.R33-38, 2004.
- JI, L. L.; STRATMAN, F. W.; LARDY, H. A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.263 (n.1), p.150-160, 1988.
- JI, L. L.; FU, R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J. Appl. Physiol.*, v.72 (n.2), p.549-554, 1992.
- JI, L. L.; FU, R.; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.*, v.73 (n.5), p.1854-1859, 1992.
- JI, L. L. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am J Sports Med*, v.24 (n.6 Suppl), p.S20-24, 1996.
- JI, L. L.; LEICHTWEIS, S. Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*, v.20, p.91-106, 1997.
- JI, L. L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v.959, p.82-92, 2002.
- JONES, T. E.; BAAR, K.; OJUKA, E.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J. O. Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol*, v.284, p.E96-E101, 2003.
- KAYATEKIN, B. M.; GONENC, S.; ACIKGOZ, O.; UYSAL, N.; DAYI, A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol*, v.87 (n.2), p.141-144, 2002.
- KELLEY, D. S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*, v.17 (n.7-8), p.669-673, 2001.

- KHASSAF, M.; CHILD, R. B.; MCARDLE, A.; BRODIE, D. A.; ESANU, C.; JACKSON, M. J. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol*, v.90 (n.3), p.1031-1035, 2001.
- KORSHUNOV, S. S.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*, v.416 (n.1), p.15-18, 1997.
- KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, v.92 (n.5), p.2177-2186, 2002.
- KRETZ-REMY, C.; ARRIGO, A. P. Gene expression and thiol redox state. *Methods Enzymol*, v.348, p.200-215, 2002.
- KWONG, L. K.; SOHAL, R. S. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, v.350 (n.1), p.118-126, 1998.
- LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*, v.382, p.511-517, 2004.
- LARSSON, L. The age-related motor disability: underlying mechanisms in skeletal muscle at the motor unit, cellular and molecular level. *Acta Physiol Scand*, v.163 (n.3), p.S27-29, 1998.
- LAWLER, J. M.; POWERS, S. K.; VISSER, T.; VAN DIJK, H.; KORDUS, M. J.; JI, L. L. Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am. J. Physiol.*, v.265 (n.6 Pt 2), p.R1344-1350, 1993.
- LEE, J.; GOLDFARB, A. H.; RESCINO, M. H.; HEGDE, S.; PATRICK, S.; APPERSON, K. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc*, v.34 (n.3), p.443-448, 2002.
- LEEUWENBURGH, C.; JI, L. L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys*, v.316 (n.2), p.941-949, 1995.
- LEEUWENBURGH, C.; HANSEN, P. A.; HOLLOSZY, J. O.; HEINECKE, J. W. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med*, v.27 (n.1-2), p.186-192, 1999.
- LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr. Med. Chem.*, v.8 (n.7), p.829-838, 2001.
- LENN, J.; UHL, T.; MATTACOLA, C.; BOISSONNEAULT, G.; YATES, J.; IBRAHIM, W.; BRUCKNER, G. The effects of fish oil and isoflavones on delayed onset muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc*, v.34 (n.10), p.1605-1613, 2002.
- LILL, R.; NEUPERT, W. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol*, v.6 (n.2), p.56-61, 1996.

- LINDSTEDT, S.; REICH, T. E.; KEIM, P.; LASTAYO, P. C. Do muscle function as adaptable locomotor springs? *The Journal of Experimental Biology.*, v. 205, p.2211-2216, 2002.
- LIU, J.; YEO, H. C.; OVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S. J.; CHYU, D. W.; BROOKS, G. A.; AMES, B. N.; CHU, D. W. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*, v.89 (n.1), p.21-28, 2000.
- LIU, Y.; STEINACKER, J. M. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci*, v.6, p.D12-25, 2001.
- LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, v.80 (n.5), p.780-787, 2002.
- LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am J Physiol*, v.258 (n.4 Pt 1), p.C723-729, 1990.
- _____. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *Am J Physiol*, v.261 (n.5 Pt 1), p.C774-779, 1991.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- MADSEN, L.; FROYLAND, L.; KRYVI, H.; AUWERX, J.; STAELS, B.; BERGE, R. K. The mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of plasma triglyceride. *Lipids*, v.34 Suppl, p.S167, 1999a.
- MADSEN, L.; RUSTAN, A. C.; VAAGENES, H.; BERGE, K.; DYROY, E.; BERGE, R. K. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids*, v.34 (n.9), p.951-963, 1999b.
- MATAIX, J.; QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTINO, M.; MANAS, M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, v.24 (n.4), p.511-521, 1998.
- MC ARDLE, A.; JACKSON, M. J. Exercise, oxidative stress and ageing. *J Anat*, v.197 Pt 4, p.539-541, 2000.
- MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, v.244 (n.22), p.6049-6055, 1969.
- MCARDLE, A.; JACKSON, M. J. Exercise, oxidative stress and ageing. *J Anat*, v.197 Pt 4, p.539-541, 2000.
- MCCORD, J. M.; ROY, R. S.; SCHAFFER, S. W. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol*, v.5, p.183-189, 1985.

