



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ROSELENE MODOLO REGUEIRO

LORENÇONI

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO E DA
RESTRIÇÃO HÍDRICA NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS**

**São José do Rio Preto
2011**

Roselene Modolo Regueiro Lorençon

INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO E
DA RESTRIÇÃO HÍDRICA NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Moacir F. de Godoy

São José do Rio Preto
2011

Lorençoni, Roselene Modolo Regueiro

Influência do treinamento físico e da restrição hídrica no estresse oxidativo em ratos. São José do Rio Preto, 2011.

98 p.

Tese [Doutorado] – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Moacir F. de Godoy

1. Estresse oxidativo;
2. Miocárdio;
3. Treinamento;
4. Restrição hídrica.
5. Ratos

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas e Quadros.....	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvi
Resumo.....	xix
Abstract.....	xxi
1. Introdução.....	01
1.1. Objetivo.....	03
2. Revisão da Literatura.....	04
2.1. Radicais Livres e Estresse Oxidativo.....	04
2.2. Radicais Livres e Exercícios Físicos.....	08
2.3. Radicais Livres, Estudos Clínicos e Experimentais.....	11
2.4. Exercício Físico, Hidratação e Estresse Oxidativo.....	14
3. Material e Métodos.....	19
3.1. Desenho do Estudo.....	19
3.2. Caracterização da Amostra.....	19
3.3. Formação dos Grupos Experimentais.....	20
3.3.1. Percentual de Restrição Hídrica.....	24
3.4. Programa de Treinamento.....	25
3.5. Obtenção das Amostras.....	26

3.6. Análises Bioquímicas.....	28
3.6.1. Obtenção de Homogenato e Sobrenadante do Miocárdio de rato.....	29
3.6.2. Quantificação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	29
3.6.3. Medida da Quimiluminescência em Miocárdio estimulada por Hidroperóxido de Tert-Butil.....	31
3.6.4. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) por Luminescência.....	31
3.7. Procedimentos Estatísticos.....	33
4. Resultados.....	34
4.1. Generalidades.....	34
4.2. Peso Corporal (PC).....	35
4.3. Peso do Coração.....	36
4.4. Relação Peso Coração / Peso Corporal.....	38
4.5. Análise da Lipoperoxidação.....	39
4.6. Análise da Quimiluminescência.....	41
4.7. Análise da Capacidade Antioxidante Total (TRAP).....	47
5. Discussão.....	55
6. Conclusões.....	69
7. Referências Bibliográficas.....	70
8. Apêndice.....	97

Dedicatória

A **DEUS** por tudo que me proporciona. Com sua presença, luz e força sempre me abençoa.

A minha família **Marcelo, Marcelinho e Marcella** pelo apoio incondicional em todos os momentos de alegria e angústia durante o período de desenvolvimento deste trabalho e pela compreensão da minha ausência, muito obrigado, por existirem em minha vida. Amo vocês.

A meus pais **Lorival e Mafalda** pelo exemplo de vida e amor sempre a mim dedicados.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy**, por acreditar prontamente no nosso projeto, pela confiança e empatia desde nosso primeiro contato. Sua atitude possibilitou a realização de um sonho, que sempre fará parte de um dos mais belos capítulos da minha vida. Dizer-te muito obrigado Professor Doutor Godoy, não expressa em plenitude tudo que o senhor significa para mim.

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei**, pela amizade, carinho, apoio e dedicação não só durante a realização deste trabalho, mas principalmente nestes muitos anos dividindo o Setor de Cardiologia da FCT/UNESP, meu eterno agradecimento.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Camargo Silva Filho**, que em todos os momentos teve uma palavra de apoio, abriu as portas do seu Laboratório, passou seus ensinamentos e sempre confiou no meu trabalho. Obrigado Zeca.

À **Profa Dra. Dalva Minonroze Albuquerque Ferreira**, minha colega de sala, por compartilhar comigo seu carinho, sua ética profissional, seus conhecimentos com o ORIGIN e por estar sempre me apoiando. Muito obrigado querida amiga.

À **Profa Dra. Edna Maria do Carmo**, minha sempre aluna e colega de trabalho, por compartilhar comigo seus conhecimentos e por dar força sempre. Muito obrigado querida amiga.

Aos professores **Dra. Susimary Trevisan Padulla, Dr. Jayme Netto Júnior e Dr. Carlos Marcelo Pastre**, meus companheiros de Pós-Graduação, pela amizade, pelo apoio sempre e sem vocês as viagens longas não seriam tão agradáveis. Muito obrigado amigos.

Ao professor **Dr. Augusto Cesinando de Carvalho**, simplesmente pelo carinho e apoio. Muito Obrigado.

Às **Profas. Dra. Dionei Ramos e Dra. Ercy Mara Cipulo Ramos**, Chefe e Vice-chefe do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP, que nos momentos de dificuldades não mediram esforços e estavam sempre prontas para ajudar. Muito Obrigado.

Aos funcionários **Marcos Barros e Danielli Baeta** do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP, que estiveram sempre presentes ao longo desses anos. Serei sempre muito grata a vocês.

Aos demais **Colegas, Docentes do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente**, pelo apoio, amizade, incentivo e cooperação durante a realização do Curso de Pós-Graduação.

Ao professor **Dr. Rubens Cecchini**, do Departamento de Patologia Geral da Universidade de Londrina - UEL, que abriu as portas do seu laboratório e auxiliou nas análises das técnicas bioquímicas.

À **Fisioterapeuta Dra. Flavia Alessandra Guarnier**, que não mediu esforços para auxiliar na realização e análise das técnicas bioquímicas, sempre com a maior disposição. Sem sua ajuda não seria possível fechar esse capítulo da minha vida.

As alunas **Daniela Yamada de Aguiar, Érika Mizutani, Camila Fujihara, Claudia Mitie Hissayasu, Débora Figueiredo Santos, Michelle Rebolo, Lívia Hissae Miyoshi, Rebeca Nicolás Paronetto, Vânia Zamperlim Souza Silva, Elizabeth Belucci e Maíra Leal Fructuozo**; as especializadas **Ana Laura Ricci Vítor e Aline Fernanda Barbosa Bernardo** e a mestranda **Alice Cristina Antonio dos Santos**, pelo apoio constante, mas principalmente pelo auxílio durante o período de coleta dos dados desta pesquisa. Muito obrigado, vocês são sensacionais.

Em especial à **Doutoranda Ana Carolina Panveloski**, que não mediu esforços para auxiliar-me em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Muito, muito obrigada.

A Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP em nome do Prof. **Dr. Domingo Marcolino Braile**, pela oportunidade recebida.

À **Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza** e **Prof. Dr. Reinaldo Azoubel** representando todos os professores e aos funcionários **José Antonio Silistino, Fabiana Cristina Godoy, Rosimere Cleide Souza Desidério, Guilherme Martins Dias, Luís Henrique Oliveira Ferreira** e **Bruno** do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde da Faculdade de Medicina de São José de Rio Preto que me proporcionaram sempre, ao longo desses anos, uma imensa alegria e satisfação. Serei para sempre muito grata.

À instituição de ensino que sou vinculada e aos seus professores, coordenadores, chefes de departamento, diretor, vice-diretor e demais funcionários da **FCT- UNESP/Campus de Presidente Prudente**. Pelo apoio e compreensão a minha realização acadêmica.

Aos laboratórios: **Laboratório de Histologia e Laboratório de Fisiologia do Estresse da FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente** pela execução de todo o delineamento experimental e ao **Laboratório de Radicais Livres do Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina** pelo desenvolvimento de todas as análises bioquímicas.

Aos Técnicos de Laboratórios **Sidney Leirião** e **Jesus Antonio Vargas**, pela dedicação, paciência e inestimável ajuda no desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigado.

À **Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP)** por
fomentar parte das bancadas das análises bioquímicas desta pesquisa.

Epígrafe**SOL DE PRIMAVERA**

*Quando entrar setembro e a boa nova andar nos campos,
Quero ver brotar o perdão onde a gente plantou juntos outra vez,
Já sonhamos juntos, semeando as canções no vento,
Quero ver crescer nossa voz no que falta sonhar
Já choramos muito, muitos se perderam no caminho,
Mesmo assim, não custa inventar uma nova canção, que venha nos trazer
Sol de primavera abre as janelas do meu peito
A lição sabemos de cor,
Só nos resta aprender.*

(Beto Guedes/ Ronaldo Bastos)

Lista de Figuras

Figura 1.	Gaiola coletiva utilizada para alojar os animais que ingeriram água <i>ad libitum</i>	23
Figura 2.	Gaiola individual utilizada para alojar os animais com restrição hídrica.....	23
Figura 3.	Esteira utilizada durante a realização dos experimentos.....	25
Figura 4.	Animais caminhando durante o experimento.....	26
Figura 5.	Incisão longitudinal para retirada do coração.....	27
Figura 6.	Coração.....	28
Figura 7.	Balança de precisão utilizada para pesar os corações.....	28

Figura 8. Gráfico representativo dos valores da concentração de dialdeído malônico (MDA) estimulada por substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em músculo cardíaco de ratos submetidos a sacrifício 1 hora e 72 horas após o programa de treinamento. Resultados expressos em nanomoles de Dialdeído malônico (MDA) por grama de tecido, dos grupos GAS – animais sedentários que ingeriram água *ad libitum* (controle) (n = 6); GAE1 – animais treinados que ingeriram água *ad libitum* e sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (n = 6); GAE72 – animais treinados que ingeriram água *ad libitum* e sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHE1 – animais treinados submetidos a restrição hídrica e sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHE72 – animais treinados submetidos a restrição hídrica e sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHS1 – animais sedentários submetidos a restrição hídrica e sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHS72 – animais sedentários submetidos a restrição hídrica e sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (n = 6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes por teste *t de student* para dados não pareados. 40

Figura 9. Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), são expressas por setas coloridas. As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way* Anova..... 42

Figura 10. Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), está expressa por seta preta. As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way* Anova..... 43

Figura 11. Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – animais sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE1 – animais treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE1 – animais treinados submetidos à restrição hídrica (n=6); GRHS1 – animais sedentários submetidos à restrição hídrica (n=6); GAEI1 – animais sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediate) que receberam água *ad libitum* (n=6) GRHEI1 – animais sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediate) submetidos à restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way* Anova..... 45

- Figura 12. Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – animais sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE72 – animais treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE72 – animais treinados submetidos à restrição hídrica (n=6); GRHS72 – animais sedentários submetidos à restrição hídrica (n=6); GAEI72 – animais sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate) que receberam água *ad libitum* (n=6) GRHEI72 – animais sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate) submetidos à restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way* Anova. 46
- Figura 13. Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6)..... 50

- Figura 14. Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6)..... 51
- Figura 15. Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediate), expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAEi – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHEi – treinados com restrição hídrica (n=6); comparados aos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); grupos GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6)..... 52

Figura 16. Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate), expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); comparados aos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após programa de treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); grupos GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6)..... 53

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1.	Distribuição dos grupos experimentais.....	22
Tabela 2.	Valores médios do peso corporal dos animais dos grupos estudados.....	35
Tabela 3.	Valores médios do peso dos corações dos animais dos grupos estudados.....	37
Tabela 4.	Valores médios da relação peso do coração/peso do coração dos animais dos grupos estudados.....	38
Tabela 5.	Valores de MDA dos grupos estudados.....	39
Tabela 6.	Valores da média e erro padrão na análise da Capacidade Antioxidante Total (TRAP), dos animais sacrificados 1h e 72h após treinamento.....	47
Quadro 1.	Ensaio para quantificação das substâncias reativas de TBARS utilizadas na quantificação de lipoperóxidos de membrana.....	30
Quadro 2.	Ensaio para determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) por luminescência de TRAP.....	32

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABAP	- 2-2 Azobis-amidino-propano
ABS	- Absorbância
ADP	- Adenosina Difosfato
ATP	- Adenosina Trifosfato
C₆H₈O₆	- Ácido Ascórbico
CAT	- Catalase
CEAA	- Comissão de Ética e Experimentação Animal
Cu⁺	- Cobre
Cu-ZnSOD	- Cobre-Zinco Superóxido Dismutase
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
ERH	- Espécies Reativas de Hidrogênio
ERRO	- Espécies Reativas de Oxigênio
FADH₂	- Flavina Adenina Dinucleotídeo
Fe²⁺	- Ferro
FeCl₃	- Cloreto Férrico
FeSOD	- Ferro Superóxido Dismutase
GAS	- Grupo de animais sedentários que receberam água <i>ad libitum</i> (controle)
GAE	- Grupo de animais treinados que receberam água <i>ad libitum</i>
GRHS	- Grupo de animais sedentários com restrição hídrica
GRHE	- Grupo de animais treinados com restrição hídrica
GAE imediato	- Grupo de animais que realizaram apenas 1 sessão de treinamento e receberam água <i>ad libitum</i>
GRHE	- Grupo de animais que realizaram apenas 1 sessão de

imediat	-	treinamento com restrição hídrica
GPx	-	Glutathione Redutase
GSH	-	Glutathione
GSH-Px	-	Glutathione Peroxidase
GSSG	-	Glutathione Oxidada
H⁺	-	Íon de Hidrogênio
H₂O	-	Água
H₂O₂	-	Peróxido de Hidrogênio
HO₂[·]	-	Radical Hidroperoxil
HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HSP	-	<i>Heat Shock Proteins</i>
K₂HPO₄	-	Fosfato de Potássio Monobásico
KCL	-	Cloreto de Potássio
MDA	-	Malondialdeído
MnSOD	-	Manganês Superóxido Dismutase
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NADH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NO[·]	-	Óxido Nítrico
O₂	-	Oxigênio
O₂^{·-}	-	Radical Superóxido
OH[·]	-	Radical Hidroxil
PSI	-	Índice de Tensão Fisiológica
QL	-	Quimiluminescência
R	-	Valor de Emissão de Lipoperóxidos Pré-formados
SEM	-	Média e Erro padrão da média
SOD	-	Superóxido Dismutase

t ind	- Tempo de indução da Reação
TBA	- Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	- Ácido Tricloroacético
TD	- Turner Designs
TRAP	- Capacidade Antioxidante Total
TSH	- Tiroxina
UEL	- Universidade Estadual de Londrina
URL	- Unidades Relativas de Luz
V₀	- Velocidade Inicial da Reação
VO₂ máx	- Consumo Máximo de Oxigênio

RESUMO

Introdução: Os radicais livres (RL) podem atuar sobre a maioria dos componentes celulares, levando-os a modificações de suas funções e estruturas. Sua formação ocorre principalmente durante o processo aeróbio de produção de ATP, mais especificamente na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Para impedir a ação tóxica dos RL sobre as células, indivíduos saudáveis apresentam mecanismos de defesa antioxidantes. O desequilíbrio entre estes mecanismos de defesa e os RL, constitui o “estresse oxidativo”. Sabe-se que o exercício é uma conhecida forma de estresse, pois há aumento dos RL pelo aumento do consumo de oxigênio e a exposição crônica a ele, chamada treinamento físico. A importância da hidratação está em considerar a necessidade da mesma durante a realização de exercícios físicos e assim entende-se adequado investigar o estresse oxidativo nas condições descritas.

Objetivo: Quantificar o conteúdo de peróxidos de membrana do miocárdio de ratos treinados submetidos ou não à restrição hídrica. **Metodologia:** Foram utilizados 72 ratos, divididos aleatoriamente em 6 grupos; GAS (n=12) - grupo sedentário com água *ad libitum*; GAE (n=12) - grupo treinado com água *ad libitum*; GRHS (n=12) - grupo sedentário com restrição hídrica; GRHE (n=12) - grupo treinado com restrição hídrica; GAEI (n=12) - grupo sedentário com água *ad libitum* e apenas uma sessão de treinamento – imediato; GRHEI (n=12) - grupo sedentário com restrição hídrica e apenas uma sessão de treinamento-imediato. Os grupos GAS e GAE serviram como controle, sendo a quantidade de água consumida por eles a base para o cálculo de 25% de restrição hídrica de GRHS e GRHE respectivamente. O programa de

treinamento foi realizado em esteira rolante para animais de pequeno porte, sessões de treinamento realizadas três vezes por semana, com duração de 60 minutos, durante doze semanas. Para obtenção das amostras, os animais foram sacrificados por decapitação e os fragmentos do músculo cardíaco congelados para as análises. Seis animais do GAS, GAE, GRHE e GRHS foram sacrificados 1 hora após a última sessão de treinamento e seis com 72 horas após a mesma. Os grupos GAE imediato e GRHE imediato tiveram seis dos seus animais sacrificados 1 hora após uma única sessão de exercícios e seis após 72 da mesma sessão. A formação de lipoperóxidos de membrana foi avaliada pelos métodos de Quimiluminescência (QL), analisada por *two-way* ANOVA; Substâncias Reativas ao Ácido Tilbarbitúrico (TBARS) e Capacidade Antioxidante Total (TRAP), analisadas pelo teste t de student para dados não pareados, com valor de $p < 0,05$ considerado significativo. **Resultados:** As análises das curvas da QL demonstraram níveis de lipoperóxidos de membranas aumentados para o grupo treinado e submetidos à restrição hídrica em relação aos controles. Revelam também recuperação após 72 horas. Os dados do TRAP demonstraram significativo consumo dos antioxidantes não solúveis nos animais treinados submetidos à restrição hídrica. **Conclusões:** O treinamento físico de baixa intensidade associado à restrição hídrica, praticado em fase aguda ou crônica provoca aumento do estresse oxidativo, embora com recuperação.

