

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

TESE DE DOUTORADO

**Modificações no Imunoconteúdo de HSP70 em mulheres atletas de Handebol
durante um ano de treinamento: papel do estradiol**

Maria Helena Weber

Porto Alegre, março de 2012

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

TESE DE DOUTORADO

**Modificações no Imunoconteúdo de HSP70 em mulheres atletas de Handebol
durante um ano de treinamento: papel do estradiol**

Doutoranda

Maria Helena Weber

Orientador

Prof^o Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Tese apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas: Bioquímica

Porto Alegre, março de 2012

Este trabalho foi realizado no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela Pró-Reitoria de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS) e pela Universidade Feevale.

Dedicatória

Dedico esta Tese de Doutorado a meu Pai, que tão pouco pensou em si para que eu pudesse chegar aqui.

Agradecimentos

Á Deus, que tudo sabe, que tudo vê, que tudo realiza, por habitar minha alma e orientar minha vida.

Aos meus pais, Silvino e Sueli, por terem me dado esta vida maravilhosa. Quero dizer a ti Mãe, prá não ficar com ciúme do pai, pois se não fosse tua batalha, teu amor, teu incentivo, como eu ia dedicar essa tese ao meu pai, se não fosse por ti, eu nem teria saído do interior.

Aos meus irmãos Daniel e Tiago pelo grande amor que temos entre nós, às minhas cunhadas pelo carinho e compreensão da minha ausência e especialmente à Fernanda pelo apoio e incentivo nesta caminhada.

Aos meus sobrinhos amados, Galileu (afilhado), Renata e Gabriel vocês são as grandes bênçãos de Deus para nossa família, e que venham mais....

Ao Abelardo, meu amor, grande incentivador e companheiro, tu sabes que “Eres mi vida, regalo que Diós há me dado a mi...”

Ao meu orientador, Prof^o José Cláudio, que me aceitou para fazer parte deste tão seletto grupo, por acreditar na minha capacidade de realizar e concluir este estudo nas minhas condições de tempo. Obrigada Zé, admiro tua forma de ser e de ensinar, levarei comigo este exemplo, e modéstia à parte, quiçá eu possa aplicá-la também.

Aos amigos do Lab 32, pela amizade, companheirismo, convivência, especialmente ao Carlos Eduardo, o Bobs, que me assessorou nos experimentos, nas coletas em Novo Hamburgo, quantos finais de semana no Lab. muuuuito obrigada, sem tua ajuda, eu não teria conseguido. Ao Guilherme e a Mariana Escobar, pelo apoio no inicio de tudo, ao Rafael Schröder, ao Marcos de Oliveira, ao Ricardo Rocha e à Fernanda Caregnato por suas contribuições no trabalho.

A nutricionista Dra Gilberti, pela amizade, incentivo e exemplo de dedicação ao ensino e á pesquisa em nutrição.

Á Feevale, especialmente ao Prof^o Renato, a Isabel e a Tatiana do Lab. de Biomedicina que prestaram todo o apoio não apenas para as coletas, mas também na realização dos exames bioquímicos das atletas.

Ás atletas que com sua efetiva participação, me possibilitaram a realização deste estudo, ao Prof^o Renato Arena, o técnico, que fazia marcação cerrada para que não se esquecessem das coletas, e ao Colégio Santa Catarina pelo apoio.

Às secretárias do ICS da Feevale, pelo suporte nos momentos de turbilhão.

Às professoras do curso de Nutrição da Feevale, nutricionistas Cláudia, Flávia, Gisele, Hosana, Soninha e Simone pelo companheirismo, amizade e apoio nas muitas tarefas quando eu não podia estar presente.

Ao meu amigo Alex, que por conhecer o trabalho do Prof^o José Cláudio, sugeriu que eu o procurasse. Alex querido, muito obrigado de coração.

Às amigas Glaci e Teresa, pelo apoio.

Aos amigos do Vitta, principalmente à Silvia e a Juliane, pelo carinho, apoio e compreensão das vezes que “*fechei a agenda*”. À minha colega e amiga nutricionista Mariluz por todo apoio e incentivo, e por ter assumido nosso trabalho sozinha, em muitos momentos. Aos pacientes e alunos, pela compreensão das vezes que tive que transferir as consultas e avaliações.

Ao mestre Masaharu Taniguchi fundador da Seicho-No-Ie, que me transmitiu o sublime ensinamento *Homem Filho de Deus*, e me permitiu desta forma tentar compreender a Verdade da Vida.

Nossa vida é regida pelos pensamentos que nós mesmos concebemos e pelas idéias e crenças que temos, disse Jesus Cristo há mais de 2000 anos atrás, “Conforme creste assim será” e até hoje os homens insistem em atrelar suas dificuldades á causas externas de qualquer ordem, quando tudo esta na própria mente. O homem se desenvolve na medida exata da fé que tem sobre si mesmo.

Masaharu Taniguchi

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese de doutorado estão apresentados na forma de artigos científicos. As sessões Matérias e Métodos, Resultados, Discussão e Referencias Bibliográficas se encontram nos respectivos artigos.

Os itens Introdução, Discussão, Conclusão e Perspectivas encontrados nesta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados contidos nos artigos científicos do presente trabalho. As Referencias Bibliográficas referem somente as citações que aparecem nos itens supracitados.

As informações técnicas mais precisas sobre cada metodologia utilizada poderão ser encontradas nos artigos científicos correspondentes.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| PARTE I | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO | 13 |
| 1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO..... | 14 |
| 1.3 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E EXERCÍCIO..... | 17 |
| 1.3.1 ENZIMÁTICO..... | 18 |
| 1.3.2 NÃO ENZIMÁTICO..... | 19 |
| 1.3.3 ESTROGÊNIO COMO PARTE DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE | 19 |
| 1.4 PROTEÍNAS “HEAT SHOCK” | 23 |
| 1.5 HANDEBOL – CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS..... | 25 |
| 1.6 MULHER E EXERCÍCIO FÍSICO..... | 26 |
| 2 OBJETIVOS | 28 |
| 2.1 GERAL | 28 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| PARTE II | 29 |
| CAPÍTULO 1 | 30 |
| Comparison Of The Dietetic And Anthropometric Profile Of Handball Athletes During A Training Period | 30 |
| CAPÍTULO 2 | 35 |
| Changes In Lymphocyte Hsp70 Levels In Women Handball Players Throughout One Year Of Training: The Role Of Estrogen Levels | 35 |
| CAPÍTULO 3 | 47 |
| Correlation Between Nutritional Practice And Oxidative Stress In Young Female Handball Athletes During One Year Of Training And Games | 48 |
| PARTE III | 69 |
| 3. DISCUSSÃO | 70 |
| 4. CONCLUSÃO | 79 |
| 5. PERSPECTIVAS | 80 |
| REFERÊNCIAS | 81 |

PARTE I

RESUMO

A proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) é uma chaperona fundamental nos processos de reparo celular, não apenas em condição de hipertermia como também em outras alterações metabólicas. O exercício físico é capaz de induzir a síntese de HSP70 uma vez que estimula o metabolismo oxidativo aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil antropométrico e nutricional de mulheres atletas de handebol, além de investigar se existe correlação entre os níveis de estradiol e o estado redox com o imunoconteúdo de HSP70 em linfócitos do plasma, no decorrer de um ano de treinamento físico. O estudo iniciou com a participação de 47 jogadoras, sendo que trinta atletas (entre 12 e 24 anos) cumpriram todas as etapas e foram incluídas na análise. As coletas foram realizadas em três períodos distintos: início, metade (após 4 meses de treino) e final da temporada de treinos. As atletas foram divididas em dois grupos de acordo com os níveis de estradiol: Estradiol Baixo (EB) ($\geq 30 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Estradiol Normal (EN) ($30\text{--}330 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Neste estudo não observamos diferença na atividade da superóxido dismutase (SOD), no conteúdo de proteínas oxidadas, nem nos níveis de HSP70 extracelular (eHSP70), em nenhum período do estudo. A atividade da catalase (CAT) aumentou na metade da temporada no grupo EN. Foram observados menores níveis de grupamentos tióis reduzidos (SH) no grupo EN e menores níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na metade e no final da temporada em ambos os grupos, havendo uma correlação inversa significativa entre o consumo de vitamina C e os níveis de dano oxidativo a lipídios. O imunoconteúdo de HSP70 intracelular (iHSP70) no grupo EN aumentou na metade e no final da temporada, enquanto que no grupo EB o conteúdo de iHSP70 mostrou-se elevado desde o início da temporada. Nossos resultados sugerem que o estradiol plasmático pode ter um importante papel na proteção ao dano oxidativo, e que os níveis de iHSP70, proteína considerada um biomarcador de inflamação, pode ser alterado tanto pelo estradiol, quanto pelo estresse oxidativo induzido pelo exercício.

ABSTRACT

The heat shock protein of 70kDa (HSP70) is a chaperone essential for cellular repair processes, not only on the condition of hyperthermia, but also in other metabolic challenges. Physical exercise is capable to induce an increase in the HSP70 synthesis once it augments oxidative metabolism increasing production of reactive oxygen species. In the current study we investigated whether a relationship between estradiol levels and parameters related to the redox environment and the immunocontent of HSP70 in lymphocytes and plasma of women handball players throughout 1 year a year of physical training, as well as anthropometric profile and nutritional status. Forty-seven female handball athletes (12 – 24 years old) started participating in the study and thirty completed all stages of the research, and were included in the study. The samples were taken at three different periods: Season beginning, mead-season (after four months of training) and season end. The athletes were divided into two groups according to levels of estradiol: low estradiol (≥ 30 pg·mL⁻¹) (LE) and normal estradiol (30–330 pg·mL⁻¹) (NE). In this study no changes were detected in SOD activity, protein carbonyl and extracellular HSP70 (eHSP70) in any study period. Catalase (CAT) activity increased in the middle of the season in NE group. Lower levels of reduced thiol (SH) were observed in the NE group and lower levels of uric acid in both groups (LE and NE) at the end of the season. The levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were lower in the middle and end of the season in both groups, e found a significant inverse correlation between the consumption of vitamin C and lipid peroxidation (TBARS). The immunocontent of intracellular HSP70 (iHSP70) in the NE group increased in the middle and the end of the season, whereas in group LE, iHSP70 was higher since the beginning of the season. Our results suggest that estradiol plasma levels can play an important role throughout the exercise training season and that the iHSP70, a biomarker of inflammation, is affected by both estradiol and oxidative stress induced by exercise

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – American Dietetic Assosiation

AU – Ácido úrico

CAT – Catalase

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EN – Estradiol Normal

EB – Estradiol Baixo

ERO – Espécie Radicalares de Oxigênio

ERN - Espécie Radicalares de Nitrogênio

Er α – Receptor de estrogênio α

Er β - Receptor de estrogênio β

GPx – Glutaciona Peroxidase

HSP – Heat Shock Protein

eHSP - Heat Shock Protein extracellular

iHSP - Heat Shock Protein intracellular

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

LPO – Peroxidação lipídica

MDA - malondialdeído

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (reduzida)

ON^{*} – Óxido Nítrico

OH^{*} – Radical Hidroxil

O₂⁻ - Radical Ânion Superóxido

PC – Proteína Carbonil

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP – total radical-trapping antioxidant potential, potencial antioxidante total

SOD – Superóxido Dismutase

SH – tiol reduzido

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGENIO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas derivadas do oxigênio, sendo que as principais ERO podem ser divididas em dois grupos: as radicalares, como por exemplo, o anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e o radical hidroxil (HO^{\cdot}); e as não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As espécies radicalares são moléculas altamente instáveis que podem trocar elétrons através de reações de oxidação/redução formando assim radicais livres. Radical livre é definido como uma espécie química com um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, podendo ser átomos de hidrogênio, cloreto, metais de transição ou moléculas cujo elétron desemparelhado esteja localizado no orbital externo conferindo-lhe uma reatividade relativamente alta devido à grande tendência de adquirir um segundo elétron neste orbital (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Radicais livres são descritos quimicamente pela representação da espécie química seguida por um ponto (*) que indica um elétron desemparelhado (PRYOR, 1973; BOVERIS, 1998). Classicamente, as reações dos radicais livres são divididas em a) reações de iniciação, b) reações de propagação, e c) reações de finalização (término). Nas reações de iniciação um radical livre é formado a partir de espécies químicas não radicalares (estáveis) ($AB + C \Rightarrow A^{\cdot} + D + E$). Nas reações de propagação, um radical livre reage com uma molécula estável, gerando outro radical

livre ($A^{\bullet} + CD \Rightarrow AC + D^{\bullet}$). Já nas reações de finalização, dois radicais livres perdem seus elétrons desemparelhados e formam um produto estável ($A^{\bullet} + B^{\bullet} \Rightarrow A-B$).

A reatividade química do radical livre é determinada pelo número total de elétrons desemparelhados, conseqüentemente, a reatividade varia muito entre um radical e outro (BOVERIS, 1998). O anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é a espécie reativa de oxigênio de maior ocorrência. É produzido quando uma molécula de oxigênio é parcialmente reduzida, recebendo apenas um elétron ao invés de dois, o que evita sua completa redução e a formação da água no final do processo. A produção excessiva do radical $O_2^{\bullet-}$ pode causar um desbalanço redox no ambiente celular, uma vez que induz a produção de radical hidroxil ($^{\bullet}OH$). A geração do radical hidroxil, a mais potente espécie reativa de oxigênio, pode ocorrer ou através da reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição como Fe^{+2} ou Cu^{+2} (via reação de Fenton), ou da reação com óxido nítrico (NO^{\bullet}), formando peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), o qual pode gerar o radical nitrosil ($ONOOH$), que ao se degradar da origem ao radical hidroxil. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

As ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, e assim a maioria das células aeróbias possui mecanismos eficientes para evitar os efeitos negativos dessas moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Porém, apesar de a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ocorrerem como parte normal do metabolismo celular, essas moléculas podem ter seus níveis aumentados em condições de estresse (BLOOMER; GOLDFARB, 2004). O estresse oxidativo é uma condição que

se estabelece quando a formação de radicais livres excede a capacidade do sistema antioxidante de metabolizar essas moléculas.

A relação entre exercício e estresse oxidativo tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, visto que durante o exercício ocorre um aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio pelo organismo, e um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Diversos trabalhos relatam que existe relação entre o exercício físico intenso com um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) em diversos tecidos e esse aumento está diretamente relacionado com a intensidade e duração do esforço físico podendo assim, como em outras situações, gerar danos às biomoléculas celulares, especialmente os lipídios e proteínas de membranas, além também do DNA (POWERS; JACKSON, 2008; JENKINS, 2000; BLOOMER, 2008).

Powers e Jackson (2008) relatam que a primeira referência de danos causados pelos radicais livres durante o exercício físico data de 1978, e que apesar das elucidações obtidas até o momento, ainda existem dúvidas sobre quais são os mecanismos responsáveis pelo aumento da produção dessas moléculas oxidantes durante o exercício, uma vez que já é bem estabelecido que o músculo, tanto em repouso quanto em contração, produz ERO e ERN.

Como o exercício físico promove um aumento no volume do oxigênio consumido, vários mecanismos foram propostos para explicar como a produção de ERO ocorre durante o exercício físico, e entre eles estão:

- 1) A cadeia de transporte de elétrons: formação de superóxido principalmente nos complexos I (NADPH-ubiquinona oxido redutase) e complexo III (citocromo c redutase) (BOVERIS; CHANCE, 1972).
- 2) A ativação da Xantina Oxidase: durante o exercício de alta intensidade e intermitente a desaminação da adenosina monofosfato (AMP) acumulada no músculo esquelético, é desaminada em inosina monofosfato (IMP), importante para a ressíntese de ATP. O IMP é transformado em hipoxantina que em condições normais dá origem ao ácido úrico. Em repouso, essa enzima está na forma de xantina desidrogenase. Quando há isquemia como no exercício intenso, a xantina desidrogenase é convertida à forma oxidase usando o oxigênio molecular comoceptor de elétrons, gerando com isso $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (SJÖDIN; WESTING, 1990).
- 3) A ativação de neutrófilos: após o exercício, neutrófilos polimorfonucleares são recrutados para remoção de proteínas e células danificadas, assim como monócitos e macrófagos. Os neutrófilos são a maior fonte de produção de superóxido, que ocorre através da redução univalente do oxigênio, com a presença de NADPH, em uma reação catalisada pela NADPH oxigenase (JI, 1999).
- 4) Músculo esquelético: o músculo esquelético produz óxido nítrico (NO^{\cdot}), a partir do aminoácido arginina através da enzima óxido nítrico sintase. O NO^{\cdot} , formado pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) uma espécie reativa, que pode influenciar no balanço redox intramuscular. (REID, 1998; REID; DURHAM, 2002).

