

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA – ESEF

Anderson Rech

**Avaliação do processo de recuperação muscular, através da
ultrassonografia e de marcadores de estresse oxidativo, após dano
induzido por uma sessão aguda de exercício concorrente em ratos
machos Wistar**

Porto Alegre, Novembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA – ESEF

Anderson Rech

Avaliação do processo de recuperação muscular, através da ultrassonografia e de marcadores bioquímicos, após dano induzido por uma sessão aguda de exercício concorrente em ratos machos Wistar

Monografia apresentada à Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito para a conclusão do curso de Licenciatura em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Ronei Silveira pinto

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Matté

Porto Alegre, Novembro de 2011

Anderson Rech

Avaliação do processo de recuperação muscular, através da ultrassonografia e de marcadores bioquímicos, após dano induzido por uma sessão aguda de exercício concorrente em ratos machos Wistar

Conceito Final:

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____-UFRGS

Orientador – Prof.Dr. Ronei Silveira Pinto - UFRGS

Agradecimentos

Gostaria de agradecer...

Resumo

O treinamento concorrente combina, simultaneamente, estímulos que promovem adaptações aeróbicas e neuromusculares, sendo uma opção para a área esportiva de alto desempenho, bem como para a obtenção de uma melhor qualidade de vida. Considerando que não há trabalhos na literatura que tenham estudado o período de recuperação muscular após uma sessão de treino concorrente, o objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros de estresse oxidativo e dano muscular no período de recuperação, após uma sessão de exercício agudo de treinamento de força (12 rep. 2' intervalo), em esteira (30' 70% VO₂max) e concorrente (6 rep. 2' int. e 15' 70% VO₂max). Ratos Wistar machos adultos foram divididos nos grupos controle (n=6), força (n=6), esteira (n=6) e concorrente (n=6). O músculo gastrocnêmio e o sangue foram coletados 6, 24 e 48h após a sessão de exercício. Foram avaliadas as atividades das enzimas superóxido-dismutase, catalase e glutational-peroxidase, a produção de espécies reativas e o conteúdo de grupos tióis livres em tecido muscular, além das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A atividade da lactato-desidrogenase sérica e a *echo intensity* muscular por imagem de ultrassom foram determinadas como um índice de dano muscular. Nossos resultados mostraram uma manutenção nos níveis da superóxido-dismutase na maioria dos tempos analisados, com exceção do grupo força 24 h, o qual teve uma diminuição. Também houve um aumento da atividade da catalase no grupo força 6h, e uma diminuição na atividade da glutational-peroxidase em 24 h para os grupos esteira e força. A produção de espécies reativas aumentou no grupo força 6 e 24 h. O conteúdo de grupos tióis apresentou-se aumentado em 24h no grupo concorrente e em 48h no grupo

esteira em relação ao grupo força. Os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico se mostraram diminuídos no grupo força em todos os momentos comparados com o grupo esteira e controle. A lactato desidrogenase mostrou aumento da atividade em 24 h para o grupo concorrente e em 48 h para o grupo esteira em soro de ratos. Foi verificado um aumento na *echo intensity* nos grupos esteira e concorrente em 6, 24 e 48 h, enquanto que no grupo força só houve aumento no tempo de 24 h. Os ratos que realizaram exercício de força apresentaram índices de estresse oxidativo muscular, evidenciado pelo aumento de espécies reativas e das atividades das enzimas antioxidantes, entretanto foi identificado aumento da lactato desidrogenase sérica apenas após 48 h. O treinamento concorrente e a esteira mostraram efeitos similares no período recuperativo, evidenciados pelo aumento da lactato desidrogenase sérica e da *echo intensity*. O aumento dos grupos tióis livres musculares no grupo esteira 48 h ainda está sob investigação pelo nosso grupo. Podemos observar com nossos resultados, que a pouca especificidade da técnica de quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico pode ter influenciado nos resultados apresentados de dano a lipídeos. Os resultados sugerem que, para todos os grupos analisados, dentro de um programa de exercício feito cronicamente, o intervalo de uma sessão para a seguinte deve ser superior a 48 h para que haja uma recuperação adequada da musculatura esquelética.

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Revisão de literatura.....	11
2.1 Treinamento concorrente.....	11
2.2 Dano muscular.....	14
2.3 Dano muscular e o processo inflamatório.....	16
2.4 Estresse oxidativo, dano muscular e processo adaptativo.....	19
3. Objetivo.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Materiais e métodos.....	23
4.1 Problemas da pesquisa.....	23
5. Delineamento da pesquisa.....	23
5.1 Procedimento experimental.....	24
5.2 Tamanho amostral.....	24
5.3 Divisão dos grupos.....	24
5.4 Protocolo de exercício aeróbico.....	25
5.5 Protocolo de exercício de força.....	25
5.6 Protocolo de treinamento concorrente.....	26
5.7 Tratamento animal após a sessão aguda de exercício físico.....	26
6. Técnicas laboratoriais.....	27
6.1 Determinação da Atividade da Lactato Desidrogenase.....	27
6.2 Ultrassom.....	27
6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	28
6.4 Determinação da atividade da superóxido-dismutase.....	29
6.5 Determinação de atividade da catalase.....	29
6.6 Determinação da atividade da glutationala-peroxidase.....	29
6.7 Oxidação da diclorofluoresceína.....	29
6.8 Determinação do conteúdo de grupos tióis.....	30
7. Considerações éticas.....	30
8. Local de execução.....	31
9. Análise estatística.....	31
10. Resultados.....	31
10.1 Atividade da enzima superóxido-dismutase.....	31

10.2	Atividade da enzima catalase.....	32
10.3	Atividade da enzima glutathione-peroxidase.....	33
10.4	Medida da Produção de Espécies Reativas.....	33
10.5	Conteúdos de tióis livres.....	34
10.6	Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	35
10.7	Lactato-desidrogenase sérica.....	35
10.8	Echo intensity.....	36
11.	Discussão.....	37
12.	Conclusões.....	48
13.	Perspectivas de estudos.....	49
14.	Bibliografia.....	50

1. Introdução

O treinamento concorrente vem sendo amplamente estudado e utilizado por se tratar de uma forma de treino que combina, simultaneamente, estímulos que promovem adaptações aeróbicas e neuromusculares. A sua utilização é uma opção para a área esportiva de alto desempenho (MILLET et al., 2002) e também para a busca por uma melhor qualidade de vida (DAVIS et al., 2009).

Diversos benefícios são observados com o treinamento concorrente. Entre eles: ganhos de força máxima e potência (IZQUIERDO-GABARREN, 2010), melhora no consumo máximo de oxigênio (VO_2max), diminuição do percentual de gordura e massa gorda total (SILLANPÄÄ et al., 2009), bem como melhora na composição corporal total e flexibilidade (DAVIS et al., 2009).

Mesmo com os olhares da ciência voltados para esse tipo de treinamento, o conhecimento do comportamento do dano muscular envolvido em uma única sessão ainda é limitado. Para nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura que tenham avaliado o dano muscular, bem como a recuperação desse dano, em uma única sessão de treino concorrente, tanto em humanos quanto em ratos.

O dano muscular, extensamente revisado por PROSKE e MORGAN (2001), está relacionado, principalmente, à fase excêntrica do movimento (fase em que o músculo é forçadamente alongado), que é responsável pela ruptura de sarcômeros nas miofibrilas e dano ao sistema de acoplamento excitação-contracção. Além disso, também ocorrem danos às linhas Z, desorganização de miofilamentos e alterações nos túbulos T musculares. A dor muscular, intrínseca ao dano muscular, pode prejudicar as sessões seguintes por uma

diminuição da capacidade de trabalho em alta intensidade. Sendo assim, estratégias de atenuação da dor e conhecimentos sobre o comportamento do dano muscular são de grande valor científico e prático (HOWATSON e SOMEREN, 2008).

O estresse oxidativo está ligado ao dano muscular, pois há um aumento da formação de radicais livres durante o exercício e também durante o processo recuperativo. Células inflamatórias infiltradas no tecido muscular durante a recuperação muscular tem a capacidade de produzir radicais livres (MILIAS et al. 2005). No entanto, poucos estudos, como o de BAILEY et al. (2010), avaliaram o dano muscular em resposta ao exercício e a sua correlação com o estresse oxidativo. No entanto, esse tipo de análise nunca foi feita em humanos ou em ratos submetidos ao treinamento concorrente.

Acreditando na importância da discussão realizada acima, e considerando a nossa impossibilidade de realizar experimentos com humanos, foi planejado um protocolo de treinamento concorrente para ratos Wistar adultos. A plataforma de treinamento de força foi baseada no trabalho de ILHA et al., (2008). O protocolo de esteira é baseado nos trabalhos de CECHETTI et al. (2007).

O estudo e a compreensão da magnitude do dano muscular e dos mecanismos do mesmo em uma sessão aguda de exercício físico são importantes para fins de se obter uma melhor periodização e um tempo de recuperação muscular. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi traçar uma curva de tempo de recuperação de fatores ligados ao dano muscular, relacionados com a homeostase metabólica, estresse oxidativo, e processo

inflamatório no músculo de ratos submetidos a uma sessão aguda de treinamento concorrente.

2. Revisão de literatura

2.1 Treinamento concorrente

O treinamento concorrente é caracterizado por incluir, em uma mesma sessão ou programa de treino, estímulos para o condicionamento aeróbico e de força (DAVIS et al., 2009). Ao longo das últimas décadas, e especialmente após o início do século XXI, o treinamento concorrente vem sendo amplamente estudado e avaliado por diferentes áreas da pesquisa em exercício. A prática de exercícios objetivando um ganho de força concomitante ao treinamento para amplificar a resposta aeróbica já foi estudada no domínio da saúde (DAVIS et al., 2009; GOLZARI et al., 2010; JORGE et al., 2011), da qualidade de vida (HENDRICKSON et al., 2010; JORGE et al., 2011) e, principalmente, do desempenho desportivo (AAGAARD e ANDERSEN, 2010; TAIPALE et al., 2010).

DAVIS et al. (2008), realizaram um estudo envolvendo adolescentes do sexo feminino com sobrepeso, em que buscou-se verificar a influência do treinamento concorrente sobre parâmetros metabólicos e de adiposidade. Nesse trabalho, 41 adolescentes foram submetidas a 16 semanas de restrição dietética, treinamento de força ou treinamento concorrente. Os resultados encontrados demonstraram que o treinamento concorrente foi mais efetivo na diminuição de todos os valores de adiposidade do que uma dieta nutricional rígida e treinamento de força juntamente com a restrição dietética. Além disso,

foram verificadas diminuições na glicose sanguínea de jejum a níveis abaixo dos demais grupos.

HENDRICKSON et al. (2010) buscaram verificar o efeito do treinamento concorrente no desempenho de mulheres ativas em de tarefas ocupacionais. Com esse objetivo, 56 mulheres jovens ativas foram divididas entre os grupos de treinamento aeróbio, treinamento de força, treinamento concorrente e grupo controle para um acompanhamento de oito semanas. Estavam entre as variáveis analisadas: teste de uma repetição máxima (1RM) para os exercícios supino e agachamento, consumo de oxigênio máximo (VO_2max), carregamento e levantamento de caixas e pesos. O resultado obtido foi que os grupos de treinamento aeróbico e treinamento de força obtiveram resultados específicos ao seu tipo de treinamento, enquanto que, o treinamento concorrente resultou em um equilíbrio para os ganhos dos diferentes testes, obtendo melhoras em todas as performances analisadas.