Palavras chave: lipoperoxidação, miocárdio, treinamento, restrição hídrica.

ABSTRACT

Introduction: The oxygen species (ROS) can act on most cellular components, causing them to change their functions and structures. Its formation occurs during the process of aerobic ATP production, specifically in the chain of mitochondrial electron transport. To prevent the toxic action of RL on cells, healthy individuals have antioxidant defense mechanisms. The imbalance between these defense mechanisms and the RL, is the "oxidative stress". It is known that exercise is a known form of stress, since there is an increase in RL by increasing oxygen consumption and chronic exposure to it, called physical training, is able to trigger adjustments in response to increased production of ROS or that is, chronic exercise results in the formation of oxidants and oxidative stress, and perhaps as a consequence, induces antioxidant enzymes and antioxidant synthesis to minimize the effects of oxidant. The importance of hydration is to consider the need for it especially during physical exercises and thus believes it is appropriate to investigate oxidative stress in those circumstances. **Objective:** To quantify the peroxide content of myocardial membranes of trained rats were not submitted to water restriction. **Materials e Methods:** 72 rats were divided randomly into six groups; GAS (n = 12) - sedentary group with water ad libitum; GAE (n = 12) - a group trained with water ad libitum; GRHS (n = 12) - sedentary group with water restriction; GRHE (n = 12) - a group trained with water restriction; GAEI (n = 12) - the sedentary with ad libitum water and only one training session - immediately; GRHEI (n = 12) - sedentary group with restriction water and only one training session,

immediately. GAS groups served as controls and GAE, and the amount of water consumed by them the basis for the calculation of 25% water restriction GRHS and GRHE respectively. The training program was performed on a treadmill for small animals and the training sessions were held three times per week, lasting 60 minutes, for twelve weeks. To obtain these samples, the animals were sacrificed by decapitation, taking place soon after the surgery. Six animals of GAS, GAE, GRHE and GRHS were sacrificed one hour after the last training session and six to 72 hours thereafter. The groups immediately GAE end GRHE immediately had six of his animals sacrificed one hour after a single session is 72years and six after the same session. The heart was removed and the fragments of cardiac muscle were frozen for biochemical analysis. Lipoperóxidos de membrane formation methods evaluated by chemiluminescence (CL) stimulated by-butyl hydroperoxide have analyzed by two-way ANOVA Acid Reactive Substances Tilbarbitúrico (TBARS) and total antioxidant capacity (TRAP), compared by student t test for unpaired samples, with p value <0.05 was considered significant. **Results:** The analysis of the curves in QL shown lipoperoxide membrane levels increased for the trained group and subjected to water restriction in relation to controls. They also show recovery after 72 hours. Data from the TRAP showed a significant consumption of antioxidants is not soluble in trained animals submitted to water restriction. **Conclusion:** The low-intensity physical training associated with fluid restriction, practiced in the acute or chronic causes increased oxidative stress, although with recovery.

Keywords: lipid peroxidation, myocardium, training, water restriction.

1 INTRODUÇÃO

A idéia de que radicais livres são produzidos em excesso durante o exercício físico, e que estas substâncias são responsáveis por alguns dos efeitos deletérios do exercício, tem sido amplamente discutida por muitos anos.

(1)

Signorini e Signorini ⁽²⁾, relatam que no esforço físico intenso, seja em organismos treinados ou não, a percentagem representativa da quantidade de oxigênio (O₂) que não é reduzida pela citocromo-oxidase aumenta na mesma proporção do aumento global de oxigênio, que é admitido por uma demanda maior da célula. Pode-se esperar com isto, um aumento do estresse oxidativo no organismo treinado implicado em aumento do consumo de antioxidantes pela célula. O treinamento proporciona adaptações no organismo de acordo com o tipo de estímulo aplicado, por esta condição, pode-se deduzir uma maior resistência ao estresse provocado. Entretanto, no organismo treinado, existe sempre a possibilidade de alguns tecidos e áreas sofrerem déficit temporário de O₂ com repercussões histológicas por ação dos radicais livres (RL).

Há evidências que a produção de RL e subsequente peroxidação lipídica são seqüelas normais ocorridas pelo aumento do consumo de O₂, que acontece concomitante com o exercício⁽³⁾, além de que outros fatores podem influenciar a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) durante o exercício e também está claro que a intensidade e duração do exercício representam papel importante neste processo. ⁽⁴⁾

Os riscos do estresse oxidativo com o exercício parecem depender da

intensidade e do estado de treinamento do indivíduo, pois o exercício exaustivo realizado por indivíduos destreinados comporta uma maior probabilidade de produzir lesões oxidativas nos músculos ativos. ⁽⁵⁾

Em geral o treinamento pode causar respostas adaptativas nas enzimas antioxidantes do músculo esquelético, mas pequeno efeito no sistema de enzimas do miocárdio e hepático.

Na célula cardíaca o fenômeno de redução incompleta do oxigênio também acontece, fazendo-se de modo mais intenso devido á elevada demanda de oxigênio no miocárdio em solicitações físicas intensas. Estudos como o de (Douglas *et al* ⁽⁶⁾), relatam que os níveis de antioxidantes tendem a diminuir com a idade, no entanto, parece que a prática regular de exercícios com intensidade leve a moderada contribuem para manter os fatores antioxidantes a níveis constantes mesmo com o aumento da idade. Portanto, sugere-se que quanto maior e mais prolongado for o esforço maior será a demanda de antioxidantes no tecido do miocárdio. O coração é um órgão que tem uma das menores proporções favoráveis para a produção e remoção das ERO.

O exercício físico pode induzir a um estado de desidratação se as taxas de líquido perdido não for rapidamente substituído. A desidratação de 2% da massa corporal pode prejudicar as funções fisiológicas e de desempenho do exercício ⁽⁷⁾, aumentando a freqüência cardíaca e a temperatura central ao longo do tempo, diminuindo o débito cardíaco, e alterando a função do sistema nervoso central ^(8,9), a fim de estabilizar as condições fisiológicas e minimizar as pressões sobre os sistemas cardiovascular, neuromuscular e termorregulação,

importante para repor os líquidos durante o exercício, prolongando assim o tempo de execução do mesmo^(10,11).

Nesse contexto, entendeu-se como pertinente, elaborar um modelo experimental, que se aproximasse da realidade dos praticantes de exercícios físicos de baixa intensidade com restrição de água e empreender investigação das possíveis repercussões sobre o estresse oxidativo.

Os dados obtidos podem contribuir para as ciências da saúde e do esporte, para melhor entendimento de implicações clínicas importantes, tais como danos à função cardíaca em decorrência da prática de exercícios físicos sem hidratação adequada, comum em países de clima tropical como o Brasil.

1.1 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo quantificar o estresse oxidativo em miocárdio de ratos treinados submetidos ou não à restrição hídrica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Radical livre (RL) é definido como molécula ou átomo com número ímpar de elétrons na sua última camada. Estas características conferem à molécula instabilidade e reatividade bioquímica. Os radicais livres adquirem a estabilidade química interagindo com substâncias não-radicais, ao cederem um elétron a uma molécula estável, formando um radical reduzido, ou aceitando um elétron a partir de uma molécula estável, convertendo - a em radical oxidado.^(12, 13)

Os diferentes RL existentes nos sistemas biológicos são nomeados de acordo com o átomo base no qual encontram - se associados: carbono (C), enxofre (S), o de azoto (N) e oxigênio (O). Dessa forma, se designam por radicais de C, S, N ou O.⁽¹³⁾

Como conseqüência da vida aeróbia, o organismo gera continuamente espécies reativas de oxigênio (EROS). Destas, as mais referidas são o radical superóxido (O_2^\bullet), o radical hidroxil (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroperoxil (HO_2) e óxido nítrico (NO), produzidos nos organismos por meio da redução incompleta do oxigênio molecular e muitas vezes, são úteis como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico como ocorre, por exemplo, durante a fagocitose realizada pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos que utilizam o peróxido de hidrogênio no combate a microorganismos invasores⁽¹³⁻¹⁷⁾.

Apesar da principal função mitocondrial, ser a produção de energia existem evidências que apontam as mitocôndrias como fonte de ERO durante as reações que antecedem a fosforilação oxidativa⁽¹⁸⁻²²⁾. A formação de intermediários da redução tetravalente do O₂, assim como a fuga de elétrons para o O₂, a partir da cadeia transportadora de elétrons (CTE), particularmente dos complexos I e III, são os mecanismos apontados como responsáveis pela produção de ERO na mitocôndria.⁽²³⁾

Os RL podem atuar sobre a maioria dos componentes celulares, levando a modificação das funções e estruturas celulares. Componentes celulares que sofrem ação dos radicais livres são os ácidos nucléicos que podem ser modificados estruturalmente, como a molécula do ácido desoxirribonucléico (DNA), implicando em mutações gênicas.^(24, 25)

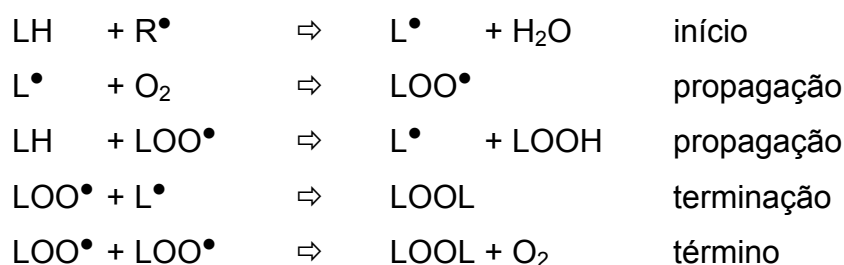
A membrana celular é muito susceptível às agressões provocadas pelas ERO devido aos níveis aumentados de ácidos graxos em seu meio e sua importante função de interação de proteínas e lipídios. Ao sofrer lipoperoxidação, a bicamada lipídica que compõe a membrana celular, tem sua estrutura e sua permeabilidade aos solutos alterados e, conseqüente redução da interação com as mais diversas moléculas que entram e saem da célula. Este processo de lipoperoxidação tem sido relacionado a mecanismos altamente lesivos às células, que podem desencadear processos inflamatórios, envelhecimento precoce e até câncer.⁽²⁶⁻²⁹⁾

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia que uma vez iniciada propaga-se continuamente. Na fase de iniciação os radicais livres e lipídios reagem com os lipídios insaturados das membranas, retirando o hidrogênio

para formar radical peroxila. Na primeira fase da propagação esse radical peroxila retira um novo hidrogênio dos lipídios insaturados, formando hidroperóxido de lipídio e novamente lipídio na segunda fase da propagação. Os peróxidos de lipídios formados podem ser clivados em aldeídos, como o malondialdeído (MDA), capaz de aumentar significativamente a toxicidade de radicais livres, sendo considerado o “segundo mensageiro de toxicidade”.⁽²⁸⁻³⁰⁾

Essa seqüência pode ser interrompida se o radical livre encontra-se com outro radical, estabilizando-se, ou, na presença de antioxidantes que neutralizam a ação do radical livre. De outra forma, a lipoperoxidação atingirá a fase de término quando os radicais lipídicos e peroxila formados anteriormente se propagarem até a autodestruição⁽²⁹⁾.

As etapas desta reação onde L representa o lipídio, desenvolvem-se da seguinte maneira:



Está bem estabelecido que o estresse oxidativo desencadeia uma série de alterações como a hipertrofia cardíaca, perda funcional de miócitos ao aumento da apoptose e necrose e, fibrose intersticial desencadeando então à disfunção da bomba cardíaca.⁽³¹⁻³³⁾ Nesta configuração, o aumento da produção de ERO pode contribuir também para uma disfunção contrátil.

Para impedir a ação tóxica dos radicais livres sobre as células, indivíduos saudáveis apresentam mecanismos de defesa antioxidantes. O

desequilíbrio entre estes mecanismos de defesa e os radicais livres, constitui o “estresse oxidativo”. (15, 25)

Os mecanismos de defesa antioxidante atenuam as conseqüências do estresse oxidativo, eliminando ou reduzindo a intensidade das reações. Devido à especificidade da formação dos radicais livres nas células, as enzimas antioxidantes são produzidas e liberadas no mesmo compartimento celular, compondo assim a primeira linha de defesa contra a lesão oxidativa.⁽¹³⁾

Existem basicamente dois grupos de antioxidantes biológicos, os enzimáticos ou endógenos e os não enzimáticos ou exógenos. (19, 27, 34, 35)

Os enzimáticos ou endógenos são:

❶ Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD representa uma série de enzimas multifuncionais de ação antioxidante sendo encontrada na maioria de células animais. (20) Entretanto, sua atividade é tecido-específica, de forma que no tecido cardíaco é cerca de quatro vezes menor do que no tecido hepático.

A SOD cataliza a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e H_2O em presença do íon H^+ . (21)

Foram identificados três tipos de superóxido dismutase: manganês superóxido dismutase (MnSOD), presente na mitocôndria; cobre-zinco superóxido dismutase (Cu-ZnSOD), presente no citosol e; ferro superóxido dismutase (FeSOD) presente no citoplasma da *Escherichia Coli*. (19)

A Cu-ZnSOD é uma enzima que protege vários órgãos dos danos induzidos pelo O_2 em músculo esquelético. (36) Foi demonstrada uma relação

entre a SOD e a atividade antiinflamatória em que os leucócitos polimorfonucleares, células efetivas na resposta inflamatória, liberam grandes concentrações de O₂ e que a administração de SOD inibia essa liberação.⁽³⁷⁾

② **Glutationa Peroxidase (GSH-Px)**

A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio para a água. É encontrada no citosol das células animais, inclusive no coração e, a sua atividade é dependente da concentração de glutatona reduzida (GSH), utilizada como doadora de elétrons.^(19, 22, 29)

③ **Catalase (EC)**

A catalase é uma metaloproteína que catalisa a formação de água e oxigênio a partir do peróxido de hidrogênio, formado pela ação da SOD. Nos mamíferos, está presente nos eritrócitos e em quase todos os tecidos, existindo em maior quantidade no fígado, rim e baço.⁽³⁸⁾ Embora a catalase faça parte de um dos mecanismos de defesa celulares contra os radicais livres, sua atuação é de pouca importância no tecido cardíaco.^(39, 40)

Os antioxidantes não enzimáticos ou exógenos são: - ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), retinol (vitamina A), betacaroteno, licopeno, luteína, selênio e outros metais antioxidantes.^(41, 42)

2.2 Radicais Livres e Exercício Físico

Atualmente, existem claras evidências que suportam a importância do

exercício físico regular na prevenção e/ou no controle de algumas doenças crônicas. Esse conceito de que vida sedentária não beneficia a saúde originou-se a partir de estudos epidemiológicos iniciados na década de 1950. Estes estudos demonstraram correlação positiva entre a incidência de doenças cardiovasculares com ao sedentarismo, comparando-se o nível de atividade física de funcionários burocratas dos correios com os carteiros, que circulavam diariamente pelas ruas. Semelhantemente, o mesmo foi feito com cobradores dos ônibus de Londres que subiam e desciam escadas diariamente, aos motoristas. ^(35, 43)

Os efeitos benéficos do exercício físico podem ser observados na função cardíaca, circulação periférica, função pulmonar e na musculatura esquelética. Indivíduos fisicamente ativos apresentam maior capacidade cardiorrespiratória em relação aos sedentários e, portanto, reduzido risco às doenças cardiovasculares. ⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾

A importância dos radicais livres tornou-se evidente a partir de estudos em medicina desportiva que mostraram a presença desses radicais em lesões inflamatórias articulares e musculares, na síndrome *overtraining* e, mais recentemente nas lesões teciduais após isquemia e reperfusão cardíaca. ^(21, 22, 36)

Inúmeras adaptações bioquímicas estão associadas ao exercício físico, como por exemplo, a elevação da capacidade oxidativa mitocondrial de piruvato e ácidos graxos. ⁽⁴⁹⁾ A produção aeróbia de ATP ou fosforilação oxidativa, ocorre nas mitocôndrias, por meio da cadeia respiratória. O ATP é produzido através da fosforilação da adenosina difosfato (ADP) através da

energia liberada na transferência de hidrogênio, dos transportadores reduzidos, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂) ao oxigênio. A transferência de elétron na cadeia respiratória pode resultar na redução parcial do oxigênio, formando RL. ^(34, 50)