Porém, está bem documentado que parte da resposta aguda ao exercício e a adaptação do músculo ao exercício depende da presença das ERO, e que o

estresse oxidativo associado ao exercício pode, portanto, ser parte de um processo de adaptação fisiológica normal do organismo (BLOOMER, 2008; SAHLIN et al., 2010). Dados da literatura mostram que indivíduos e animais adaptados a um protocolo de treinamento além de possuírem maior quantidade das enzimas mitocondriais oxidativas, apresentam também níveis maiores das principais enzimas antioxidantes, sendo que essa alteração é considerada como fundamental para uma resposta adequada do músculo esquelético ao treinamento físico (JENKINS, 1998).

Ainda, com relação à formação de ERO durante o exercício, sabe-se que esta não se limita apenas ao metabolismo aeróbio, pois durante os períodos de exercício anaeróbio intenso, as espécies reativas podem ser geradas pela atividade da xantina oxidase, isquemia/reperfusão muscular causada pelos “sprints” repetitivos, aumento de catecolaminas na circulação, ativação de leucócitos, entre outros (CHIEN et al., 1978; SJÖDIN; HELLSTEN; APPLE, 1990; CHAO et al., 1999; COOPER et al., 2002).

1.3 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E EXERCÍCIO

Aproximadamente 85 a 90% do oxigênio que respiramos são metabolizados na mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons, sendo que os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e em reações químicas de oxidação diretas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dentre as defesas antioxidantes pode-se reconhecer a existência de substâncias de natureza endógenas, como as enzimas e os antioxidantes não-enzimáticos, e de natureza exógena (nutrientes). Entre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione

peroxidase (GPx) (URSO; CLARKSON, 2003). Dados na literatura mostram que indivíduos e animais adaptados a um protocolo de treinamento possuem níveis maiores de enzimas antioxidantes, sendo esta uma das alterações fundamentais do músculo esquelético em resposta ao treinamento físico, assim como as adaptações de enzimas mitocondriais oxidativas (JENKINS, 1998).

1.3.1 Enzimático

Superóxido Dismutase (SOD): esta enzima controla a concentração do estado estacionário do ânion $O_2^{\cdot-}$, transformando-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. A SOD apresenta três isoformas: Mn-SOD (mitocondrial), Cu/Zn-SOD (citosólica) e Fe-SOD (extracelular) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

Catalase (CAT): é uma hemoenzima que catalisa a decomposição do H_2O_2 , formando O_2 e H_2O . A catalase das células animais é composta por quatro subunidades, cada uma das quais possui um grupo heme que contém ferro em seu sítio ativo (MURRAY et. al, 2003).

Glutationa peroxidase (GPx): é a enzima que catalisa a decomposição de uma grande variedade de hidroperóxidos e peróxidos, como o H_2O_2 e os hidroperóxidos derivados da oxidação dos ácidos graxos. Duas isoformas desta enzima são descritas, uma dependente de selênio (Se) e outra independente. É composta por quatro subunidades protéicas, cada uma delas contendo um átomo de Se no seu sítio ativo. Sua concentração intracelular é muito baixa (HALIWELL; GUTERIGE, 2007).

1.3.2 Não enzimático

O sistema antioxidante não enzimático é composto por estruturas de baixo peso molecular, sintetizadas pelo organismo humano como a bilirrubina, os hormônios sexuais, a melatonina, a coenzima Q, o ácido úrico, entre outros. Porém, os antioxidantes também podem ser obtidos através da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E), e os grupos fenóis de plantas (flavonóides) (URSO; CLARKSON, 2003).

1.3.3 Estrogênio como parte do sistema de defesa antioxidante

Estrogênios são hormônios secretados principalmente pelos ovários e, em menor quantidade pelos testículos (KENDALL; ESTON, 2002). Os estrogênios naturalmente sintetizados são o 17- β -estradiol, o mais potente e produzido em maior quantidade, a estrona e o estriol, que são menos potentes (WILLIAMS; STANCEL, 1996). Esses hormônios apresentam como função primária a manutenção da função reprodutiva normal (HELDRING et al., 2007), sendo que nas últimas décadas receberam atenção especial por exercerem vários efeitos biológicos em sistemas fisiológicos como o cardiovascular, o imunológico, o músculo-esquelético, e o sistema nervoso central (KATZENELLENBOGEN et al., 1995; PERSKY et al., 2000).

Esses hormônios são derivados do colesterol, que sofre uma série de modificações químicas, incluindo clivagem da ramificação no C17 pela enzima citocromo P450, mas tendo como passo fundamental a aromatização a partir da androstenadiona e testosterona. (Figura 1). (MARKS; MARKS; SMITH, 2005; GRUBER et al., 2002).

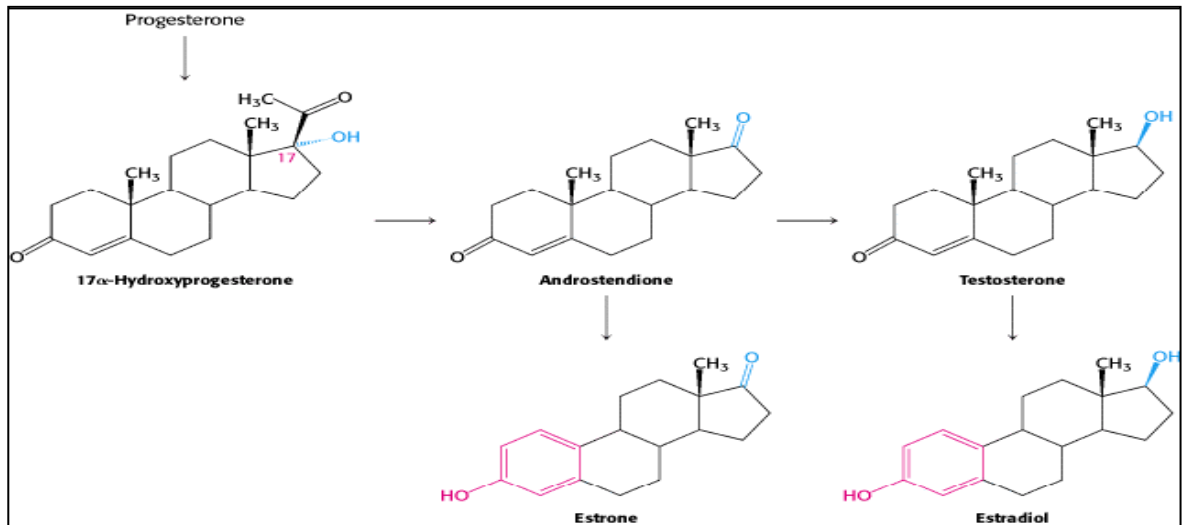


Figura 1 – Via de formação de Androgênios e Estrogênios

FONTE: BERG; TYMOCZKO; STRYER. p. 1094

Além da síntese de estrogênio ocorrer nos ovários, esse hormônio também pode estar presente em pequenas quantidades em tecidos como o cérebro, a próstata, o útero, as glândulas mamárias e o tecido adiposo, especialmente durante o período da menopausa. Por ser derivado do colesterol, apresenta características lipofílicas e tem, portanto, facilidade em atravessar a membrana celular e ligar-se ao seu receptor no citoplasma ou no núcleo celular (GRUBER et al., 2002). Dois tipos de receptores estrogênicos são conhecidos: receptor α ($Er\alpha$) e receptor β ($Er\beta$), os quais são homólogos e estão localizados em diversos tecidos-alvos como, por exemplo, as células endoteliais das artérias, as células do músculo liso e do miocárdio (GRUBER et al., 2002; COURSE: KORACH, 1999).

Com relação ao músculo esquelético humano, sabe-se que o estrogênio tem ação direta sobre a massa muscular visto que esse tecido apresenta receptores de estrogênio na membrana celular, no citoplasma e na membrana nuclear (LEMOINE et al., 2003, WIJK et al., 2003). Porém, estudos como os de Kalbe e colaboradores (2006) mostraram que a capacidade do estrogênio em atenuar a lesão muscular e a resposta inflamatória induzida pelo exercício, não é mediada pelo receptor e pode,

estar relacionada com outras características do estrogênio como a estabilização da membrana muscular e consequente diminuição da ruptura do sarcolema, entretanto em humanos, esses efeitos não estão claramente definidos (ENNS; IQBAL; TIIDUS, 2008; TIIDUS; ENNS, 2009)

A ação do estrogênio como antioxidante deve-se principalmente devido a presença de um grupamento hidrofenólico em sua molécula, o que pode interferir na iniciação da reação da lipoperoxidação (Figura 2), evitando sua propagação e subsequente formação de ERO, além de poder evitar dano ao DNA principalmente através da inibição da formação do radical $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007; WIERMAN, 2007). Ainda, sabe-se que esse hormônio tem ação moduladora sobre as enzimas antioxidantes SOD e GPx (STREHLOW et al., 2003; VINÃ et al., 2005).

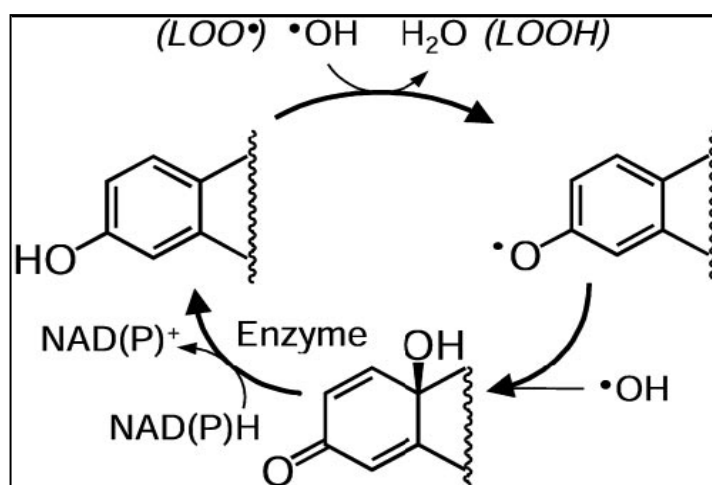


Figura 2 - Ação antioxidante do 17β-estradiol sob radical hidroxil ($\cdot OH$)
 FONTE: PROKAI et al., (2003).

Estudos que examinaram as diferenças sexuais nos seres humanos relataram maiores níveis séricos de CK (creatina quinase) em homens pós-exercício em relação às mulheres (SEWRIGHT et al., 2008; STUPKA et al., 2000) e atribuíram essas diferenças ao estrogênio. Em estudos com animais, tanto os ratos machos quanto as fêmeas ovariectomizadas quando suplementados com

estrogênio, mostraram redução na atividade da CK, semelhante as fêmeas com ovários intactos (FENG, LI; WANG, 2004; ENNS, TIIDUS, 2010).

Especula-se ainda que o estrogênio possa ter um efeito sobre a força e o tamanho da massa muscular, assim como também é capaz de influenciar as propriedades contráteis do músculo. Estudos com terapia de reposição hormonal em roedores verificaram que existe alteração na expressão da cadeia de miosina na presença de estrogênio, tanto nas fibras de contração lenta quanto de contração rápida, auxiliando assim na prevenção à sarcopenia (DIONNE; KINAMAN; POEHLMAN, 2000). Entretanto, alguns estudos são inconclusivos, principalmente aqueles que dizem respeito aos estudos com humanos (KAHLERT et al., 1997; SIPILA et al., 2001; SCIOTE et al., 2001; MADDALOZZO et al., 2004).

Brown (2008) ao estudar as diferenças entre gêneros e exercício, identificou que as mulheres têm mais resistência para exercícios de longa distância com menor utilização de glicogênio, maior utilização de gordura como combustível e menor taxa de incremento respiratório em exercícios submáximos, quando comparadas com os homens. Portanto, os hormônios sexuais femininos podem influenciar a utilização de substratos durante o exercício (MAUGHAN; BURKE, 2004).

Estudos com animais sugerem que essas diferenças metabólicas são mediadas pelos hormônios sexuais femininos, principalmente, o 17- β -estradiol (TARNOPOLSKI et al., 2001, KOMUNALEIN et al., 1999).

1.4 PROTEÍNAS “HEAT SHOCK”

Diversas estratégias foram desenvolvidas pelas células como adaptação a situações ambientais adversas, como por exemplo, a resposta ao choque térmico, também conhecida como resposta ao estresse (WELCH, 1992). Neste sentido, as HSPs (*heat shock proteins*), uma classe de proteínas de estresse (LOCKE et al, 1995), tem importância fundamental na sobrevivência celular, não apenas em condição de hipertermia mas também em outros desafios metabólicos (YELLON, MARBER, 1994; WELCH, 1992).

Desde que as HSPs foram encontradas na circulação em humanos, o interesse em correlacionar os níveis sanguíneos dessas proteínas com diversos estados patológicos tem crescido, especialmente porque em condições fisiológicas a expressão dessas proteínas é baixa. Uma das proteínas de choque térmico mais estudada é a HSP70, encontrada tanto no compartimento intracelular (iHSP70) como no extracelular (eHSP70), mas que desempenha diferentes funções em cada ambiente (ASEA, 2007; TERRY et al., 2004).

Na circulação as HSPs podem iniciar cascatas de sinalização em diversos tipos celulares (CALDERWOOD et al., 2007). Em humanos a eHSP70 está associada a condições de estresse tais como, inflamação, infecções virais e bacterianas, e doenças oncológicas (MULTHOFF, 2007). Estudos recentes do nosso grupo associaram o aumento de eHSP70 ao grau de severidade e mortalidade em pacientes com sepse. Foi observado que os níveis aumentados de eHSP70 em pacientes com septicemia foram modulados pelo estado oxidante do paciente durante a evolução do quadro de sepse (GELAIN et al., 2011).

No ambiente intracelular, as HSPs sempre estiveram associadas a sua função clássica de “chaperona molecular”, impedindo a agregação de proteínas e

auxiliando o remodelamento e manutenção de proteínas estruturais. Porém, estudos atuais mostram que em circunstâncias não fisiológicas, mais precisamente em doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, diabetes Tipo I, e possivelmente na aterosclerose e alergias, essas proteínas podem estimular citocinas antiinflamatórias e agir como reguladores do processo inflamatório (VAN EDEN, VAN DER ZEE, R; PRAKKEN 2005; POCKLEY et al., 2003). Dessa forma, acreditasse que a iHSP70 esteja associada com a citoproteção e com mecanismos anti-inflamatórios e apoptóticos (ASEA, 2007; BEERE, 2005; SIMAR et al., 2007).

Com relação ao exercício físico, observou-se que as HSP70 podem ser liberadas por diferentes células de mamíferos em resposta ao aumento da demanda energética e/ou estresse oxidativo (PAROO; DIPCHAND; NOBLE, 2002; WALSH et al, 2001). Paroo, Tiidus e Noble (1999) mostraram que o exercício promove o aumento da expressão de HSP70, e que esse aumento está associado ao estresse oxidativo. A alteração do estado redox aliada a condições de hipóxia, aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} e diminuição de pH, e juntamente com a elevação de temperatura, estimulariam a expressão dessas proteínas durante o exercício físico (LOCKE; NOBLE; ATKINSON, 1990; WALSH et al., 2001).

As eHSP70 podem ter origem em diversos tecidos e células, inclusive durante o exercício físico (WALSH et al., 2001; FEBBRAIO et al., 2004; FEHRENBACH et al., 2005). A liberação dessas proteínas ocorre mesmo na ausência de ruptura celular, e é desencadeada por diferentes mecanismos e influenciada por diferentes indutores (MAMBULA et al., 2007; LANCASTER; FEBBRAIO, 2005a; SUN; MAcRAE, 2005).

Uma única sessão de exercício pode levar a um aumento transitório de HSP70 no músculo esquelético (PUNTSCHART et al., 1996) e leucócitos humanos

(RYAN; GISOLFI; MOSELEY, 1991), e no músculo esquelético (CHEN et.al., 1995, SKIDMORE et al., 1995) e coração de ratos (LOCKE et al., 1995, SALO; DONOVAN; DAVIES, 1991). Além disso, o treinamento físico regular intenso, eleva os níveis de HSP70 no coração (POWERS et al., 1998), músculo esquelético (GONZALEZ; HERNANDO; MANSO, 2000) e leucócitos no período de repouso (FEHRENBACH et al., 2000).

Estudo realizado por Heck, Schöler e Bittencourt (2011) em modelo experimental de exercício físico em linfócitos extraídos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar, observou um aumento no conteúdo intracelular de HSP70 no grupo que realizou exercício de maior intensidade. Também relacionou a exportação de HSP70 para o ambiente extracelular com o aumento da intensidade do exercício.