Em um estudo voltado para o alto desempenho, MILLET et al. (2002) buscaram avaliar os benefícios trazidos pelo TC na economia de movimento e na curva de VO_2max . Para isso, 15 triatletas foram divididos em dois grupos: TA e TC. O treinamento contou com 14 semanas de duração e ao final desse período foram avaliados o VO_2max , o desempenho no teste de 3000 metros, a potência muscular e a força máxima de membros inferiores. Apesar de o TC não ter demonstrado efeito sobre a curva de VO_2 , o mesmo gerou melhoras na força máxima e na economia de movimentos dos triatletas, melhorando seu desempenho no teste de 3000 metros.

Um trabalho de CRISTEA et al. (2008), também realizado com atletas, procurou avaliar o efeito do TC em corredores de velocidade de meia idade. O TC foi realizado ao longo de 20 semanas e contou com altas intensidades de treinamento de força e exercícios de potência. Os resultados foram totalmente favoráveis, havendo uma melhora na força máxima, na força explosiva e no desempenho geral dos esportistas. Foi concluído que essas melhoras foram obtidas especialmente por adaptações hipertróficas musculares, que não foram diminuídas pelo treino aeróbico.

Sendo assim, são claras as respostas positivas encontradas na literatura quanto ao treinamento concorrente: melhora na potência e na força máxima (HENDRICKSON et al., 2010), hipertrofia, economia de movimento, desempenho aeróbio (MILLET et al., 2002), diminuição da adiposidade e melhora de parâmetros metabólicos como a glicose sanguínea (DAVIS et al., 2009). No entanto, um fenômeno ainda é muito discutido na literatura e seu papel ainda não está bem estabelecido, tendo recebido o nome de fenômeno da interferência. No ano de 1980, foi publicado o primeiro trabalho que visou avaliar a influência do treinamento concorrente sobre ganhos de força (BAAR, 2006). Neste artigo, foram encontrados dados que indicavam que os ganhos de força trazidos pelo treinamento específico eram prejudicados pela adição de treinamento de resistência aeróbia (ou seja, um modelo de treinamento concorrente). Desde então, diversos trabalhos na literatura nas áreas de biologia molecular, neuromuscular, entre outras, tentam validar e explicar o fenômeno da interferência (DOCHERTY e SPORER, 2000; DUDLEY e DJAMIL, 1985; HAWLEY, 2009).

Mesmo com essa ampla gama de estudos encontrados na literatura, algumas questões ainda não estão claras no que diz respeito ao tempo de recuperação após uma sessão de treinamento, visto que esse tempo, de insuficiente, pode prejudicar as adaptações ao exercício.

2.2 Dano muscular

O dano muscular induzido pelo exercício físico ocorre principalmente pelo trabalho excêntrico (fase do movimento em que o músculo é forçado a alongar enquanto produz tensão) a que esse músculo é submetido e ao qual não está adaptado (HUGHES et al., 2010). Esse processo de dano está associado à diminuição na capacidade de produção de força (ALLEN, 2001) e potência (CHEUNG et al., 2003), diminuição do ângulo de movimento de determinada articulação (CHEN et al., 2009), modificação dos padrões eletromiográficos e de recrutamento das fibras musculares (CHEUNG et al., 2003).

Embora o dano ao músculo esquelético induzido pelo exercício possa ser entendido como um processo prejudicial, sabe-se que o mesmo é importante no processo de adaptação, principalmente no período inicial de treino. Mesmo as contrações excêntricas, em comparação com as concêntricas e isométricas, sendo as maiores responsáveis pelo dano muscular (GIBALA et al., 1995), percebe-se um maior índice de ganhos, tanto hipertróficos como de força, quando exercícios excêntricos máximos são realizados em comparação com concêntricos da mesma natureza (NOSAKA et al., 2003).

Após exercícios excêntricos podemos perceber sinais claros de danos estruturais no músculo esquelético quando o mesmo é utilizado para análise

histológica. Em uma revisão de PROSKE e MORGAN (2001) são citadas as principais formas de dano estrutural: desconexão de um sarcômero com outro, rompimento de linhas Z, desorganização de miofilamentos e dano aos túbulos T.

O DM, como estudado por CHEN et al., (2011), parece estar correlacionado com o grau de uso diário dos músculos submetidos ao processo danoso por exercício. A musculatura mais requisitada em atividades funcionais corriqueiras terá uma menor suscetibilidade ao processo de dano muscular.

Os principais fatores responsáveis pelo dano muscular são o estresse mecânico gerado pelas contrações, distúrbios na homeostase intracelular de cálcio e a resposta inflamatória desencadeada pelos processos anteriores (CLARKSON e SAYERS, 1999). Fatores mecânicos, como a tensão exercida sobre as unidades motoras e o alongamento de sarcômeros, iniciam o dano muscular, enquanto as mudanças na homeostase do cálcio (dano ao sarcômero gera aumento de cálcio intracelular o que ativa algumas vias responsáveis pela degradação protéica) e uma resposta exagerada do processo inflamatório (aumento da migração de células imunológicas ao sítio de lesão) causam o efeito danoso no período pós-exercício (CLARKSON e SAYERS, 1999). Já na recuperação do exercício, outros fatores inflamatórios e a síntese de proteínas ligadas ao estresse parecem exercer um papel importante no reparo ao dano (CLARKSON e SAYERS, 1999).

O dano muscular também está associado ao extravasamento de material intramuscular. O parâmetro mais comumente usado para a verificação do dano muscular é a medida da atividade da creatina-cinase, uma enzima muscular

que é extravasada no sangue. (BYRNE et al., 2001; CHEN, et al., 2009; FOLLAND et al., 2000). Outras proteínas do músculo esquelético que passam pelo mesmo processo são a lactato-desidrogenase (LDH) e a mioglobina (Mb) (FERRI et al., 2006).

A avaliação de dano muscular por imagens de ultrassom também pode ser realizada (NOSAKA e CLARKSON, 1996). Esse tipo de análise leva em consideração o aumento na *echo-intensity*, calculada a partir de diferentes tons de cinza na imagem, em uma região de interesse, obtidas por ultrassonografia. Sendo assim, em imagens em que é encontrado um maior dano muscular também é encontrado um aumento na *echo-intensity*. Ainda é desconhecido o motivo pelo qual há um aumento da *echo-intensity* com o dano muscular, no entanto seu uso para tal medida já está disseminado como método de pesquisa (NOSAKA e SAKAMOTO, 2001; NOSAKA, NEWTON e SACCO, 2002; CHEN et al., 2010; FUJIKAKE et al., 2009).

Embora haja muitos trabalhos na literatura mostrando o comportamento do dano muscular, não é do nosso conhecimento a existência de um estudo que tenha verificado o mesmo induzido pelo treinamento concorrente.

2.3 Dano muscular e o processo inflamatório

Após o dano muscular provocado pelo estresse mecânico e pela ruptura de proteínas em consequência do desequilíbrio na homeostase do cálcio, é desencadeado um processo inflamatório, que pode ser exacerbado e causar um dano ainda maior àquela musculatura (CLARKSON e SAYERS, 1999). Após uma sessão de treinamento, em que há a presença do componente excêntrico, ocorre o dano muscular e conseqüentemente um aumento da

migração de células imunológicas para o sítio da lesão. O aumento mais significativo é o da migração de macrófagos, que chegam a triplicar o seu número no tecido lesionado (STUPKA et al., 2001).

Embora essa reação inflamatória e a migração de células imunológicas para o tecido lesado sejam importantes na remoção das células lesadas e na remodelação do tecido muscular, é indispensável compreender que isso pode gerar um efeito deletério, especialmente quando a resposta é exacerbada (CHEN, et al., 2009).

KOÇTÜRK et al. (2008) mostraram a presença de um efeito agudo pró-inflamatório do exercício físico, especialmente do exercício extenuante. Citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) são encontradas no tecido muscular esquelético imediatamente após o exercício, atingindo seu pico em 3 h, se mantém com níveis acima do basal até 12 h, voltando aos seus valores pré exercício após esse período (KOÇTÜRK et al., 2008). Esse aumento também está ligado a apoptose (morte celular programada) de células lesadas no tecido muscular durante o exercício, já que serão os leucócitos teciduais que removerão as mesmas.

PAULSEN et al. (2008) buscaram avaliar o efeito de um protocolo de dano muscular sobre o acúmulo de leucócitos no músculo lesado. Foi observado uma ação inflamatória celular local em resposta ao dano muscular. Além disso, pela primeira vez foi encontrada uma correlação positiva entre o acúmulo de leucócitos e mudanças na função muscular em até três dias após a indução do

dano. O acúmulo de macrófagos é gradual, tendo seu pico em 96 h pós-exercício.

Em um trabalho visando avaliar relação entre a migração de células inflamatórias para o músculo lesado e o aumento da eco-intensidade das imagens de ultrassom, FUJIKAKE et al. (2009) induziram o dano muscular com uma injeção de cloridrato de bupivacaína (BPVC) em ratos adultos. Os resultados analisados mostram que não há relação entre o aumento do sinal de ultrassom e a infiltração de células inflamatórias no sítio da lesão. No entanto, a formação de edema, após o dano muscular, pode ter relação com o mesmo. O pico da eco-intensidade das imagens de ultrassom foi atingido 24 h após a injeção de BPVC, enquanto a infiltração de células inflamatórias atingiu seu pico em até 48 h. É válido ressaltar que a indução de dano muscular de forma química jamais resultara em uma mimetização perfeita do ambiente muscular após o exercício por si só. Assim, a avaliação desse processo em um modelo experimental fiel a indução fisiológica do dano muscular seria certamente importante.

Portanto, não se sabe ao certo o motivo pelo qual o dano muscular leva a um aumento na eco-intensidade, mas essa ferramenta passou a ser usada para tal medida de forma significativa no meio científico (FUJIKAKE et al. 2009).

Não foram encontrados trabalhos na literatura que explicassem o comportamento do processo inflamatório após uma sessão de treinamento concorrente. A grande maioria dos trabalhos que falam em citocinas e interleucinas é de ordem apenas aeróbica (SHOJAEI et al., 2011; OSTROWSKI

et al. 1998; BRUUNSGAARD et al. 1997) ou do treino de força (OCHI et al., 2011; IZQUIERDO-GABARREN, 2010; SERRANO et al., 2007).

2.4 Estresse oxidativo, dano muscular e processo adaptativo

Radicais livres (RL) são moléculas ou átomos altamente reativos que apresentam um elétron desemparelhado na última camada de valência. Espécies reativas compreendem tanto RL quanto outras moléculas que não possuem elétrons desemparelhados, entretanto podem dar origem à RL (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Os RL são produzidos em diversas situações do nosso metabolismo, e são altamente reativos, podendo proporcionar dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA), proteínas e lipídeos de membranas plasmáticas (ALADAG et al. 2009; HALLIWELL, 2006).

Como revisado extensamente por DRÖGE (2002), durante o processo de produção de trifosfato de adenosita (ATP) pela fosforilação oxidativa, ocorrido na membrana mitocondrial interna, o oxigênio tem a função de receber elétrons da cadeia respiratória para formar água. No entanto, durante esse processo, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que pode chegar até 5% do O_2 consumido. Entre eles, o primeiro a ser formado é o Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O radical $O_2^{\cdot-}$ é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa que pode ser convertida ao RL hidroxil (OH^{\cdot}), o mais reativo das ERO, via reação de Fenton.

O estresse oxidativo também está ligado ao dano muscular secundário causado pelas células fagocíticas, os neutrófilos e macrófagos, que em resposta a mediadores inflamatórios se infiltram no tecido lesado pelo exercício

(AOI et al., 2004; MILIAS et al., 2005;). Dessa forma, após a geração de dano muscular, os níveis de estresse oxidativo muscular são correlacionados com o pico de migração de células inflamatórias, entre 48 e 72 h pós exercício (KOÇTURK et al., 2008; FUJIKAKE et al., 2009).