O fluxo sanguíneo coronário aumenta em até quatro vezes e a captação de oxigênio do sangue pelo músculo cardíaco aumenta ainda mais durante o exercício físico. ^(51, 52) Portanto, inevitavelmente, o aumento do consumo de O₂ induzido pelo exercício físico apresenta-se como uma situação favorável à produção acrescida de ERO e, aparentemente, ao incremento do estresse oxidativo a nível celular, tecidual e orgânico. ^(23, 26)

Uma vez que cerca de 2-5% do O₂ consumido pode resultar na produção de ERO, um incremento da taxa metabólica oxidativa cardíaca decorrente do exercício físico constitui-se como um fator predisponente para a produção acrescida de ERO a nível mitocondrial, com alterações no estado redox celular e aumentos dos indicadores diretos e indiretos de lesão oxidativa tecidual. ⁽⁵³⁾ Contudo, esta situação, repetida no tempo, poderá constituir um forte estímulo modelador dos diferentes sistemas antioxidantes cardíacos. ^(54, 55)

A relação entre o treinamento físico e estresse oxidativo ainda é controverso. Diversos estudos sugerem que o treinamento físico com natação ou esteira pode aumentar a capacidade de defesa antioxidante do músculo cardíaco, diminuindo a peroxidação lipídica. ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾ Adicionalmente, alguns pesquisadores demonstraram que o treinamento aumentou a resistência do miocárdio hipertrofiado de ratos à lipoperoxidação após isquemia e reperfusão. ⁽⁵⁹⁻⁶²⁾

Por outro lado, outras pesquisas demonstraram que o treinamento físico induz elevação da lipoperoxidação, da atividade da SOD e diminuição da atividade da GSH-Px no tecido cardíaco. E ainda, existem estudos que não detectaram alterações significativas na atividade da SOD, GSH-Px ou nas taxas de lipoperoxidação do miocárdio de ratos após treinamento. ^(63, 64)

2.3 Radicais Livres: Estudos Clínicos e Experimentais

Vários estudos têm examinado a influência do treinamento físico na atividade das enzimas antioxidantes. ^(57, 64) Estudos recentes indicam que o treinamento de resistência reduz as lesões do miocárdio resultantes do episódio de Isquemia-Reperusão (I-R). Adicionalmente, foi demonstrado que o treinamento de resistência pode acentuar a atividade de certas enzimas antioxidantes no coração. Dessa forma, a melhora da proteção contra a lesão cardíaca mediada por RL é um mecanismo potencial para explicar a “cardioproteção” induzida pelo exercício físico durante o episódio de I-R. ^(54, 65)

Um estudo realizado por Burneiko *et al* ⁽⁶⁶⁾ com ratos treinados por natação durante 9 semanas, analisou o estresse oxidativo no tecido do miocárdio. Os resultados mostraram que o treinamento realizado tanto sem sobrecarga, quanto com 2% de sobrecarga, elevou as concentrações de ácido tiobarbitúrico (TBA) e hidroperóxido (HP), no entanto reduziu as atividades da SOD total e SOD CU-ZN, sem alterar as atividades da glutathiona peroxidase (GSH-PX).

Somani *et al* ⁽⁶⁷⁾, examinaram a resposta de enzimas antioxidantes cardíacas em ratos destreinados e em ratos treinados durante 10 semanas por meio de um programa de treinamento de resistência. Os autores observaram que o exercício agudo induziu aumento das atividades de Mn-SOD, catalase e glutathione peroxidase apenas em ratos destreinados.

Posteriormente, Venditti & Di Meo ⁽⁶⁸⁾, relataram que 10 semanas de treinamento de natação resultou em melhora significativa da capacidade antioxidante *in vitro* de músculos esqueléticos e menor lipoperoxidação após o exercício exaustivo.

Adicionalmente, Frankiewicz-Jozko *et al* ⁽⁶⁹⁾, demonstraram um significativo aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido cardíaco de ratos destreinados após 3 horas de exercícios exaustivo na esteira. No entanto, estas alterações não foram detectadas em animais treinados por 4 semanas, sugerindo que treinamento físico pode proteger o tecido cardíaco da lesão oxidativa de lipídeos.

De acordo com Husain e Somani ⁽⁷⁰⁾, ratos submetidos a exercícios na esteira após 6,5 semanas de treinamento, apresentaram aumento significativo de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase) no músculo cardíaco.

Uma pesquisa realizada por Lew *et al.* ⁽⁷¹⁾ mostrou que a auto-regulação da atividade enzimática antioxidante cardíaca em resposta ao treinamento físico é intensidade-dependente. Neste estudo, a atividade da catalase, citrato sintase e da glutathione peroxidase foi analisada no miocárdio de ratos submetidos a exercício físico em esteiras sob diferentes durações (30, 60 e 90

min.) e diferentes intensidades (leve, moderada e alta). Nos diferentes grupos estudados, com treinamento moderado e alto, o ventrículo direito teve aumento da atividade da superóxido dismutase. No ventrículo esquerdo a superóxido dismutase, aumentou no treinamento de curta duração e alta intensidade e no de longa duração com intensidade baixa e moderada.

As respostas adaptativas do organismo frente ao exercício físico em relação à produção de estresse oxidativo e aos mecanismos de defesa antioxidantes parece ser tecido-específico. Verificando o efeito de um programa de treinamento por natação de 7 a 21 semanas sobre o comportamento da atividade da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em ratos, Kanter *et al* ⁽⁷²⁾, verificaram que após 21 semanas, a atividade da catalase foi auto-regulada no coração, enquanto que as atividades das outras enzimas foram aumentadas somente no plasma sanguíneo e no fígado.

Nakao *et al* ⁽⁷³⁾, investigaram o efeito do programa de treinamento por natação durante 6 semanas nas três isoenzimas de SOD em ratos. Os resultados obtidos sugerem que, com exceção do fígado, as respostas de outros tecidos (músculo esquelético, rim) são diferentes e o fígado pode ser um dos órgãos mais sensíveis para adaptação para estresse oxidativo durante treinamento físico.

Neste contexto, a fisioterapia, ciência que tem por objetivo eliminar ou minimizar as limitações físicas e sociais impostas a uma pessoa portadora de uma afecção aguda ou crônica e que utiliza o exercício físico como instrumento de trabalho, assume papel fundamental na recuperação dos indivíduos com disfunções do seu sistema cardiovascular. ⁽⁷⁴⁾

2.4 Exercício Físico, Hidratação e Estresse Oxidativo

A importância da hidratação está não somente por garantir um bom desempenho durante as atividades, encurtando o tempo de recuperação após as mesmas⁽⁷⁵⁾, mas, sobretudo ao considerar que o ser humano constitui-se, em grande parte, de água. O teor de água do organismo humano depende da idade, composição corporal e do sexo, representando cerca de 60% da massa corporal de um homem e 50% da massa de uma mulher. ^(76, 77)

O balanço hídrico e de eletrólitos é fundamental para a função de todos os órgãos e, de fato, para manter a saúde em geral. A água proporciona o meio de reações bioquímicas no tecido celular e é essencial para a manutenção do volume adequado de sangue e, portanto, da integridade do sistema cardiovascular. ^(78, 79)

Juntamente com o oxigênio, a água é um dos elementos mais importantes para a vida; ela é elemento estrutural de macromoléculas, serve como solvente para substâncias de menores moléculas atua como meio de transporte e é utilizada em muitas reações enzimáticas. Além disso, somente em soluções aquosas é que as substâncias podem entrar e sair das células e reagir entre si no meio intracelular. A água também lubrifica as articulações e é importante para o sistema cardiovascular e para a termorregulação. ^(5, 76, 80, 81)

Além disso, a água tem papel importante na homeostase celular durante o exercício físico. Os eritrócitos que carregam oxigênio e os nutrientes como a glicose, os aminoácidos e os ácidos graxos alcançam os músculos ativos através do plasma sangüíneo, o qual é constituído basicamente de água; da mesma forma que o dióxido de carbono e outros produtos metabólicos deixam as células musculares através do plasma sangüíneo. ⁽⁷⁷⁾

Uma desidratação relativamente pequena, da ordem de um a dois por cento do peso corporal é suficiente para alterar o desempenho em exercícios de resistência⁽⁸¹⁾; perdas de líquidos e minerais equivalentes a quatro por cento, reduzem o desempenho da força do esportista. A partir de cinco por cento, surgem alterações fisiológicas graves (fadiga, câibras musculares). Perdas de líquido de mais de dez por cento do peso corporal são críticas para a vida.^(75, 76)

Bergeron *et al*⁽⁸⁷⁾, verificou que na desidratação progressiva ocorre uma diminuição do volume circulatório, conhecido como hipovolemia, uma vez que a água segue a mesma direção do fluxo gerado pelos íons sódio e cloreto perdidos através da transpiração, ou seja, do espaço extracelular para o ambiente externo.

A água do corpo provém de duas fontes principais: da ingestão de líquidos ou da água contida nos alimentos e da síntese que ocorre no organismo em consequência da oxidação dos carboidratos, sendo a ingestão total de água de aproximadamente 2300 ml/dia, considerando que dependendo do clima, dos hábitos individuais e do nível de atividade física⁽⁸⁰⁾, este valor pode ser alterado, sendo a sensação de sede o primeiro sinal relacionado ao seu controle.⁽⁸²⁾

Deve-se contrabalancear cuidadosamente a ingestão de água pelas perdas diárias que ocorrem a partir do organismo. A evaporação de líquido do trato respiratório e a difusão da pele são, quando considerados juntos, responsáveis por perda de cerca de 700 ml/dia em condições normais.

Normalmente, apenas pequena quantidade de água (100 ml/dia) é perdida nas fezes. ⁽⁸⁰⁾

O restante das perdas hídricas do corpo é precisamente controlado e ocorre através da urina excretada pelos rins e do suor. O rim normal tem a extraordinária capacidade de variar as proporções relativas de solutos e de água na urina; quando existe água em excesso no corpo e a osmolaridade dos líquidos corporais encontra-se reduzida, o rim é capaz de excretar urina com baixa osmolaridade (diluída). Inversamente, quando ocorre déficit de água e a osmolaridade dos líquidos corporais encontra-se elevada, o rim é capaz de excretar urina concentrada. ⁽⁸⁰⁾

Quando um organismo apresenta uma redução do conteúdo de fluidos corporais caracteriza-se uma situação conhecida como hipoidratação, sendo a hiperidratação caracterizada por um volume de água no corpo acima do normal. O termo desidratação define uma redução mais ou menos rápida da água corporal. ⁽⁸¹⁾

O processo de déficit hídrico está intimamente associado à prática de atividades físicas, e nesse caso, a desidratação hipertônica é observada. Quando da perda hídrica pela sudorese, perde-se água principalmente do espaço extracelular e o equilíbrio osmótico é afetado. Visando o seu restabelecimento, a água desloca-se do meio intra para o meio extracelular por meio do mecanismo de regulação osmótica. Dessa forma, um processo de desidratação contínuo durante o exercício físico conferirá uma progressiva redução do conteúdo hídrico em ambos os compartimentos. ^(78, 83)

A hipoidratação induzida pela sudorese promoverá redução do volume plasmático e aumento da pressão osmótica do plasma em proporção à quantidade de

perda de fluido. O volume plasmático diminui em razão de o plasma fornecer o líquido precursor do suor. Sendo o mesmo hipotônico em relação ao plasma observa-se também o aumento da pressão osmótica. O sódio e o cloreto são os principais responsáveis pela osmolalidade plasmática elevada, auxiliando na mobilização do fluido do espaço intracelular para o extracelular como mecanismo de defesa em pessoas hipoidratadas. ^(79, 84-86)

A regulação do balanço hídrico é mantida pelo sistema vasopressina e renina-angiotensina-aldosterona, um mecanismo hormonal que controla a osmolaridade, o conteúdo de sódio e o volume do líquido extracelular. ⁽⁸²⁾

Por uma série de ajustes compensatórios esta redução de volume plasmático produz efeitos marcantes na capacidade do coração de bombear sangue e oxigênio aos órgãos que necessitam de um fluxo sanguíneo mais intenso durante a atividade física. Para manter o débito cardíaco e a pressão arterial sob tais condições a frequência cardíaca deve aumentar ^(81, 88, 89) como consequência há diminuição da força aeróbica máxima e do desempenho real, pois o limite de tolerância à temperatura corpórea interna é atingida mais rapidamente causando hipertermia, e o tempo necessário para se chegar à exaustão é reduzido. É de se esperar que se o indivíduo estiver hidratado antes de se exercitar, os efeitos nocivos da desidratação demorem mais para se manifestar. ^(88, 90)

Alterações decorrentes do reduzido conteúdo hídrico intracelular tais como o estado de hidratação de macromoléculas e conseqüente mudanças conformacionais, redução do transporte intracelular citoplasmático, alterações no pH e na concentração de íons citoplasmáticos, e acúmulo de íons orgânicos e inorgânico⁽⁹¹⁾ causam disfunções no transiente de enzimas ou na cadeia de

transporte de elétrons que culminam em produção de RL.

A fim de estabilizar as condições fisiológicas e minimizar as pressões sobre os sistemas cardiovascular, neuromuscular e termorregulação é importante repor os líquidos durante o exercício, prolongando assim o tempo de execução do mesmo.^(10, 11)

As relações entre o desempenho durante o exercício físico, a desidratação e a reidratação tem sido demonstrado por muitos pesquisadores.^(92, 93) No entanto, é escasso na literatura estudos que investigaram o efeito do estado de hidratação sobre o estresse oxidativo subsequente ao exercício físico.

Recentemente, Paik *et al*⁽⁹⁴⁾ demonstraram aumento de marcadores de estresse oxidativo no plasma sanguíneo de indivíduos desidratados (3% de desidratação) submetidos a corrida em esteira rolante até a exaustão (a 80% do VO_2 máx). No entanto, este efeito pôde ser minimizado pela reposição hídrica com água ou bebidas hidroeletrólíticas esportivas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

O estudo caracteriza-se como experimental, apresentando como variável dependente o comportamento do estresse oxidativo. Como variáveis independentes serão consideradas: restrição hídrica, treinamento físico e momento de sacrifício.

3.2 Caracterização da Amostra

O protocolo experimental foi aprovado pelo CEEA (Comitê de Ética na Experimentação Animal) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP no dia 12 de abril de 2005, protocolo F- 001-002394/2004. Para a realização do experimento foram utilizados 72 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. Albina, Rodentia, Mammalia), com idade de aproximadamente 70 dias, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, e mantidos no Biotério da FCT/UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Campus de Presidente Prudente. Esses animais permaneceram no biotério até completar 70 dias para serem utilizados. Foram alojados em gaiolas de plástico, sendo seis gaiolas coletivas e trinta e seis gaiolas individuais para o controle da restrição hídrica, à temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 7:00 à 19:00 horas (período claro) e 19:00 à

7:00 (período escuro).

O manejo e o transporte dos animais do biotério para a esteira, sempre foi realizado por uma mesma pessoa a fim de evitar estresse dos ratos.

3.3 Formação dos Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, marcados e organizados em seis grupos:

- **GAS** (n=12), Controle, os animais desse grupo foram alojados em gaiolas plásticas coletivas (30 x 45 x 16 cm) com 4 animais cada (Figura 1). Não realizaram o programa de treinamento, foram alimentados com ração padrão e água de torneira fornecida *ad libitum*. Forneceram a média de ingestão de água para o cálculo da restrição hídrica dos animais do **GRHS**.

- **GRHS** (n=12), os animais desse grupo foram alojados em gaiolas metálicas individuais. Não realizaram o programa de treinamento, sendo alimentados com ração padrão *ad libitum* e água de torneira fornecida de maneira controlada, com restrição de 25% a partir da média ingerida pelos animais do **GAS**. Seis animais foram sacrificados 1 hora após o programa de treinamento e seis após 72 horas.

- **GAE** (n=12), os animais desse grupo foram alojados em gaiolas plásticas coletivas (60 x 50 x 20 cm) com 6 animais cada. Realizaram o programa de treinamento, foram alimentados com ração padrão e água de torneira fornecida *ad libitum*. Forneceram a média de ingestão de água para o cálculo da restrição hídrica dos animais do **GRHE**. Seis animais foram

sacrificados 1 hora após o programa de treinamento e seis após 72 horas.

- **GRHE** (n=12), os animais desse grupo foram alojados em gaiolas metálicas individuais (30 x 20 x 20 cm) (Figura 2). Realizaram o programa de treinamento, sendo alimentados com ração padrão *ad libitum* e água de torneira fornecida de maneira controlada, com restrição de 25% a partir da média ingerida pelos animais de **GAE**. Seis animais foram sacrificados 1 hora após o programa de treinamento e seis após 72 horas.

- **GAE imediato** (n=12), os animais desse grupo foram alojados em gaiolas plásticas coletivas (60 x 50 x 20 cm) com 6 animais cada. Foram alimentados com ração padrão, água de torneira fornecida *ad libitum* e realizaram apenas uma sessão de treinamento, com seis animais sacrificados 1 hora após a mesma e seis após 72 horas.