1.5 HANDEBOL – CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

O handebol é uma modalidade esportiva coletiva de atividade motora completa, com tempo de jogo fixado em 60 minutos, e um intervalo de 10 minutos. Envolve uma grande quantidade de movimentações associadas à manipulação de bola (ELENO; BARELA; KOKUBUN, 2002) com características de esforços de alta intensidade e curta duração com pausas entre os esforços (SOUZA et al., 2000).

Assim como outros esportes coletivos, o handebol requer um fornecimento misto de energia, onde a própria combinação dos esforços realizados durante o jogo permite o envolvimento das três vias metabólicas, a anaeróbia alática, anaeróbia láctica e a oxidativa, com predominância das vias anaeróbia alática e oxidativa (DELAMARCE et al., 1987; GOROSTIAGA et al., 2006). É considerado um exercício com características de trabalho intermitente, pois apresenta alternância entre

esforço e pausa, ou seja, com estímulos submáximos alternados com deslocamentos de maior intensidade. Assim o handball é considerado uma atividade completa, pois exige várias habilidades motoras, entre elas corrida, saltos e arremessos.

1.5 MULHER E EXERCÍCIO FÍSICO

A participação das mulheres em esportes competitivos aumentou muito nas últimas décadas. Os primeiros relatos datam de 1948, e referem-se à participação de 385 mulheres atletas nos Jogos Olímpicos de Verão, porém a participação da mulher em competições esportivas oficiais teve seu início apenas em 1972. Nas últimas décadas houve um aumento significativo no número de atletas do sexo feminino, atingindo o seu máximo nos Jogos Olímpicos de Pequim 2008, onde mais de 42% dos 11.028 atletas eram mulheres. Da mesma forma, em 2006, no Jogos Olímpicos de Inverno de Turim (Itália), 40% dos 2.500 atletas eram do sexo feminino, e o Comitê Olímpico prevê que aproximadamente 44% de todos os atletas participantes dos Jogos Olímpicos de 2012 serão mulheres (O'BRIEN, ROBERTSON, 2010).

As diferenças entre os sexos quanto à fisiologia do exercício iniciam mesmo antes da puberdade, mas aumentam durante a adolescência e a vida adulta. Essas diferenças baseiam-se fundamentalmente na composição corporal, pois os homens possuem maior massa muscular em termos absolutos e relativos (por peso corporal total), enquanto que mulheres possuem maior percentual de gordura corporal, o que resulta em uma menor eficiência termorregulatória nos exercícios realizados em ambientes quentes (HERNANDEZ; NAHAS, 2009). Poucos são os trabalhos que

investigam o impacto do treinamento físico intenso na saúde da mulher, e a maioria dos estudos realizados até hoje se refere a aspectos patológicos relacionados ao envelhecimento.

Porém, existem modelos que utilizam mulheres no período pré e pós-menopausa que tem como objetivo investigar diferenças entre o gênero masculino e feminino (MILNE; NOBLE, 2008) tentando relacioná-los com a maior sobrevivência de mulheres em relação aos homens em determinado ciclo da vida, para auxiliar em diagnósticos, condutas de prevenção e tratamentos (KATZENELLENBOGEN et al., 1995; WALSH et al., 1999; DANTAS et al., 2002; SHULTZ et al., 2005; ZHANG et al., 2009).

Entretanto, a maioria dos estudos que investigam as diferenças entre gêneros e exercício avalia apenas as diferenças antropométricas, composição corporal e consumo nutricional, entre gêneros e no mesmo gênero entre os diferentes esportes (GHOLAMI; RAD, 2010). Poucos são os estudos que abordam questões metabólicas, fisiológicas e bioquímicas com mulheres, ainda mais especificamente na área esportiva (MAUGHAN; BURKE, 2004).

Talvez isso se deva a dificuldade de delimitar interferências nos resultados, pois além da questão hormonal natural, explicada pelas diferenças nas taxas hormonais entre as fases do ciclo menstrual (SHULTZ et al., 2005), o uso frequente de anticoncepcionais orais, elaborados a partir de estrogênios e progestinas e que tem como resultado a diminuição da função hipofisária e inibição da ovulação, também pode interferir nos resultados dos estudos. Mesmo assim, é de fundamental importância realizar estudos com essa população com objetivo de auxiliar na elaboração dos protocolos de exercício, prevenção de lesões, melhora de rendimento, qualidade de vida e saúde da mulher atleta.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar a variação dos parâmetros de estresse oxidativo e associá-los com o imunocorrelato sérico de proteínas de choque térmico (HSP70) em mulheres (com estradiol baixo e normal), atletas de handebol ao longo de uma temporada de treinamento (12 meses).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os parâmetros de estresse oxidativo (peroxidação lipídica, grupamentos carbonil, atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase) em atletas femininas durante uma temporada de treinamento (12 meses).

Analisar o imunocorrelato (sérico e em linfócitos) de HSP70 em atletas femininas durante uma temporada de treinamento (12 meses).

Avaliar a relação dos níveis do hormônio estradiol com os parâmetros de estresse oxidativo e o imunocorrelato de proteínas de choque térmico (HSP70) em atletas femininas durante uma temporada de treinamento (12 meses).

Analisar o consumo dietético em atletas femininas durante uma temporada de treinamento (12 meses) e correlacionar com os parâmetros de estresse oxidativo.

Comparar o perfil dietético e antropométrico das atletas de handebol no início da temporada e após quatro meses de treinamento.

PARTE II

CAPÍTULO 1

COMPARISON OF THE DIETETIC AND ANTHROPOMETRIC PROFILE OF HANDBALL ATHLETES DURING A TRAINING PERIOD

MARIA HELENA WEBER ^{1,2}; CRISTINA KEHL ¹; JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA ²

¹ Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

helenaweber@feevale.br

Artigo publicado no FIEP BULLETIN. ISSN-0256-6419.

**Fédération Internationale d'Education Physique – FIEP. V. 82 – Special Edition
– Article II, pg 209-212, 2012.**

49 - COMPARISON OF THE DIETETIC AND ANTHROPOMETRIC PROFILE OF HANDBALL ATHLETES DURING A TRAINING PERIOD

MARIA HELENA WEBER^{1,2}CRISTINA KEHL¹JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA²

1. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

helenaweber@feevale.br

INTRODUCTION

Handball is a sport featuring high intensity effort and short duration with pause between efforts, with great energy consumption, both in competitions and in trainings. Because of these factors, an excellent nutrition is indispensable to the athletes to improve their performance in matches and post-training recovery (González-Gross et al., 2001).

In spite of the increasing participation of females in competitive sports and of the advances in medicine and sports nutrition, there are not many studies about nutritional aspects which are specific to that population yet (Maughan, R.J, Shirreffs, S.M., 2007). Nutrition is essential to athletic performance. Balanced feeding can reduce fatigue, maximize training and recovery, as well as optimize health and the athlete's performance, and the nutritional need is influenced by various individual factors such as frequency, intensity, training duration, among others (Maughan & Burke, 2004). Besides an adequate amount of calories, it must be considered in the feeding plan an adequate quantity of carbohydrates (CHO), proteins (prot.), lipids (Lip.), vitamins, minerals e water, in order to permit optimal training and recovery conditions, and for better results in competitions (Gonzales-Gross et al, 2001). Carbohydrates are the main energy source during physical exercise and the daily provision coming from them to supply the demands of exercise as well as to restore the losses caused by training, must be between 50 and 70% of the total energy content (TEC) of the diet, or between 6 to 10g/kg/day (Pamplona, A.P., Kazapi, I.A.M, 2004; Pereira, B.; Souza, Jr, T.P., 2005). Regarding proteins, their main function is to serve as a structural element, but, in some conditions like prolonged exercise and fasting, this nutrient can be oxidized to promote ATP resynthesis (Tarnopolski, M.A., 1999). In addition, when there is an insufficient provision of carbohydrates in the diet, a greater muscle protein catabolism occurs in order to satisfy the energy needs, affecting the athlete's strength and performance (Lancha Jr, 2002). The recommendation of proteins to athletes has a little increment when compared to sedentary population (0,8 to 1,2g/Kg/day) (DRI, 2002), being recommended 1,2 to 1,8g/Kg/day (Tanopolski, M.A., 1999; SBME, 2009) since there is no need for larger amounts in order to promote protein synthesis. This quantity is normally obtained with a protein intake about 12 to 15% of TEC. Lipids, besides their energetic function, are also used in hormones synthesis, participate in the structure of cellular membranes and help with the transport of liposoluble vitamins, therefore, recommendation must be between 25 and 30% of TEC (Soares, E.A, 2001). Since there are not many studies which approach strategies for nutrition of female athletes, especially in the field of handball, this paper aimed to compare the dietetic and anthropometric profile of female handball athletes in pre-training and post-training period (after four months training).

MATERIALS AND METHODS

An assessment of the nutritional profile of 16 women handball athletes was performed. For the anthropometric assessment the following variables were verified: weight, height and skin folds (tricipital, suprailiac, abdominal and thigh). In order to do so, a Filizola scale, a Gofeca stadiometer, and a Cescorf adipometer were used, respectively. The athletes were wearing a minimum of clothes, barefoot and in a comfortable environment. The body fat percentage was calculated using the equations proposed by Jackson (1980) and classified according to the reference of Lohman (1992) quoted by Heyward, V.H. and Stolarczyk, L.M. (2000). Food consumption was evaluated by a feeding inquiry on three days of the week, without taking weekends into account, and calories and macronutrients were determined using DietWin Professional software. Since there are no specific recommendations for female athletes and studies on these groups are still limited, the results were compared with the recommendations proposed by ADA (American Diet Association, Dietitians of Canada, American College of Sports Medicine, 2009). The project was authorized by the Research Ethics Committee from Feevale University, RS, Brazil. The participation of athletes in this study happened through informed consent authorization. The statistical analysis occurred through the statistical package SPSS 12.0 (Statistical Package for Social Science), using descriptive statistics: mean and standard deviation, and t test, Pearson's correlation coefficient to a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

The sample consisted of 16 female handball players with a mean age of 21,5 years (\pm 3,2), and training five days a week, which comprised working out, running, practice with ball and game and competitions according to the state and national handball calendar.

The characteristics of the sample as for means and standard deviations for weight, height, Body Fat % (%G) and Fat-free Mass (MM) of the female athletes can be observed in table 1.

Table 1 – Means and standard deviations for weight, height, %G and MM in both periods

| Variables | Pre-training | Post-training |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Weight (kg) | 56,84Kg (\pm 9,14) * | 58,62Kg (\pm 8,23) * |
| Height (cm) | 164,18cm (\pm 6,88) | 164,6cm (\pm 6,31) |
| Body Fat (%) | 23,2 % (\pm 3,2) | 22,4% (\pm 2,8) |
| Fat-free Mass (kg) | 47,91Kg (\pm 4,7)* | 49,28Kg (\pm 5,3)* |

* Significant difference $p < 0,05$ between pre and post-training

The average daily consumption for the three-day analysis is represented in table 2. The energy consumption in calories was significantly lower ($p < 0,05$) in pre-training when compared to post-training period. CHO consumption is below recommended continuing the same during all training period, and protein consumption although being adequate, increased significantly in the post-training period when compared to pre-training, just like lipids consumption. Liquids intake didn't reach the recommendation in both periods of the study.

Table – 2 Average consumption of calories, macronutrients and liquids

| Variables | Recommendations | Pre-training | Post-training |
|-------------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Total energy content (TEC) Kcal/day | 2103,08 to 2330,44 ^a 2168,34 to 2402,37 ^b | 1883,41Kcal/day (±628,03)* | 2101,62Kcal/day (±804,85)* |
| CHO g/day | 341,04 ^a 351,72 ^b | 284,35 (±90,39) | 280,55 (±118,06) |
| Protein g/day | 68,2 to 90,9 ^a 70,34 to 93,7 ^b | 74,82 (±27,21)* | 83,65 (±30,91)* |
| Lipids (%) | 25 to 30 ^{a,b} | 25,74 (±8,59)* | 32,74 (±9,97)* |
| Liquids (Liters/day) | 2,6 Lts | 1,78 | 1,82 |

Liquids (Liters/day) 2,6 Lts 1,78 1,82 Pre-training recommendation; Post-training recommendation b
* Significant difference $p < 0,05$ between pre and post-training

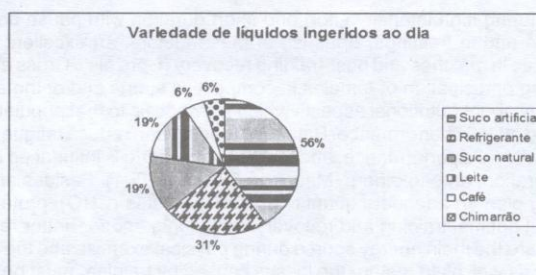


Chart 1: Variety of liquids ingested per day

Regarding the percentage of body fat we observe that there was a significant difference between the collections. The reduction was from 23,2% ($\pm 3,2$) to 22,4% ($\pm 2,8$) in the first and in the second collection, respectively, both considered normal for female athletes, however in the superior limits (until 24%). Analyzing the mean of fat-free mass found in the athletes, we verify an increase in it. In the preparation period the athletes had 47,91Kg of fat-free mass, but right after four months training, this amount increased to 49,28Kg (Table 1). Since some athletes are in growing phase, we verified an increase in height (not significant, though) between the two different collection stages. There was also an increase in weight, and since we verified a reduction in the body fat percentage, we can relate this rise to fat-free mass and not to the athletes' body fat. Analyzing the total energy content (TEC), we can verify that there was a significant difference between the two periods. In pre-training period caloric consumption was 1883,41Kcal/day ($\pm 628,03$) and in post-training (after four months of practice) the caloric value increased, remaining 2101,62Kcal/day ($\pm 804,85$), but in both periods the consumption did not reach the minimum recommended (37 Kcal/kg/day) (Burke, L.M. 2001; SBME, 2009) (Table 2). When we analyze the ingestion of carbohydrates in grams, we verify a significant reduction between the two distinct stages of training. Both samples are below the mean ingestion of carbohydrates considered as ideal (6g/Kg of weight/day) (Burke, L.M. et al 2006) but we can observe that instead of a rise in the consumption of this macronutrient, the athletes diminished its ingestion. In the first collection the ingestion of carbohydrates was 284,35g per day ($\pm 90,39$) considering that the ideal mean for this stage would be 341,04g per day and in the second collection this amount decreased to 280,55g ($\pm 118,06$), regarding that the ideal mean for this stage would be 351,72g as we can see in table 2.

In the study of Pamplona and Kazapi (2004), in which the food consumption was evaluated, though only in men practicing various sports categories, it was observed consumption below recommended for carbohydrates in all categories, exactly like our study. Almeida and Soares (2003) have also verified the low ingestion of carbohydrates in female athletes practicing volleyball. Researches carried out with Brazilian athletes from different sports categories indicate that the daily ingestion of carbohydrates is about, in average, 45 to 50% from the total of energy consumed, a quantity below the orientations proposed to active individuals (Biesek, S. et al., 2005). When we analyze the ingestion of proteins in grams, the values in the first and second collection are within what is considered ideal for the athletes (minimum of 1,2g/Kg of weight per day and maximum of 1,6g/Kg of weight per day or 10 to 15%). There was a significant change between the two collections. In the pre-training period the athletes had an ingestion of 74,82g ($\pm 27,21$) of proteins per day and in post-training this amount increased to 83,65g ($\pm 30,91$) per day (Table 2). Differently from other studies with different sports which showed protein consumption above recommendations (Pamplona and Kazapi, 2004). As for the consumption of fat in the athletes' feeding, we can observe a significant change between the two stages of collection. In pre-training period, we verify an ingestion of lipids of 25,74% ($\pm 8,59$), that is, near the inferior limit considered as ideal (25%). After the four months of practice, however, fat ingestion increased significantly to 32,74% ($\pm 9,97$), even exceeding the ideal superior limit (30%), as it can be observed in table 2. This fact may be related with the period of this collection which was made during the winter, when it is known, there is a higher consumption of calories and mainly lipids, in the southern region of the country, both because of the way food is made and of the kind of ingredients used. In the work of Kazapi and Ramos (1998) with swimmers, it was also found a high consumption of lipids if compared with ideal recommendations. Grandejean (1997), studying elite athletes, showed values between 29 and 49% for the consumption of lipids, however. When we analyze liquids ingestion, we verify that the athletes had an average intake of 1,78Lts per day and what is considered ideal for the age range and gender assessed in this study, is 2,5Lts per day (DRI, 2005) (table 2), therefore, below recommended. Regarding the kinds of liquids ingested during the day, 100% of the athletes mentioned they drank water daily. The second most cited liquid was artificial juice, with 56% (n=9) of acceptance, soda with 31% (n=5), natural juice and milk with 19% (n=3) to each (Chart 1).