As células possuem métodos para se defender e conter os malefícios gerados pelas ERO. Entre elas destacamos as defesas antioxidantes enzimáticas da superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GPx), e as defesas não-enzimáticas das vitaminas A, C, E, flavonóides, ácido úrico, glutathiona (GSH), entre outros. Um organismo encontra-se em uma situação de estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes, sendo que os últimos são encontrados de forma mais elevada (LIU et al. 2008)

A enzima SOD converte imediatamente o $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 , que é detoxificado a água tanto pela CAT quanto pela GPx. Outra enzima importante para a manutenção do estado redox é a glutathiona-redutase (GR) que regenera a GSH que foi oxidada pela atividade da GPx durante a eliminação do H_2O_2 (JOHANSEN et al., 2005). Abaixo estão ilustradas cada uma das reações enzimáticas.

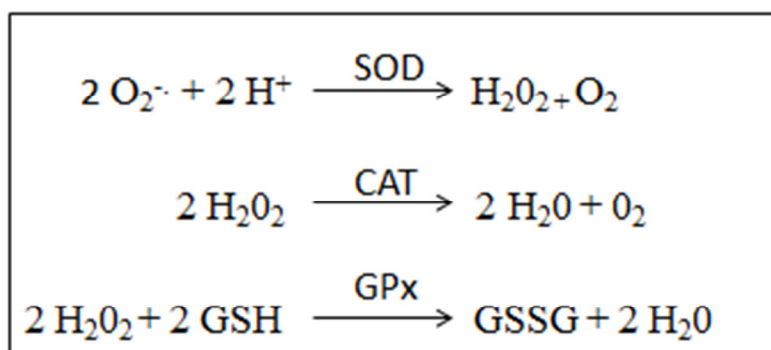


Figura 1. Reações enzimáticas catalisadas pela superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GPx). $O_2^{\cdot-}$ Radical superóxido; H^+ hidrogênio; H_2O_2 peróxido de hidrogênio; O_2 oxigênio; H_2O água; GSH glutathiona reduzida; GSSG glutathiona oxidada.

O estresse oxidativo e o dano muscular estão profundamente inter-relacionados, já que o dano muscular secundário, produzido pelas células fagocíticas infiltradas no tecido muscular, é gerado a partir da produção de espécies reativas (NIKOLAIDIS et al., 2007). Há portanto, uma relação intrínseca entre o estresse oxidativo e a migração fagocitária e, segundo UCHIYAMA et al. (2006), o estresse oxidativo é um possível mecanismo de indução de dano muscular além do estresse mecânico. Há indícios de que ele seja específico segundo as características individuais de cada músculo (KOÇTÜRK et al., 2008).

Se pautarmos juntamente os trabalhos de NIKOLAIDIS et al. (2006) e FUJIKAKE et al. (2009) podemos perceber uma relação entre o pico de migração de células fagocíticas (entre 48 e 72 h) e os valores elevados de estresse oxidativo (atingindo o pico em 72 h), o que demonstra a intrínseca relação temporal entre ambos.

Em um trabalho com treinamento de força para ratos adultos, UCHIYAMA et al. (2006) buscaram avaliar o efeito de uma sessão de treinamento de força com uma intensidade equivalente a 70-75% da força máxima sobre parâmetros de estresse oxidativo. As atividades das enzimas SOD, CAT e GPx foram avaliadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48, 72, 96 e 168 h após o exercício. Os resultados mostram que há um pico nas primeiras horas após o exercício (entre 3 a 6 h) o que se repete em intensidade semelhante após 48-72 h pós-exercício. Segundo o autor, o estresse oxidativo é um possível mecanismo de indução de DM além do estresse mecânico.

O que pode ser observado na literatura é um vasto conhecimento sobre o comportamento do dano muscular e sua relação com o estresse oxidativo (NIKOLAIDIS et al., 2007; SILVA et al., 2011; UCHIYAMA et al., 2006). No entanto, nenhum trabalho que relaciona o dano muscular e o estresse oxidativo em uma sessão de treinamento concorrente foi encontrado na literatura.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito de uma sessão de exercício concorrente sobre variáveis de estresse oxidativo e dano muscular em ratos Wistar machos adultos e compará-los com os resultados obtidos com o exercício de força e aeróbico, realizados separadamente.

3.2 Objetivos específicos:

- 1- Avaliar os efeitos de uma sessão de exercício concorrente, bem como dos exercícios aeróbicos e de força feitos separadamente, em ratos Wistar machos adultos sobre marcadores de dano muscular e traçar uma curva de recuperação dessas variáveis em diferentes tempos: 6, 24 e 48 h pós-exercício.
- 2- Verificar a eco-intensidade do ultrassom no músculo esquelético (gastrocnêmios) em diferentes momentos da fase de recuperação, assim como relacionar a intensidade do sinal com os dados de estresse oxidativo obtidos.
- 3- Verificar o efeito de uma sessão de exercício concorrente sobre marcadores de estresse oxidativo, atividades da SOD, CAT, GPx, ,

oxidação do DCF, conteúdo de grupos tióis e lipoperoxidação no músculo esquelético, bem como avaliar a curva de recuperação desses marcadores.

4. Materiais e métodos

4.1 Problemas da pesquisa

Como podemos verificar pela análise de literatura, o exercício concorrente ainda é pouco estudado em modelos animais. Dessa forma, buscamos com esse trabalho responder a seguinte questão: qual será o tempo necessário para uma recuperação completa do músculo esquelético em termos de marcadores de dano muscular e de estresse oxidativo e qual é a inter-relação dessas variáveis?

Hipóteses:

H1: Há dano muscular significativamente maior no grupo de exercício concorrente em relação aos animais que treinaram esteira e força apenas.

H2: O dano muscular, avaliado pela *echo-intensity* do ultrassom e pela atividade sérica da LDH, não acompanha a curva dos marcadores de estresse oxidativo.

H3: Em 48 h após a sessão de exercício, será possível observar a normalização nos valores de dano muscular dos grupos força, esteira e exercício concorrente quando comparado ao grupo controle.

5. Delineamento da pesquisa

5.1 Procedimento experimental

Foram utilizados para esse trabalho 52 ratos Wistar machos adultos (entre 60 e 90 dias de vida) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos sob um ciclo de claro/escuro 12h/12h e temperatura ambiente a 23°C, recebendo *ad libitum*, dieta comercial padrão para ratos de laboratório, e a água fornecida aos animais foi trocada com frequência impedindo o desenvolvimento de microorganismos. Os animais ficaram em caixas (no máximo 4 por caixa) de propileno (41x34x16 cm), as mesmas foram armazenadas em uma sala destinada ao tratamento e manipulação de animais, no biotério do Departamento de Bioquímica.

5.2 Tamanho amostral

De acordo com a proposição de Callegari-Jacques (2003) e considerando $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$ foram utilizados seis animais em todos os parâmetros bioquímicos avaliados e quatro animais para as medidas de ultrassom. Esses números estão de acordo com a literatura científica, como pode ser observado nos artigos publicados com protocolos idênticos ou semelhantes ao que foi utilizado e que encontraram diferenças significativas para as variáveis analisadas (KARAGOUNIS et al., 2010; LEAL JUNIOR et al., 2010; MARKERT et al., 2005; SILVA et al., 2010).

5.3 Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos para os experimentos: Controle, Exercício Aeróbio, Exercício de Força e Exercício Concorrente.

Utilizamos 18 animais por tratamento, tendo um n=6 por grupo. Esse modelo foi repetido 3 vezes para que tivéssemos amostras para os diferentes tempos de sacrifício dos animais. Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia em três diferentes tempos após a sessão de exercício (6, 24, 48 h). O grupo controle foi composto por animais que não exerceram nenhum dos protocolos de exercício, mas foi exposto a uma troca de caixas no mesmo momento que os animais do grupo exercício para que sofresse o estresse da manipulação e da mudança de ambiente.

5.4 Protocolo de exercício aeróbico

O grupo que realizou exercício aeróbico passou por um processo de 3 dias de adaptação em uma esteira motorizada adaptada para animais, na qual a velocidade e o tempo de duração foram aumentados gradualmente. No quarto dia foi realizada a sessão aguda de exercício de 20 min. a 60% do $VO_2\text{max}$ (CECHETTI et al., 2007) tendo como base a média de VO_2 de animais de experimentos anteriores. Os animais que se recusaram a correr foram gentilmente incentivados, com um bastão de vidro ou suaves toques em suas costas, para que o fizessem.

5.5 Protocolo de exercício de força

O grupo que foi submetido ao exercício de força realizou um protocolo semelhante, porém adaptado, ao descrito por ILHA (2008). Os animais foram estimulados a subir uma rampa de madeira forrada com borracha com 1 m. de comprimento. A inclinação da rampa era de 30° e no topo existia um ambiente escuro onde o animal poderia repousar por um intervalo de cerca de 2 min. No primeiro dia de adaptação os animais reconheciam a rampa sem nenhum tipo

de peso atrelado a suas costas. No segundo dia (24 h após o primeiro dia), a sobrecarga foi colocada no dorso do animal e foi fixada em um cabo que foi atrelado a uma abraçadeira presa ao peito do animal. O mesmo é composto por uma abraçadeira que liga um cabo de aço, mas não foram colocados pesos. No terceiro dia (24 h após o segundo dia) de adaptação foi colocada no animal uma sobrecarga equivalente a 15% da massa corporal do mesmo. Os pesos eram colocados sobre uma esteira que era presa ao cabo de aço. Já na sessão aguda de exercício foi posto junto ao cabo de aço uma sobrecarga equivalente a 85-95% do peso corporal e o animal terá que realizar 10-12 subidas.

5.6 Protocolo de treinamento concorrente

O grupo que realizou o treinamento concorrente fez 15 min. de esteira a 60% do VO_2 máx e cinco subidas com a sobrecarga equivalente a 85-95% da massa corporal. O fato de não somarmos simplesmente o protocolo aeróbio ao de força, como realizado por ILHA et al., (2008), foi feito com o intuito de evitar resultados específicos por um volume maior de treinamento.

5.7 Tratamento animal após a sessão aguda de exercício físico

Após a sessão de treinamento pertinente, os animais tiveram imagens de ultrassom dos músculos sóleo e gastrocnêmio obtidas no aparelho de ultrassonografia, para análise futura. Posteriormente, estes animais foram decaptados e tiveram seu sangue coletado em tubos falcons para posterior centrifugação e verificação da LDH sérica. Imediatamente, após a coleta de sangue, o músculo gastrocnêmios foi dissecado e pesado para análise das atividades de SOD, CAT e GPx, DCF, TBARS e SH.

Os ratos Wistar foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Não foi utilizada anestesia prévia dos animais, pois os anestésicos comumente utilizados podem promover alterações nas amostras e podem interferir bioquimicamente nas técnicas utilizadas para a avaliação de estresse oxidativo (ISTAPHANOUS e LOEPKE, 2009; TODOROVIC et al., 2003). As amostras de músculo foram rapidamente retiradas e dissecadas em placa de Petri sobre gelo.

De acordo com o guia de severidade de procedimentos, os animais foram submetidos a procedimentos de grau leve, caracterizados desse modo por ser provável que os animais experienciem dor, sofrimento ou desconforto leves que durem pouco tempo. São procedimentos que não acarretaram prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais (PROPESQ-Comissões-CEUA).

6. Técnicas laboratoriais

6.1 Determinação da Atividade da Lactato Desidrogenase

A quantificação do extravasamento de LDH foi realizada por meio da utilização de Kit comercial (Labtest ref. 37) e a leitura dos produtos da reação foi feita em um leitor de placas a 500 nm.