- **GRHE imediato** (n=12), os animais desse grupo foram alojados em gaiolas metálicas individuais (30 x 20 x 20 cm) (Figura 2). Foram alimentados com ração padrão *ad libitum* e água de torneira fornecida de maneira controlada, com restrição de 25% a partir da média ingerida pelos animais de **GAE**. Os animais desse grupo realizaram apenas uma sessão de treinamento, com seis animais sacrificados 1 hora após a mesma e seis após 72 horas.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

GRUPOS 6 x 12	Condições Experimentais		
	Treinamento	Restrição Hídrica	Sacrifício
GAS	N	Ausência	1h / 72h
GRHS	N	Presença	1h / 72h
GAE	S	Ausência	1h / 72h
GRHE	S	Presença	1h / 72h
GAE imediato	N	Ausência	1h / 72h
GRHE imediato	N	Presença	1h / 72h

S = Sim; N = Não; Ausência = sem restrição hídrica; Presença = com Restrição Hídrica

Os animais dos grupos GAE foram treinados no período da manhã e, os dos grupos GRHE no período da tarde, sempre no mesmo horário às segundas, quartas e sextas-feiras.

O cálculo da restrição hídrica foi feito separadamente durante o período para o grupo que não realizou o programa de treinamento e para o que realizou, porque se sabe que o consumo de água durante o exercício aumenta drasticamente. ⁽⁸⁶⁾

A correção foi realizada a cada dois dias respeitando o que foi ingerido nos dias de treinamento e o que foi ingerido nos dias de repouso, realizando a restrição hídrica de 25% de acordo com o que os animais ingeriam nesses dias, a água era proporcionada relacionando os grupos que não realizaram o treinamento e os grupos que realizaram o treinamento, ou seja, a quantidade de água ofertada ao GRHE era baseada na quantidade ingerida pelo GAE, e a quantidade de água ofertada ao GRHS era baseada na quantidade ingerida pelo GAS.

Para os fins de semana (sexta, sábado e domingo), o cálculo foi realizado utilizando um valor da quantidade ingerida no último dia de treinamento e dois da quantidade ingerida no último dia de repouso, ou seja, foi realizado baseando-se na quarta e quinta - feira anterior.



Figura 1 - Gaiola coletiva utilizada para alojar os animais que ingeriam água *ad libitum*.



Figura 2 - Gaiola individual utilizada para alojar os animais com restrição hídrica.

3.3.1 Percentual de Restrição Hídrica

Segundo Wilmore & Costill ⁽⁷⁷⁾, em adultos a ingestão diária de água deve ser em torno de 33 mililitros (mL) de água por quilograma (kg) de peso corporal. Esse mesmo indivíduo tem um teor de água que varia 57 a 65% (média = 61%) do total da massa corporal. ⁽⁹⁵⁾

Uma desidratação relativamente pequena, da ordem de um a dois por cento do peso corporal é suficiente para alterar o desempenho em exercícios de resistência⁽⁸¹⁾, entretanto alterações fisiológicas graves (fadiga, câibras musculares) surgem somente a partir de uma desidratação de cinco por cento do peso corporal. ⁽⁷⁵⁾

Um indivíduo de 100 Kg tem aproximadamente 61 Kg de sua massa corporal corresponde ao teor de água do organismo, e sua ingestão diária de água deveria ficar em torno de 3,33 L. Supondo uma desidratação de 1,5% do teor de água da massa corporal desse indivíduo, haveria uma perda de 0,915 ml do teor de água do organismo a qual corresponde a 27,27% da quantidade ideal de água ingerida. ⁽⁹⁵⁾

Logo, em condições ideais uma restrição de 25% da água ingerida, não causa uma desidratação maior que 2% do peso corporal, o que não acarreta em graves alterações fisiológicas. ⁽⁹⁵⁾

Não foram encontradas referências com o comportamento de animais na situação de restrição hídrica, assim os cálculos foram baseados no comportamento de humanos.

3.4 Programa de Treinamento

O programa de treinamento foi realizado em esteira rolante para animais de pequeno porte, no Laboratório de Fisiologia do Estresse da FCT/UNESP - Campus de Presidente Prudente, durante doze semanas. A esteira foi construída pelo SENAI de Presidente Prudente, baseada no modelo de (Andrew *et al*⁽⁹⁶⁾).

A esteira é composta por um motor elétrico de 1480 rpm (rotações por minuto) e 1/3 HP (Horse power), com redutor de velocidade, de lona com suporte de madeira, dividida em oito pistas fechadas superiormente por vidro para evitar a fuga dos animais (Figura 3).



Figura 3 - Esteira rolante utilizada durante a realização do experimento.

A lona da esteira possui 3,0 metros de comprimento, onde os animais andavam a uma velocidade de 9,75 metros por minuto, que totalizou uma quantidade de metros a cada sessão de 60 minutos, que corresponde a um exercício de baixa intensidade.⁽⁹⁷⁾

As sessões de treinamento foram realizadas três vezes por semana

(segundas, quartas e sextas-feiras), durante doze semanas, sendo que a primeira semana foi de adaptação ao ambiente de treinamento. Na semana de adaptação os animais foram submetidos a sessões de treinamento com duração de 15, 30 e 45 minutos e nas onze semanas subseqüentes os animais realizaram três sessões de treinamento de 60 minutos. A cada sessão, seis animais eram colocados simultaneamente nas raias da esteira (Figura 4).

Os animais foram pesados três vezes por semana, antes da execução do treinamento e os pesos anotados individualmente em planilhas.



Figura 4 – Animais realizando a sessão de treinamento durante o experimento.

3.5 Obtenção das Amostras

Para a coleta das amostras os animais foram sacrificados por decapitação, realizando-se logo em seguida o procedimento cirúrgico. Os animais dos grupos **GAE** e **GRHE** foram sacrificados em duas etapas: seis uma hora após a última sessão de treinamento e, seis, 72 horas após a

mesma. Os animais do **GAE imediato** e **GRHE imediato** também foram sacrificados em duas etapas: seis animais, uma hora após uma única sessão de treinamento e, seis 72 horas após a mesma. Os controles foram sacrificados utilizando o mesmo protocolo, mesmo não realizando o treinamento.

Para a retirada do coração o toráx do animal foi cuidadosamente aberto preservando-se todas as estruturas como mostra a Figura 5.

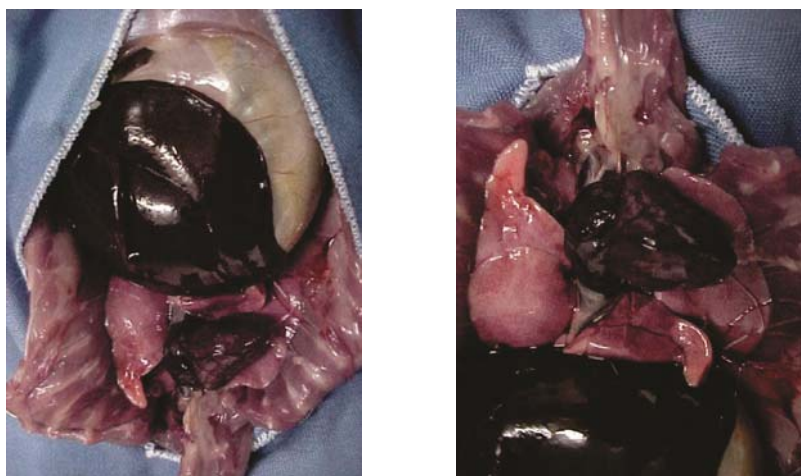


Figura 5 - Incisão longitudinal para retirada do coração.

Após este procedimento o coração (Figura 6) foi imediatamente pesado em balança analítica eletrônica (Figura 7) marca Sauter e os dados anotados em uma ficha para posterior análise estatística. Em seguida, com uma seringa, foi injetado soro fisiológico para lavar o coração e remover o sangue das cavidades para então separar fragmentos do músculo cardíaco (cerca de 1mg). Os fragmentos separados para análise do estresse oxidativo foram armazenados em eppendorfs que foram imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido e foram devidamente congelados para posterior análise bioquímica.



Figura 6 – Coração.

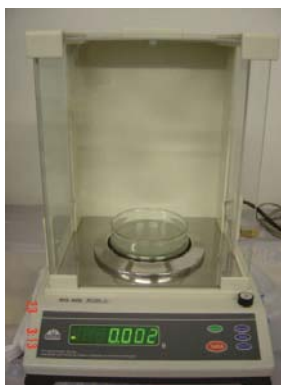


Figura 7 - Balança de precisão utilizada para pesar os corações.

3.6 Análises Bioquímicas

A análise bioquímica foi realizada no Laboratório de Radicais Livres do Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina – UEL. O transporte do material do Laboratório de Presidente Prudente para Londrina se deu por via terrestre, cuidadosamente armazenado em nitrogênio. O período de armazenamento até o início da análise do material foi de trinta e cinco dias.

3.6.1. Obtenção de Homogenato e Sobrenadante do Miocárdio de rato

O tecido do miocárdio foi pesado e transferido para uma solução tampão Fosfato de Potássio Monobásico (K_2HPO_4) 10 mM em Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9%, pH 7.4, na proporção de 10 mL de solução para cada 100 mg de tecido. Cada amostra foi então homogeneizada em homogeneizador tipo ultraturrax, sob banho de gelo. Os tecidos foram homogeneizados de forma idêntica, em 5 ciclos de 30 segundos, com 1 minuto de intervalo. Utilizou-se homogenato total para os ensaios de quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e medida da quimiluminescência (QL). O sobrenadante de uma centrifugação a 11000 x g, por 15 minutos em centrífuga refrigerada (Janetzky K24) foi usado para análise da capacidade antioxidante total (TRAP).

3.6.2 Quantificação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O método do TBARS, modificado por Cecchini *et al*⁽⁹⁸⁾, foi utilizado para a quantificação de lipoperóxidos de membrana como descrito no Quadro 2. A amostra usada no método corresponde ao homogenato citado no item 3.6.1.

Quadro 1. Ensaio para quantificação das substâncias reativas de TBARS utilizadas na quantificação de lipoperóxidos de membrana.			
MISTURA	BRANCO (mL)	TUBO 1 (MI)	TUBO 2 (mL)
Amostra	-----	1,0	1,0
KCl (1,15%)	1,0	-----	-----
H ₂ O	0,2	0,2	-----
FeCl ₃ (1mM)	-----	-----	0,1
Ác. Asc (1mM)	-----	-----	0,1
TCA (2,8%)	1,0	1,0	1,0
TBA (1%)	1,0	1,0	1,0

Os tubos foram agitados e colocados em banho de água à 95° C por 15 minutos. Em seguida, inseridos em banho de gelo e acrescentado 2,0 ml de n-butanol, agitados vigorosamente por 40 segundos e submetidos à centrifugação de 2.400g por 15 minutos. Em seguida, a leitura da fase orgânica foi realizada à temperatura ambiente em espectrofotômetro (Varian 634 S) de duplo feixe a 535 e 572 nm.

Os níveis de lipoperoxidação foram expressos em nanomoles de dialdeído malônico/100mg de tecido, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{nanomoles / 100 mg de tecido} = \frac{\text{ABS} \times 1000 \times 2}{\text{---}}$$

ABS = absorvência

2 = fator de diluição

156 = coeficiente de extinção mmolar do TBA a 535 nm ($E_{535} = 156. \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Buege e Aust⁽⁹⁹⁾).

3.6.3 Medida da Quimiluminescência em Miocárdio estimulada por Hidroperóxido de Tert-Butil

Para medida da QL utilizou-se o método descrito por Gonzales-Flecha *et al.*⁽¹⁰⁰⁾ Para tanto, usou-se 875 μL do homogenato descrito no item 2.6.1, 105 μL de tampão KH_2PO_4 10 mM, NaCl 0,9% pH 7,4, e adicionou-se 20 μL de t-butil hidroperóxido (concentração final de 6mM). A QL estimulada pelo tert-butil foi aferida em luminômetro TD 20/20 (Turner Designs), com resposta de 300-650 nm. Os resultados foram expressos em Unidades Relativas de Luz (URL)/g de tecido. A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada utilizando-se análise de regressão linear das curvas médias.

3.6.4 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) por Luminescência

A TRAP foi avaliada segundo as técnicas descritas por Niki *et al.*⁽¹⁰¹⁾ e Repetto *et al.*⁽¹⁰²⁾, conforme mostrada na Quadro 3 abaixo. Os reagentes foram colocados em tubos específicos de 1 mL, acondicionados ao abrigo da luz. A amostra utilizada foi o sobrenadante descrito no item 2.8.1. O ABAP (2-2 azobis-amidino-propano) corresponde ao sistema gerador de radicais livres. A

QL estimulada após a adição do ABAP reage com o luminol, sendo aferida por 30 minutos em luminômetro TD 20/20 (Turner Designs).

Quadro 2. Ensaio para Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) por luminescência de TRAP.			
MISTURA	1ª Leitura (mL)	2ª Leitura (mL)	3ª Leitura (mL)
Tampão Glicina (0,1M) pH 8.0	0,9	0,83	0,83
Luminol (200 μ M)	0,05	0,05	0,05
ABAP (200 μ M)	0,05	0,05	0,05
Trolóx (20 μ M)	-----	0,07	-----
Amostra	-----	-----	0,07

O sistema foi calibrado adicionando-se à reação um análogo da vitamina E (trolox), para comparação com a mesma quantidade de amostra. O tempo de redução (min) da luminescência em níveis basais, desde a adição da amostra à mistura de reação até a recuperação dos níveis iniciais de luminescência, é proporcional a concentração de antioxidantes presentes na amostra. Este período é denominado tempo de indução (t_{ind}). Após o consumo dos antioxidantes, os radicais do luminol são regenerados e os níveis iniciais de luminescência são recuperados. A comparação entre o t_{ind} após a adição de trolox e t_{ind} após adição de amostra, permitirão obter valores de TRAP em μ M de trolox de acordo com a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M trolóx}) = t_{\text{amostra}} / t_{\text{trolóx}}$$

t_{amostra} = tempo de indução promovido pela adição da amostra

$t_{\text{trolóx}}$ = tempo de indução promovido pelo mesmo volume de 1 μM de trolóx

3.7 Procedimentos Estatísticos

Para análise do peso corporal, peso do coração, relação peso do coração/peso corporal foi aplicado análise de variância (ANOVA).

As análises descritivas de todas as variáveis estudadas estão apresentadas como médias e erros-padrão da média (SEM). Utilizou-se programa de análise estatística computadorizada (Origin 6.0), para análise dos testes de TBARS e TRAP. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste t de student para dados não pareados, com valor de $p < 0,05$ considerado significativo. Para análise de QL, utilizou-se o programa *Graph Pad Prism 4*. A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância *two-way* ANOVA, com $p < 0,05$ considerado significativo, utilizando-se o teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls como *post-hoc*, quando necessário. A análise de regressão linear foi utilizada para obter-se a velocidade inicial (V_0) da curva de QL, unindo-se o ponto inicial e máximo de leitura da curva média QL-tempo.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados quanto às generalidades observadas durante os experimentos, ao peso corporal dos animais, ao peso do coração, a relação peso do coração/peso corporal e análises bioquímicas.

4.1 Generalidades

Na semana de adaptação ao treinamento, dois dos animais não se adaptaram e foram substituídos por animais de mesma idade e peso semelhante.

No decorrer das sessões alguns animais se mostraram agressivos e agitados, por vezes tentando fugir das raias nas quais eram colocados, com o tempo os animais se adaptavam, diminuindo a agitação. Observamos por algumas vezes que os animais prendiam a cauda junto à lona, sendo necessária intervenção manual mediante o reposicionamento do animal para correta execução do protocolo.

Outro fato observado foi que certos animais se posicionaram espontaneamente em sentido contrário àquele estabelecido, de forma a executar o treinamento por alguns instantes em marcha ré, principalmente quando houve intervenção para reposicionamento.

Alguns animais apresentaram feridas na cauda e um animal apresentou feridas no rosto. Com exceção destas circunstâncias, o período de treinamento

foi realizado sem intercorrências.

4.2 Peso Corporal (PC)

Os valores médios \pm desvio padrão dos pesos corporais dos animais dos diferentes grupos estudados no experimento se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 Valores médios do peso corporal dos animais dos grupos estudados.