CONCLUSION

Based on the results obtained in this study, we verified that there was a little increase in the consumption of calories, and that this rise was caused by the increment of proteins and fats, since the consumption of CHO decreased. It is conceived that the rise in proteins comes from the belief that proteins are fundamental elements for physical performance and that the increase in fats occurred due to the period of collection, which was made during the winter. The hydration of the athletes is not adequate in amount as well and though everyone of them told us they drink water, other beverages with empty calories were also cited with great acceptance such as soda and artificial juice.

REFERENCES

- ADA (American Diet Association, Dietitians of Canada). **American College of Sports medicine (2009)**. Disponível em: <<http://www.acsm.org>>. Acesso em: 15 jul 2011.
- ALMEIDA, T.A.; SOARES, E.A. Perfil dietético e antropométrico de atletas adolescentes de voleibol. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.9, 2003.
- BIESEK, S. et al. **Estratégias de Nutrição e Suplementação no Esporte**. Barueri, SP: Manole, 2005.
- BURKE, L.M. Energy needs for athletes. **Can J Appl Physiol**. n. 26, p. 202-19, 2001.
- BURKE, L.M., LOUCKS, A.B. and BROAD, N. (2006) Energy and carbohydrate for training and recovery. **Journal of Sports Science** n.24, p. 675-685.
- Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Vol. 15, n.3, Mar/Abr, 2009.
- DRI - INSTITUTE OF MEDICINE/ FOOD AND NUTRITION BOARD. Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and aminoacids (macronutrientes). National Academy Press. Washington, 2002. **Food and Nutrition Board**. Institute of Medicine, **National Academies**. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride and Sulfate. 2005. Disponível em: < .
- GONZÁLEZ-GROSS, M., GUTIÉRREZ, A., MESA, RUIZ-RUIZ, J., CASTILLO, JM., **La Nutrición en La Práctica Deportiva: Adaptación de La Pirámide Nutricional a Las Características de La Dieta del Deportista**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. v. 51, n. 4. Caracas, 2001.
- GRANDEJEAN, A.C. Diets of elite athletes: has the discipline of sports nutrition made a impact **Journal Nutrition**. v.127, p.874-877, 1997.
- HEYWARD, V.H.; STOLARCZYK, L. M. **Avaliação da composição corporal aplicada**. São Paulo, SP: Manole, 2000.
- KAZAPI, I.M.; RAMOS, L.A.Z. Hábitos e consumo Alimentares de atletas nadadores. **Revista de Nutrição**. v.11, p.117-124, 1998.
- LANCHA, Jr. A.H. **Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora**. Cap. 6, 2002.
- MAUGHAN, JR., BURKE LM. **Nutrição Esportiva**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004.
- MAUGHAN RJ, SHIRREFFS SM. Nutrition and hydration concerns of the female football player. **Br J Sports Med**. p.1-5, 2007.
- PAMPLONA, A.P.; KAZAPI, I.A.M. Avaliação dietética de praticantes de atividade física em diferentes modalidades esportivas: um estudo comparativo. **Revista Nutrição em Pauta**. Mai/Jun, 2004.
- PEREIRA B. e SOUZA JR, T.P. **Metabolismo celular e exercício físico: aspectos bioquímicos e nutricionais**. São Paulo, SP: Phorte, 2004.
- SOARES, E.A. Manejo nutricional no exercício físico. **Revista Nutrição em Pauta**. São Paulo, SP: Mai/Jun. 2001.
- TARNOPOLSKY, M.A. Protein and physical performance. **Curr Opin Clin Nutritional Metab. Care**, v. 2 p. 533-7, 1999.

RS-239, Número 2755, CEP 93352-000,
 Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil
 E-mail: mariahelena.weber@yahoo.com.br
 Telefone: +55 51 35868926, Fax: +55 51 35868800

COMPARISON OF THE DIETETIC AND ANTHROPOMETRIC PROFILE OF HANDBALL ATHLETES DURING A TRAINING PERIOD

ABSTRACT

In spite of the increasing participation of females in competitive sports and of the advances in medicine and sports nutrition, there are not many studies about nutritional aspects which are specific to that population yet. Therefore, this paper aimed to compare the dietetic and anthropometric profile of female handball athletes during two distinct stages, in the pre-training (beginning of the season) and post-training (after four months training) period. Sixteen female athletes from a handball team were assessed. The methods used were: three-day food journal and verification of anthropometric measures, such as weight, height and skin folds. Analyzing the food consumption of three days, it was found, in the pre-training period an average consumption of 1883,41Kcal, 284,35g of carbohydrates, 74,82g of proteins and 25,74% of lipids. In the post-training period, however, the average consumption was of 2101,62Kcal, 280,55g of carbohydrates, 83,64g of proteins and 32,74% lipids. Regarding hydric intake, we verified that the consumption was below recommended, the athletes' average being 1,78Lts a day. Body fat percentage found was 23,2 % ($\pm 3,2$) and 22,4% ($\pm 2,8$) in the first and second collection respectively, and fat-free mass average was 47,91Kg ($\pm 4,7$) in pre-training and 49,28Kg ($\pm 5,3$) in post-training period. One concludes that the athletes' body fat percentage decreased after four months of training and there was an increase in fat-free mass. There was a significant difference in the handball athletes' feeding habits, in the different stages of training, and food consumption was inadequate regarding calories, macronutrients and hydric intake, if comparing it with the reference consumption. Therefore, this study enhances the need for more nutritional information and for monitoring of the athletes by a professional in the field of nutrition to the optimization of their performance during trainings and competitions.

KEY WORDS: Handball, Macronutrients, Body Fat Percentage.

COMPARAISON DU PROFIL DIETETIQUE ET ANTHROPOMETRIQUES DE ATHLÈTES DE HANDBALL LORS D'UN STAGE

RÉSUMÉ

En dépit de la participation croissante des femmes dans les sports compétitifs et des progrès de la médecine et de la nutrition sportive, il n'y a pas encore beaucoup d'études concernant les aspects nutritionnels spécifiques à cette partie de la population. On a vérifié les profils diététiques et anthropométriques de seize athlètes féminines d'une équipe de handball pendant deux périodes distinctes. Les méthodes utilisées ont été: le journal alimentaire de trois jours et la vérification des mesures anthropométriques (poids, hauteur et plis cutanés).

L'analyse de la consommation alimentaire de trois jours, une pré-consommation moyenne de 1883,41 Kcal, 284,35 g de glucides, 74,82 g de protéines et de 25,74% de lipides. En période après la formation, la consommation moyenne a été de 2101,62 Kcal, 280,55 g de glucides, 83,64 g de protéines et de lipides 32,74%. En ce qui concerne l'apport hydrique, la consommation a été inférieure à celle recommandée étant donné que la moyenne des athlètes est de 1,78 Lts la journée. Le

pourcentage de graisse qui a été trouvé est de 23,2% ($\pm 3,2$) et 22,4% ($\pm 2,8$) la première et deuxième collécte respectivement, et la moyenne la masse maigre a été 47.91 kg ($\pm 4,7$) dans la période précédant la formation et 49.28 kg ($\pm 5,3$) après la formation. Le pourcentage des athlètes qui ont diminué la graisse après quatre mois d'entraînement et ils ont aussi eu une augmentation de la masse maigre. La consommation alimentaire est insuffisante en calories en ce qui concerne les macro éléments et un apport hydrique, si elle est comparée à la consommation de référence. Par conséquent, cette étude renforce le besoin d'une information plus nutritive et pour accompagnement des athlètes par un professionnel dans le domaine de la nutrition à l'optimisation de leur performance lors des formations et des concours.

MOTS CLES: Handball, Macro éléments, Pourcentage de graisse.

COMPARACIÓN DEL PERFIL DE LA DIETA Y DE LA ANTROPOMETRÍA DE ATLETAS DE BALONMANO EN UN PERIODO DE ENTRENAMIENTO

RESUMEN

A pesar del aumento de la participación femenina en los deportes de competición y los avances en la medicina y la nutrición deportiva, hay pocos estudios sobre los aspectos nutricionales específicos para esta población. Este estudio tuvo como objetivo comparar el perfil de la dieta y la composición corporal de las atletas de balonmano en dos fases distintas. Los métodos utilizados fueron: tres días de interrogatorio del consumo de alimentos y las medidas antropométricas, como peso, talla y pliegues cutáneos. El análisis del consumo medio de alimentos en el periodo de pre-entrenamiento fue de 1.883,41 Kcal, 284,35 g de carbohidratos, 74,82 g de proteínas y 25,74% de lípidos. El promedio del consumo post-entrenamiento fue 2.101,62 Kcal, 280,55 g de carbohidratos, 83,64 g de proteínas y 32,74% de lípidos. Con respecto a la ingesta de agua, se observó un consumo por debajo del recomendado, con un promedio de 1,78 Lts. El porcentaje de grasa fue de 23.2% ($\pm 3,2$) y 22,4% ($\pm 2,8$) y la media de la masa corporal magra fue 47,91 kg ($\pm 4,7$) y 49,28 kg ($\pm 5,3$), en la primera y segunda evaluación, respectivamente. Se concluye que el porcentaje de grasa en los atletas disminuyó después de cuatro meses de entrenamiento y hubo aumento en la masa corporal magra. No hubo diferencias significativas en los hábitos alimenticios de los atletas de balonmano en las diferentes fases de entrenamiento, y el consumo de calorías, macronutrientes y de agua, fue insuficiente en comparación con el consumo de referencia. Así, este estudio refuerza la necesidad de más información nutricional y una supervisión de un profesional de la nutrición para un óptimo desempeño durante el entrenamiento y las competiciones.

PALABRAS CLAVE: Balonmano, Macronutrientes, Porcentaje de grasa.

COMPARAÇÃO DO PERFIL DIETÉTICO E ANTROPOMÉTRICO DE ATLETAS DE HANDEBOL DURANTE UM PERÍODO DE TREINAMENTO

RESUMO

Apesar da crescente participação feminina em esportes competitivos e dos avanços na medicina e nutrição esportiva, ainda são poucos os estudos sobre aspectos nutricionais específicos a esta população assim este trabalho objetivou comparar o perfil dietético e antropométrico das atletas de handebol durante duas fases distintas, no período pré-treinamento (início da temporada) e pós-treinamento (após quatro meses de treinamento). Foram avaliadas 16 atletas do gênero feminino de um time de handebol. Os métodos utilizados foram: diário alimentar de três dias e aferição das medidas antropométricas como peso, estatura e dobras cutâneas. Analisando o consumo alimentar de três dias, foi encontrado, no período pré-treinamento um consumo médio de 1883,41Kcal, 284,35g de carboidratos, 74,82g de proteínas e 25,74% de lipídios. Já no período pós-treinamento o consumo médio foi de 2101,62Kcal, 280,55g de carboidratos, 83,64g de proteínas e 32,74% de lipídios. Com relação à ingestão hídrica, verificamos um consumo abaixo do recomendado, sendo a média das atletas de 1,78Lts ao dia. O percentual de gordura encontrado foi de 23,2 % ($\pm 3,2$) e 22,4% ($\pm 2,8$) na primeira e segunda coletas respectivamente, e a média de massa magra foi de 47,91Kg ($\pm 4,7$) no período pré-treinamento e 49,28Kg ($\pm 5,3$) pós-treinamento. Conclui-se que o percentual de gordura das atletas diminuiu após os quatro meses de treinamento e houve um aumento da massa magra. Houve diferença significativa nos hábitos alimentares das atletas de handebol, nas diferentes fases de treinamento, e o consumo alimentar foi inadequado em relação as calorías, macronutrientes e ingestão hídrica, quando comparado com o consumo de referência. Sendo assim, este estudo reforça a necessidade de maiores informações nutricionais e um acompanhamento de um profissional da área de nutrição para a otimização do desempenho durante os treinos e competições.

PALAVRAS-CHAVE: Handebol, Macronutrientes, Percentual de Gordura.

CAPÍTULO 2

CHANGES IN LYMPHOCYTE HSP70 LEVELS IN WOMEN HANDBALL PLAYERS THROUGHOUT ONE YEAR OF TRAINING: THE ROLE OF ESTROGEN LEVELS

**Maria Helena Weber, Ricardo Fagundes da Rocha, Carlos Eduardo Schnorr,
Rafael Schröder and José Cláudio Fonseca Moreira**

Artigo publicado no Journal of Physiology and Biochemistry

DOI 10.0007/s13105-012-0148-0

CAPÍTULO 3

CORRELATION BETWEEN NUTRITIONAL PRACTICE AND OXIDATIVE STRESS IN YOUNG FEMALE HANDBALL ATHLETES DURING ONE YEAR OF TRAINING AND GAMES

Maria Helena Weber*^{1,2}, Carlos Eduardo Schnorr², Renato Arena¹ and José Cláudio Fonseca Moreira²

¹School Clinics of Nutrition, Institute of Health Sciences, Superior Teaching Establishment Federation University (Universidade Feevale), Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil;

²Center of Oxidative Stress Research (CEEQ), Professor Tuiskon Dick Department of Biochemistry, Institute of Health Basic Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

Artigo submetido ao periódico Journal of Sports Science and Medicine

CORRELATION BETWEEN NUTRITIONAL PRACTICE AND OXIDATIVE STRESS IN YOUNG FEMALE HANDBALL ATHLETES DURING ONE YEAR OF TRAINING AND GAMES

Weber, M.H.,^{*1,2} Schnorr, C.E.,² Arena, R.,¹ and Moreira, J.C.F.²

¹ School Clinics of Nutrition, Institute of Health Sciences, Superior Teaching Establishment Federation University (Universidade Feevale), Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil

² Center of Oxidative Stress Research (CEEQ), Professor Tuiskon Dick Department of Biochemistry, Institute of Health Basic Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author

Maria Helena Weber

Federal University of the Rio Grande do Sul (UFRGS)

Rua Ramiro Barcelos, número 2600, prédio Anexo, laboratório 32, CEP 90035-003

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Phone: +55 051 33085577/ +55 051 33085578

Fax: +55 051 33085540

E-mail address: mariahelena.weber@yahoo.com.br

Running head: **Nutritional and oxidative stress in athletes**

ABSTRACT

Objectives: Despite the increase in female participation in competitive sports and the many advances in sports medicine and nutrition, there are only few studies on the nutritional aspects of this specific population. The purpose of the present study was to assess the dietetic profile of this population and find correlations with markers of oxidative stress.

Methods: We conducted a prospective cohort study consisting of 30 female handball athletes (12–24 years old). Their usual dietary intake was obtained by a 24h food recall and 7-day food record. We evaluated the calories, macronutrients (proteins, carbohydrates, and lipids), and micronutrients (vitamins A, C, and E, and zinc and selenium) as well as the parameters of oxidative damage such as malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PC), sulfhydryl (SH), and total reactive antioxidant potential (TRAP).

Results: The energy consumption in $\text{kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ was significantly lower ($p < 0.05$) during the pre-training period than during the mid-season. The carbohydrate consumption was below the recommended average daily allowance throughout the season, while the protein intake ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) was below the recommended allowance in 43.3%, 26.7%, and 33.3% of the athletes during the pre-, mid-, and late season, respectively. However, 50% of the group exceeded the recommended protein intake. Regarding the redox parameters, we observed a significant negative correlation between vitamin C intake and lipid peroxidation (MDA) ($p = 0.016$) and a positive, although non-significant ($p = 0.063$), correlation between vitamin A intake and TRAP.

Conclusion: In the present study, the calorie and nutrient intakes were not adequate in female athletes. Oxidative damage (MDA) was lower when vitamin C

intake was higher. The total antioxidant potential (TRAP) was higher, although not significantly, in athletes who took more vitamin A. The remaining micronutrients do not seem to be correlated with the biomarkers of oxidative damage.

Keywords: Women; Nutrition; Oxidative damage; Energy; Vitamin.

INTRODUCTION

Despite an increase in women's participation in competitive sports and the many advances in sports medicine and nutrition, there are only few studies on the nutritional aspects of female athletes. Although studies on women have many biases including difficult-to-control variables such as hormonal changes, the menstrual cycle, etc., this population is increasingly participating in both recreational and high-performance sports and should be better studied (Maughan and Shirreffs, 2007). Handball is a sport with high physical exertion (80% VO_{2max}) over a short duration with emphasis on motor skills such as speed and strength, which require highly developed anaerobic power (i.e., metabolic pathway) (Rannou et al. 2001).