6.2 Ultrassom

Para a obtenção das imagens foi utilizado um aparelho de ultrassonografia (Philips, VMI, Indústria e Comércio Ltda. Lagoa Santa, MG, Brasil). Um transdutor com frequência de amostragem de 7,5MHz foi posicionado de

forma perpendicular sobre o músculo avaliado (gastrocnêmio). Para a aquisição da imagem foi utilizado um gel à base de água, que promove um contato acústico sem a necessidade de causar pressão com o transdutor sobre o músculo. Após a identificação do tecido adiposo subcutâneo e o tecido ósseo na imagem do ultrassom, essa foi salva para análises subsequentes. Em cada imagem foi determinada uma região de interesse de 1 cm², e nessa região foi determinada a echo-intensity baseada no histograma da escala de cinza (0: preto; 256: branco). A echo-intensity foi quantificada utilizando o programa *image-j* (version 1.37, National Institute of Health, USA)

De acordo com o guia de severidade de procedimentos, o exame de ultrassom é um procedimento de grau leve, caracterizados desse modo por ser provável que os animais experienciem dor, sofrimento ou desconforto leves que durem pouco tempo. São procedimentos que não acarretarão em prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais (PROPESQ-Comissões-CEUA).

6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Com o objetivo de verificar a lipoperoxidação, detectamos a formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através de uma reação dos produtos de peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido a 100°C. As amostras foram misturadas com 0,6 mL de TCA 10% e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e foram aquecidas a 100°C em uma incubadora para placas por 40 min. Os níveis de TBARS foram verificados em cada amostra pela absorbância a 532 nm. As amostras foram comparadas com uma curva padrão (usando 1,1,3,3-tetramethoxypropano) e os resultados foram

calculados como nmol de TBA/mg de proteína e estão expressados em % do controle (DRAPER e HADLEY, 1992).

6.4 Determinação da atividade da superóxido-dismutase

A atividade da SOD foi verificada pela quantificação da inibição da autooxidação superóxido dependente da adrenalina pela captação da absorbância das amostras em 480 nm (MISRA e FRIDOVICH,1972). A atividade da SOD está expressa como U/mg de proteína.

6.5 Determinação de atividade da catalase

A atividade da enzima CAT é medida espectofotometricamente pela degradação do peróxido de hidrogênio medida a 240 nm a 25°C. Para calcular a atividade utiliza-se o número de micromoles de H₂O₂ consumidos por minuto por mg de proteína (AEBI, 1984).

6.6 Determinação da atividade da glutathiona-peroxidase

A atividade da GPx foi determinada pelo método de WENDEL (1981) espectofotometricamente pelo sistema GSH/NADPH/GR , pela decomposição do H₂O₂ a 340 nm. A atividade enzimática foi medida indiretamente pela média do decaimento do NADPH. Os resultados estão expressos em U/mg de proteína.

6.7 Oxidação da diclorofluoresceína

A produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) foi determinada por meio do método de oxidação do DCFH (Lebel *et al.*, 1992). Sessenta µL de amostra biológica foi incubada à 37°C, no escuro, por 30 min,

com 240 µL de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) em placa de 96 poços. H₂DCF-DA é clivada por esterases celulares e o H₂DCF formado é oxidado pelas espécies reativas presentes na amostra, produzindo o composto fluorescente DCF, que é determinado fluorimetricamente utilizando os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 525 nm. Uma curva padrão foi realizada em paralelo com as amostras, utilizando DCF como padrão (0,25 – 10 mM). Os resultados estão expressos como nmol DCF/mg proteína e posteriormente relativizados em percentual do grupo controle.

6.8 Determinação do conteúdo de grupos tióis

O conteúdo de tióis reduzidos foi determinado espectrofotometricamente (Aksenov & Markesbery, 2001) por meio da reação dos grupos tióis livres da amostra com 5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) no escuro, durante 30 min, formando TNB, que absorve à 412 nm. Os resultados estão expressos como nmol TNB/mg de proteína.

7. Considerações éticas

Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008, as diretrizes da Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do “Canadian Council on Animal Care (CCAC). Além disso, o mesmo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais

(CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (nº do projeto 21206) no dia 26/09/2011.

8. Local de execução

A parte experimental deste trabalho de conclusão de curso foi realizada nos laboratórios do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cujos laboratórios possuem a infra-estrutura para o trabalho com animais de experimentação, além dos equipamentos, vidrarias e reagentes necessários para a sua execução. A elaboração do trabalho teórico e escrita foi realizada na própria Escola de Educação Física (ESEF) da UFRGS.

9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Graphpad Prism 5.0 para Windows. Para o teste de normalidade utilizou-se o teste de Shapiro-wilk. Após os dados apresentarem distribuição normal foi utilizado o teste ANOVA de duas vias, com a utilização do pós-teste de Bonferroni para a análise entre os diferentes tempos de recuperação.

10. Resultados

10.1 Atividade da enzima superóxido-dismutase

A Figura 2 apresenta a atividade da SOD no músculo gastrocnêmio nos diferentes períodos de recuperação (n=6).

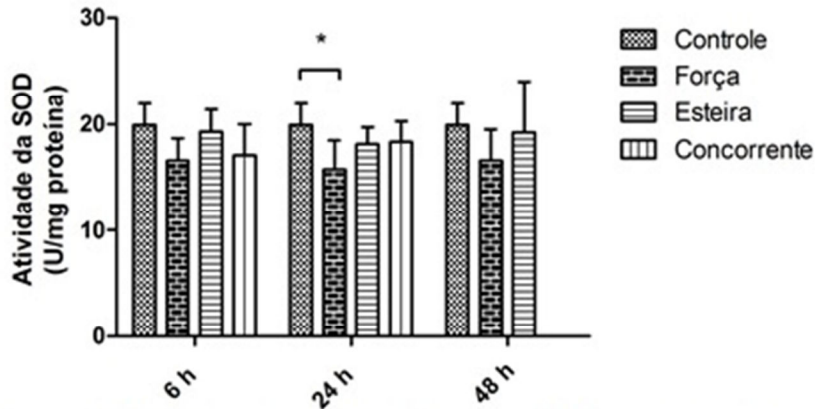


Figura 2. Atividade da superóxido-dismutase (SOD) no músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para n=6 (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e força 24h ($p<0,05$).

A atividade da SOD apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) no grupo força 24 h quando compara ao grupo controle. Os demais grupos não obtiveram valores com diferença estatística nem para o grupo controle nem para diferentes modalidades de exercício.

10.2 Atividade da enzima catalase

A Figura 3 demonstra os valores obtidos para a atividade da CAT no músculo gastronômico nos diferentes períodos de recuperação (n=6).

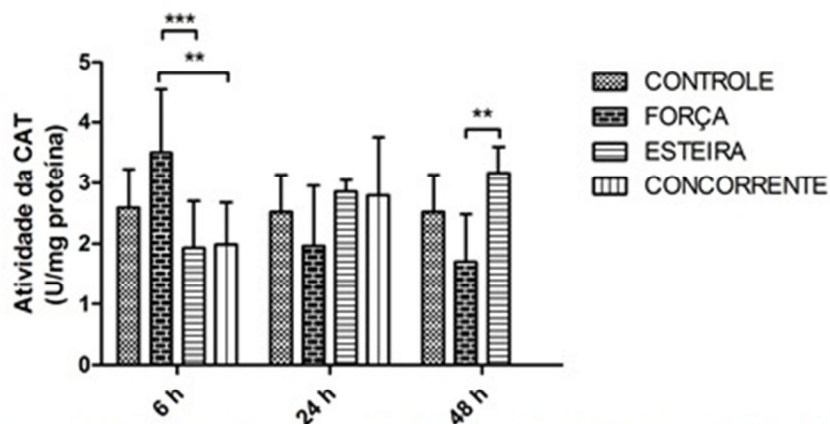


Figura 3. Atividade da catalase (CAT) no músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para n=6 (animais) por grupo. Diferença significativa: força e esteira 6h ($p<0,001$) e 48h ($p<0,01$) e entre os grupos força e concorrente 6h ($p<0,01$).

A CAT apresentou um aumento na sua atividade no grupo força em 6h quando comparada com os grupos esteira ($p<0,001$) e concorrente ($p<0,01$). Sua atividade, no entanto, se mostrou diminuída no grupo força em 48 h quando comparada ao grupo esteira ($p<0,01$).

10.3 Atividade da enzima glutaciona-peroxidase

Na Figura 4 estão contidos os valores da atividade da GPx no músculo gastrocnêmio nos diferentes tempos do período de recuperação ($n=6$). Os grupos força ($p<0,01$) e esteira ($p<0,05$) apresentaram uma diminuição da atividade da GPx em 24 h quando comparados ao grupo controle. A atividade da GPx se mostrou aumentada em 48h após o exercício aeróbico quando comparado ao grupo força ($p<0,01$).

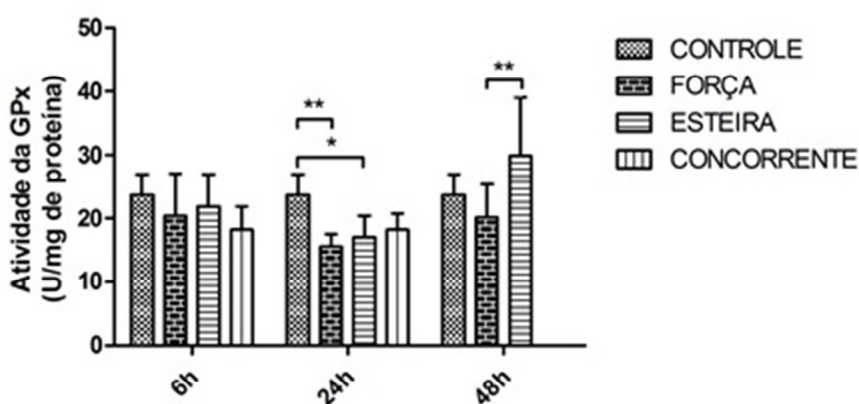


Figura 4. Atividade da glutaciona-peroxidase (GPx) em músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para $n=6$ (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e força 24h ($p<0,01$), controle e esteira 24h ($p<0,05$); força e esteira 48h ($p<0,01$).

10.4 Medida da produção de espécies reativas

A Figura 5 apresenta os resultados para a produção de espécies reativas medida pela oxidação do DCF no músculo gastrocnêmio ($n=6$).

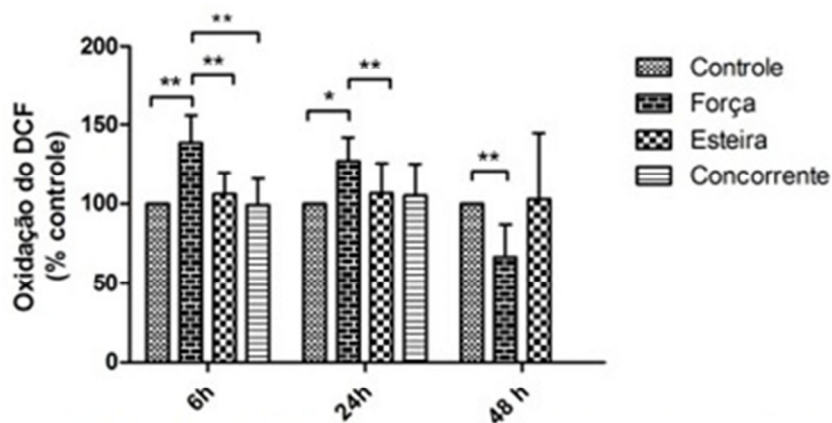


Figura 5. Oxidação do DCFH (% do controle) em músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para n=6 (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e força 6h ($p<0,01$), 24h ($p<0,05$) e 48h ($p<0,01$), força e esteira 6 e 24h ($p<0,01$); e concorrente 6h ($p<0,01$).