- MCMILLIN, J. B.; BICK, R. J.; BENEDICT, C. R. Influence of dietary fish oil on mitochondrial function and response to ischemia. *Am. J. Physiol.*, v.263 (n.5 Pt 2), p.H1479-1485, 1992.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, v.5 (n.28), p.57-62, 1987.
- MIRANDA, S.; FONCEA, R.; GUERRERO, J.; LEIGHTON, F. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.258 (n.1), p.44-49, 1999.
- MITCHELL, J. B.; DUGAS, J. P.; MCFARLIN, B. K.; NELSON, M. J. Effect of exercise, heat stress, and hydration on immune cell number and function. *Med Sci Sports Exerc*, v.34 (n.12), p.1941-1950, 2002.
- MOLE, P. A.; BALDWIN, K. M.; TERJUNG, R. L.; HOLLOSZY, J. O. Enzymatic pathways of pyruvate metabolism in skeletal muscle: adaptations to exercise. *Am J Physiol*, v.224 (n.1), p.50-54, 1973.
- MORGAN, D. L.; ALLEN, D. G. Early events in stretch-induced muscle damage. *J Appl Physiol*, v.87 (n.6), p.2007-2015, 1999.
- MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, v.259 (n.5100), p.1409-1410, 1993.
- MORRISON, W. R.; SMITH, L. M. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res*, v.53, p.600-608, 1964.
- MOYES, C. D.; HOOD, D. A. Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. *Annu Rev Physiol*, v.65, p.177-201, 2003.
- NAGAN, N.; ZOELLER, R. A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res.*, v.40 (n.3), p.199-229, 2001.
- NEGRE-SALVAYRE, A.; HIRTZ, C.; CARRERA, G.; CAZENAVE, R.; TROLY, M.; SALVAYRE, R.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J*, v.11 (n.10), p.809-815, 1997.
- NOMURA, K.; IMAI, H.; KOUMURA, T.; KOBAYASHI, T.; NAKAGAWA, Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J*, v.351 (n.Pt 1), p.183-193, 2000.
- OLIVER, I. T. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J*, v.61 (n.1), p.116-122, 1955.
- OOSTENBRUG, G. S.; MENSINK, R. P.; HARDEMAN, M. R.; DE VRIES, T.; BROUNS, F.; HORNSTRA, G. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol*, v.83 (n.3), p.746-752, 1997.

OSMUNDSEN, H.; BRAUD, H.; BEAUSEIGNEUR, F.; GRETI, J.; TSOKO, M.; CLOUET, P. Effects of dietary treatment of rats with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid on hepatic lipid metabolism. *Biochem J*, v.331 (Pt 1), p.153-160, 1998.

OSTRANDER, D. B.; SPARAGNA, G. C.; AMOSCATO, A. A.; MCMILLIN, J. B.; DOWHAN, W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem*, v.276 (n.41), p.38061-38067, 2001.

PACKER, L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci*, v.15 (n.3), p.353-363, 1997.

PACKER, L.; TRITSCHLER, H. J.; WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, v.22 (n.1-2), p.359-378, 1997.

PADDON-JONES, D.; ABERNETHY, P. J. Acute adaptation to low volume eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v.33 (n.7), p.1213-1219, 2001.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PISTOLESE, M.; RUGGIERO, F. M. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *An International Journal on Genes and Genomes.*, v.286, p.135-141, 2002.