Despite the existence of are gender differences and that nutrition and hydration guidelines are developed on the basis of studies on males (Maughan and Shirreffs, 2007), there is no doubt that a healthy and appropriate diet is essential for an athlete's physical performance and helps maximize training and recovery speed while improving health and performance (Gonzalez et al. 2001). It is well known that food and beverages affect health, weight, body composition, and athletic performance, thus increasing the interest in the field of sports nutrition (American Diet Association, Dietitians of Canada, American College of Sports Medicine, 2000).

Another area of current interest is the consumption of micronutrients with antioxidant potential (e.g., ascorbate, tocopherols, carotenoids, and bioflavonoids) present in fruits and vegetables rich in antioxidant nutrients (Watson et al., 2005)

since intense physical exercise may increase the production of reactive oxygen species (ROS) and free radicals in different tissues (Halliwell and Gutteridge, 2007).

This has raised interest in various fields, especially in the prescription of dietary supplements, including macromolecules such as lipids, proteins, and nucleic acids as well as supplements with the potential to reduce oxidative damage in cells and tissues (Ji, 1999; Schoder et al., 2000). The antioxidant nutrients examined in the present study include vitamins A, C, and E as well as zinc and selenium.

Since few studies approach the subject of nutritional strategies for female athletes, especially for handball, the primary objective of this study was to evaluate the dietary intake of calories, macronutrients (i.e., carbohydrates, proteins, and lipids), and antioxidant nutrients (vitamins A, C, and E, and zinc and selenium) by female handball athletes. The secondary objective was to analyze the correlation between the consumption of antioxidants of interest and biomarkers of oxidative damage and plasma antioxidant capacity since there is no data about their variability in female handball athletes over a training period. At present, it is unclear whether supplementation of these nutrients is needed. Therefore, this work aims to avoid possible excesses in the consumption of supplements for example.

METHODS

Study design

We conducted a prospective cohort study in which we evaluated 47 female handball athletes who were members of the Santa–Feevale team in Novo Hamburgo, Brazil (12–24 years old). The Committee of Ethics and Research of Feevale University approved the research protocol of this study (number: 2.08.02.08.1279), which is in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from all participants. The study was

conducted over 3 different 9-month periods: the pre-season (beginning of the year's training), mid-season (4 months after beginning of training), and late season (9 months after the beginning of the study).

Training and season periods

The periods of intense training included afternoons and nights, totaling 10–11 training sessions per week (Monday to Saturday) for 3–4h daily. During the competition period, training took place according to the game schedule. The athletes took part in 14 competitions among other teams in the Brazilian Championship and National Handball League during the study period. Thirty athletes completed all stages of the research and were included in the study. The participants were divided into different groups according to age: 11–14, 15–18, and above 19 years (hereafter referred to as 19–24 years).

Nutritional assessment

Data on the athletes' usual dietary intake were obtained by a 24-h diet recall administered by the same nutritionist during the 3 study periods and a 7-day diet record filled in by the athletes. The athletes were instructed to record all foods and beverages consumed including brand, type, and method of preparation with the portion/amount in household measures. Participants were further instructed to maintain their usual eating habits during the study period. They were also asked about allergies and/or food intolerances, and supplement intake. All measurements were converted to milliliters (mL) and grams (g). To calculate the calorie and nutrient intake, we used Dietwin Professional (version 8) nutrition software. Intake adequacy was assessed according to the recommendations proposed by the American Diet Association (ADA), Dietitians of Canada, American College of Sports Medicine (2000) and the Dietary Recommended Intake (DRI, 2000).

To assess micronutrient intake, we had to change the 11–14 years age group since recommendations for vitamin and mineral intake for 11–13-year-old individuals differ from those of the 14-year-old individuals, which are the same as those for 15–18-year-old individuals. Thus, this age was grouped in this category. Diets were analyzed by a single examiner to increase the reliability and to minimize the potential variations when interpreting the dietary surveys (Burke and Deakin, 2006).

Anthropometric evaluation

Anthropometric evaluation was conducted during each phase of the study. The weights and heights were measured using a Welmy™ mechanical scale (± 0.1 kg) and a Gofeca™ wall-mounted stadiometer with no baseboard (± 0.1 cm), respectively. Skinfolds (triceps, abdomen, subscapular, suprailiac, and thigh) were measured using a Cescorf™ skinfold caliper according to the International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK, 2000).

Oxidative stress

The parameters for evaluating oxidative stress were levels of thiol groups (SH) and carbonyl groups (an index of oxidative damage to proteins), malondialdehyde (MDA, an index of lipid peroxidation), and total reactive antioxidant potential (TRAP, total antioxidant capacity of plasma).

Blood samples (10 mL) were taken from a vein in the antecubital region into tubes containing EDTA as an anticoagulant. The athletes were instructed to fast for 12 hours (overnight fasting) and not to use any antioxidant supplements and/or vitamins, as well as to inform if they had been taking any medication up to 30 days before sampling. Plasma and cells were then separated by centrifugation at $1800 \times g$ at 5°C for 10 min. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was measured as an index of lipid oxidation. The TBARS test consists of an acid-heating reaction of the

lipid peroxidation end product, MDA, with thiobarbituric acid (TBA). TBARS was measured at 532 nm, and the results are expressed as $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{protein}^{-1}$ (Draper and Hadley, 1990). To analyze protein oxidation, we measured the carbonyl content on the basis of the reactions of dinitrophenylhydrazine with protein carbonyl groups, and the results are expressed as $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{protein}^{-1}$ (Levine et al., 1990). The total content of sulfhydryl (SH), which is present in proteins as well as glutathione, was measured at 412 nm by its reaction with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and the results are expressed as $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{protein}^{-1}$ (Ellman, 1959). TRAP was used as an index of non-enzymatic antioxidant capacity on the basis of peroxy radical (generated by AAPH solution, 2,2'-azobis[2-amidinopropane] with luminol) quenching by sample compounds. Readings were recorded on the basis of the chemiluminescence emission. Briefly, we prepared an AAPH solution, added luminol (AAPH + luminol, a radical generating system), and then waited for the system to stabilize for 2 h before taking the first reading. After adding the samples, we analyzed the readings from the luminometer counter in 96-well microplates for nearly 60 min. The results were transformed into percentages, and the area under curve (AUC) was calculated using GraphPad software version 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As for TRAP, it is important to highlight that smaller AUCs indicate greater antioxidant potential (i.e., an inversely proportional relationship) (Lissi et al., 1992; Dresch et al., 2009).

Statistical analysis

Quantitative variables are expressed as means and standard deviations (symmetric distribution) or medians and interquartile ranges (asymmetric distribution). Qualitative variables are expressed as absolute and relative frequencies. To compare the parameters over time, we used analysis of variance (ANOVA) for

repeated measurements with a Bonferroni post hoc test. In case of asymmetry, we used the Friedman test followed by the Wilcoxon test. The McNemar chi-square test was used to compare the qualitative parameters over time. Spearman's correlation test was applied to evaluate correlations among the variables. Data were analyzed using SPSS software version 18.0. The accepted level of significance was set at 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTS

Anthropometric evaluation

The present study included 30 female handball players divided into 3 groups by age according to the handball competition categories. The anthropometric data of all athletes are shown in Table 1.

When evaluating the diet, no food intolerances or allergies were reported, and the only supplement used during some competitions was maltodextrin.

The average daily intake values obtained by averaging the 24-h recall and 7-day records are shown in Tables 2 and 3.

Energy consumption in calories per kilogram of body weight per day ($\text{kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) was significantly lower ($p < 0.05$) in the pre-season than in the mid-season but not in the late season. The carbohydrate intake, both in percentage and weight (g), remained below the recommended allowance (ADA, 2000) in the 3 season periods (Table 2).

Energy consumption was below the recommendations for 66.7% ($n = 20$) of the athletes during the pre-season, 36.7% ($n = 11$) during mid-season, and 60% ($n = 18$) during late season with a significant difference ($p = 0.019$) between the pre-season and mid-season. Protein consumption ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) was below the recommended allowances for 43.3% ($n = 13$) of the athletes during the pre-season,

26.7% (n = 8) during mid-season, and 33.3% (n = 10) during late season; however, 50% of the athletes (n = 15) reported an intake above the recommended allowance.

There was a significant difference ($p \leq 0.05$) between the pre-season and mid-season (Table 2). Vitamin C intake in the pre, mid, and late seasons was 191.35%, 108%, and 118.76% of the DRI, respectively, and that of Zn was 103.45%, 122.58%, and 121.2%. The remaining micronutrients analyzed stayed below the recommendations (DRI) (Table 3).

There was no significant correlation between any of the dietary variables and carbonyl or sulfhydryl levels during the 3 periods (pre-season, mid-season and late season) (Table 4). With respect to MDA, we observed a significant negative correlation between vitamin C intake and lipid peroxidation (MDA) ($p = 0.016$), and a positive although non-significant ($p = 0.063$) correlation between vitamin A intake and TRAP (Table 4).

DISCUSSION

The objective of this study was to determine the dietary profile of the study group and to determine the correlations between some biomarkers of oxidative damage and the antioxidant capacity of plasma with the intake of selected micronutrients usually associated with antioxidant protection.

Calories and macronutrients

In the present study, the handball athletes had a lower average daily calorie intake than recommended, which may be related to their return to training. Some athletes were overweight when training resumed, which could explain the initial low calorie intake (66, 7% of the group) (Table 2). The caloric intake per kg body weight per day showed an even higher deficit since in both the pre- and late seasons, calorie intake was below the recommended minimum allowance ($37 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$).

The minimum allowance was exceeded in the mid-season ($38.24 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) but just barely (Table 2). Studies with female soccer players also found energy intake below recommendations ($31.0 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) (Martin et al., 2006; Fogelhom, 1994). This dietary pattern is frequently observed in endurance and aesthetical sports as well as in sports wherein classification is determined by body weight (Loucks, 2004; Genton 2010). Despite these observations, we found a linear growth and body weight increase in younger athletes (Table 1) that can predict adequate energy intake that had not been observed because of the limitations of the techniques used. The distribution of macronutrients in the diet also drew our attention. Although there was an increase in calories in the mid- and late seasons compared to the pre-season (Table 2), it was not due to an increase in protein intake and not carbohydrates ($p < 0.05$). This demonstrates that athletes still emphasize protein intake perhaps because they still ascribe muscle mass increases solely to protein intake.

Over the entire training season, we observed that calorie and carbohydrate intake were below the recommendations for most participants. It is known that a positive energy balance is essential for adaptations to training, cognitive function, and the immune system (Bacurau, 2002). Furthermore, carbohydrates are the main source of energy during exercise and are crucial in maintaining glycogen stores and helping with the post-training recovery (Burke, 2001; Burke et al. 2006, Maughan and Shirreffs, 2007). Studies on college athletes (Hinton and Beck, 2005) and female soccer players (Rosenbloom et al., 2006) also found low calorie intakes, usually due to low carbohydrate consumption. These results corroborate the present results in that 56.7% and 76.7% of the athletes consumed fewer carbohydrates than recommended during the pre- and mid-seasons, respectively (Table 2).

In the pre-season, 60% ($n = 18$) of the athletes consumed a higher percentage of protein than recommended ($1.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$); however, in terms of absolute consumption (i.e., g/kg), we observed that this level decreased to 30% ($n = 9$) (Table 2). Meanwhile, we found that 43.3% and 33% of the athletes during the pre- and late season did not meet the minimum recommended levels of protein intake ($1.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$). When comparing calorie consumption throughout the season, we found that during the mid-season, 40% of the group had an adequate calorie intake compared with the pre-season when only 13% of the group had adequate intake. We also found that this increase in consumption was due to an increase in both carbohydrates and proteins; during the pre-season, 9 athletes consumed more protein than the recommendations, while during mid-season, 15 athletes began consuming more than the recommended allowance. Despite evidence indicating that training does not benefit from an over-consumption of protein (Tipton and Wolfe, 2004; Tarnopolsky, 1999), many athletes had this habit in the present study. We found that lipid consumption was adequate for most athletes during the 3 periods of the study (Table 2).

Micronutrients

Regarding micronutrient consumption, biomarkers of oxidative damage, and the antioxidant capacity of plasma, the results show that vitamin C consumption was associated with greater protection against oxidative damage. The athletes had a higher intake of this vitamin with lower plasma MDA levels ($p = 0.016$) (Table 4).

As for vitamin A consumption, we found that although athletes with a greater vitamin A intake exhibited higher total antioxidant capacity (TRAP), the correlation was not significant ($p = 0.063$) (Table 4). This may be in part because the consumption of vitamin A reached 67.86%, 72.5%, and 82.14% of the DRI in the pre-

, mid-, and late seasons, respectively (Table 3). Perhaps if the sample was larger or if consumption had reached 100% of the DRI, we would obtain statistically significant results similar to those with vitamin C of which the consumption was 191.35%, 108%, and 118.76% of the DRI during the pre-, mid-, and late seasons, respectively.

These results are concordant with those of other studies showing that a diet rich in antioxidant foods such as fruits and vegetables may have a protective effect against oxidative stress (Boaventura et al., 2011; Block et al., 2002). However, there are still a only few studies that quantitatively relate the consumption of antioxidants in the diet to oxidative damage (Lasheras et al., 2003). The use of supplements in sports is not uncommon, and although many studies demonstrate the benefits of antioxidant vitamins (i.e., A, C, and E), which are deemed important in protecting against oxidative stress induced by exercise, there is still much controversy regarding the need or efficacy of micronutrient supplementation for athletes (Ji, 1999; Schroder et al., 2000; Chevion et al., 2003; Bonina et al., 2005). Despite technical limitations in evaluating dietary intake, we believe that the decrease in MDA is also associated with the consumption of fruits and vegetables and not just an adaptation to exercise. It is known that physical training promotes adaptation to oxidative stress (Ferreira and Reid, 2008; Powers et al., 1999; Sahlin et al., 2010) and that trained individuals have lower levels of lipid peroxidation than untrained ones (Bloomer et al., 2008). Our study considered the usual dietary intake of the study participants over a training period. We used the athletes as internal controls, thus minimizing potential distortions arising from comparing different individuals with different genetics and physiologies as well as forced interpretations by using overall averages. The use of individuals as their own controls minimizes errors in the experimental design as well as intrinsic variations among individuals that could mask data and interpretations.

Lately, many studies have highlighted the relationship between the consumption of fruits and vegetables, and antioxidant concentrations in the blood (Dauchet et al., 2008). Furthermore, other studies show that these benefits are not achieved with supplementation (Schneider et al., 2009; Muntwyler et al., 2002; Frank et al., 2000), while still others found associations between supplementation and adverse health effects and a pro-oxidant state (Berger, 2005; Oliveira et al., 2007).

The roles of diet in modulating oxidative stress in athletes who are subjected to elevated mitochondrial reactive species production or other metabolic pathways, according to the requirements of training, competitions, and seasons require further study. Most studies are still conducted *in vitro* or as animal models using supplements and do not take into account the actual state of the athletes, their nutrition, or daily requirements; this may represent a complete change in the notions used to empirically design diets and training regimens. We believe that our study will help produce better-founded notions for the design of diets for young female athletes during the annual training and competitions.

CONCLUSION

The results of the present study with female athletes show that (1) calorie and carbohydrate intake is lower than recommended for most athletes while protein intake exceeds recommendations; (2) MDA is significantly lower in athletes who have higher vitamin C intake; (3) although not statistically significant, vitamin A intake is positively correlated with total antioxidant capacity (TRAP). The remaining micronutrients are not correlated with biomarkers of oxidative damage. Despite the limitations of the techniques used our study, we believe that a balanced diet should be the first choice for both untrained individuals and athletes and that supplementation should be approached with greater caution.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*/National Council for Research and Development (CNPq), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*/Coordination for Improvement of Superior Level Personnel (CAPES), and the *Rede Instituto Brasileiro de Neurociência*/Net Brazilian Institute of Neuroscience (IBN-Net) – 01.06.0842-00. We would also like to thank Universidade Feevale and the UFRGS, a public university in Brazil, where the study was performed.