A oxidação do DCF se mostrou aumentado em 6h ($p<0,01$) e 24h ($p<0,05$), e diminuído em 48h ($p<0,01$) no grupo força quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, em comparação com o grupo esteira, o DCF do grupo força se mostrou aumentado em 6h e diminuído em 48h ($p<0,01$).

10.5 Conteúdos de tióis livres

A Figura 6 apresenta os valores para o conteúdo de grupos tióis livres (SH) no tecido muscular nos diferentes períodos de recuperação (n=6).

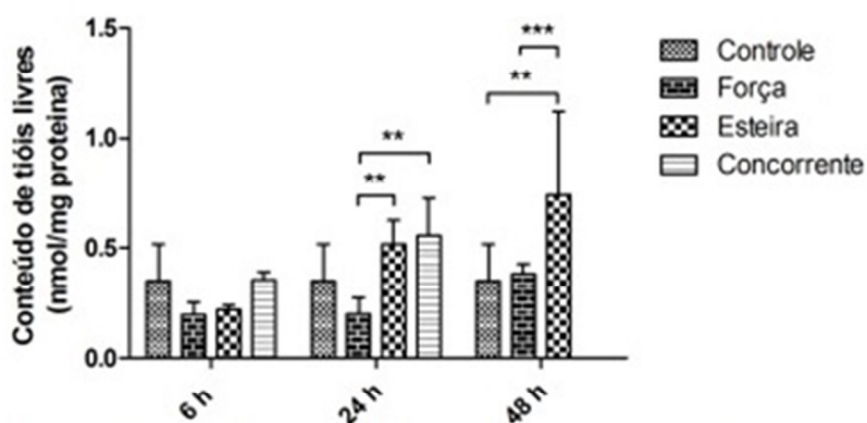


Figura 6. Grupos Tióis Totais (SH) no músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para n=6 (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e esteira 48h ($p<0,001$), força e esteira 24h ($p<0,01$) e 48h ($p<0,001$); e entre os grupos força e concorrente 24h ($p<0,001$).

O conteúdo de SH livre aumentou no grupo esteira em 48 h ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle.

10.6 Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Na Figura 7 estão apresentados os resultados do TBARS obtidos do músculo gastrocnêmio nos diferentes tempos de recuperação ($n=6$). O grupo força apresentou uma diminuição do TBARS em todos os tempos de recuperação em relação ao controle ($p < 0,001$), ao grupo esteira ($p < 0,001$) e ao concorrente em 24h ($p < 0,001$). Já o grupo concorrente apresentou diminuição significativa em 6h em relação ao grupo controle e esteira ($p < 0,001$). Porém, demonstrou um aumento significativo em 24h quando comparado aos grupos controle e força ($p < 0,001$).

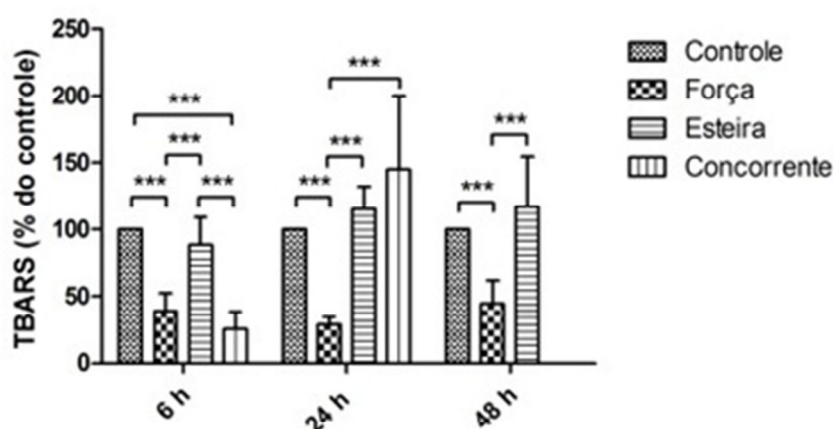


Figura 7. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS % do controle) no músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para $n=6$ (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e força 6, 24 e 48h ($p < 0,001$), força e esteira 6, 24 e 48h ($p < 0,001$); força e concorrente 24h ($p < 0,001$) e esteira e concorrente 6h ($p < 0,001$).

10.7 Atividade da lactato-desidrogenase sérica

Na Figura 8 são apresentados os dados da LDH sérica nos diferentes períodos de recuperação ($n=5$). O grupo força demonstrou um aumento na

LDH sérica que atingiu significância em 48h em relação ao controle ($p < 0,05$). Já o grupo esteira, demonstrou aumento significativo em 48h quando comparado ao controle ($p < 0,01$) e 6h quando comparado ao grupo concorrente ($p < 0,05$). O grupo concorrente demonstrou valores aumentados de LDH em 24 h quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) e força ($p < 0,01$).

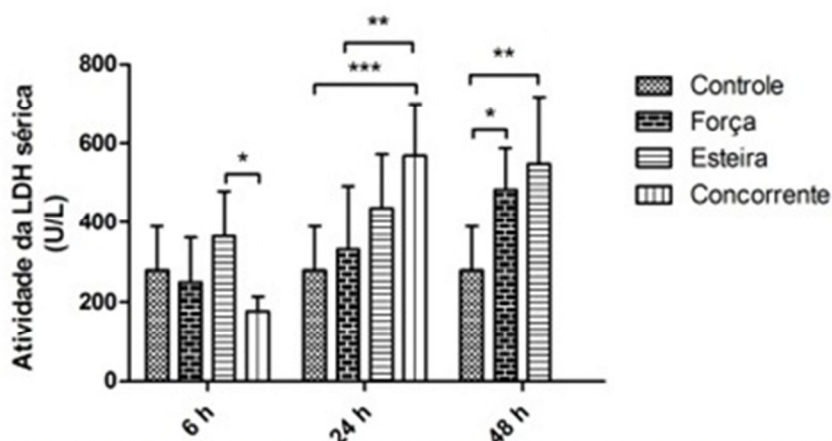


Figura 8. Atividade da Lactato-desidrogenase no plasma de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para $n=6$ (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e força 48h ($p < 0,05$), controle e esteira 48h ($p < 0,01$); controle e concorrente 24h ($p < 0,001$); força e concorrente 24h ($p < 0,01$) e esteira e concorrente 6h ($p < 0,05$).

10.8 Medida da echo intensity muscular

Na Figura 9 são mostrados os dados da variação percentual da *echo intensity* antes e após o exercício nos diferentes tempos de recuperação ($n=4$). Foi observado incremento significativamente estatístico nos grupos esteira ($p < 0,001$) e concorrente 6h ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle. Esteira e concorrente 6h também sofreram um aumento quando comparados ao grupo força 6h ($p < 0,001$). Os grupos força 24h ($p < 0,05$), esteira 24h ($p < 0,05$) e concorrente 24h ($p < 0,001$) tiveram um aumento quando comparados ao grupo controle. Nenhum dos grupos diferiu significativamente em 48h.

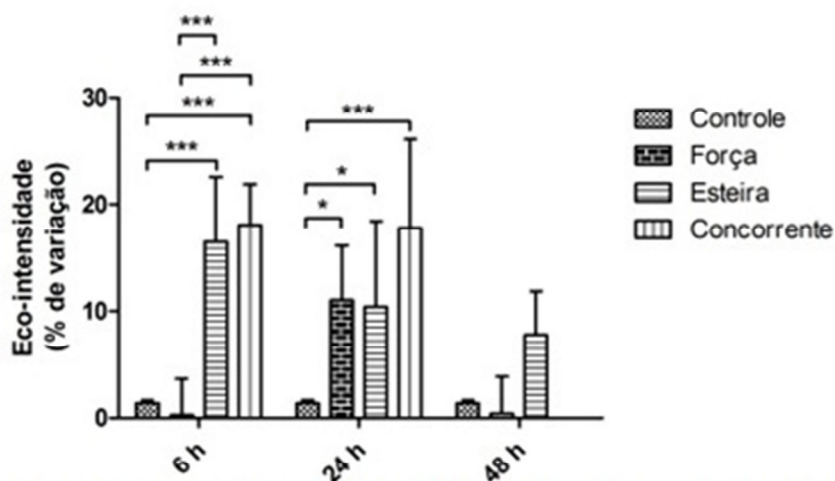


Figura 9. Eco-intensidade no músculo de ratos submetidos ao treinamento de força, esteira ou concorrente. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. para $n=6$ (animais) por grupo. Diferença significativa: controle e força 24h ($p<0,05$), controle e esteira 6h ($p<0,001$) e 24h ($p<0,05$); controle e concorrente 6 e 24h ($p<0,001$); força e esteira 6h ($p<0,001$); força e concorrente 6h ($p<0,001$).

11. Discussão

O objetivo do presente estudo foi, observar qual seria o tempo necessário para uma recuperação completa do músculo esquelético em termos de marcadores de dano muscular e estresse oxidativo, decorrentes de uma sessão de exercício concorrente e qual seria a inter-relação dessas variáveis.

Encontramos nesse estudo uma resposta distinta para os índices de estresse oxidativo entre as diferentes modalidades de exercício propostas como modelo animal. O exercício de força parece ser capaz de exercer um aumento dos níveis de estresse oxidativo como demonstrado pelos valores aumentados de DCFH e diminuídos de SH. No entanto não foram encontradas grandes variações na resposta da enzimas antioxidantes. Já os exercícios de esteira e concorrente se mostraram semelhantes para as respostas antioxidantes enzimáticas, assim como para os valores de DCF e SH. Os

resultados da LDH sérica mostraram um aumento significativo para os grupos força e esteira em 48 h e para o grupo concorrente em 24 h. Isso pode significar a possibilidade de, em tempos superiores a 48 h, ainda encontrarmos dano muscular nesses animais. A *echo-intensity* se mostrou aumentada em todos os grupos em 24 h, no entanto, no grupo esteira e no grupo concorrente já havia um aumento em 6 h. Isso indica que o estímulo do treinamento aeróbico foi capaz de gerar maior dano muscular, identificado por esse parâmetro, do que o treino de força por si só. Por outro lado, os dados de estresse oxidativo indicam um maior prejuízo induzido pelo exercício de força no gastrocnêmio.

Poucos trabalhos com treinamento concorrente e estresse oxidativo foram encontrados na literatura. SCHAUN et al. (2011) estudaram o efeito crônico dessa modalidade de exercício, porém o efeito sobre o dano muscular e/ou efeito agudo do mesmo não foi objetivado. Da mesma maneira, RADOVANOVIC et al. (2009) verificaram o efeito de 12 semanas de treinamento concorrente sobre parâmetros de estresse oxidativo em judocas, no entanto, nenhuma avaliação aguda foi feita. Dessa forma, esse é o primeiro trabalho que busca relatar os efeitos de uma sessão aguda de treinamento concorrente sobre os níveis de estresse oxidativo muscular.