GRUPOS	Peso Corporal inicial (g) (2 semanas antes do início do treinamento)	Peso Corporal (g) na 1ª semana de treinamento	Peso Corporal (g) na 12ª semana de treinamento
GAS	291,20 \pm 9,163	371,20 \pm 11,413	527,10 \pm 5,339
GRHS	290,75 \pm 21,346	311,42 \pm 2,872	376,98 \pm 7,795
GAE	294,50 \pm 11,448	356,04 \pm 8,369	485,33 \pm 7,163
GRHE	287,06 \pm 19,645	312,10 \pm 6,772	379,29 \pm 7,399
GAE imediato	297,50 \pm 17,521	342,41 \pm 18,647	410,91 \pm 21,060
GRHE imediato	294,33 \pm 19,772	335,83 \pm 19,063	372,66 \pm 22,247

Nota: GAS – animais sedentários que ingeriram água *ad libitum* (controle); GRHS – animais sedentários submetidos a restrição hídrica; GAE – animais treinados que ingeriram água *ad libitum*; GRHE – animais treinados submetidos a restrição hídrica; GAE imediato – animais que realizaram apenas uma sessão de treinamento que ingeriram água *ad libitum*; GRHE imediato - animais que realizaram apenas uma sessão de treinamento submetidos a restrição hídrica. Estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

As médias do peso corporal não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos duas semanas antes do início do treinamento ($p=0,67$). Logo após essa pesagem inicial, a restrição hídrica foi iniciada nos animais dos grupos GRHS, GRHE e GRHE imediato, e na primeira semana de treinamento apresentaram diferença significativa em relação aos

grupos GAS, GAE e GAE imediato. Na primeira semana de treinamento já pôde ser observado diferença entre o PC dos animais submetidos à restrição hídrica comparado aos seus respectivos controles. O PC dos animais do grupo GRHS apresentou redução de 16,10% em relação ao PC dos animais do GAS, os animais do grupo GRHE, de 12,37% do PC em relação ao PC dos animais do GAE e os animais do grupo GRHE imediato, de 1,92% em relação aos animais do GAE imediato.

A diferença entre o peso corporal dos animais dos grupos aumentou após as 12 semanas de treinamento. Na décima segunda semana de treinamento observamos as seguintes diferenças entre o PC dos animais submetidos à restrição hídrica comparado aos seus respectivos controles. O PC dos animais do grupo GRHS apresentou redução de 28,48% em relação ao PC dos animais do GAS, os animais do grupo GRHE, de 21,85% do PC em relação ao PC dos animais do GAE e os animais do grupo GRHE imediato, de 9,31% em relação aos animais do GAE imediato.

Os grupos submetidos à restrição hídrica apresentaram pesos corporais menores em relação aos com água *ad libitum*.

4.3 Peso do Coração (pc)

A Tabela 3 mostra os valores médios \pm desvio padrão do peso do coração dos animais dos diferentes grupos utilizados no experimento.

Tabela 3 Valores médios do peso dos corações (pc) dos animais dos grupos estudados.

GRUPOS	Peso do coração (pc) (g)
GAS	1,446 ± 0,152
GRHS	1,129 ± 0,111
GAE	1,469 ± 0,122
GRHE	1,140 ± 0,061
GAE imediato	1,183 ± 0,079
GRHE imediato	1,053 ± 0,048

Nota: GAS – animais sedentários que ingeriram água *ad libitum* (controle); GRHS – animais sedentários submetidos a restrição hídrica; GAE – animais treinados que ingeriram água *ad libitum*; GRHE – animais treinados submetidos a restrição hídrica; GAE imediato – animais que realizaram apenas uma sessão de treinamento que ingeriram água *ad libitum*; GRHE imediato - animais que realizaram apenas uma sessão de treinamento submetidos a restrição hídrica. Estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

O grupo que apresentou maiores valores de peso do coração foi o GAE e o que apresentou menores valores de peso do coração foi o GRHE imediato.

Foram relacionados os valores médios do peso dos corações dos grupos com restrição hídrica (GRHS, GRHE e GRHE imediato) e sem restrição hídrica (GAS, GAE e GAE imediato), os quais não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,727$ e $p = 0,669$ respectivamente). O mesmo foi feito com os grupos treinados (GAE e GRHE) e os grupos sedentários (GAS e GRHS), que apresentaram valores estatisticamente significantes com valor de $p < 0,001$.

Observamos as seguintes diferenças entre o pc dos animais submetidos à restrição hídrica comparado aos seus respectivos controles. O pc dos animais do grupo GRHS apresentou redução de 15,00% em relação ao pc dos animais do GAS, os animais do grupo GRHE, de 22,39% do pc em relação ao

dos animais do GAE e os animais do grupo GRHE imediato, de 10,98% em relação aos animais do GAE imediato.

4.4 Relação Peso Coração/Peso Corporal

O provável grau de hipertrofia miocárdica foi avaliado pela relação entre peso do coração (pc) e o peso do animal (PC). Na Tabela 4 podemos verificar a relação entre o peso do coração e o peso corporal.

Tabela 4 Valores médios da relação peso do coração/peso do corpo dos animais dos grupos estudados.

GRUPOS	Relação peso do coração/peso corporal
GAS	0,0027 ± 0,0002
GRHS	0,0029 ± 0,0002
GAE	0,0030 ± 0,0001
GRHE	0,0030 ± 0,0002
GAE imediato	0,0028 ± 0,0002
GRHE imediato	0,0028 ± 0,0002

Nota:GAS – animais sedentários que ingeriram água *ad libitum* (controle); GRHS – animais sedentários submetidos a restrição hídrica; GAE – animais treinados que ingeriram água *ad libitum*; GRHE – animais treinados submetidos a restrição hídrica; GAE imediato – animais que realizaram apenas uma sessão de treinamento que ingeriram água *ad libitum*; GRHE imediato - animais que realizaram apenas uma sessão de treinamento submetidos a restrição hídrica. Estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

A relação peso do coração / peso corporal não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Nota-se que aumento do peso do coração foi relativamente proporcional ao aumento do peso corporal, e dessa forma a relação se manteve em valores bastante próximos.

4.5 Análise da Lipoperoxidação

O MDA, resultado da peroxidação lipídica foi analisado pelo teste de TBARS e os valores encontrados são dados em nanomoles de MDA por grama de tecido. Os valores médios, mediana, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 5 Valores do MDA dos grupos estudados

	Média	Mediana	DP	Valor Mínimo	Valor Máximo
GAS	0,597	0,600	0,057	0,521	0,672
GRHS 1h	0,663	0,670	0,048	0,592	0,722
GAE 1h	0,570	0,571	0,033	0,513	0,608
GRHE 1h	0,643	0,647	0,049	0,576	0,715
GRHS 72 h	0,607	0,622	0,069	0,506	0,685
GAE 72 h	0,560	0,577	0,050	0,495	0,613
GRHE 72 h	0,602	0,594	0,043	0,558	0,683

Nota: GAS – animais sedentários que ingeriram água *ad libitum* (controle); GRHS1 – animais sedentários submetidos a restrição hídrica, sacrificados 1h após término do programa de treinamento; GAE1 – animais treinados que ingeriram água *ad libitum*, sacrificados 1h após término do programa de treinamento; GRHE1 – animais treinados submetidos a restrição hídrica, sacrificados 1h após término do programa de treinamento; GRHS72 – animais sedentários submetidos a restrição hídrica, sacrificados 72h após término do programa de treinamento; GAE72 – animais treinados que ingeriram água *ad libitum*, sacrificados 72h após término do programa de treinamento; GRHE72 – animais treinados submetidos a restrição hídrica, sacrificados 72h após término do programa de treinamento. Estatisticamente significativo para $p < 0,05$.

Quando comparados entre si, os grupos que receberam água *ad libitum* (Tabela 5), não apresentaram diferenças significantes nos valores de MDA, com $p=0,427$ (Figura 10). O GAS apresentou a maior concentração de MDA, seguido pelo GAE 1h e GAE 72h.

A figura 8 representa os valores da concentração de dialdeído malônico (MDA) estimulada por TBARS, em consequência da Lipoperoxidação em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora e 72 horas após o término do programa de treinamento. Evidencia-se que os valores dos grupos de animais sedentários e expostos ao treinamento, tanto com água *ad libitum* como com restrição hídrica, não revelam diferenças significativas em relação ao controle. O grupo GRHS1 obteve o maior valor médio de MDA e a diferença entre os valores encontrados comparados ao controle ficou bem próxima de alcançar a significância estatística, com $p=0,056$.

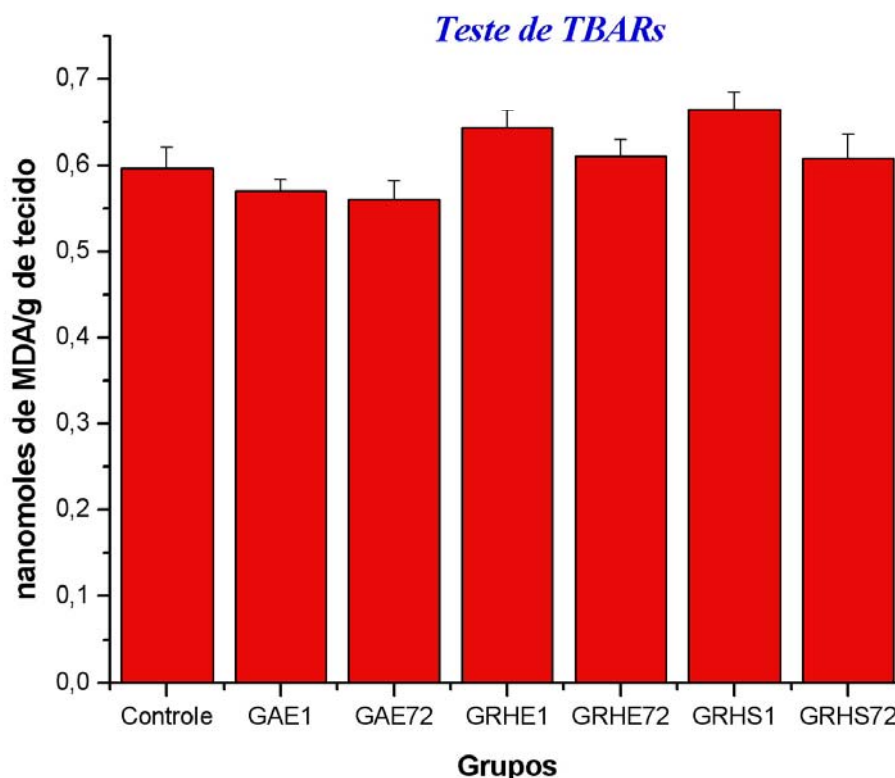


Figura 8 Gráfico representativo dos valores da concentração de dialdeído malônico (MDA) estimulada por substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em músculo cardíaco de ratos submetidos a sacrifício 1 hora e 72

horas após o programa de treinamento. Resultados expressos em nanomoles de Dialdeído malônico (MDA) por grama de tecido, dos grupos GAS – animais sedentários que ingeriram água *ad libitum* (controle) (n = 6); GAE1 – animais treinados que ingeriram água *ad libitum* e sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (n = 6); GAE72 – animais treinados que ingeriram água *ad libitum* e sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHE1 – animais treinados submetidos a restrição hídrica e sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHE72 – animais treinados submetidos a restrição hídrica e sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHS1 – animais sedentários submetidos a restrição hídrica e sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (n = 6); GRHS72 – animais sedentários submetidos a restrição hídrica e sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (n = 6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes por teste *t de student* para dados não pareados.

4.6 Análise da Quimiluminescência

A figura 9 mostra a curva de luminescência do miocárdio dos animais submetidos ao sacrifício 1 hora após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo. Evidencia-se que os animais treinados que receberam água *ad libitum* (GAE1) apresentam uma curva mais elevada, em relação ao controle (GAS) ($p < 0,0001$) e observa-se também que os animais treinados que

receberam água *ad libitum* (GAE1) também revela diferença nos valores da curva em relação aos animais sedentários submetidos à restrição hídrica (GRHS1) ($p < 0,0001$).

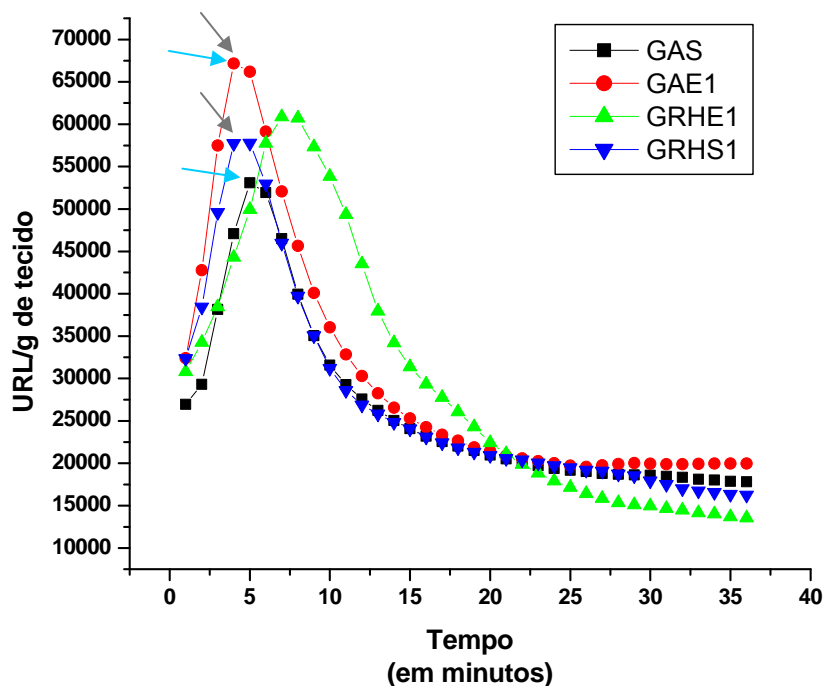


Figura 9 Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), são expressas por setas coloridas. As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way*

Anova.

- $p < 0,0001$ quando comparado ao GAS
→ $p < 0,0001$ quando comparado ao GRHS1

A figura 10 mostra a curva de luminescência do miocárdio dos animais submetidos a sacrifício 72 horas após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo. Observa-se que o grupo GRHE72 - animais treinados submetidos à restrição hídrica revela diferença nos valores da curva em relação ao controle (GAS) ($p < 0,0001$); grupo controle em relação ao GRHS72 – animais sedentários submetidos à restrição hídrica ($p < 0,0001$).

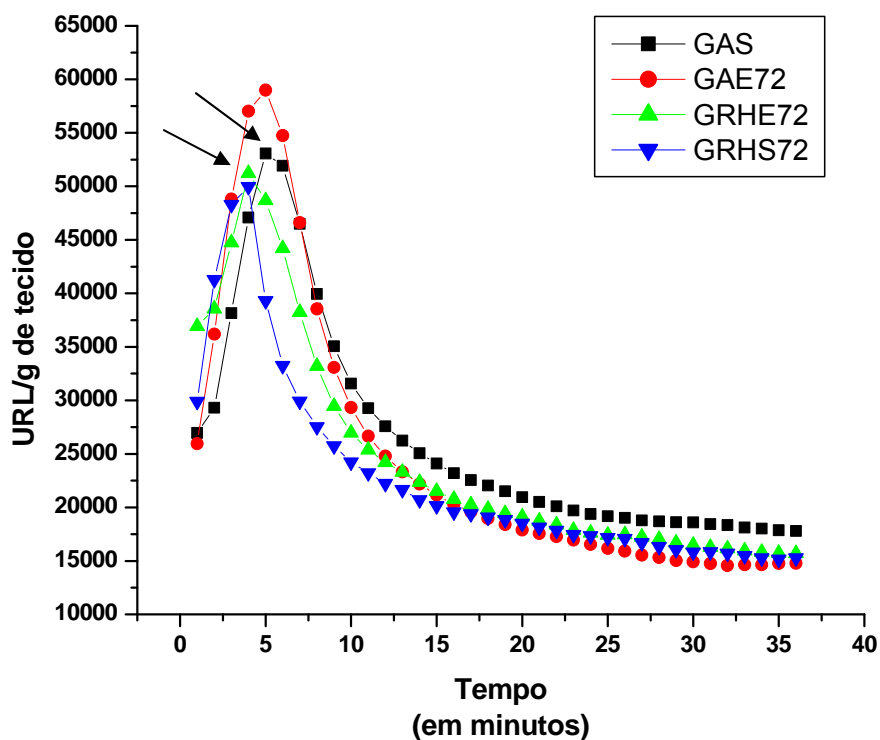


Figura 10 Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), está expressa por seta preta. As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way* Anova.

—————▶ $p < 0,0001$ quando comparado ao GRHE

A figura 11 mostra a curva de luminescência do miocárdio dos animais submetidos a sacrifício 1 hora após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo (GAS, GAE1, GRHE1, GRHS1) comparando com a curva de luminescência do miocárdio dos animais submetidos a sacrifício 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediate), expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo (GAEI1 e GRHEI1). Observa-se que os grupos GAEI1 e GRHEI1 revelam diferenças nos valores da curva em relação ao controle (GAS) ($p < 0,0001$).