REFERENCES

- ADA - American Dietetic Association, Dieticians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. (2000) *Journal of the American Dietetic Association* 100, 1543-1556.
- Bacurau, R.F.P., Bassit, R.A., Sawada, L., Navarro, F., Martins Jr., E. and Costarosa, L.F.B.P. (2002) Carbohydrate supplementation during intense exercise and the immune response of cyclists. *Clinical Nutrition* 21(5), 423-429.
- Berger, M.M. (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition* 24, 172-183.
- Block, G., Dietrich, M., Norkus, E.P., Morrow, J.D., Hudes, M., Caan, B. and Parker, L. (2002) Factors associated with oxidative stress in human populations. *American Journal of Epidemiology* 1, 156(3), 274-285.
- Bloomer, R.J., Kelsey, H. and Fischer-Wellman, B.S. (2008) Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise, training status, and dietary intake. *Gender Medicine* 5, 218-228.
- Boaventura, B.C.B, Di Pietro, P.F., De Assis, M.A.A., Ambrosi, C., Nesello, L.A.N., Da Silva, F.O., Vasconcelos, F.A.G., Moreira, J.C.F. and Fausto M.A. (2011) Antioxidant biomarkers and food intake in elderly women. *Journal of Nutrition, Health, and Aging* 5, 1-5.
- Bonina, F.P., Puglia, C., Cimino, F., Trombetta, D., Tringali, G., Roccazzello, A.M., Insirello, E., Rapisarda, P. and Saija, A. (2005) Oxidative stress in handball players: effect of supplementation with a red orange extract. *Nutrition Research* 25, 917-924.
- Burke, L. and Deakin, V. (2006) Measuring nutritional status of athletes: clinical and research perspectives. In: *Clinical sports nutrition*. 3rd edition Australia: McGraw Hill. 35-69.
- Burke, L.M., Loucks, A.B. and Broad, N. (2006) Energy and carbohydrate for training and recovery. *Journal of Sports Science* 24, 675-685.
- Burke, L.M. (2001) Energy needs for athletes. *Canadian Journal of Applied Physiology* 26, 202-219.
- Chevion, S., Moran, D.S., et al. (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proceedings of the National Academy of Science* 100(9), 5119-5123.
- Dauchet, L., Péneau, S., Bertrais, S., Vergnaud, A.C., Estaquio, C., Kesse-Guyot, E., Czernichow, S., Favier, A., Faure, H., Galan, P. and Hercberg, S. (2008) Relationships between different types of fruit and vegetable consumption and serum concentrations of antioxidant vitamins. *British Journal of Nutrition* 100(3), 633-641.

Draper, H.H. and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421-431.

Dresch, M.T., Rossato, S.B., Kappel, V.D., Biegelmeier, R., Hoff, M.L., Mayorga, P., Zuanazzi, J.A., Henriques, A.T. and Moreira, J.C. (2009) Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Analytical Biochemistry* 385, 107-114.

Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.

Ferreira, L.F. and Reid, M.B. (2008) Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology* 104, 853-860.

Fogelhom, M. (1994) Vitamins, minerals and supplementation in soccer. *Journal of Sports Science* 12, 23-27.

Frank, E., Bendich, A. and Denniston, M. (2000) Use of vitamin-mineral supplements by female physicians in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 72, 969-975.

Genton, L., Melzer, K. and Pichard, C. (2010) Energy and macronutrient requirements for physical fitness in exercising subjects. *Clinical Nutrition* 29, 413-423.

González-Gross, M., Gutiérrez, A., Mesa, Ruiz-Ruiz, J., Castillo, J.M. (2001) La Nutrición en La Práctica Deportiva: Adaptación de La Pirámide Nutricional a Las Características de La Dieta del Deportista. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51, 4.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th edition. Oxford University Press, New York.

Hinton, P.S. and Beck, N.C. (2005) Nutrient intakes of men and women collegiate athletes with disordered eating. *Journal of Sports Science and Medicine* 4, 253-262. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes (DRI)*. (2000) National Academy Press, Washington, D.C.

International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK). *International Standards for Anthropometric Assessment*. National Library of Australia, Adelaide.

Ji, L.L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 222(3), 283-292.

Lasheras, C., Gonzalez, S., Huerta, J.M., Lombardia, C., Ibañez, R., Patterson, A.M. and Fernandez, S. (2003) Food habits are associated with lipid peroxidation in an elderly population. *Journal of the American Dietetic Association* 103, 1470-1477.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.

Lissi, E., Pascual, C. and Del Castillo, M.D. (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Research Communications* 17, 299-311.

Loucks, A.B. (2004) Energy balance and body composition in sports and exercise. *Journal of Sports Science* 22, 1-14.

Martin, L., Lambeth, A. and Dawn, S. (2006) Nutritional practices of national female soccer players: analysis and recommendations. *Journal of Sports Science and Medicine* 5, 130-137

Maughan, R.J. and Shirreffs, S.M. (2007) Nutrition and hydration concerns of the female football player. *British Journal of Sports Medicine* 41(Suppl 1): i60–i63.

Muntwyler, J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Buring, J.E. and Gaziano, J.M. (2002) Vitamin supplement use in a low-risk population of US male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Archives of Internal Medicine* 162, 1472-1476.

Oliveira, M.R., Pasquali, M.A.B., Silvestrin, R.B., Souza, T.M. and Moreira, J.C.F. (2007) Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotor and exploratory activity of adult rats. *Brain Research* 1169, 112-119.

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

Rannou, F., Priorex, J., Zorehal, H., Gratos de Lamarque, A. and De Lamarque, P. Physiological profile of Handball players. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 2001; 41, 349-353.

Rosenbloom, C.A., Loucks, A.B. and Ekblom, B. (2006) Special populations: the female player and the youth player. *Journal of Sports Science* 24, 783-793.

Sahlin, K., Shabalina, I.G., Mattsson, M.C., Bakkman, L., Fernström, M., Rozhdestvenskaya, Z., Enqvist, J.K., Nedergaard, J., Ekblom, B. and Tonkonogi, M. (2010) Ultraendurance exercise increases the production of reactive oxygen species in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 108, 780-787.

Schneider, C.D., Silveira, M.M., Bellóklein, A., Moreira, J.C.F. and Oliveira, A.R. (2009) Antioxidant vitamin supplementation and oxidative stress in triathletes. *Gazzetta Medica Italiana. Archivio per le Scienze Mediche* 168, 23-30.

Schoder, H., Navarro, E., Tramullas, A., Mora, J. and Galiano, D. (2000) Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three-compound antioxidative supplement. *International Journal of Sports Medicine* 21, 146-150.

Tarnopolsky, M.A. (1999) Protein and physical performance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2, 533-537.

Tipton, K.D. and Wolfe, R.R. (2004) Protein and amino acids for athletes. *Journal of Sports Science* 22, 65-79.

Watson, T.A., Callister, R., Taylor, R.D., et al. (2005) Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 37, 63-71.

Table 1. Anthropometric characteristics of the participants by age and time period

| Category | Variables | Period | | |
|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Pre-season | Mid-season | Late season |
| 12–14 years | Weight (kg) | 52.83 ± 9.87 | 54.46 ± 8.88 | 55.38 ± 8.76 |
| | Height (cm) | 160.25 ± 5.94 | 161.43 ± 5.57 | 162.31 ± 5.70 |
| | BMI | 20.47 | 20.83 | 20.94 |
| 15–18 years | Weight (kg) | 59.36 ± 8.54 | 61.69 ± 8.26 | 61.53 ± 9.15 |
| | Height (cm) | 165.05 ± 5.99 | 165.45 ± 6.21 | 165.50 ± 6.21 |
| | BMI | 21.9 | 22.63 | 22.59 |
| 19–24 years | Weight (kg) | 65.51 ± 8.17 | 66.57 ± 7.72 | 65.87 ± 7.78 |
| | Height (cm) | 169.02 ± 4.66 | 169.04 ± 4.66 | 169.04 ± 4.66 |
| | BMI | 22.9* | 23.26* | 23.02 |

Results are expressed as mean (SD). * Significant difference ($p < 0.05$) between pre-season and mid-season

Table 2. Average calorie and micronutrient intake by season period compared to the recommended allowances

| Variables | Recommendations | Season Period | | |
|---|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | | Pre-season | Mid-season | Late season |
| Kcal/kg/day ^{†*} | 37–41 | 34.4 ± 11.45 | 38.24 ± 10.96 | 36.33 ± 11.44 |
| TEI (kcal·kg⁻¹·day⁻¹) ^{††*} | 2327.26 ± 250 | 1989.46 ± 549.72 | 2299.17 ± 592.68 | 2172.78 ± 548.19 |
| Agreement with recommendations (n (%)) [†] | Below | 20 (66.7) | 11 (36.7) | 18 (60) |
| | Equal | 4 (13.3) | 12 (40.0) | 5 (16.7) |
| | Above | 6 (20) | 7 (23.3) | 7 (23.3) |
| CHO (%) | 60–70 | 56.27 ± 7.27 | 54.32 ± 7.97 | 57.96 ± 5.67 |
| Agreement with recommendations (n (%)) | Below | 17 (56.7) | 23 (76.7) | 17 (56.7) |
| | Equal | 13 (43.3) | 7 (23.3) | 12 (40) |
| | Above | 0 | 0 | 1 (3.3) |
| CHO (g·kg⁻¹·day⁻¹) | 6–10 | 4.86 ± 1.72 | 5.19 ± 1.72 | 5.25 ± 1.73 |
| Agreement with recommendations (n (%)) | Below | 25 (83.3) | 19 (63.3) | 21 (70) |
| | Equal | 4 (13.3) | 11 (36.7) | 8 (26.7) |
| | Above | 1 (13.9) | 0 | 1 (3.3) |
| Prot. (%) | 15 | 15.52 ± 3.6 | 16.37 ± 4.04 | 15.47 ± 3.57 |
| Agreement with recommendations (n (%)) | Below | 3 (10) | 3 (10) | 7 (23.3) |
| | Equal | 9 (30) | 11 (36.7) | 5 (16.7) |
| | Above | 18 (60) | 16 (53.3) | 18 (60) |
| Prot. (g·kg⁻¹·day⁻¹) | 1.2–1.4 | 1.32 ± 0.49 | 1.53 ± 0.49 | 1.37 ± 0.46 |
| Agreement with recommendations (n (%)) [†] | Below | 13 (43.3) | 8 (26.7) | 10 (33.3) |
| | Equal | 8 (26.7) | 7 (23.3) | 12 (40) |
| | Above | 9 (30) | 15 (50) | 8 (26.7) |
| Lip. (%) | 20–35 | 28.19 ± 6.67 | 29.30 ± 7.70 | 26.56 ± 5.18 |
| Agreement with recommendations (n (%)) | Below | 4 (13.3) | 4 (13.3) | 3 (10) |
| | Equal | 21 (70) | 18 (60) | 27 (90) |
| | Above | 5 (16.7) | 8 (26.7) | |

TEI, Total energy intake; kcal·kg⁻¹·day⁻¹, kilocalories per kg per day; CHO, carbohydrates; Prot., proteins; Lip., lipids

* Results are expressed as mean (SD)

† Significant difference between pre-season and mid-season ($p \leq 0.05$)

†† Significant difference between pre-season and mid-season ($p = 0.019$)

Table 3. Micronutrient intake adequacy during the 3 season periods

| Micronutrients | DRI | Intake in each period* | | | | | |
|-----------------|--|------------------------|--------|--------------------|--------|----------------------|--------|
| | | Pre-season | | Mid-season | | Late season | |
| | | Median (P25–P75)* | % DRI | Median (P25–P75)* | % DRI | Median (P25–P75)* | % DRI |
| Vit. A (µg/d) | 600 [†] ; 700 ^{‡§} | 465 (361–545) | 67.86 | 507 (377–800) | 72.5 | 553 (364–977) | 82.14 |
| Vit. E (mg/d) | 11 [†] 15 ^{‡§} | 4.6 (3.1–8.9) | 35.48 | 6.26 (5.0–11.1) | 46.57 | 6.37 (4.42–10.61) | 50.70 |
| Vit. C (mg/d) | 45 [†] ; 65 [‡] ; 75 [§] | 115.2 (38.2–196.1) | 191.35 | 63.74 (41.8–154.6) | 108.56 | 71.10 (47.10–158.42) | 118.76 |
| Zinc (mg/d) | 8 ^{†§} ; 9 [‡] | 8.5 (3.5–13.6) | 103.45 | 10.59 (8.3–15.4) | 122.58 | 10.50 (7.48–16.10) | 121.02 |
| Selenium (µg/d) | 40 [†] ; 55 ^{‡§} | 21.7 (17–25) | 40.75 | 23.00 (20.7–27.0) | 45.82 | 21.00 (18.90–5.20) | 40.00 |

* Interquartile range (difference between the 25th (P25) and 75th (P75) percentiles,

[†] Dietary reference intake for females from 9–13 years old;

[‡] Dietary reference intake for females from 14–18 years old;

[§] Dietary reference intake for females from 19–24 years old.

Table 4. Correlations among biomarkers of oxidative stress and micronutrients according to Spearman's correlation coefficient

| Micronutrients | TBARS | | Carbonyl | | SH | | TRAP | |
|-----------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|
| | r _s | p | r _s | p | r _s | p | r _s | p |
| Vit. A (µg/d) | -0.121 | 0.523 | 0.073 | 0.705 | -0.057 | 0.766 | 0.344 | 0.063 |
| Vit. E (mg/d) | 0.083 | 0.665 | 0.134 | 0.490 | -0.026 | 0.893 | -0.210 | 0.264 |
| Vit. C (mg/d) | -0.437 | 0.016 | 0.109 | 0.575 | -0.157 | 0.407 | 0.201 | 0.288 |
| Zinc (mg/d) | -0.192 | 0.311 | -0.50 | 0.766 | -0.064 | 0.737 | 0.007 | 0.969 |
| Selenium (µg/d) | -0.283 | 0.130 | 0.118 | 0.542 | -0.122 | 0.519 | -0.168 | 0.376 |

Vit., vitamin; TBARS (expressed in nmol MDA/mg protein); carbonyl (nmol carbonyl/mg protein); SH (nmol·SH⁻¹·mg protein⁻¹); TRAP (arbitrary units); p (p value).

PARTE III

3. DISCUSSÃO

Apesar do avanço nas pesquisas com atletas, ainda são poucos os estudos com mulheres atletas e, mais ainda, no que diz respeito à relação entre o exercício e os parâmetros de estresse oxidativo. Esse fato talvez possa ser explicado pelas dificuldades na definição da amostra por fatores como flutuação hormonal, ciclo menstrual, entre outros. No presente estudo investigamos há existência de relação entre os níveis de estradiol e os parâmetros ligados ao ambiente redox e aos níveis de HSP sérico extracelular, bem como se o consumo de nutrientes antioxidantes está correlacionado com os parâmetros de estresse oxidativo, em mulheres atletas de handebol durante 12 meses de treinamento regular.

As atletas foram divididas em dois grupos de acordo com os níveis de estradiol: Estradiol Baixo (EB) (até 30 pg.mL⁻¹) e Estradiol Normal (EN) (30-330 pg.mL⁻¹), considerado-se normal entre 30 e 330 pg.mL⁻¹ independente da fase do ciclo menstrual como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Nível plasmático de estradiol (Centerlab[®], Beckman Coulter).

| CICLO MENSTRUAL | REFERENCIAS |
|------------------------|--------------------|
| Fase folicular | 30 - 120 pg/ml |
| Pico ovulatorio | 90 - 330 pg/ml |
| Fase lútea | 65 - 180 pg/ml |
| Menopausa | Abaixo de 30 pg/ml |
| Homens | 15 - 80 pg/mL |

O período de treinamento incluiu os turnos da tarde e noite, totalizando 10 a 11 treinos semanais (segunda a sábado), com 3 a 4 horas diárias. No período de competições os treinos ocorriam de acordo com o calendário de jogos. As atletas participaram de várias competições no período de estudo, dentre elas Campeonato Brasileiro e Liga Nacional de Handebol. Trinta atletas participaram de todas as etapas da pesquisa, e foram incluídas no estudo. Os níveis de HSP70 intra e extracelular, os parâmetros de estresse oxidativo e o consumo dietético foram avaliados em três períodos do ano de 2009, a saber: a) primeira coleta, entre 9 e 14 de março (período anterior ao início do treinamento); b) segunda coleta, entre 18 e 25 de julho, e c) terceira coleta, entre 5 e 12 de novembro (períodos de treinamento e competições estaduais e interestaduais).

O capítulo I teve por objetivo comparar o perfil dietético e antropométrico em dois momentos do estudo pré-treinamento e após quatro meses de treinos. Observamos que houve aumento no consumo de calorias no período de treinamento, o que é esperado pelo aumento da demanda energética do exercício, porém este aumento foi decorrente do aumento do consumo de proteínas e lipídios e não de carboidratos que são nutrientes essenciais para manter e repor os estoques de glicogênio muscular, função cognitiva e sistema imune (BURKE, 2001; BURKE; LOUCKS; BROAD, 2006; BACURAU, 2002). Estudos com atletas colegiais (HINTON; BECK, 2005) e atletas de futebol feminino também observaram um consumo insuficiente de calorias decorrente do baixo consumo de carboidratos corroborando com nosso estudo (ROSENBLOOM; LOUCKS; EKBLUM, 2006; GIBSON, et al., 2011).