Como mostrado na Figura 10 adaptada do artigo de REID (2007), o estresse oxidativo gerado dentro do músculo pode ser responsável por diversos efeitos deletérios que prejudicarão sua ativação de uma forma ótima. Um aumento da formação de espécies reativas pode ser responsável pelo dano aos túbulos T, às bombas de Cálcio, mitocondrial, prejuízo no *input*

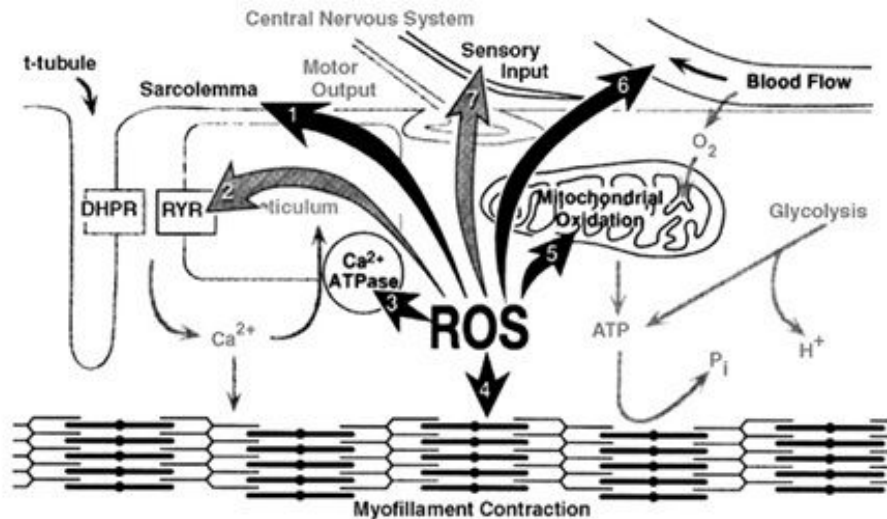


Figura 10. Possíveis locais de atuação das ERO no músculo. 1, função do sarcolema; 2, liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático; 3, captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático; 4, contração dos miofilamentos; 5, metabolismo mitocondrial; 6, controle microvascular; 7, resposta ao sistema nervoso central. ROS: espécies reativas de oxigênio; DHPR: receptores de dihidropiridina; RYR: receptores de rianodina.

sensorial e outros fatores neuromusculares, e ainda um dano direto as proteínas contráteis.

O exercício intenso promove um aumento na produção de espécies reativas no ambiente da fibra muscular. Nesse tipo de exercício, não só a produção das EROs encontra-se aumentada, mas também das ERN, as quais podem ter uma participação importante no processo de dano (BEJMA 2000). No nosso estudo encontramos um aumento da produção de espécies reativas, medida pela técnica de oxidação do DCFH, no grupo força em 6 e 24 h após o término do exercício. Não há na literatura outro trabalho que tenha tratado da dosagem do DCFH após um exercício de força. No entanto, BEJMA (2000) encontrou um aumento do DCFH após uma sessão de exercício em esteira até a exaustão. No nosso trabalho, os grupos esteira e concorrente não tiveram diferença significativa em relação ao controle em nenhum dos momentos avaliados. Isso pode indicar que o exercício de força foi um desafio maior aos

sistemas antioxidantes daqueles animais, pois foi capaz de incrementar a geração de ERO e ERN.

Acompanhando o mesmo princípio de que há a possibilidade de um aumento da geração de espécies reativas durante o processo recuperativo devido ao exercício físico anteriormente executado, buscamos determinar o conteúdo de grupos tióis no músculo após o exercício. Essa técnica é capaz de verificar a quantidade de grupamentos sulfidrilas (SH) na forma reduzida (AKSENOVA & MARKESBERY, 2001). A oxidação dos grupos SH pode modificar o estado condicional de um determinado aminoácido, possibilitando até mesmo um prejuízo no funcionamento da proteína. Para exemplificar esse processo, o trabalho de SCHERER E DEAMER (1986) mostrou que o estresse oxidativo gerado no músculo é capaz de causar dano a sulfidrilas e comprometer a função da Ca^+ -ATPase, ligada ao transporte de cálcio no retículo sarcoplasmático.

Outros trabalhos na literatura já demonstraram que há um comportamento relativamente padronizado dessa técnica quando utilizado para comparar grupos de exercício com um grupo não exercitado. A grande maioria dos trabalhos mostra uma diminuição nos grupamentos SH reduzidos (ASCENSÃO et al. 2008; SILVA et al. 2011). No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que mostrassem o comportamento dos grupamentos SH no músculo após uma sessão de treino de força ou concorrente.

Nossos resultados mostraram que não houve variação significativa nas primeiras 24 h de recuperação pós-exercício para nenhum dos grupos

analisados em relação ao controle. O grupo esteira 48 h demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo controle e ao grupo força. Esse aumento inesperado ainda está sendo estudado pelo nosso laboratório.

No trabalho de LAITANO et al. (2011) os autores buscaram comprovar que o músculo esquelético seria capaz de liberar Glutathiona Reduzida (GSH) após um exercício em desidratação. A GSH também pode ser detectada pela técnica de sulfidrilas, mas não de forma específica. Dessa maneira, podemos sugerir que devido a exportação do GSH tivemos um incremento da sua síntese por parte do músculo. Porém, outras técnicas laboratoriais são necessárias para podermos nos apropriar dessa afirmação.

Tem sido demonstrado que a produção de espécies reativas pela contração muscular é capaz de gerar um estado de estresse oxidativo no músculo. Como resposta adaptativa a um estímulo crônico, os sistemas de defesa antioxidante tendem a se tornar mais responsivos a essas demandas, se tornando capaz de responder de forma adequada a um estímulo agudo (JI 2008). Diversos trabalhos com exercício físico em modelos animais estão publicados na literatura e medem a atividade enzimática da SOD, CAT e GPx como um parâmetro do incremento de demanda das mesmas, causada pelo aumento nos RL (SIMPLICIO et al. 1997; KAYATEKIN et al. 2002; UCHIYAMA et al. 2006; ROCHA et al. 2010).

Em um trabalho em que ratos machos Wistar passaram por um a sessão de treinamento de levantamento de pesos, foi feito uma curva de recuperação para medidas das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e dano muscular (CK) em 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48, 72, 96 e 168 horas pós-exercício

(UCHIYAMA et al. 2006). O comportamento encontrado nas enzimas antioxidantes foi de um aumento nas primeiras horas após exercício, seguido por uma diminuição a níveis basais (8h -24h) e um novo aumento após as 24 h (UCHIYAMA et al. 2006). Já para exercício aeróbicos em camundongos, um estudo que avaliou a repercussão de sprints nos níveis das enzimas relatou um comportamento parecido com o observado por UCHIYAMA et al (2006) (KAYATEKIN et al. 2002). No trabalho de KAYATEKIN et al. (2002), os animais tiveram um aumento da atividade da SOD e da GPx logo após o exercício, seguido de um retorno a valores basais em até 24 h. Não foram medidos valores acima de 24 h.

Entretanto, nossos resultados mostraram uma resposta diferente dos trabalhos citados acima. O único resultado significativo de variação da SOD foi uma diminuição no grupo força 24 h em relação ao controle. Em nenhum outro momento a SOD apresentou alteração significativa, tanto para o grupo esteira como para o grupo concorrente.

Em relação a atividade da CAT, observamos um comportamento relativamente diferente da SOD. A CAT aumentou no grupo força 6 h após o exercício quando comparada aos grupos esteira e concorrente. No entanto, em 48 h a CAT foi significativamente menor no grupo força comparado ao grupo esteira. Em outro estudo que trabalhou com dano muscular induzido por exercício, a CAT teve um aumento já em 24 h pós-exercício e se manteve elevada até 4 dias pós-exercício (NIKOLAIDIS et al. 2007) .

A atividade da GPx se mostrou diminuída no grupo força em 24 h, demonstrando o mesmo padrão da SOD. Sua atividade também esteve

diminuída no grupo esteira em 24 h, porém demonstrou um aumento significativo em 48 h quando comparado ao grupo força. O grupo concorrente manteve seus níveis de GPx indiferentes ao controle ou a força durante todos os momentos do exercício.

No estudo de UCHIYAMA et al. (2006), a CAT foi a enzima que teve seus níveis aumentados mais tardiamente em relação as demais. Foi encontrada diferença significativa apenas após 72 h do exercício. Já a GPx teve seu aumento desde as primeiras 24 h e continuou aumentando, atingindo seu pico em 72 h. Achados similares foram obtidos no estudo de PASCHALIS et al. (2007). Esses trabalhos nos mostram que seria importante a medida dos valores também em 72 h pós-exercício para o traçado de uma curva mais completa para ambas as enzimas. NIKOLAIDIS et al. (2008) citam que o estresse oxidativo derivado do dano muscular pode começar a aparecer depois de vários dias de exercício, já que sua principal fonte são as células fagocíticas infiltradas no tecido muscular na fase recuperativa.

Sendo assim, modalidades de exercício em esteira e concorrente, em apenas uma sessão, podem não ter sido de intensidade suficiente para gerar um aumento considerado na geração de EROs, já que não houve grandes variações na atividade das enzimas antioxidantes. No entanto, não podemos descartar a hipótese de que essas adaptações poderiam. Já o exercício de força, como demonstrado pelo aumento no DCFH, foi capaz de incrementar a produção de espécies reativas. A diminuição nas atividades das enzimas SOD e GPx podem ser fruto de dano causado as enzimas pelos próprios RL. Na revisão de HALLIWELL (2006), o autor cita que há a possibilidade do aumento nos níveis de RL causarem uma diminuição na atividade da SOD. SALO et al.,

(1990) propõem que, em uma situação de estresse, quando a SOD estiver trabalhando em uma intensidade alta em um primeiro momento, pode haver inativação e modificação estrutural causada pelo seu produto, o H_2O_2 , levando a uma diminuição da sua atividade. Essa modificação estrutural pode levar a degradação da proteína por proteases, o que acarretaria em uma diminuição na defesa antioxidante.

A medida do TBARS é capaz de demonstrar de forma indireta um índice de lipoperoxidação. Nessa técnica, a amostra é processada de tal maneira que haja uma reação dos produtos finais de lipoperoxidação, tais como o malondialdeído (MDA), com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido a $100^\circ C$ (ROCHA et al. 2010). Existem diversos trabalhos publicados na literatura estimando o efeito do exercício na lipoperoxidação medida por TBARS. Porém, grande parte desses estudos averiguou o TBARS plasmático, tanto em ratos quanto em humanos (LIU et al. 2005; SILVEIRA et al. 2007; NIKOLAIDIS et al. 2007; PASCHALIS et al. 2007; ASCENÇÃO et al. 2008; ROCHA et al. 2010; FEAIRHELLER et al. 2011;). Em um trabalho de VESKOUKIS et al. (2009) foi apurado se a medida de parâmetros de estresse oxidativo no plasma refletia o que estava se passando em diferentes tecidos, entre eles o músculo esquelético, após a realização de uma sessão aguda de natação até a exaustão para ratos machos wistar. Esse estudo não encontrou correlação entre as medidas de TBARS plasmáticas e teciduais (músculo esquelético) após o exercício, embora tenha encontrado para outros parâmetros.

Trabalhos de ARSLAN et al. (2001) e KOÇTURK et al. (2008) compararam diferentes músculos (sóleo e gastrocnêmio) expostos a uma sessão de exercício em esteira ou voluntário. Os autores perceberam que o

efeito do mesmo sobre parâmetros de estresse oxidativo, incluindo o TBARS, é específico para cada músculo. Isso se deve a diferenças na composição dos tipos de fibras entre os diferentes músculos. Músculos com uma maior característica oxidativa tendem a ter maior produção de radicais livres do que músculos que utilizam de forma mais preponderante o metabolismo anaeróbio.

A grande maioria dos trabalhos que relaciona TBARS, exercício e músculo esquelético, trazem resultados semelhantes uns aos outros. SILVA et al. (2011) encontraram um aumento nos níveis de TBARS do músculo gastrocnêmio de ratos machos submetidos a uma sessão exercício excêntrico. KAYATEKIN et al. (2002) encontraram um aumento nos níveis de TBARS nas primeiras 3 h após o exercício de sprints em camundongos. Porém, esses valores voltaram ao normal em 24 h. KOÇTURK et al. (2008), em um protocolo de exercício extenuante em esteira, encontraram um aumento nos níveis de TBARS no músculo gastrocnêmio logo após o exercício (3h) e esse aumento manteve-se por até 24 h, voltando aos valores basais em 48h. ARSLAN et al. (2001) encontraram níveis aumentados de TBARS no músculo gastrocnêmio em 24 h após o exercício espontâneo para ratos.

Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que tratasse da medida dos níveis de lipoperoxidação no músculo após uma sessão de treinamento concorrente ou após um protocolo de exercício de força semelhante ao realizado nesse trabalho. Em nosso trabalho, encontramos uma manutenção dos níveis de TBARS no grupo esteira durante todos os momentos de análise, não diferindo do grupo controle. Esses dados não condizem com os achados na literatura, embora os trabalhos analisados acima tenham utilizados protocolos de maior exposição à modalidade de exercício em

questão do que o nosso protocolo de exercício. A resposta mais curiosa encontrada no nosso trabalho foi uma diminuição dos níveis de TBARS no grupo força em todos os tempos pós exercício quando comparado ao grupo controle e ao grupo esteira. O grupo concorrente também apresentou a mesma diminuição em 6h, retornando a valores basais em 24h. Sabe-se que o método de TBARS é bastante inespecífico porque o TBA pode reagir com outros compostos que não sejam o MDA (GROUSSARD et al. 2003). Dessa forma, outras avaliações bioquímicas devem ser realizadas para confirmar esses dados.

Ainda que o estresse oxidativo possa ser correlacionado com o dano muscular, outras aferições são mais comumente usadas, tendo-se em vista a sua praticidade, aplicabilidade e menor invasão tecidual. Entre elas, utilizamos a medida da *echo intensity* e da atividade da LDH sérica.

A medida plasmática da atividade de enzimas específicas tem sido utilizada em diversos trabalhos na literatura científica. Especialmente nos quais o objetivo era verificar o impacto do exercício sobre o músculo, ou seja, o dano muscular (MILIAS et al. 2005; FERRI et al. 2006; YAMIN et al. 2008; BARRIOS et al. 2011). Basicamente são medidas as enzimas que supostamente, pelo dano muscular gerado pelo exercício, foram extravasados do músculo esquelético. Esse extravasamento, como revisado por BRANCACCIO et al. (2010), pode ser um indexador de necrose ou dano tecidual gerado pelo exercício.

Outra técnica que pode ser utilizada para a medida do dano muscular induzido pelo exercício é a avaliação da variação em escala de cinza da *echo*

intensity após determinado protocolo. Nessa perspectiva, muitos trabalhos têm surgido na literatura com a utilização dessa técnica em humanos (NOSAKA et al. 2002; CHEN et al. 2009; CHEN et al. 2010; CHEN et al. 2011; RADAELLI et al. 2011). No entanto, só fomos capazes de encontrar um artigo que tratasse da utilização da *echo intensity* para os mesmos objetivos em ratos, em que FUJIKAKE et al. (2009) utilizaram uma indução de dano muscular por produtos químicos (bupivacaína) para traçar um gráfico de recuperação da musculatura desses animais.

Em um protocolo com humanos, buscando causar um dano muscular de elevada magnitude (6 séries de 6 repetições excêntricas máximas), MILIAS et al. (2005) perceberam que a LDH plasmática aumentava em 24 h após o exercício e permanecia elevada até 96 h após. Com um protocolo semelhante, CHEN et al. (2009) também encontraram um aumento da LDH plasmática por até 120 h pós exercício. Nesse estudo, da mesma forma que a LDH foi verificada em uma curva ascendente até 120 h, a *echo intensity* também foi encontrada da mesma maneira. Ou seja, ambas variáveis demonstraram certa correlação entre si. Da mesma forma, NOSAKA & NEWTON (2002) encontraram um aumento da *echo intensity* após um protocolo excêntrico realizado com humanos adultos jovens. Os valores permaneceram elevados por até 120 h, assim como os valores de LDH.

Não encontramos nenhum trabalho na literatura que avaliasse o dano muscular seguido de uma sessão de treinamento concorrente, nem em humanos, tampouco em animais. Entendemos que o comportamento da recuperação muscular após esse modelo de treinamento é algo substancial para uma adequada prescrição. Os resultados que encontramos nos

surpreenderam em alguns aspectos. A LDH só obteve aumentos significativos a partir de 24 h pós exercício concorrente, e após 48 h do exercício de força e em esteira. No entanto, a *echo intensity* demonstrou aumentos 6 h após o exercício em esteira e concorrente e se manteve elevada no tempo de 48 h. Enquanto isso, o exercício de força teve um aumento apenas em 24 h e voltou aos valores basais em 48 h. Podemos perceber que os valores de LDH e *echo intensity* só apresentaram correspondência nos exercício esteira e concorrente, enquanto o exercício de força não manteve o padrão esperado para essa resposta.

Tanto os valores da LDH quanto da *echo intensity* se mostraram mais elevados no grupo concorrente em relação aos demais. Se não significativamente, com uma tendência considerável. No entanto, o tamanho amostral pode ter reduzido esse potencial de diferença entre os grupos. Da mesma forma, o fato de não termos avaliado o grupo concorrente em 48 h, faz com que a discussão se limite a uma especulação do comportamento do dano muscular nesse grupo.

12. Conclusões

Não encontramos trabalhos semelhantes ao nosso na literatura científica, de modo que esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito do treinamento de força, esteira e concorrente sobre o dano muscular e sua relação com o estresse oxidativo muscular de ratos machos Wistar.

Notamos que as três modalidades de exercício responderam com algumas particularidades interessantes. O treino de força pareceu estar

relacionado a um aumento das espécies reativas em relação aos demais grupos. A técnica de TBARS parece não ser um bom indicativo de lipoperoxidação para essa modalidade de exercício. Já o grupo concorrente e esteira não tiveram grandes diferenças entre ambos, no que diz respeito aos níveis de estresse oxidativo. As enzimas antioxidantes tiveram pouca variabilidade, portanto, dentro do período analisado, podemos perceber que não houve aumento nas suas atividades, como era esperado.

O protocolo de exercício concorrente pareceu ser capaz de induzir um dano muscular mais pronunciado do que os protocolos de força e esteira feitos separadamente no que diz respeito aos resultados de LDH e *echo-intensity*.

Sendo assim, podemos concluir que um programa de treinamento de qualquer das modalidades aqui apresentadas, com o intuito de verificar alterações de ordem crônica, o intervalo ótimo para a recuperação muscular entre as sessões é superior ao período de 48 h.

13. Perspectivas de estudos

Visto que alguns parâmetros analisados no presente estudo ficaram prejudicados pelo n amostral, o próximo passo será aumentar o tamanho da amostra de maneira a fortificar nossas afirmações e demonstrar valores mais consistentes.

Pretendemos analisar diferentes músculos, como o sóleo, para estudarmos a diferença na composição de fibras e sua relação com o dano muscular causado pelo exercício.

Posteriormente, pretendemos avaliar os efeitos crônicos do exercício concorrente sobre variáveis impraticáveis de trabalhar em humanos, como a síntese proteica muscular e os efeitos do fenômeno da interferência sobre as adaptações musculares.

14. Bibliografia

- 1- AAGAARD, P.; ANDERSEN, J. L. Effects of strength training on endurance capacity in top-level endurance athletes. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 20 Suppl 2, p. 39-47, 2010.
- 2- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105:121-126, 1984
- 3- AKSENOV, M.Y. & MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, **302**, 141-145, 2001.
- 4- ALADAG, I. EYIBILEN, A; GÜVEN, M. ATIŞ, O.; ERKOKMAZ, U. Role of oxidative stress in hearing impairment in patients with type two diabetes mellitus. **The Journal of laryngology and otology**, v. 123, n. 9, p. 957-63, 2009.
- 5- ALLEN, D. G. Eccentric muscle damage: mechanisms of early reduction of force. *Acta physiologica Scandinavica*, v. 171, n. 3, p. 311-9, 2001.
- 6- AOI, W. NAITO, Y. TAKANAMI, Y. et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free radical biology & medicine**, v. 37, n. 4, p. 480-7, 2004.
- 7- ARSLAN, Ş. ERDEM, S. KILINÇ, K. et al. Free radical changes in rat muscle tissue after exercise. **Rheumatology International**, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2001.

- 8- ASCENSÃO, A. REBELO, A. OLIVEIRA, E. et al. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 10-11, p. 841-51, 2008.
- 9- BAILEY, D. M. WILLIAMS, C. BETTS, J. A; THOMPSON, D.; HURST, T. L. Oxidative stress, inflammation and recovery of muscle function after damaging exercise: effect of 6-week mixed antioxidant supplementation. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 6, p. 925-36, 2011.
- 10- BAAR, K. Training for Endurance and Strength : Lessons from Molecular Biology Training for Endurance and Strength : Lessons from Cell Signaling. **Med Sci Sports Exercise**, v. 38 n. 11 p. 1939-1944, 2006.
- 11- BARRIOS, C. HADALA, M. ALMANSA, I. et al. Metabolic muscle damage and oxidative stress markers in an America's Cup yachting crew. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 7, p. 1341-50, 2011.
- 12- BEJMA, J. RAMIRES, P.; JI, L. L. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 169, n. 4, p. 343-51, 2000.
- 13- BRANCACCIO, P. LIPPI, G.; MAFFULLI, N. Biochemical markers of muscular damage. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 48, n. 6, p. 757-67, 2010.
- 14- BRUUNSGAARD, H. GALBO, H. HALKJAER-KRISTENSEN, J. et al. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **The Journal of physiology**, v. 499 (Pt 3, p. 833-41, 1997.
- 15- BYRNE, C. ESTON, R. G.; EDWARDS, R. H. Characteristics of isometric and dynamic strength loss following eccentric exercise-induced muscle damage. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 11, n. 3, p. 134-40, 2001.

- 16- CECHETTI, F. RHOD, A. SIMÃO, F. et al. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. **Brain research**, v. 1157, p. 121-5, 2007.
- 17- CHEN, T. C. CHEN, H.-L. LIN, M.-J. WU, C.-J.; NOSAKA, K. Muscle damage responses of the elbow flexors to four maximal eccentric exercise bouts performed every 4 weeks. **European journal of applied physiology**, v. 106, n. 2, p. 267-75, 2009.
- 18- CHEN, T. C. CHEN, H.-LIAN; LINT, M.-JU; WUT, C.-JUN; NOSAKA, K. Potent Protective Effect Conferred by Four Bouts of Low-Intensity Eccentric Exercise. **Med Sci Sports Exercise**, v. 42 n. 5, p. 1004-1012, 2010.
- 19- CHEN, T. C. LIN, K.-Y. CHEN, H.-L. LIN, M.-J.; NOSAKA, K. Comparison in eccentric exercise-induced muscle damage among four limb muscles. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 2, p. 211-23, 2011.
- 20- CHEN, H.-L. NOSAKA, K.; CHEN, T. C. Muscle damage protection by low-intensity eccentric contractions remains for 2 weeks but not 3 weeks. **European journal of applied physiology**, 2011.
- 21- CHEUNG, K. HUME, P. A.; MAXWELL, L. Treatment Strategies and Performance Factors. **Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 145-164, 2003.
- 22- CLARKSON, P. M.; SAYERS, S. P. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquée**, v. 24, n. 3, p. 234-48.
- 23- CRISTEA, A; KORHONEN, M. T. HÄKKINEN, K. et al. Effects of combined strength and sprint training on regulation of muscle contraction at the whole-muscle and single-fibre levels in elite master sprinters. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 193, n. 3, p. 275-89, 2008.