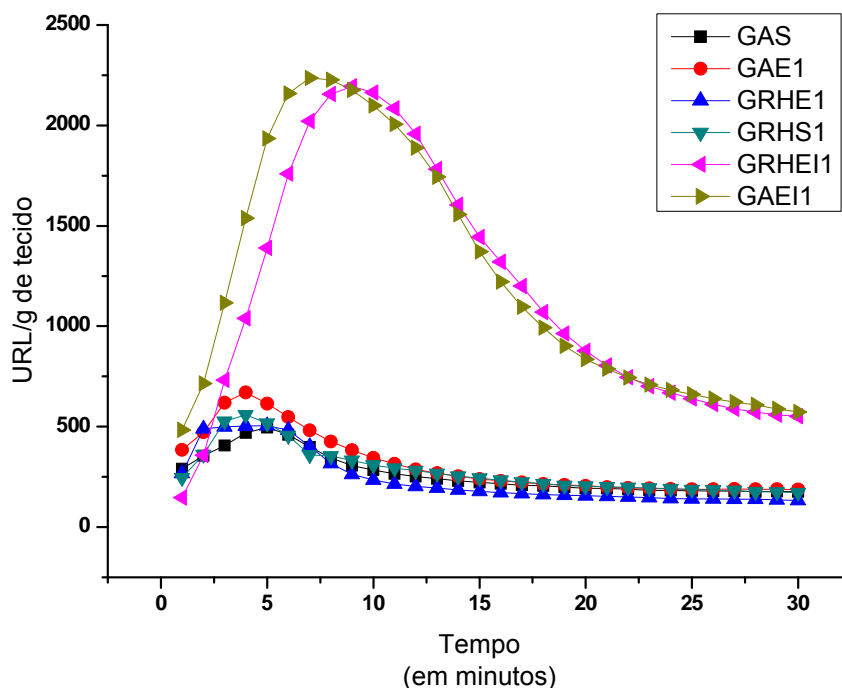


Figura 11 Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – animais sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE1 – animais treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE1 – animais treinados submetidos à restrição hídrica (n=6); GRHS1 – animais sedentários submetidos à restrição hídrica (n=6); GAEI1 – animais sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediato) que receberam água *ad libitum* (n=6) GRHEI1 – animais sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediato) submetidos à restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). As curvas representam 40 pontos extraídos da curva

original, e comparados por *two way* Anova.

A figura 12 mostra a curva de luminescência do miocárdio dos animais submetidos a sacrifício 72 horas após o término do programa de treinamento, expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo (GAS,GAE72, GRHE72, GRHS72) comparando com a curva de luminescência do miocárdio dos animais submetidos a sacrifício 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate), expressa em unidades relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo (GAEI72 e GRHEI72). Observa-se que os grupos GAEI72 e GRHEI72 revelam diferenças nos valores da curva em relação ao controle (GAS) ($p < 0,0001$), embora o GRHEI72 apresente boa recuperação.

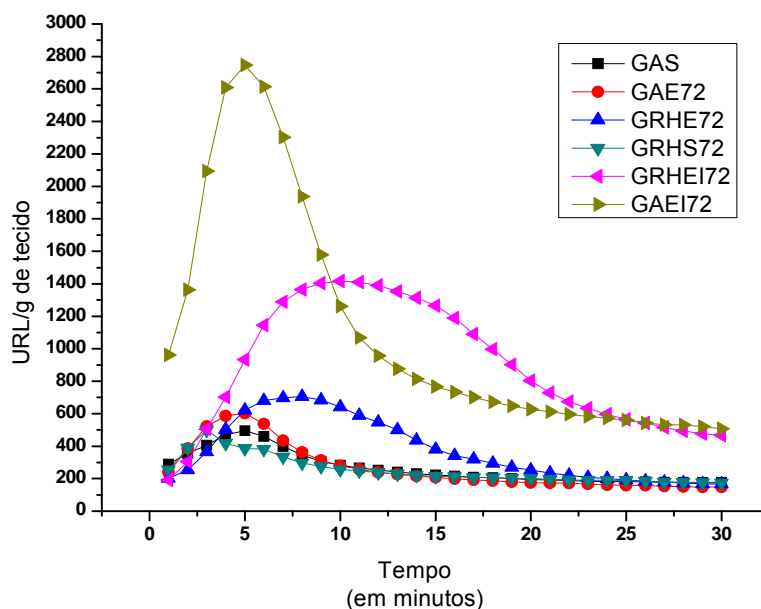


Figura 12 Curvas obtidas nas análises de Quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de tert-Butil (*t-BOOH*) em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento, expressa em unidades

relativas de luz por grama de tecido (URL/g tecido), em razão do tempo, dos grupos GAS – animais sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE72 – animais treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE72 – animais treinados submetidos à restrição hídrica (n=6); GRHS72 – animais sedentários submetidos à restrição hídrica (n=6); GAEI72 – animais sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate) que receberam água *ad libitum* (n=6) GRHEI72 – animais sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate) submetidos à restrição hídrica (n=6). A comparação dos resultados entre os grupos e a descrição das diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). As curvas representam 40 pontos extraídos da curva original, e comparados por *two way* Anova.

4.7 Análise da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

Tabela 6. Valores da média e erro padrão na análise da Capacidade Antioxidante Total (TRAP), dos animais sacrificados 1 hora e 72 horas após o treinamento.

Grupos	T. ind (min.)	Rate (URL/min.)	Pico (URL)	TRAP (μM trolox)
GAE1 (n=6)	5,51 \pm 1,1	0,341 \pm 0,01	458,40 \pm 138,6	0,788 \pm 0,16
GRHE1 (n=6)	7,12 \pm 0,5	0,224 \pm 0,06	402,52 \pm 74,1	0,521 \pm 0,04
GRHS1 (n=6)	5,38 \pm 0,3	0,280 \pm 0,06	462,04 \pm 61,9	0,374 \pm 0,02
GAS (n=6)	4,97 \pm 0,3	0,454 \pm 0,1	735,46 \pm 138,6	0,457 \pm 0,03
GAE72 (n=6)	4,61 \pm 0,5	0,459 \pm 0,03	616,8 \pm 26,1	0,362 \pm 0,04
GRHE72 (n=6)	6,18 \pm 0,4	0,328 \pm 0,03	475,56 \pm 38,1	0,430 \pm 0,03
GRHS72 (n=6)	6,97 \pm 0,4	0,198 \pm 0,02	371,97 \pm 15,0	0,998 \pm 0,06

Nota: O tempo de indução (T. ind) em minutos corresponde ao tempo (em minutos) que os antioxidantes solúveis presentes na amostra, impedem o disparo da reação de luminescência dada pelo 2-2 Azobis Amidinopropano. O Rate refere-se a velocidade inicial da reação, expressa em Unidade Relativa de Luz por minuto (URD/min). O Pico de Emissão da TRAP corresponde à emissão máxima atingida após consumo de antioxidante.

Os valores das variáveis relativas ao TRAP dos grupos de animais sacrificados 1 hora após o treinamento, como os sacrificados após 72 horas, são mostrados na Tabela 5.

Notou-se que para o tempo de indução, quando comparados ao GAS, grupo com água *ad libitum* e sedentário, GRHE1, grupo com restrição hídrica e exercício sacrificado 1h após o treinamento, e GRHE72, grupo com restrição hídrica e exercício sacrificado 72h após o treinamento, apresentaram maior tempo de indução ao azobis, ou seja, apresentaram maior quantidade de antioxidantes solúveis disponível para utilização. Isso aconteceu também com GRHS1 e GRHS72 grupos de animais sedentários submetidos à restrição hídrica pelo tempo correspondente ao treinamento.

Os grupos GAE1 animais com água *ad libitum* e exercício, sacrificados 1h após o treinamento e GAE72 animais treinados com água *ad libitum* sacrificados 72h após o programa de treinamento, apresentaram maior consumo de antioxidantes solúveis, quando comparados com os grupos GRHE1, animais treinados com restrição hídrica, sacrificado 1h após o treinamento e GRHE72, animais treinados com restrição hídrica, sacrificados 72h após o treinamento.

O grupo GRHE1, animais treinados com restrição hídrica, sacrificados 1h após o treinamento, apresentou maior quantidade de antioxidantes solúveis do que o grupo GRHS1, animais sedentários com restrição hídrica e sacrificados 1h após o treinamento.

O grupo GRHS72, animais sedentários submetidos à restrição hídrica, sacrificados 72 h após o treinamento apresentou recuperação no tempo de

indução, quando comparado ao GRHS1, animais sedentários submetidos à restrição hídrica, sacrificados 1 h após o programa de treinamento.

Na análise do Rate, somente o grupo GRHS72, animais sedentários submetidos à restrição hídrica e sacrificados 72h após o treinamento, apresenta diminuição dos níveis de radicais presentes na amostra suficientes para reduzir a velocidade de subida da reação, quando comparado ao grupo controle (GAS).

O grupo GAE72, animais treinados com água *ad libitum*, sacrificados 72h após o treinamento, apresenta recuperação dos níveis de emissão quando comparado ao grupo GAE1 animais treinados com água *ad libitum*, sacrificados 1h após o treinamento.

O grupo GAE72, animais treinados com água *ad libitum* e sacrificados 72h após o treinamento apresentou aumento significativo de antioxidantes solúveis, quando comparado aos grupos GRHE1, GRHS1, GRHE72, e GRHS72, grupos submetidos à restrição hídrica.

Os grupos GAE72, GRHE72, e GRHS72, com sacrifício 72 horas após o término do programa de treinamento, apresentaram diferenças entre si somente quando comparados os animais que foram submetidos à restrição hídrica e treinamento, GRHE72, e restrição hídrica somente, GRHS72.

Na análise do Pico de emissão, as diferenças significativas encontradas foram coerentes com as relacionadas no Rate.

Para análise da TRAP, animais sedentários submetidos à restrição hídrica (GRHS72), mostraram valores maiores em relação aos demais grupos, considerando os sacrificados 72h como os sacrificados 1h após o treinamento.

A figura 13 revela os valores da Capacidade antioxidante Total (TRAP), medida por QL em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento. Os resultados apontam para um consumo da TRAP apenas no grupo GRHS1 – animais sedentários submetidos à restrição hídrica, quando comparado ao grupo controle GAS – animais sedentários que receberam água *ad libitum*, porém não significante.

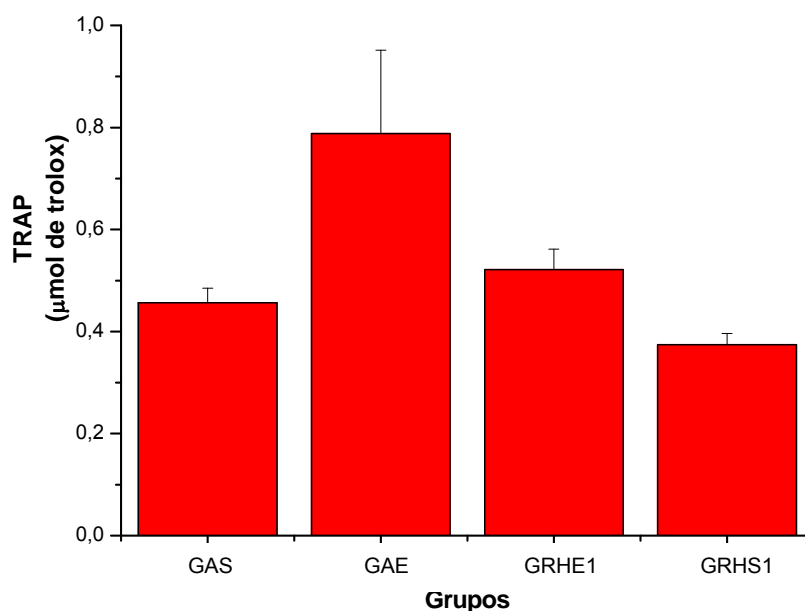


Figura 13 Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6).

A Figura 14 revela os valores da Capacidade antioxidante Total (TRAP), medida por QL em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento. Os resultados apontam para um consumo da TRAP apenas no grupo GAE72 – animais treinados que receberam água *ad libitum*, quando comparado ao grupo controle GAS – animais sedentários que receberam água *ad libitum*, porém não significante.

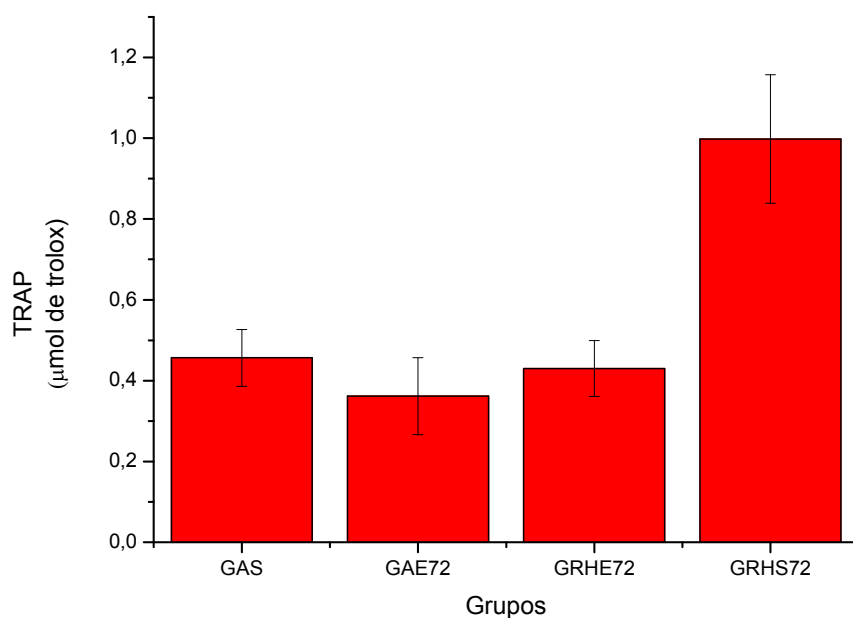


Figura 14 Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6).

A Figura 15 revela os valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP), medida por QL em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após o término do programa de treinamento (GAS, GAE1, GRHS1, GRHE1) comparado aos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP), medida por QL em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (GAEI1 e GRHEI1). Os resultados apontam para um aumento significativo da TRAP nos grupos imediatos indicando aumento dos níveis de antioxidantes.

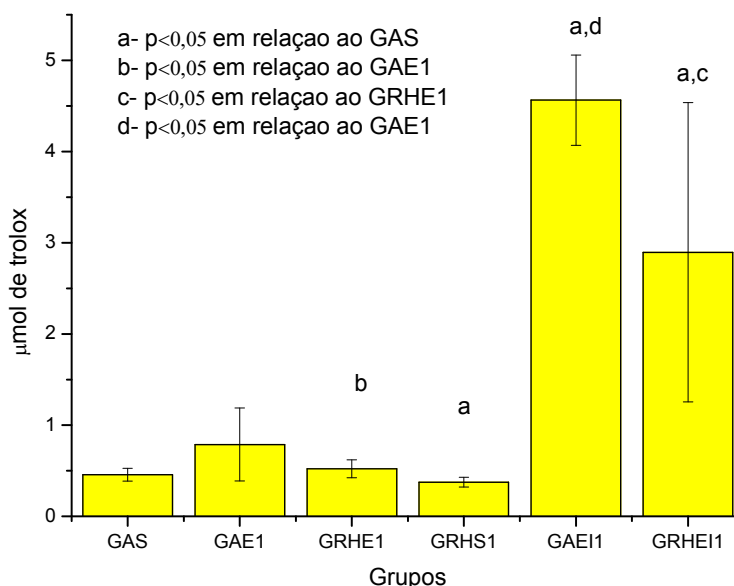


Figura 15 Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após uma única sessão de treinamento (imediato), expressa em micromoles (μM) de trolox, dos grupos GAEi – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHEi – treinados com restrição hídrica (n=6); comparados aos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 1 hora após treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); grupos GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6).

A Figura 16 mostra os valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP), medida por QL em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após o término do programa de treinamento (GAS, GAE72, GRHS72, GRHE72) comparado aos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP), medida por QL em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (GAEI72 e GRHEI72). Os resultados apontam para um aumento significativo da TRAP nos grupos imediatos indicando a manutenção do aumento dos níveis de antioxidantes, mesmo após 72 horas.