Outro aspecto interessante do comportamento alimentar das atletas estudadas foi que, apesar das evidências de que não existe nenhuma vantagem no

consumo aumentado de proteínas acima das recomendações para o treinamento, é grande o número de atletas que tem esse hábito, o que provavelmente ocorre porque as mesmas relacionam o consumo de proteína com o aumento da massa muscular e da força para execução do treinamento (TIPTON; WOLFE, 2004; TARNOPOLSKY, 1999; MAUGHAN; SHIRREFFS, 2007).

No capítulo II investigamos a relação entre os níveis de estradiol e os parâmetros relacionados ao ambiente redox, bem como com o imunoconteúdo intra e extracelular de HSP70 nas atletas.

Observamos que o imunoconteúdo de iHSP70 estava menor no grupo EN (Estradiol Normal), quando comparado ao grupo com EB (Estradiol Baixo) no início da temporada, sugerindo que o estradiol possa estar atuando diretamente na proteção a danos oxidativos, e por isso no grupo EB o conteúdo de iHSP70 foi mais elevado, independentemente do treinamento.

Em estudos com roedores foi observada maior expressão de HSP70 e sua relação com processos oxidativos em ratos nas etapas de maior intensidade de treinamento, sugerindo que as HSPs estariam atuando como um sistema estabilizador das espécies reativas de oxigênio geradas durante o exercício (SMOLKA et al., 2000; HAMILTON et al., 2003; SIMAR et al., 2007). Sabe-se que exercícios de alta intensidade podem aumentar a exportação de HSP70 para a circulação (eHSP70), porém tal observação não é válida para exercícios de intensidade moderada (HECK; SCHÖLER; BITTENCOURT, 2011). Especula-se que o aumento nos níveis de HSP70 representa um fator citoprotetor e antiinflamatório, pois evita a desnaturação de proteínas intracelulares, e influencia na sinalização da via apoptótica principalmente através da inibição da ativação do fator de transcrição NFkB (BEERE, 2005; ZANIN-ZHOROV et al., 2005).

Interessantemente observamos que junto com o aumento do imunoconteúdo de HSP70 intracelular no grupo EN durante o período de treinamento, houve um aumento significativo na atividade da CAT no mesmo grupo, mas uma diminuição nos níveis de antioxidantes não-enzimáticos (TRAP), de ácido úrico (AU) e de grupamentos sulfidril (SH), sugerindo que talvez o grupo com níveis de estradiol normal tenha uma proteção antioxidante adicional conferida pelo estradiol. Esse fato pode ser confirmando pelo aumento nos níveis basais do conteúdo de HSP70 no grupo estradiol baixo, onde esse aumento pode ser responsável pela proteção contra as ERO.

Embora o efeito protetor do estrogênio no músculo esteja bem documentado (BOMBARDIER et. al, 2009), o mecanismo de ação permanece obscuro, e três fatores são usualmente relacionados com a ação protetora do estrogênio (ENNS; TIIDUS, 2010): sua estrutura ser semelhante a vitamina E e poder assim ter capacidade de agir como *scavenger* de radicais livres; sua estrutura ser similar ao colesterol, conferindo maior estabilidade a membrana; e devido ao fato do tecido muscular apresentar 3 tipos de receptores de membrana para estrogênio (ER α , ER β e ER), sugerindo um papel regulatório desse hormônio sobre o músculo. Provavelmente um, dois ou todos esses processos estão ativos durante as condições de estresse no tecido muscular (ENNS; IQBAL; TIIDUS, 2008).

Com relação aos parâmetros de dano oxidativo, observamos que houve uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nos dois grupos ao longo do período do treinamento, porém esse resultado parece não sofrer interferência do estradiol. Bloomer e Fisher-Wellman (2008), em estudo realizado com homens e mulheres, treinados e não treinados, observaram menores níveis de oxidação lipídica (MDA) em mulheres, quando comparados aos homens independente do

treinamento, e associaram esse resultado em parte com o efeito antioxidante do estrogênio. Assim, o estrogênio pode atuar tanto como um antioxidante contra a peroxidação lipídica induzida pelo exercício, como também melhorar a fluidez e a estabilidade da membrana, além de auxiliar no reparo do músculo esquelético atenuando a infiltração de macrófagos (TIIDUS; ENNS, 2009).

Sabe-se que o uma única sessão de exercício estimula o aumento da produção de ERO e ERN com conseqüente aumento do estresse oxidativo, e inúmeros estudos observaram aumento no sistema de defesa antioxidante tanto em exercícios aeróbios (ELOSUA et al., 2003; KNEZ; COOMBES; JENKINS, 2006) quanto anaeróbios (BLOOMER; GOLDFARB, 2004; RADAK et al., 2001). Entretanto, estudos com treinamento físico regular, ou seja, praticado ao longo de um período de tempo, ainda geram muitas dúvidas. Portanto, nossos dados são relevantes visto que poucos são os estudos com mulheres atletas, especialmente no que diz respeito à fisiologia e bioquímica do exercício em uma população cada vez mais presente tanto em esportes recreativos como de alto rendimento.

O capítulo III teve como objetivo avaliar o perfil dietético do grupo estudo, buscando correlacionar biomarcadores de dano oxidativo com a capacidade antioxidante do plasma, e com o consumo de micronutrientes, como as Vitaminas E e C e os minerais selênio e zinco, uma vez que esses são frequentemente associados à proteção antioxidante. Nesse estudo o consumo de nutrientes foi avaliado através de um *Recordatório Alimentar de 24 horas*, aplicado pela mesma nutricionista nos três períodos do estudo, e do *Registro Alimentar de sete dias*, preenchido pelas próprias atletas que foram instruídas a anotar todos os alimentos e bebidas consumidos (marca, tipo, modo de preparo), com as respectivas porções/quantidades em medidas caseiras.

As participantes foram orientadas a manter seus hábitos alimentares usuais no período do estudo. Avaliando o consumo das vitaminas A, E, C e dos minerais zinco e selênio, observamos que apenas o consumo de Vitamina C e o Zn atingiram a DRI (Ingestão Dietética Recomendada) ao longo do treinamento, sendo que para os demais micronutrientes analisados os índices de consumo ficaram abaixo da mesma. Porém, ao correlacionarmos esses resultados com os biomarcadores de estresse oxidativo, observamos que existe uma correlação inversa e significativa apenas entre o consumo de Vitamina C e a peroxidação lipídica (TBARS).

Nossos resultados, por exemplo, são contrários aos de Bloomer (2008), que observou uma correlação significativa entre o consumo de vitamina C e a diminuição nos níveis de dano oxidativo a lipídios (MDA) em homens treinados, mas não em mulheres treinadas. Também outros estudos como os de Pfeiffer et al. (1999), com indivíduos treinados e os de Bonina et al. (2005) com atletas, mostraram que um suplemento dietético foi capaz de reduzir o estresse oxidativo. Assim, ainda são muitas as dúvidas acerca da utilização de suplementos nutricionais na tentativa de diminuir o estresse oxidativo em atletas, pois os resultados ainda são bastante controversos.

Machefer et al. (2007), em estudo com participantes da “*Maratona de Sables*” (230km divididos em 6 provas durante 7 dias consecutivos) observaram que não houve aumento nos níveis de TBARS no grupo suplementado com um multivitamínico durante a competição, enquanto que no grupo placebo a quantidade de TBARS aumentou significativamente no terceiro dia. Porém não houve diferença significativa nos níveis de GSH, ácido úrico e SOD entre os grupos.

Estudo com triatletas masculinos mostraram uma correlação positiva entre o consumo de dieta antioxidante padronizada (rica em vitaminas A, E, C) e TRAP o que não foi observado quando os mesmos atletas foram suplementados via oral (cápsulas contendo os mesmos nutrientes e quantidades). É possível que esse resultado esteja relacionado com outros componentes antioxidantes da dieta como, por exemplo, os flavonóides, e que não somente às vitaminas (SCHNEIDER et al., 2009).

Os resultados, muitas vezes controversos, podem estar relacionados às diferentes metodologias aplicadas nos estudos, como: tipo de suplementos e tempo de uso, modalidade de exercício e intensidade dos mesmos, avaliação dos resultados. Além disso, uma das maiores dificuldades no estudo do alimento/suplemento, está relacionada às limitações das técnicas para avaliação da biodisponibilidade do nutriente, ou seja, sua absorção no trato gastrointestinal, seu metabolismo, ação e excreção, pois um determinado composto pode ser ativo *in vitro*, porém desde sua absorção até sua excreção, existe um longo percurso, e, portanto, resultados *in vitro* não podem ser aplicados por si só (SIES, 2007).

Sabe-se que os suplementos são amplamente utilizados por atletas na tentativa de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a proteção aos danos causados pelo exercício (JI, 1999; SCHRODER et al., 2000). Porém, é consenso que o uso de suplementos alimentares deve ser permitido apenas para indivíduos com deficiências nutricionais específicas diagnosticadas (ADA, 2000), visto que o consumo regular, excessivo ou não, deve ser evitado, pois ainda há falta de evidências comprobatórias de que o consumo realmente melhora o desempenho físico.

Há mais de uma década, vários estudos realizados em nosso laboratório observaram que a vitamina A é uma molécula redox ativa capaz de induzir um estado pró-oxidante em concentrações não muito superiores as fisiológicas em diferentes modelos experimentais *in vitro* (MOREIRA et al., 1997; DAL-PIZZOL et al., 2001; FROTA et al., 2004; ZANOTTO-FILHO et al., 2008), e que a vitamina A também pode promover estresse oxidativo e modular processos redox-dependentes também em modelos animais (DAL-PIZZOL et al., 2001; GELAIN et al., 2006, 2008, PASQUALI et al., 2009, DE OLIVEIRA et al., 2008; 2009; DA ROCHA et al., 2010; SCHNORR et al., 2011). Também foram observados efeitos pró-oxidantes da vitamina A, como aumento na peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, dano ao DNA e modificação na atividade de enzimas antioxidantes em cultura de células de Sertoli (DAL-PIZZOL et al., 2000, 2001).

De Oliveira e Moreira (2007) verificaram ainda que a suplementação com vitamina A em doses clínicas induz um estado pró-oxidante em diferentes tecidos, como pulmão e coração, assim como em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos Wistar adultos, além de induzir comportamento tipo ansiedade e diminuição na atividade locomotora e exploratória em animais tratados por 28 dias (DE OLIVEIRA et al., 2007a,b 2008). Além disso, diferentes doses de suplementação com vitamina A durante a gestação e amamentação em ratos, alteraram parâmetros de estresse oxidativo em diversos tecidos das mães e dos filhotes, especialmente do SNC (SCHNORR et al., 2011).

Neste capítulo mostramos que o consumo de alimentos ricos em vitamina C contribuiu para a diminuição nos níveis de peroxidação lipídica das atletas, porém ainda são muitas as dúvidas acerca da utilização de suplementação no esporte. Apesar dos inúmeros avanços na medicina e nutrição esportiva, mais estudos são

necessários na tentativa de desenvolver estratégias nutricionais adequadas ao indivíduo atleta de forma a contribuir na orientação da prescrição dietética, priorizando a qualidade de vida e a saúde do atleta. Ainda, sendo que a principal fonte de antioxidantes exógenos é a dieta, o efeito desses na prevenção de doenças que desencadeiam um desbalanço redox no ambiente celular é amplamente reconhecido (LASHERAS et al., 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA et al., 2008; POLIDORI et al., 2009; BOAVENTURA et al., 2011).

Porém, uma questão fundamental ainda necessita ser esclarecida, se os antioxidantes endógenos são suficientes para prevenir o estresse oxidativo induzido pelo exercício ou se é necessário realizar suplementação dessa população, e se for, qual deve ser a quantidade recomendada para atingir um efeito terapêutico e ainda, se as diferenças fisiológicas e bioquímicas entre os gêneros devem ser consideradas.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- 1) O estradiol pode ter um importante papel na modulação do dano oxidativo, visto que o imunoconteúdo de HSP70 intracelular estava menor no grupo EN (Estradiol Normal) quando comparado ao grupo com EB (Estradiol Baixo) no início da temporada.
- 2) No grupo Estradiol Normal (EN) ao mesmo tempo em que tivemos aumento do imunoconteúdo de HSP70 intracelular no decorrer do treinamento também observamos aumento da atividade da CAT e diminuição significativa do TRAP, de ácido úrico (AU) e tióis reduzidos (SH), sugerindo maior proteção ao estresse oxidativo pelo estradiol.
- 3) Houve uma correlação inversa significativa entre o consumo de vitamina C e peroxidação lipídica (MDA) e uma correlação positiva, apesar de não significativa, entre o consumo de Vitamina A e TRAP, o que pode estar relacionado com o consumo de vitamina A abaixo das recomendações.
- 4) Na avaliação do consumo das vitaminas A, E, C e dos minerais Zinco e selênio, verificamos que apenas o consumo de Vitamina C e o Zn atingiram a DRI (Ingestão Dietética Recomendada) ao longo do treinamento, os demais micronutrientes analisados ficaram abaixo das recomendações.

5. PERSPECTIVAS

Os resultados aqui apresentados permitiram verificar a escassez de estudos com a população feminina jovem e atleta, portanto abre espaço para um amplo número de estudos nesta área. Como principais perspectivas de continuação deste trabalho temos:

- 1) Correlacionar parâmetros redox com o consumo de fitoestrógenos em atletas usuárias de anticoncepcional oral visto que estes inibem a produção de estradiol e são amplamente utilizados por mulheres atletas.
- 2) Quantificar o imunoconteúdo de HSP70 intra e extracelular e correlacionar com o consumo de fitoestrógenos nesta população.
- 3) Avaliar os níveis de ativação de NFkB e NRF2 e correlacionar com o consumo de fitoestrógenos em atletas mulheres que utilizam anticoncepcional oral.

REFERÊNCIAS

ADA - American Dietetic Association, Dieticians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. (2000) **Journal of the American Dietetic Association** 100, 1543-1556.

ASEA, A. Mechanisms of HSP72 release. **J Biosci.** n.32, 2007, p.579-584.

BACURAU, R.F.P. et al. Carbohydrate supplementation during intense exercise and the immune response of cyclists. **Clinical Nutrition.** vol.21, n.5, 2002, p.423-429.

BARBOSA, K.B. et al. Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. **An Sist Sanit Navar.** n.31, 2008, p.:259-80.

BEERE, H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. **J. Clin. Invest.** v.115, n.10, 2005, p.2633-2639.

BERG, J.M; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. Biochemistry (5th): **Amazon.co.uk.** cap. 26 p. 1094

BLOOMER, R.J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. **Adv Clin Chem.** n.46, 2008, p.1-50.

BLOOMER, R.J; FISHER-WELLMAN, K.H Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise, training status, and dietary intake. **Gender Medicine.** v. 5, n. 3, 2008.

BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H. Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. **Can J Appl Physiol.** n.29, 2004, p.245-263.

BOAVENTURA, B.C.B. et al. Antioxidant biomarkers and food intake in elderly women. **J Nutr Health & Aging.** 2011.

BOMBARDIER, E. et al. Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus. **J Appl Physiol.** n.106, 2009, p. 2009-2015.

BONINA, F.P. et al. Oxidative stress in handball players: effect of supplementation with a red orange extract. **Nutrition Research**. n.25, 2005, p.917-924.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**. v. 58, p. 350-356, 1998.

BOVERIS, A., CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal**. v. 34, p. 707-716, 1972.

BROWN, M. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. **Adv Physiol Educ**. n.32, 2008, p.120-126.

BURKE, L.M., LOUCKS, A.B., BROAD, N. Energy and carbohydrate for training and recovery. **J Sports Sci**. n.24, 2006, p.675-85.

BURKE, L.M. Energy needs for athletes. **Can J Appl Physiol**. n.26, 2001, p. 202-219.

CALDERWOOD, S.K. et al. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. **Febs Letter**. n.581, 2007, p.3689-3694.

CHAO, W.H. et al. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. **Journal Nutritional**. v.129, 1999, p. 2009-2012.

CHEN, H.W. et al. Synthesis of HSP72 induced by exercise in high temperature. **Chin J Physiol**. n.38, 1995, p.241-246.

CHIEN, K.R. et al. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. **J. Biol. Chem**. n.253, 1978, p.4809-4817.

COOPER, C.E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem Soc Trans**. n.30, 2002, p.280-285.

COUSE, J.F; KORACH, K.S. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? **Endocrine Reviews**. n.20, 1999. p.358-417.

DA ROCHA, R.F. et al. Long-term vitamin A supplementation at therapeutic doses induces mitochondrial electrons transfer chain (METC) impairment and increased mitochondrial membrane-enriched fraction (MMEF) 3-nitrotyrosine on rat heart. **Free Radic. Res.** 2010.