- 24- DAVIS, J. N. TUNG, A. M. Y. CHAK, S. S. et al. Aerobic and Strength Training Reduces Adiposity in Overweight Latina adolescents. **Med Sci Sports and Exercise**. p. 1494-1504, 2009.
- 25- DAVIS, J. N. TUNG, A. M. Y. CHAK, S. S. et al. Aerobic and Strength Training Reduces Adiposity in Overweight Latina Adolescents. **Med Sci Sports Exercise** v 41, n 7,, p. 1494-1504, 2009.
- 26- DOCHERTY, D.; SPORER, B. A proposed model for examining the interference phenomenon between concurrent aerobic and strength training. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 30, n. 6, p. 385-94, 2000.
- 27- DRAPER HH, HADLEY M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol** 186:421-431.
- 28- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- 29- FAIRHELLER, D. DIAZ, M. K. STURGEON, K. M. WILLIAMSON S. T. BROWN M. D. Racial Differences in the Time-Course Oxidative Stress Responses to Acute Exercise. **Journal of Exercise Physiology**. v 14, n. 1, p. 49-59, 2011.
- 30- DUDLEY, G.A., DJAMIL, R. Incompatibility of endurance- and strength-training modes of exercise. **Journal of Applied Physiology**. v. 59, n. 5, Pages 1446-1451, 1985.
- 31- FERRI, A. NARICI, M. GRASSI, B.; POUSSON, M. Neuromuscular recovery after a strength training session in elderly people. **European journal of applied physiology**, v. 97, n. 3, p. 272-9, 2006.
- 32- FOLLAND, J. P. CHONG, J. COPEMAN, E. M.; JONES, D. A. Acute muscle damage as a stimulus for training-induced gains in strength. **Medicine & Science in Sports**, , n. February, p. 1200-1206, 2000.

- 33- FUJIKAKE, T. HART, R.; NOSAKA, K. Changes in B-mode ultrasound echo intensity following injection of bupivacaine hydrochloride to rat hind limb muscles in relation to histologic changes. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 35, n. 4, p. 687-96, 2009.
- 34- GIBALA, M. J.; MACDOUGALL, J. D. et al. Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. **J Appl Physiol**. v. 78, n. 2, p. 702-708, 1995.
- 35- GOLZARI, Z. SHABKHIZ, F. SOUDI, S. KORDI, M. R.; HASHEMI, S. M. Combined exercise training reduces IFN- γ and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood mononuclear cells in women with multiple sclerosis. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1415-9, 2010. Elsevier B.V.
- 36- GROUSSARD, C. RANNOU-BEKONO, F. MACHEFER, G. et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. **European journal of applied physiology**, v. 89, n. 1, p. 14-20, 2003.
- 37- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.
- 38- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Society**, v. 141, n. June, p. 312-322, 2006.
- 39- HAWLEY, J. A. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme, v. 34, n. 3, p. 355-61, 2009.
- 40- HENDRICKSON, N. R. SHARP, M. A; ALEMANY, J. A; et al. Combined resistance and endurance training improves physical capacity and performance on tactical occupational tasks. **European journal of applied physiology**, v. 109, n. 6, p. 1197-208, 2010.

- 41- HOWATSON, G.; SOMEREN, K. A VAN. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 38, n. 6, p. 483-503, 2008.
- 42- HUGHES, J. D. JOHNSON, N. A; BROWN, S. J. et al. Effects of eccentric exercise-induced muscle damage on intramyocellular lipid concentration and high energy phosphates. **European journal of applied physiology**, v. 110, n. 6, p. 1135-41, 2010.
- 43- ILHA, J. ARAUJO, R. T. MALYSZ, T. et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and neural repair**, v. 22, n. 4, p. 355-66, 2008.
- 44- IZQUIERDO-GABARREN, M. GONZÁLEZ, R. T. E. et al. Concurrent strength and endurance training not to failure optimize performance gains. **Med Sci Sports and Exercise**. V. 42, n 6, p. 1191-1199, 2010.
- 45- JI, L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 2, p. 142-52, 2008.
- 46- JOHANSEN, J. S. HARRIS, A. K. RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular diabetology**, v. 4, n. 1, p. 5, 2005.
- 47- JORGE, M. L. M. P. OLIVEIRA, V. N. DE; RESENDE, N. M. et al. The effects of aerobic, resistance, and combined exercise on metabolic control, inflammatory markers, adipocytokines, and muscle insulin signaling in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism: clinical and experimental**, p. 1-9, 2011.
- 48- KAYATEKIN, B. M. GÖNENÇ, S. AÇIKGÖZ, O. UYSAL, N.; DAYI, A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. **European journal of applied physiology**, v. 87, n. 2, p. 141-4, 2002.

- 49- KOÇTÜRK, S. KAYATEKIN, B. M. RESMI, H. et al. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. **European journal of applied physiology**, v. 102, n. 5, p.515-24, 2008.
- 50- KRAUSE, S. VIANNA, D. R. SILVEIRA, E. M. S. et al. Acute exercise stimulates macrophage function : possible role of NF-kB pathways. **Cell**, , n. August 2006, p. 63-73, 2007.
- 51- LAITANO, O. KALSI, K. K. PEARSON, J. et al. Effects of graded exercise-induced dehydration and rehydration on circulatory markers of oxidative stress across the resting and exercising human leg. **European journal of applied physiology**, 2011.
- 52- LEBEL, C.P., ISCHIROPOULOS, H. & BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol**, **5**, 227-231, 1992.
- 53- LIU, J.-F. CHANG, W.-Y. CHAN, K.-H. et al. Blood lipid peroxides and muscle damage increased following intensive resistance training of female weightlifters. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1042, p. 255-61, 2005.
- 54- LIU, Bin; CHEN, Yumin; CLAIR, Daret K. St.. ROS and p53: versatile partnership. **Free Radic Biol Med.**, Lexington, Ky, v. 44, n. 8, p.1529-1535, 2008.
- 55- MILLET, G. P. JAOUEN, B. BORRANI, F.; CANDAU, R. Effects of concurrent endurance and strength training on running economy and $\dot{V}O_2$ kinetics. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 34, n. 8, p. 1351-9, 2002.
- 56- MILIAS, G. A; NOMIKOS, T. FRAGOPOULOU, E. ATHANASOPOULOS, S.; ANTONOPOULOU, S. Effects of eccentric exercise-induced muscle injury on blood levels of platelet activating factor (PAF) and other inflammatory markers. **European journal of applied physiology**, v. 95, n. 5-6, p. 504-13, 2005.

- 57- MISRA HP, FRIDOVICH I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem** 247 (10):3170-3175.
- 58- NIKOLAIDIS, M. G. PASCHALIS, V. GIAKAS, G. et al. Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 39, n. 7, p. 1080-9, 2007.
- 59- NIKOLAIDIS, M. G. PASCHALIS, V. GIAKAS, G. et al. The Effect of Muscle-Damaging Exercise on Blood and Skeletal Muscle Oxidative Stress. **Sports Medicine**, v. 38, n. 7, p. 579-606, 2008.
- 60- NOSAKA, K.; SAKAMOTO, K. Effect of elbow joint angle on the magnitude of muscle damage to the elbow flexors. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 1, p. 22-9, 2001.
- 61- NOSAKA, K.; NEWTON, M. Is recovery from muscle damage retarded by a subsequent bout of eccentric exercise inducing larger decreases in force? **Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia**, v. 5, n. 3, p. 204-18, 2002.
- 62- NOSAKA, K. NEWTON, M.; SACCO, P. Muscle damage and soreness after endurance exercise of the elbow flexors. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 34, n. 6, p. 920-7, 2002.
- 63- NOSAKA, K. LAVANDER, A. NEWTON, M. et al. Muscle Damage in Resistance Training. **Int Jour of Spo Health and Exercise**. v. 1, n. 1, p. 1-8, 2003.
- 64- NOSAKA, K.; CLARKSON, P. M. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 28, n. 8, p. 953-61, 1996.
- 65- OCHI, E.; NAKASATO, K.; ISHII, N. Muscular hypertrophy and changes in cytokine production after eccentric training in the rat skeletal muscle. **Journa of Strength and Conditioning Research**. v. 0, p. 1-10. 2011.

- 66- OSTROWSKI, K. ROHDE, T. ZACHO, M. ASP, S.; PEDERSEN, B. K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **The Journal of physiology**, v. 508 (Pt 3, p. 949-53, 1998.
- 67- PAULSEN, Gøran et al. Time Course of Leukocyte Accumulation in Human Muscle after Eccentric Exercise. **Medicine & Science In Sports & Exercise**, Oslo, Norway, n. , p.75-85, 2009.
- 68- PASCHALIS, V. NIKOLAIDIS, M. G. FATOUROS, I. G. et al. Uniform and Prolonged Changes in Blood Oxidative Stress after Muscle-Damaging Exercise. **Performing arts**, v. 21, n. 5, p. 877-883, 2007.
- 69- PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. **The Journal of physiology**, v. 537, n. Pt 2, p. 333-45, 2001.
- 70- REID, M. B. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 2, p. 169-79, 2008.
- 71- ROCHA, R. F. DA; OLIVEIRA, M. R. DE; PASQUALI, M. A. D. B. et al. Vascular redox imbalance in rats submitted to chronic exercise. **Cell biochemistry and function**, v. 28, n. 3, p. 190-6, 2010.
- 72- RADOVANOVIC, D. BRATIC, M. NURKIC, M. et al. Oxidative stress biomarker response to concurrent strength and endurance training. **General physiology and biophysics**, v. 28 Spec No, p. 205-11, 2009.
- 73- 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. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 20, p. 11919-27, 1990.
- 74- SCHAUN, M. I. DIPP, T. SILVA ROSSATO, J. et al. The effects of periodized concurrent and aerobic training on oxidative stress parameters, endothelial function and immune

- response in sedentary male individuals of middle age. **Cell biochemistry and function**, , n. May, 2011.
- 75- SCHERER, M. N. DEAMER D. W. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. **Arch Biochem Biophys.** v. 246, n. 2, p. 589-601, 1986.
- 76- SERRANO, A. L.; RAJA, B. B-.; PERDIGUIRO, E.; JARDÍ,M.; CÁNOVES, P. M-. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated muscle hypertrophy. **Cell Metabolism.** v. 7, p. 33-44. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.01. 2008.
- 77- SHOJAEIA, E.a.; A.JAFARI; A.FARAJOV. Effect of acute moderate aerobic cycling on systemic inflammatory responses in young untrained men. **Science & Sports**, Tabriz,iran, n. , p.xxx-xxx, 2011.
- 78- SILLANPÄÄ, E. LAAKSONEN, D. E. HÄKKINEN, A. et al. Body composition, fitness, and metabolic health during strength and endurance training and their combination in middle-aged and older women. **European journal of applied physiology**, v. 106, n. 2, p. 285-96, 2009.
- 79- SILVA, L. A; SILVEIRA, P. C. L. RONSANI, M. M. et al. Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise. **Cell biochemistry and function**, v. 29, n. 1, p. 43-9, 2011.
- 80- SIMPLICIO, P. DI; ROSSI, R. FALCINELLI, S. CESERANI, R.; FORMENTO, M. L. Antioxidant status in various tissues of the mouse after fasting and swimming stress. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 76, n. 4, p. 302-7, 1997.
- 81- STUPKA, N. TARNOPOLSKY, M. A; YARDLEY, N. J.; PHILLIPS, S. M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 4, p. 1669-78, 2001.
- 82- TAIPALE, R. S. MIKKOLA, J. NUMMELA, A; et al. Strength training in endurance runners. **International journal of sports medicine**, v. 31, n. 7, p. 468-76, 2010.

- 83- UCHIYAMA, S. TSUKAMOTO, H. YOSHIMURA, S.; TAMAKI, T. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 452, n. 1, p. 109-16, 2006.
- 84- VESKOUKIS, A. S. NIKOLAIDIS, M. G. KYPAROS, A.; KOURETAS, D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 10, p. 1371-4, 2009.
- 85- YAMIN, C. DUARTE, J. A. R. OLIVEIRA, J. M. F. et al. IL6 (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise. **European journal of applied physiology**, v. 104, n. 3, p. 579-86, 2008.
- 86- WENDEL A. 1981. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol** 77:325-333.