PEREZ, A. C.; CABRAL DE OLIVEIRA, A. C.; ESTEVEZ, E.; MOLINA, A. J.; PRIETO, J. G.; ALVAREZ, A. I. Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v.134 (n.2), p.199-206, 2003.

PETROSILLO, G.; RUGGIERO, F. M.; PISTOLESE, M.; PARADIES, G. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett*, v.509 (n.3), p.435-438, 2001.

PETTE, D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol*, v.27 (n.4), p.423-448, 2002.

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L. L.; MARTIN, D.; HERB, R. A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.266 (n.2 Pt 2), p.R375-380, 1994.

POWERS, S. K.; LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, v.58 (n.4), p.1025-1033, 1999.

PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J. Physiol.*, v.537 (n.Pt 2), p.333-345, 2001.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; MAÑAS, M.; OCHOA, J. J.; BATTINO, M.; MATAIX, F. J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.33 (n.2), p.127-134, 2001.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, v.27 (n.1-2), p.69-74, 1999.

RADAK, Z.; PUCSUK, J.; BOROS, S.; JOSFAI, L.; TAYLOR, A. W. Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sci*, v.66 (n.18), p.1763-1767, 2000.

RAHA, S.; ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet*, v.106 (n.1), p.62-70, 2001.

RASMUSSEN, U. F.; KRUSTRUP, P.; BANGSBO, J.; RASMUSSEN, H. N. The effect of high-intensity exhaustive exercise studied in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *Pflugers Arch*, v.443 (n.2), p.180-187, 2001.

REDDY AVULA, C. P.; FERNANDES, G. Modulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging (Milano)*, v.11 (n.4), p.246-252, 1999.

REID, M. B.; HAACK, K. E.; FRANCKEK, K. M.; VALBERG, P. A.; KOBZIK, L.; WEST, M. S. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol*, v.73 (n.5), p.1797-1804, 1992.

REMITA, S. [Radiation induced lipid peroxidation: factors which determine the oxidizability of lipids]. *Can J Physiol Pharmacol*, v.79 (n.2), p.144-153, 2001.

RICHTER, C.; GOGVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEIZER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFEE, M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta*, v.1271 (n.1), p.67-74, 1995.

ROBERGS, R. A. Exercise-induced metabolic acidosis: where do the protons come from? *Sports Science*, v.5 (n.2), p.1-20, 2001.

ROSS, A.; LEVERITT, M. Long-term metabolic and skeletal muscle adaptations to short-sprint training: implications for sprint training and tapering. *Sports Med*, v.31 (n.15), p.1063-1082, 2001.

RUSSELL, A. P.; WADLEY, G.; HESSELINK, M. K.; SCHAART, G.; LO, S.; LEGER, B.; GARNHAM, A.; KORNIPS, E.; CAMERON-SMITH, D.; GIACOBINO, J. P.; MUZZIN, P.; SNOW, R.; SCHRAUWEN, P. UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. *Pflugers Arch.*, v.445, p.563-569, 2003.

SALO, D. C.; PACIFICI, R. E.; LIN, S. W.; GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem*, v.265 (n.20), p.11919-11927, 1990.