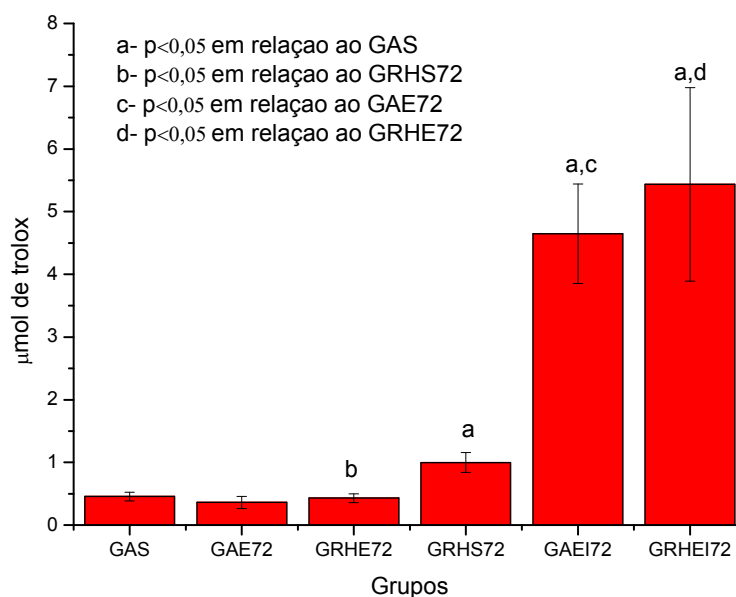


Figura 16 Gráfico representativo dos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após uma única sessão de treinamento (imediate), expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); comparados aos valores da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) medida por Quimiluminescência em músculo cardíaco de ratos sacrificados 72 horas após programa de treinamento, expressa em micromoles (μM) de trolóx, dos grupos GAS – sedentários que receberam água *ad libitum* (n=6); GAE – treinados que receberam água *ad libitum* (n=6); GRHE – treinados com restrição hídrica (n=6); grupos GRHS – sedentários com restrição hídrica (n=6).

5 DISCUSSÃO

A associação entre a prática regular de exercícios físicos e melhor padrão de saúde tem sido frequentemente relatada ⁽¹⁰³⁾. Alguns estudos epidemiológicos iniciados na década de 50 introduziram o conceito de que vida sedentária não beneficiava a saúde ⁽³⁵⁾. A atividade física tem sido recomendada como medida de interação terapêutica benéfica com papel significativo em medicina preventiva e reabilitação. ⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁸⁾

Existem evidências mostrando que o treinamento físico aeróbio em seres humanos ou animais de laboratório promove otimização da função desempenhada pelo miocárdio ^(49, 95, 109-112). Entretanto, é importante ressaltar que o exercício na dependência da duração e intensidade pode induzir a formação de radicais livres. ⁽⁹⁵⁾

Vários estudos sugerem que alterações estruturais e funcionais do músculo cardíaco podem ser associadas ao estresse oxidativo. ^(19, 98, 113-115)

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi analisar a lipoperoxidação, por meio da quantificação do MDA, da quimiluminescência e da capacidade antioxidante total (TRAP) no músculo cardíaco de ratos treinados em esteira rolante com e sem restrição hídrica.

O treinamento em esteira rolante foi utilizado devido ao fato da corrida envolver um componente muscular polimétrico (excêntrico) e as respostas aeróbias serem menos variáveis que em outros protocolos de treinamento. ⁽¹¹⁶⁾ Além disso, optou-se por utilizar um protocolo de exercício aeróbio de baixa intensidade, mimetizando dessa forma, as sessões de exercício físico

realizadas por pacientes cardiopatas na fase III da Reabilitação Cardiovascular.

Manchado *et al*⁽⁹⁷⁾ demonstraram que a máxima fase estável de lactato (MFEL) para ratos em esteira rolante está próximo de 4 mM e ocorre numa intensidade de 20 m/min, com base nesse estudo, podemos dizer então que os animais treinaram a aproximadamente 50% da MFEL, confirmando portanto que esse exercício é de baixa intensidade.

Na primeira semana de treinamento, na qual foi realizada a adaptação ao mesmo, pequenas diferenças entre os pesos corporais já começaram a ser visualizadas, principalmente entre os grupos GAS, GAE e GAEI todos ingerindo água *ad libitum*, em relação aos grupos com restrição hídrica (GRHS, GRHE e GRHEI). Estas diferenças se acentuaram no final das 12 semanas de treinamento.

Foi observada, portanto, diferença estatisticamente significante no peso corpóreo dos animais submetidos à restrição hídrica, 28,48% do GHRS em relação ao GAS, 21,85% do GRHE em relação ao GAE e 9,31% do GRHEI em relação ao GAEI, com $p < 0,05$.

Segundo Katch & McArdle,⁽⁹⁵⁾ a composição corporal de água varia de 46 a 65% e a perda ou falta de ingestão de água leva a diminuição do peso corporal, principalmente em situações de exercício, o que justifica os achados deste trabalho.

O peso do coração apresentou diferença estatisticamente significante quando comparamos os grupos treinados (GAE e GRHE) e os grupos sedentários (GAS e GRHS), com valor de $p < 0,001$.

Além disso, a relação peso do coração / peso corporal foi analisada para

verificar possível grau de hipertrofia, mas não houve diferença desses valores entre os grupos, no entanto, observa-se que há relação positiva com o peso corpóreo, ou seja, o peso do coração apresentou-se proporcional ao peso corpóreo.

A restrição hídrica pode ter proporcionado uma redução no teor de água da massa corporal e o coração se adaptado a esta condição. Além disso, no decorrer de 12 semanas os cardiomiócitos podem ter sofrido um estresse hídrico que pode ter resultado no menor peso encontrado nos grupos GRHS e GRHE.

Para avaliar o estresse oxidativo proporcionado pelos fatores treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e/ou restrição hídrica, primeiramente foi avaliada a peroxidação lipídica do coração pelo teste de ácido tiobarbitúrico (TBARS), também denominado MDA.

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é método bastante utilizado para avaliar a peroxidação lipídica, em diferentes tecidos ou amostras biológicas como, por exemplo, tecidos humanos⁽¹¹⁷⁾ ou de animais^(66, 118, 119) sob diferentes condições metabólicas tais como em resposta ao treinamento físico.^(120, 121) A quantificação de TBARS pode ser expressa por peso de tecido^(29, 122-125) ou por mg de proteína.⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾ No presente estudo optou-se por corrigir TBARS por grama de tecido, desde que todas as amostras de músculo cardíaco apresentassem peso de 1 grama.

As análises de MDA mostraram que entre os grupos que foram submetidos à restrição hídrica, o GRHS apresentou maior concentração de MDA, seguido pelo GRHE 1h e GRHE 72hs. O mesmo padrão de resposta

para concentração de MDA foi observado nos grupos controles (GAS, GAE 1h e GAE 72hs), sendo que nestes, as concentrações de MDA foram menores em comparação aos grupos GRHS, GRHE 1h e GRHE 72hs.

As comparações entre os grupos os grupos que foram submetidos à restrição hídrica e os seus respectivos controles (grupos que receberam água *ad libitum*), portanto grupos sedentários (GAS x GRHS), grupos sacrificados 1h após a última sessão de exercício (GAE 1h x GRHE 1h) e grupos sacrificados 72hs após a última sessão de exercício (GAE 72hs x GRHE 72hs), não apresentam diferença estatisticamente significativa. No entanto, essa análise nos mostra que os animais submetidos à restrição hídrica apresentaram maiores valores de MDA em relação aos grupos que receberam água *ad libitum* e, os grupos sacrificados 1h após a última sessão de exercício também apresentaram maiores valores de MDA quando comparado aos animais sacrificados 72hs após a última sessão de exercício. Estes resultados sugerem que a restrição hídrica assim como o exercício estimula produção de EROS e, esta resposta se exacerba quando os dois fatores estressores estão associados. Entretanto, após um período de 72hs pôde-se observar recuperação desse efeito metabólico da restrição hídrica associada ao exercício.

Embora a avaliação da lipoperoxidação de sistemas biológicos pelo teste do Ácido Tiobarbitúrico tem sido amplamente empregada ^(113, 129), estudos envolvendo músculo apresentam resultado de TBARS conflitantes, sendo as discrepância explicadas por diferenças metodológicas, principalmente em modelos experimentais. ^(130, 131) Outro fator que pode ser relacionado ao

equivoco na interpretação dos resultados é a superestimação da produção de dialdeído malônico.⁽¹³¹⁾ Alguns autores sugerem que a quantificação de TBARS é um ensaio útil, dada sua sensibilidade e simplicidade, desde que haja entendimento de sua inespecificidade.^(131, 132)

É importante ressaltar que as TBARS não avaliam exclusivamente a lipoperoxidação estimulada por radicais livres, apesar da maior parte da cor rósea produzida ser o resultado desta reação. Além disso, a especificidade do teste deve-se em grande parte à produção do próprio MDA, que acaba não acontecendo pela reação de terminação entre os próprios lipoperóxidos, quando presentes em grande quantidade *in vivo* e, conseqüentemente, não produzindo o MDA. A determinação da ocorrência de estresse oxidativo *in vivo* possui graves limitações devido à falta de ensaios que sejam simultaneamente sensíveis e específicos.⁽¹³³⁾

O MDA é um dos aldeídos mais abundantes resultantes da peroxidação lipídica, e a sua quantificação pelo TBARS é mais sensível imediatamente após o treinamento, o que justificaria o fato de ter sido encontrado valores de MDA elevado 1h após o treinamento e não 72hs.

Elevação na concentração de lipoperóxido no coração de ratos foi associada à prática de exercício exaustivo.^(119, 134) Benderitter *et al*,⁽¹¹⁹⁾ observou que o exercício crônico em esteira rolante por 10 semanas, 2 horas diárias a 1,6 Km/h, 5 dias por semana, induziu aumento significativo do MDA no coração.

Em outro estudo, os autores reportaram que o exercício de intensidade moderada de ratos resultou em 62 a 90% de aumento nos níveis de MDA no

músculo e de 157 a 167% de aumento, após exercício de alta intensidade sugerindo, portanto, que o aumento dos níveis de MDA é intensidade-dependente. ⁽¹³⁵⁾

Por outro lado, Venditti e Di Meo ⁽¹³⁶⁾, não observaram variação na concentração de lipoperóxidos no miocárdio de ratos durante exercício de endurance e no período de recuperação. Diversos estudos sugerem que o treinamento físico na natação ou na esteira rolante pode aumentar a capacidade de defesa antioxidante do músculo cardíaco, diminuindo a peroxidação lipídica. ^(57, 137-139)

O segundo método de análise da produção de EROS realizadas nesse estudo foi a quimiluminescência (QL). A QL tem sido recentemente proposta para medir a geração de radicais livres por células isoladas de órgãos, mas isto permite apenas a luminescência global de tecidos. ⁽¹²⁶⁾

Tanto a QL por luminol como por lucigenin, comumente usados para mensurar a produção de EROS, tem falhado na detecção do nível de atividade antioxidante endógena. O Hidroperóxido de Tert-Butil tem sido usado por vários investigadores para suscitar oxi radicais livres e lipoperóxidos. ^(127, 128)

É reportado que a QL luminol dependente pode suprir um indicador sensível do nível de produção de oxiradicais livres, pelo descanso e estimulação do tecido *in vitro*. ⁽¹²⁴⁾ No estudo de Jui-Sheng Sun *et al* ⁽¹⁴⁰⁾, a QL sem o hidroperóxido de Tert-Butil foi muito baixo e não mudou no decorrer do tempo de observação. A QL aumentou rapidamente com a adição do hidroperóxido de Tert-Butil, alcançando o pico e decrescendo devagar até alcançar o valor de pré-estimulação. A QL iniciada por hidroperóxido de Tert-

Butil tem sido ampliada pelo o uso do luminol. Portanto, a sensibilidade do tecido à QL tem sido grandemente aumentada. A QL dependente de Luminol prove uma alta sensibilidade e continuidade na análise dos radicais livres pelo Hidroperóxido de Tert-Butil.

A QL por hidroperóxido foi utilizada para detectar a diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos no fígado de ratos tratados com ingestão de etanol⁽¹²⁷⁾ e ratos submetidos a isquemia-reperfusão cardíaca.⁽¹⁴¹⁾ A fase de reperfusão que segue um período prolongado de isquemia é caracterizada por uma geração significativa de radicais livres de oxigênio; a alta reatividade desses componentes, entretanto, torna difícil para avaliar sua formação. Detectar a emissão global de quimiluminescência tem sido proposto pelos autores para obter formação de radicais livres em tecidos de fígado durante a reoxigenação.^(126, 142-145)

No presente estudo, as análises das curvas de QL foram realizadas por meio das mesmas comparações da quantificação da concentração de MDA, ou seja, entre os grupos os grupos que foram submetidos à restrição hídrica e os seus respectivos controles (grupos que receberam água *ad libitum*) submetidos ou não ao protocolo de exercício aeróbio de baixa intensidade. Entre os animais dos grupos sedentários, os animais submetidos à restrição hídrica (GRHS72) apresentaram maiores valores de QL quando comparados aos animais que receberam água *ad libitum* (GAS), $P < 0,0001$.

Em consonância com os achados do presente estudo, recentemente, (Paik *et al*⁽⁹⁴⁾) demonstraram aumento de marcadores de estresse oxidativo no plasma sanguíneo de indivíduos desidratados (3% de desidratação)

submetidos a corrida em esteira rolante até a exaustão (a 80% do VO_2 máx).

Os animais sacrificados 1h após o programa de treinamento e que receberam água *ad libitum* (GAE 1h) apresentaram maior valor de QL quando comparado aos animais sedentários que receberam água *ad libitum* (GAS), $P < 0,0001$. Esses dados então confirmam que tanto a restrição hídrica quanto o exercício físico atuam como agentes estimuladores da produção de radicais livres. No entanto, quando se comparou o grupo sedentário que recebeu água *ad libitum* (GAS) com o grupo exercitado que recebeu água *ad libitum* sacrificado após 72hs após programa de treinamento (GAE72) observa-se maiores valores de QL para o grupo GAS, sugerindo portanto que ocorre aumento das defesas antioxidantes em resposta à agressão promovida pelo exercício físico que é observada após 1h da última sessão.

Além disso, os grupos que receberam água *ad libitum* e foram sacrificados após 72hs da última sessão de treinamento (GAE72) apresentam maiores valores de QL em relação aos animais do grupo sedentário submetido à restrição hídrica (GRHS72), $P < 0,045$. Portanto, parece que o exercício físico é um estímulo maior para a produção de radicais livres em relação a restrição hídrica quando comparados isoladamente. No entanto, observa-se que quando associados ocorre uma exacerbação da produção de radicais livres, evidenciado pela comparação entre grupos submetidos à restrição hídrica sacrificados 72hs após a última sessão de exercício (GRHE72) com o grupo sedentário submetido à restrição hídrica (GRHS), $P < 0,0015$.

Sabe-se que as EROS são formadas continuamente em diferentes quantidades por meio de processos normais do metabolismo durante

exercícios crônicos. Desta forma, para contrabalancear os efeitos agressores proporcionados pelas ERO, todas as células, que possuem mecanismos de defesa, atuam para mitigar tais lesões teciduais, denominadas estresse oxidativo (Netto, Jr).⁽¹⁴⁶⁾

Ascensão *et al*,⁽¹⁴⁷⁾ afirmaram ainda que um dos principais mecanismos proporcionados pelas células encontra-se nas defesas antioxidantes e que as mesmas diferem de tecido a tecido, de tipo de célula e, possivelmente, de célula a célula do mesmo tecido.

Para verificar as relações entre a produção de ERO e o comportamento das defesas antioxidantes ocorridas no presente modelo do estudo, verificou-se por meio do método de QL, a análise do TRAP. Os animais do grupo sedentário submetido à restrição hídrica (GRHS) apresentaram menores valores de TRAP quando comparados aos animais sedentários que receberam água *ad libitum* (GAS). Os animais exercitados submetidos à restrição hídrica (GRHE1) apresentaram menores valores de TRAP quando comparados aos animais exercitados que receberam água *ad libitum* (GAE1). Os menores valores de TRAP revelam menor concentração de antioxidantes solúveis na amostra, ou seja, maior consumo dos antioxidantes. Esses achados confirmam os resultados obtidos na análise de QL, onde foi demonstrado que ocorreu aumento da produção de radicais livres nos grupos submetidos à restrição hídrica e ao exercício físico.

Além disso, pôde-se observar que houve redução de 54% no conteúdo de antioxidantes no miocárdio dos animais que receberam água *ad libitum* sacrificados 72hs após a última sessão de exercício (GAE72) em relação aos

animais sacrificados 1h após última sessão de exercício (GAE). O mesmo padrão de resposta nessa análise dos valores de TRAP foi observado nos animais submetidos à restrição hídrica e ao exercício físico simultaneamente, no entanto, a redução foi mais discreta, 17%, $P < 0,003$. Esses achados, em concordância com os resultados de QL, citados anteriormente, enfatizam que a maior promoção de estresse oxidativo se dá pela associação da restrição hídrica ao exercício físico do que cada um desses fatores isoladamente.

O aumento do estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de doenças cardiovasculares. ^(14,148,149) Estudos clínicos e experimentais sugeriram que essas condições estão associadas ao aumento da formação de radicais livres bem como da redução da defesa antioxidante. ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾ Os diversos oxidantes podem originar-se tanto do meio intracelular quanto do meio extracelular, e por vias enzimáticas ou não-enzimáticas.