DE OLIVEIRA, M.R. et al. Evaluation of the effects of vitamin A supplementation on adult rat substantia nigra and striatum redox and bioenergetic states: mitochondrial impairment, increased 3-nitrotyrosine and alpha-synuclein, but decreased D2 receptor contents. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* n.33, 2009, p.353–362.

DE OLIVEIRA, M.R. et al. Therapeutic Vitamin A Doses Increase the Levels of Markers of Oxidative Insult in Substantia Nigra and Decrease Locomotory and Exploratory Activity in Rats after Acute and Chronic Supplementation. **Neurochem Res.** n.33, 2008, p.378–383.

DE OLIVEIRA, M.R.; MOREIRA, J.C.F. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. **Toxicol. Letters.** n.173, 2007, p.145-150.

DE OLIVEIRA, M.R. et al. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. **Brain Res.** n.1169, 2007a, p.112-119.

DE OLIVEIRA, M.R. et al. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. **Neurotoxicology.** n.28, 2007b, p.1191-1199.

DAL-PIZZOL, F. et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated Sertoli cells. **Free Radic. Res.** n.35, 2001, p.749–755.

_____. Retinol supplementation induces DNA damage and modulates iron turnover in rat Sertoli cells. **Free Rad Res.** n.33, 2000. p.677–687.

DANTAS, A.P.V. et al. In Vivo Evidence for Antioxidant Potential of Estrogen in Microvessels of Female Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension.** n.39, 2002, p.405-411.

DELAMARCE, P. et al. Extent of lactic anaerobic metabolism in handballers. *Int J Sports Med.* n.8, 1987, p.55-59.

DIONNE, I.J.; KINAMAN, K.A.; POEHLMAN, E.T. Sarcopenia and muscle function during menopause and hormone-replacement therapy. *Journal of Nutrition, Health and Aging.* n.4, 2000, p.156–161.

ELENO, T.G.; BARELA, J.A.; KOKUBUN, E. Tipos de esforço e qualidades físicas do handebol. *Rev. Bras. Cienc Esporte.* v.24, n.1, 2002, p.83-98.

ELOSUA, R. et al. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis.* n.167, 2003, p.327-334.

ENNS, D.L.; TIIDUS, P.M. The Influence of Estrogen on Skeletal Muscle Sex Matters. *Sports Med.* n.40, 2010, p.41-58.

ENNS, D.L.; IQBAL, S.; TIIDUS, P.M. Oestrogen receptors mediate oestrogen-induced increases in post-exercise rat skeletal muscle satellite cells. *Acta Physiol.* n.194, 2008, p. 81-93.

FEBBRAIO, M.A. et al. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones.* v.9, n. 4, 2004, p.390–396.

FEHRENBACH, E. et al. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int J Sports Med.* n.26, 2005, p.552-557.

_____. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* n.32, 2000, p. 592–600.

FENG, X.; LI, G.Z.; WANG, S. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle strain injury and regeneration in female rats. *Acta Pharmacol Sin.* n.25, 2004, p. 1489-1494.

FROTA, M.L.C.Jr et al. Retinol-induced mdr1 and mdr3 modulation in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavengers. *Redox Rep.* n.9, 2004, p.161–165.

GELAIN, D.P. et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. **Shock**. n.35, 2011, p.466-470.

_____. Retinol increases catalase activity and protein content by a reactive species-dependent mechanism in Sertoli cells. **Chem Biol Interact**. n.174, 2008, p.38-43.

_____. Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. **Cell Sign**. n.18, 2006, p.1685–1694.

GHOLAMI, M.; RAD, L.S. Anthropometric, body composition somatotype differences of Iranian elite and female basketball and handball players. **Br J Sports Med**. n.44. 2010.

GIBSON, J.C. et al. Nutrition Status of Junior Elite Canadian Female Soccer Athletes. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**. 2011.

GONZALEZ, B.; HERNANDO, R.; MANSO, R. Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. **Pflügers Arch**. n.440, 2000, p.42–49.

GOROSTIAGA, E. et al. Effects of an entire season on physical fitness changes in elite male handball players. **Med Sci Sports Exerc**. vol.38, n.2, 2006, p. 357-366.

GRUBER, C.J. et al. Production and Actions of Estrogens. **N Engl J Med**. n. 346, 2002, p. 340-352.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford, New York, 2007.

HAMILTON, K.L. et.al. Exercise, antioxidants and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med**. v.34, n.7, 2003, p.800-809.

HECK, T.G.; SCHÖLER, C.M.; BITTENCOURT, P.I.H. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochem Funct**. n.29, 2011, p.215-226.

HELDRING, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiol Rev**. n. 87, 2007, p. 905-931.

HERNANDEZ, J.A.; NAHAS, R.M (Edit.) Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. vol.15, n.3, mar/abr, 2009.

HINTON, P.S.; BECK, N.C. Nutrient intakes of men and women collegiate athletes with disordered eating. **J Sports Sci and Med**. n.4, 2005, p. 253-262.

JENKINS, R.R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **Am. J. Clin. Nutr.** v.72, p.670S-674S, 2000.

_____. Free radicals chemistry: relationship to exercise. **Sports Medicine**. v.5, 1988, p. 156-170.

JI, LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1999; n.222, p.283-292.

KAHLERT, S. et al. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. **Biochem Biophys Res Commun**. 1997. p.373-378.

KALBE, C. et al. Evidence for estrogen receptor alpha and beta expression in skeletal muscle of pigs. **Histochem Cell Biol**. n.126, 2006, p. 83-87.

KATZENELLENBOGEN, B.S. et al. Antiestrogens: mechanisms and actions in target cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**. n.53, 1995, p. 387-393.

KENDALL, B.; ESTON, R. Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. **Sports Med**. n.32, 2002, p. 103-23.

KNEZ, W.L., COOMBES, J.S.; JENKINS, D.G. Ultra-endurance exercise and oxidative damage: Implications for cardiovascular health. **Sports Med**. n.36, 2006, p.429-441.

KOMULAINEN, J. et al. Gender differences in skeletal muscle fibre damage after eccentrically biased downhill running in rats. **Acta Physiologica Scandinavica**. n.165, 1999, p. 57-63.

LANCASTER, G.I.; FEBBRAIO, M.A. **Exosome-dependent Trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins**. v. 280, n.24, 2005a, p.23349-23355.

LASHERAS, C. et al. Food habits are associated with lipid peroxidation in an elderly population. **J Am Diet Assoc.** n.103, 2003, p.1480-1487.

LEMOINE, S. et al. Estrogen receptor alpha mRNA in human skeletal muscles. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** n.35, 2003, p.439–443.

LOCKE, M. et al. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. **Am J Physiol Cell Physiol.** n.268, 1995, p.1387–1394.

LOCKE, M.; NOBLE, E.G., ATKINSON, B.G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology.** v.258 (Cell Physiol. 27), C723-C729, 1990.

MACHEFER, G. et al. Multivitamin-Mineral Supplementation Prevents Lipid Peroxidation during “The Marathon des Sables”. **Journal of the American College of Nutrition.** vol. 26, n.2, 2007, p.111–120.

MADDALOZZO, G.F. et al. The association between hormone therapy use and changes in strength and body composition in early postmenopausal women. **Menopause.** n.11, 2004, p.438-46.

MAMBULA, S.S. et al. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. **Methods.** n.43, 2007, p.168-175.

MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. Basic Medical Biochemistry: a clinical approach. **Lippincott Williams & Wilkins.** cap. 34. 2005. p. 643-645.

MAUGHAN, R.J.; SHIRREFFS, S.M. Nutrition and hydration concerns of the female football player. **Br J Sports Med.** n. 41, Suppl 1, 2007. p. 60-3.

MAUGHAN, J.R.; BURKE, L.M. **Nutrição Esportiva.** Porto Alegre, RS: Artmed, 2004.

MILNE, K.J., NOBLE, E.G. Response of the myocardium to exercise: sex-specific regulation of hsp70. **Med Sci Sports Exerc.** n.40, 2008, p. 655-663.

MOREIRA, J.C.F. et al. Effect of retinol on chromatin structure in Sertoli cells: 1,10-phenanthroline inhibit the increased DNase I sensitivity induced by retinol. **Med Sci Res.** n.25, 1997, p.635–638.

MULTHOFF, G. Heat shock protein 70 (HSP70): membrane location, export and immunological relevance. **Methods**. n.43, 2007, p.229-237.

MURRAY, R. K et al. Harper's Illustrated Biochemistry. **McGraw-Hill**. cap. 11. 2003. p. 88 -90.

O'BRIEN, M.; ROBERTSON, A. Women and Sport. **Scott Med J**. May, 2010, p.25–28.

PAROO, Z.; DIPCHAND, E.S.; NOBLE, E.G. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**. n.282, 2002, p.245–251.

PAROO, Z.; TIIDUS. P.M.; NOBLE, E.G. Estrogen attenuates HSP 72 expression in acutely exercised male rodents. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**. n.80, 1999, p.180-184.

PASQUALI, M.A.B. et al. Vitamin a supplementation induces oxidative stress and decreases the immunocontent of catalase and superoxide dismutase in rat lungs. **Exp Lung Res**. n.35, 2009, p.427-438.

PERSKY, A.M. et al. Protective effects of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. **Proc Soc Exp Biol Med**. n.223, 2000, p. 59-66.

PFEIFFER, J.M. et al. Effect of antioxidant supplementation on urine and blood markers of oxidative stress during extended moderate-altitude training. **Wilderness Environment Medicine**. v.10, 1999, p. 66-74.

POCKLEY, A.G. et al. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. **Hypertension**. n.42, 2003, p.235–238.

POLIDORI, M.C. et al. Plasma micronutrient status is improved after a 3-month dietary intervention with 5 daily portions of fruits and vegetables: implications for optimal antioxidant levels. **Nutr. Journal**, 2009. p. 8-10.

POWERS, S.K. et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. n.275, 1998, p.1468-1477.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev.** n.88, 2008, p. 1243-1276.

PROKAI, L. et al. Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. **Proc Natl Acad Sci USA.** vol. 20, n.100, 2003. p. 11741- 11746.

PRYOR, W.A. Free radicals reactions and their importance in biochemical systems, **Federation Proceedings.** v. 32, p. 1862-1869, 1973.

PUNTSCHART, A. et al. HSP70 expression in human skeletal muscle after exercise. **Acta Physiol Scand.** n.157, 1996, p.411–417.

RADAK, Z. et al. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: From muscle to brain. **Exerc Immunol Rev.** n.7, 2001, p.90-107.

REID, M. B. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 162, p. 401-409, 1998.

REID, M. B., DURHAM, W. J. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle – potential impact on aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 959, p. 108-116, 2002.

ROSENBLOOM, C.A.; LOUCKS, A.B.; EKBLUM, B. Special populations: the female player and the youth player. **J Sports Sci.** n.24, 2006, p.783-93.

RYAN, A.J.; GISOLFI, C.V.; MOSELEY, P.L. Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. **J Appl Physiol.** n.70, 1991, p.466–471.

SAHLIN, K. et al. Ultraendurance exercise increases the production of reactive oxygen species in isolated mitochondria from human skeletal muscle. **J Appl Physiol.** n.108, 2010, p. 780-787.

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.** n.11, 1991, p.239–246.

SCHNEIDER, C.D. et al. Antioxidant Vitamin Supplementation and Oxidative Stress in Triathletes. *Gazzetta Medica Italiana. Archivio per le Scienze Mediche* (Testo stampato). v.168, n. 1, 2009, p.23-30.

SCHNORR, C.E. et al. The effects of vitamin A supplementation to rats during gestation and lactation upon redox parameters: Increased oxidative stress and redox modulation in mothers and their offspring. **Food Chem Toxicol.** n.49, 2011, p.2645-2654.

SCHRODER, H. et al. Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidative supplement. **Int J Sports Med.** n.21, 2000, p.146-150.

SCIOTE, J.J. et al. Differential effects of diminished oestrogen and androgen levels on development of skeletal muscle fibres in hypogonadal mice. **Acta Physiol Scand.** n.172, 2001, p.179-187.

SEWRIGHT, K.A. et al Sex differences in response to maximal eccentric exercise. **Med Sci Sports Exerc.** n.40, 2008, p. 242–251.

SIES, H. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. **J. Nutr.** n.137, 2007, p.1493–1495.

SIMAR, D. et al. Physical Activity Modulates Heat Shock Protein-72 Expression and Limits Oxidative Damage Accumulation in a Healthy Elderly Population Aged 60–90 Years. **J Gerontology A Biol Sci Med Sci.** n.62, 2007, p.1413-1419.

SIPILA, S. et al. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. **Clin Sci (Lond).** n.101, 2001, p.147-157.

SJÖDIN, B.; HELLSTEN, Y.H.; APPLE, F. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.** n.10, 1990, p. 236-254.

SJÖDIN, B.; WESTING, Y. H. Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. **International Journal of Sports and Medicine.** v. 11, p. 493-495, 1990.

SKIDMORE, R. et al. HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. n.268, 1995, p.92–97.

SMOLKA, M. B. et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology**. v.279, 2000, p.1539-1545.

SOUZA, J. et al. Evolução da potência aeróbia máxima em atletas de handebol adulto durante o período de preparação. **Revista treinamento Desportivo**. v.5, n.2, 2000.

STREHLOW, K. et al. Modulation of Antioxidant Enzyme Expression and Function by Estrogen. **Circulation Research**. n.93, 2003, p. 170-177.

STUPKA, N. et al. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. **J Appl Physiol**. n.89, 2000, p. 2325-2332.

SUN, Y.; MACRAE, T.H. The small heat shock proteins and their role in human disease. **Febs J**. v.272, n.11, 2005, p.2613-2627.

SHULTZ, S. J. et al. Sex differences in knee joint laxity change across the female menstrual cycle. **J Sports Med Phys Fitness**. n.45, 2005, p.594–603.

TARNOPOLSKI, et al. Gender differences in carbohydrate loading are related to energy intake. **J Appl Physiol**. n.91, 2001, p. 225–230.

TARNOPOLSKY, M.A. Protein and physical performance. **Curr Opin Clin Nutritional Metab Care**. n.2, 1999, p.533-537.

TERRY, D.F. et al. Cardiovascular Disease Delay in Centenarian Offspring: Role of Heat Shock Proteins. **Ann N Y Acad Sci**. n.1019, 2004, p. 502-505.

TIIDUS, P.M.; ENNS, L.M. Point: Counterpoint: Estrogen and sex do/do not influence post-exercise indexes of muscle damage, inflammation, and repair. **J Appl Physiol**. n.106, 2009, p.1010–1015.

TIIDUS, P.M. et al. Estrogen effects on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. **Can J Physiol Pharmacol**. n.79, 2001, p.400-406.

TIIDUS, P.M. Oestrogen and sex influence on muscle damage and inflammation: evidence from animal models. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** n.4, 2001, p.509-513.

_____. Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation, and oxidative stress. **Can J Appl Physiol.** n.25, 2000, p. 274–287.

TIPTON, K.D., WOLFE, R.R. Protein and amino acids for athletes. **J Sports Sci.** n.22, 2004, p.65-79.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology.** n.189, 2003, p. 41-54.

VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. **Nat Rev Immunol.** n.5, 2005, p.318-330.

VINÃ, J. et al. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. **Febs Letters.** n.579, 2005, p.2541-2545.

WALSH, R.C. et al. Exercise increases serum Hsp72 in humans. **Cell Stress Chaperones.** n.6, 2001, p.386–393.

WALSH, B.A. et al. 17 β -Estradiol Reduces Glycooxidative Damage in the Artery Wall. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** n.19, 1999, p.840-846.

WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews.** v.72, n.4, 1992, p. 1063-1081.

WIERMAN, M.E. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. **Adv Physiol Educ.** n.31, 2007, p. 26-33.

WIJK, A. et al. Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. **Acta Physiologica Scandinavica.** n.179, 2003, p.381–387.

WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. Estrogênios e Progestogênios. In: GOODMAN e GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 9.ed. 1996.

YELLON, D.M., MARBER, M.S. Hsp70 in myocardial ischaemia. **Experimentia**. v.50, 1994, p. 1075-1083.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat Shock Protein 60 Inhibits Th1-Mediated Hepatitis Model via Innate Regulation of Th1/Th2 Transcription Factors and Cytokines. **J Immunology**. n.174, 2005, p.3227-3236.

ZANOTTO-FILHO, A.S. et al. Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells. **Free Radic. Res**. n.42, 2008, p.593-601.

ZHANG, Q-G. et al. Vadlamudi, and Darrell W. Brann. Estrogen Attenuates Ischemic Oxidative Damage via an Estrogen Receptor -Mediated Inhibition of NADPH Oxidase Activation. **J Neuroscience**. n.29, 2009, p.13823–13836.

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**. n.33, 2002, p.337–349.