- SALO, D. C.; DONOVAN, C. M.; DAVIES, K. J. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med*, v.11 (n.3), p.239-246, 1991.
- SAMELMAN, T. R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol*, v.85 (n.1), p.92-102, 2000.
- SAYERS, S. P.; PETERS, B. T.; KNIGHT, C. A.; URSO, M. L.; PARKINGTON, J.; CLARKSON, P. M. Short-term immobilization after eccentric exercise. Part I: contractile properties. *Med Sci Sports Exerc*, v.35 (n.5), p.753-761, 2003.
- SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, v.199 (n.2), p.223-231, 1991.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.77 (n.2), p.493-501, 1994.
- SCHRAUWEN, P.; VAN AGGEL-LEIJSEN, D. P.; HUL, G.; WAGENMAKERS, A. J.; VIDAL, H.; SARIS, W. H.; VAN BAAK, M. A. The effect of a 3-month low-intensity endurance training program on fat oxidation and acetyl-CoA carboxylase-2 expression. *Diabetes*, v.51 (n.7), p.2220-2226, 2002.
- SCHWANE, J. A.; ARMSTRONG, R. B. Effect of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *J Appl Physiol*, v.55 (n.3), p.969-975, 1983.
- SEN, C. K.; MARIN, E.; KRETZSCHMAR, M.; HANNINEN, O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol*, v.73 (n.4), p.1265-1272, 1992.
- SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*, v.79 (n.3), p.675-686, 1995.
- SERVAIS, S.; COUTURIER, K.; KOUBI, H.; ROUANET, J. L.; DESPLANCHES, D.; SORNAY-MAYET, M. H.; SEMPORE, B.; LAVOIE, J. M.; FAVIER, R. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, v.35 (n.1), p.24-32, 2003.
- SERVAIS, S. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. 2004. Doctorat. Laboratoire de Physiologie. Université Claude-Bernard -Lyon 1. Lyon. 2004.
- SHIDOJI, Y.; HAYASHI, K.; KOMURA, S.; OHISHI, N.; YAGI, K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, v.264 (n.2), p.343-347, 1999.
- SJODIN, B.; HELLSTEN WESTING, Y.; APPLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*, v.10 (n.4), p.236-254, 1990.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; ALVES, A. A.; SILVEIRA, L. R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.*, v.279 (n.5), p.R1539-R1545, 2000.

SRERE, P. Citrate Synthase. *Methods in Enzymology*, v.13, p.3-5, 1969.

STILLWELL, W.; JENSKI, L. J.; CRUMP, F. T.; EHRINGER, W. Effect of docosahexaenoic acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids*, v.32 (n.5), p.497-506, 1997.

ST-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J. A.; ROEBUCK, S. J.; BRAND, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, v.277 (n.47), p.44784-44790, 2002.

SUPINSKI, G. Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol Cell Biochem*, v.179 (n.1-2), p.99-110, 1998.

SVENSSON, M. B.; EKBLUM, B.; COTGREAVE, I. A.; NORMAN, B.; SJOBERG, B.; EKBLUM, O.; SJODIN, B.; SJODIN, A. Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol Scand*, v.176 (n.1), p.43-56, 2002.

TAKEKURA, H.; FUJINAMI, N.; NISHIZAWA, T.; OGASAWARA, H.; KASUGA, N. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol*, v.533 (n.Pt 2), p.571-583, 2001.

TALMADGE, R. J.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol*, v.5 (n.6), p.695-705, 1993.

TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc*, v.32 (n.8), p.1870-1874, 1973.

_____. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol.*, v.52, p.506-513, 1978.

TESSIER, F.; MARGARITIS, I.; RICHARD, M. J.; MOYNOT, C.; MARCONNET, P. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc*, v.27 (n.3), p.390-396, 1995.

THOMASON, D. B.; BALDWIN, K. M.; HERRICK, R. E. Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.60 (n.6), p.1923-1931, 1986.

THOMPSON, H. S.; SCORDILIS, S. P.; CLARKSON, P. M.; LOHRER, W. A. A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, v.171 (n.2), p.187-193, 2001.

THOMPSON, H. S.; MAYNARD, E. B.; MORALES, E. R.; SCORDILIS, S. P. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, v.178 (n.1), p.61-72, 2003.

- THOMPSON, J. A.; HESS, M. L. The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog Cardiovasc Dis*, v.28 (n.6), p.449-462, 1986.
- TOFT, A. D.; THORN, M.; OSTROWSKI, K.; ASP, S.; MOLLER, K.; IVERSEN, S.; HERMANN, C.; SONDERGAARD, S. R.; PEDERSEN, B. K. N-3 polyunsaturated fatty acids do not affect cytokine response to strenuous exercise. *J Appl Physiol*, v.89 (n.6), p.2401-2406, 2000.
- TONKONOGLI, M.; WALSH, B.; TIIVEL, T.; SAKS, V.; SAHLIN, K. Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflugers Arch*, v.437 (n.4), p.562-568, 1999.
- TONKONOGLI, M.; KROOK, A.; WALSH, B.; SAHLIN, K. Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-sterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect? *Biochem J*, v.351, p.805-810, 2000.
- TOTLAND, G. K.; MADSEN, L.; KLEMENTSEN, B.; VAAGENES, H.; KRYVI, H.; FROYLAND, L.; HEXEBERG, S.; BERGE, R. K. Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. *Biol Cell*, v.92 (n.5), p.317-329, 2000.
- TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TSUNODA, N.; MARUYAMA, K.; TAKAHASHI, M.; KIM, H.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.247, 1998.
- TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, v.191 (n.2), p.421-427, 1980.
- TURRENS, J. F.; BECONI, M.; BARILLA, J.; CHAVEZ, U. B.; MCCORD, J. M. Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic Res Commun*, v.12-13 Pt 2, p.681-689, 1991.
- VENDITTI, P.; MASULLO, P.; DI MEO, S. Effect of training on H₂O₂ release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.372 (n.2), p.315-320, 1999.
- VENKATRAMAN, J. T.; ANGKEOW, P.; SATSANGI, N.; FERNANDES, G. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. *J Am Coll Nutr*, v.17 (n.6), p.586-594, 1998.
- VENKATRAMAN, J. T.; LEDDY, J.; PENDERGAST, D. Dietary fats and immune status in athletes: clinical implications. *Med Sci Sports Exerc*, v.32 (n.7 Suppl), p.S389-395, 2000.
- VINA, J.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; LLORET, A.; MARQUEZ, R.; MINANA, J. B.; PALLARDO, F. V.; SASTRE, J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, v.50 (n.4-5), p.271-277, 2000.

- VIRU, M. Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles. *J Sports Med Phys Fitness*, v.34 (n.3), p.217-227, 1994.
- VOTYAKOVA, T. V.; REYNOLDS, I. J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem*, v.79 (n.2), p.266-277, 2001.
- WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, v.283 (n.5407), p.1482-1488, 1999.
- WALSH, B.; TONKONOGLI, M.; MALM, C.; EKBLUM, B.; SAHLIN, K. Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans. *Med Sci Sports Exerc*, v.33 (n.3), p.436-441, 2001.
- WANG, X.; ZHAO, X.; MAO, Z. Y.; WANG, X. M.; LIU, Z. L. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures. *Neuroreport*, v.14 (n.18), p.2457-2461, 2003.
- WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, v.72 (n.4), p.1063-1081, 1992.
- WILLMORE, J.; COSTILL, D. *Physiology of Sport and Exercise.*, 2 ed., Champaign. IL: Human Kinetics Publishers., 1999.
- YAMAOKA, S.; URADE, R.; KITO, M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr*, v.118 (n.3), p.290-296, 1988.
- ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, v.33 (n.3), p.337-349, 2002.
- ZERBETTO, E.; VERGANI, L.; DABBENI-SALA, F. Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.18 (n.11), p.2059-2064, 1997.
- ZHANG, M.; MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, v.277 (n.46), p.43553-43556, 2002.
- ZOELLER, R. A.; LAKE, A. C.; NAGAN, N.; GAPOSCHKIN, D. P.; LEGNER, M. A.; LIEBERTHAL, W. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem. J.*, v.338 (Pt 3), p.769-776, 1999.
- ZOPPI, C. C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F. O.; GOULART, L. F.; MOTTA, N.; MACEDO, D. V. Alterações Em Biomarcadores De Estresse Oxidativo, Defesa Antioxidante E Lesão Muscular Em Jogadores De Futebol Durante Uma Temporada Competitiva. *Revista Paulista de Educação Física*, v.17 (n.2), p.119-130, 2003.

PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE A TESE

Molnar A.M., Alves A.A., Pereira-da-Silva L., Macedo D.V. and Dabbeni-Sala F. **Evaluation by blue native polyacrylamide electrophoresis colorimetric staining of the effects of physical exercise on the activities of mitochondrial complexes in rat muscle.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* Jul;37(7):939-47, 2004.

Servais S., Boussouar A., Molnar A., Douki T., Pequignot J.M. and Favier R. **Age-related sensitivity to Lung oxidative stress during mild ozone exposure.** *Free Radical Research (in press)*.

Molnar A.M., Servais, S.; Guichardant, M.; Lagarde, M.; Macedo, D.V.; Pereira-da-Silva, L.; Favier, R. **Mitochondrial oxidative stress induced by eccentric exercise in rat skeletal muscle (submetido Antioxidant Redox Signalling)**.