As maiores fontes de radicais livres na parede vascular com aceitáveis relevâncias fisiológicas nas doenças cardiovasculares são: a NADPH oxidase, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), xantina oxidase, cadeia respiratória/fosforilação oxidativa, cicloxigenase. ^(150, 151, 153)

Hermann e Lerman ⁽¹⁵⁴⁾ sugeriram que diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares estão diretamente relacionados à disfunção endotelial. Estes fatores de risco induzem muitas alterações que são deletérias à biologia vascular, dentre elas, uma redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO), aumento de radicais livres e um aumento da atividade endotelial.

Exercícios físicos regulares de baixa a moderada intensidade são

recomendados para prevenção de diversas doenças. Além disso, o exercício físico promove redução da produção de oxidantes, melhora o sistema de defesas antioxidantes, e aumenta a resistência de órgãos e tecidos contra os efeitos deletérios dos radicais livres.⁽¹⁵⁵⁾ Entretanto, alguns estudos evidenciam que o exercício físico, particularmente de alta intensidade, estão associados à danos musculares e aumento da formação de radicais livres.⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾

No entanto, Waard *et al*⁽¹⁵⁹⁾ demonstrou que a disfunção dos miofilamentos induzida pelo infarto do miocárdio pode ser prevenido pelo exercício físico, adicionalmente à essa observação, em 2010 outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa sugeriu que por meio do aumento da produção de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) derivada de NO, o exercício físico minimiza as modificações dos miofilamentos decorrentes do estresse oxidativo induzido pelo infarto do miocárdio.⁽¹⁶⁰⁾

Atualmente já se sabe segundo alguns estudos^(65, 70, 161, 162-73) que o exercício físico crônico pode elevar a concentração das defesas antioxidantes e da SOD no miocárdio, aumentando a capacidade de recuperação e proteção contra a lipoperoxidação. Além disso, há evidência de que somente de um a três dias de exercícios podem proporcionar efeitos adaptativos no miocárdio, elevando os níveis da enzima SOD no mesmo. De fato, Yamashita *et al*⁽¹⁶³⁾ demonstraram, por meio do bloqueio dos níveis elevados da enzima SOD no coração que, quando expostos ao exercício físico, há danos teciduais ao miocárdio, confirmando perda da capacidade de recuperação e de cardioproteção.

Foram avaliados os efeitos do treinamento em ratos no período de um

ano e comprovaram a hipótese de que tal treinamento aumentava as defesas antioxidantes, promovendo benefícios contra os efeitos deletérios do radical livre na célula. ⁽⁵⁷⁾ Schneider *et al* ⁽¹⁶⁴⁾ observaram aumento na atividade eritrocitária da enzima GPx em triatletas treinados comparados ao controle não treinados. Este aumento parece estar relacionado ao efeito condicionante e de adaptação enzimática proporcionado pelo exercício crônico.

Em concordância com a literatura, no presente estudo, pôde-se observar que o exercício físico crônico promoveu redução da produção de radicais livres tanto nos animais que receberam água *ad libitum* quanto nos que foram submetidos à restrição hídrica após o período de recuperação de 72hs comparado aos animais sacrificados 1h após a última sessão de exercício. No entanto, essa redução de radicais livres presentes na amostra não foi acompanhada de aumento de antioxidantes solúveis e, portanto esses achados sugerem que a redução da produção de radicais livres em resposta ao protocolo de exercício aeróbio se deu por outra via, independente do sistema antioxidante.

Estudos epidemiológicos afirmaram que a proteção do exercício crônico ao miocárdio contra doença cardiovascular segue uma relação dose-resposta, ou seja, o risco de morte por estas doenças diminui quando o gasto energético total, devido à atividade física, aumenta de 500 a 3500 kcal/semana. Este gasto energético deve ser em atividades que demandam intensidades de esforço relativamente altas, cerca de seis vezes maiores que o metabolismo de repouso. ⁽¹⁶⁵⁾

No coração, o ATP do miocárdico é fornecido quase exclusivamente

pelo metabolismo oxidativo nas mitocôndrias. Durante a respiração, uma pequena fração de elétrons não pareados escapa da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons e reagem com o oxigênio formando superóxido e outras espécies de oxigênio. Como resultado, a mitocôndria é responsável pela maior fração de EROs no músculo cardíaco. ⁽¹⁶⁶⁾

A coativador-1 alfa do receptor proliferador-ativador de peroxissomos γ (PGC-1 α) é uma potente reguladora do metabolismo energético do miocárdio e da biogênese mitocondrial. ⁽¹⁶⁷⁻¹⁷⁰⁾ Ela pode se ligar a fatores nucleares respiratórios de transcrição (NRF-1), a fator de transcrição de DNA mitocondrial A (mtTFA) ou a outros fatores nucleares de transcrição metabólicos para regular a biogênese e a função mitocondrial. Além disso, o aumento do conteúdo de PGC-1 α em células endoteliais vasculares promove o aumento da expressão de enzimas antioxidantes mitocondriais e reduz o estresse oxidativo e o processo de morte celular. ⁽¹⁷¹⁾

Já é consenso na literatura que o exercício físico promove otimização do processo de produção energética através de um aumento da densidade mitocondrial modulada pela PGC-1 α . ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁴⁾ Adicionalmente, a literatura mostra que o exercício físico promove redução do quadro de inflamação crônica e dos níveis de estresse oxidativo mediadas pela PGC-1 α . ⁽¹⁷¹⁾ Dessa forma, uma das hipóteses para a redução do estresse oxidativo promovido pelo exercício físico no presente estudo é o aumento da expressão da PGC-1 α .

Além disso, há evidências de três mecanismos que podem explicar a capacidade de recuperação e o efeito cardioprotetor do exercício crônico. ⁽¹⁴⁶⁾ O primeiro refere-se à melhora da circulação colateral do miocárdio

proporcionado pelo exercício. ⁽¹⁶³⁾ Embora esse efeito ocorra em algumas espécies de animais após longo período de treinamento, Shephard e Balady ⁽¹⁷⁵⁾ demonstraram que os efeitos benéficos do exercício crônico em curto tempo não são decorrentes do desenvolvimento dos vasos sanguíneos colaterais. O segundo mecanismo relaciona-se aos efeitos do exercício crônico sobre a melhora da capacidade das defesas antioxidantes do coração, ^(52, 176-178) e, o terceiro, destaca-se pela síntese das proteínas de choque térmico “*heat shock proteins*” (HSP) no miocárdio. ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados no presente delineamento experimental pode-se concluir que:

O treinamento físico de baixa intensidade associado à restrição hídrica, praticado em fase aguda ou crônica provoca aumento do estresse oxidativo, embora com recuperação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978;45:927-932.
2. Signorini JL, Signorini SL. Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. Universidade de São Paulo 1993; São Paulo.
3. Benderitter M, Hadji-Saad F, Lhuissier M, Maupoil V, Guillard JC, Rochette L. Effects of exhaustive exercise and vitamin B₆ deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. *Free Rad Biol & Med* 1996;21(4):541-549.
4. Ji LL. Exercise-Induced oxidative stress in the heart. The Biodynamics Laboratory. Observatory Drive University of Wisconsin - Madison. Madison - USA.
5. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 50.
6. Douglas CR. Tratado de fisiologia aplicada à saúde. 2002; São Paulo R.

7. Brooks GA, Fahey TD, Baldwin K. Exercise Physiology: Human Bioenergetics and its applications. Mayfield publishing company 1996;.
8. Maughan RJ. Electrolyte balance in prolonged exercise. Nutrition Bulletin 2007;10(1):28-35.
9. Chevront SN, Ely Brett R, Kenefick RW, Sawka MN. Biological variation and diagnostic accuracy of dehydration assessment markers. The American Journal of Clinical Nutrition 2010;92(3):565-73.
10. Murray B. Hydration and physical performance. J Am Coll Nutr 2007;26:542S - 8S.
11. Rehrer NJ. Fluid and electrolyte balance in ultra-endurance sport. Sports Med 2001;31:701-15.
12. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. . Current Opinion in Cell biology 2003;15(247-54).
13. Dekkers JC, Van Doornen LJP, Kemper HCJ. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise -induced muscle damage. Sports med 1996;21:231-8.
14. Storey K. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz J Med Biol

Res1996;29(12):1715-33.

15. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135: 115-20.

16. Pereira B, Costa-Rosa LFBP, Bechara, Newsholme P. Changes in the TBARS content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscle of adrenalectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 827-33.

17. Laurindo FRM, Souza HP, Luz PL. Estresse oxidativo: um denominador comum de condições vasculares patológicas. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* 1998;2: 344-55.

18. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.

19. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bacchetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998 19 (Suppl. B): B2-B11.

20. Fridovich I. Superoxide dismutase. *Ann Rev of Biochem* 1975;44:147-59.

21. Acharya J, PUNCHARD NA, Taylor JA, Thompson RPH. Real cell lipidperoxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Env. J. Haematol* 1991;47 (4):287-291.
22. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports & Exercise* 1999; 31: 987-997.
23. Ji L, Leichtweis S. Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*1997;20:91-106.
24. Percario S, Feuz A. Avaliação laboratorial dos radicais livres. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Biomolecular e Radicais Livres*1995;5:11-4.
25. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Foster MJ, Lal H. Oxidative damage mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of aging and development* 1994; 74: 121-33.
26. Jenkins R. Free radical chemistry (relationship to exercise). *Sports Medicine*1988;5:156-70.
27. Kukreja R, Hess M. The oxygen free radical system: from equations through membrana-protein interaction to cardiovascular injury and

protection. *Cardiovasc Res* 1992;26:641-55.

28. Medeiros MHG, Carvalho VB, Farias LP, Loureiro APM. DNA damage induced by secondary lipid oxidant products. *Ciência e Cultura* 1995; 47(5/6): 336-9.

29. Ferreira A, Matsubara L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997;43(1):61-8.

30. Parfitt VJ, Rubba P, Bolton C, Marotta M, Hartog M, Mancini M. A comparison of antioxidant status and free radical peroxidation of plasma lipoproteins healthy young persons from Naples and Bristol. 1994; 15: 871-76.

31. Giordano FJ. Oxygen os, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:500-8. .

32. Zimmet JM, Hare JM. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation* 2006; 114:1531-44.

33. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res* 2006;71:208-15.

34. Papas A. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*. [supplement]. 1996;31:77-82.
35. Ghorayeb N, Barros T. O exercício: preparação fisiológica, avaliação médica aspectos especiais e preventivos São Paulo 1999;Ed Atheneu:249-51.
36. Novelli ELB, Rodrigues NL, Ribas BO. Superoxi radical and toxicity of environmental nickel exposure. *Human & experimental Toxicology* 1995; 17: 248-51.
37. Cooper C, Vollard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radical and oxidative stress. *Biochemical society transactions* 2002;30(2):280-5.
38. Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmony JS, Robertson RP. Prevention of glucose toxicity in HIT - T15 cells and Zucker diabeti Fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10857-862.
39. Bono D. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction Kinetics, environment and substrate turnover. *QJM* 1994:445-53.
40. Pucheu S, Coudray C, Tressallet N, Favier J. Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2303-14.

41. Powers SK, DeRuisseau KC, Quindry J, Hamilton KL. Dietary antioxidants and exercise. *J Sports Sci*2004;22(1):81-94.
42. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*2003;189(1-2):41-54.
43. Morris JN, Heady JA, Raffle PAB *et al.* Coronary heart-disease and physical activity of work. I. Coronary heart-disease in different occupations. *Lancet* 1953; 2: 1053-7.
44. Coats AJS, Adamopoulos S, Radaeli A, McCance A, Meyer TE, Bernardi L. Controlled trial of physical training in chronic heart failure, exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. *Circulation* 1992; 85:2119-31.
45. Wielenga RP, Coats AJS, Mosterd WL, Huisveld IA. The role of exercise training in chronic heart failure. *Heart* 1997; 78: 431-436.
46. Fardy OS, Yanowitz FG, Wilson PK. Reabilitação cardio vascular, aptidão física do adulto e teste de esforço. *Rio de Janeiro*1998;Revinter(1):3-12.
47. Forjaz CLM, Tinucci T, Alonso DO, Negrão CE. Exercício físico e

diabete. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 1998; 8: 981-90.

48. Rondon MUPB, Alves MJNN, Braga AMFW, Negrão CE. Exercício físico e insuficiência cardíaca. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2000;10.

49. Baldwin KM, Winder WW, Terjung RL, Holloszy JO. Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle: adaptation to exercise. Am J Physiol 1993;225:962-6.

50. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical reviews in Toxicology 1993;23(1):21-48.

51. Wilmore JH, Costill DL. Physiology of Sport and Exercise. Human Kinetics 1999;2(Campaign IL).

52. Gul M, Hänninen O, Atalay M. Developed Under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers Co. Ltd. O. Physiological basis of exercise. In: Hänninen, O., Atalay, M. (Eds.) Physiology and Maintenance In Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) 2003;2:31-52.

53. Jackson M. Exercise and oxygen radical production by muscle. In: CK Sen LPOH, eds. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Basel: Elsevier Science B.V. 2000:57-68.

54. Atalay MC. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *Annals of the New York of Sciences*. 1999; 874; 169-177.
55. Ji L. Exercise-induced oxidative stress in the heart. In: CK Sen LP, O Hanninen, eds. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Basel: Elsevier Science B.V. 2000:689-712.
56. Kim JD, Yu BP, McCarter RJM, Lee SY, Herlihy JT. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 1996;20:83-8.
57. Venditti P, Di Meo S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *J Sports Med* 1997;18:497-502.
58. De Angelis KLD, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG. Exercise training in aging: hemodynamic, Metabolic and Oxidative stress evaluation. *Hypertension* 1997;30 (3):767-71.
59. Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS, Naito H, Fletcher LA. Exercise training reduces Myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30(8):1211-16.
60. Ji LL, Fu RG, Mitchell EW, Griffiths M, Waldrop TG, Swartz HM. Cardiac hypertrophy alters myocardial response to ischaemia and

reperfusion in vivo. Acta Physiologica Scand 1994; 151; 279-290.

61. Kihlström MT. Lipid peroxidation capacities in the myocardium of endurance-trained rats and mice in vitro. Acta Physiologica Scand 1991;146:177-83.

62. Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Parmelee DJ, Fiebig R, Ji LL. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. Acta Physiologica Scand 1997;160:139-48.

63. Kumar TC, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K, Reddanna M. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. Molecular and Cellular Biochemistry 1992;111:109-115.

64. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL. Adaptation of Glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. American Journal of Physiology 1997; 272:363-69.

65. Powers SK. Exercício, antioxidantes e "cardioproteção". Sports Science Exchange 2003;36.

66. Burneiko RM. Influência do exercício físico no estresse oxidativo em miocárdio de ratos. Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp 2002;Dissertação (Mestrado):48.

67. Somani SM, Frank S, Rybak LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol Biochem Behavior*. 1995; 51; 627-34.
68. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys*1996;331:63-8.
69. Frankiewicz-Zozko A, Faff J, Sieradzan-Gabelska B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *European Journal Applied Physiology*. 1996; 74; 470-74.
70. Husain K, Somani SM. Response of cardiac antioxidant system to alcohol and exercise training in the rat. *Alcohol*1997;14:301-07.
71. Lew H, Quintanilha A. Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *European Journal Drug Metabolism Pharmacokinetics*1991;16:59-68.
72. Kanter MM, *et al*. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *Journal Applied Physiology*1985;59:1298-303.
73. Nakao C, *et al*. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *Journal of Applied*

Physiology2000;88:649-54.

74. Vanderlei LCM. Reabilitação cardíaca: o papel da fisioterapia. FCT 40 anos, perfil científico educacional1999;Meneguette Junior M, Alves N (orgs):257-66.

75. Weineck J. Treinamento ideal: instruções técnicas sobre o desempenho fisiológico, incluindo considerações específicas de treinamento infantil e juvenil. São Paulo: Manole1999;9:22-3-640.

76. Weineck J. Biologia do esporte. São Paulo: Manole2000:366, 485, 503-4.

77. Wilmore JH, Costill DL. Fisiologia do esporte e do exercício. São Paulo: Manole2001;2:709.

78. Sawka MN, Montain SJ, Latzka WA. Hydration effects on thermoregulation and performance in the heat. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol2001;128(4):679-90.

79. Sawka MN, Montain SJ. Fluid and electrolyte supplementation for exercise heat stress. Am J Clin Nutr2000;72(Supl 2):564S - 72S.

80. Guyton AC, Hall JE. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. Rio

de Janeiro 1998; Guanabara Koogan: 639.

81. Lamb DR, Shehata AH. Benefits and limitations to prehydration. Sports Science Exchange 1999; 12: 1-6.

82. Maughan R, Leiper JB, Shirreffs SM. Rehydration and recovery after exercise. Sports Science Exchange 1996; Chicago(9): 1-6.

83. Marins JCB. Homeostase hídrica corporal em condições de repouso e durante o exercício físico. . Rev Bras Ativ Fis Saude Esp 1998; 3(2): 58-72.

84. Sawka MN, Burke LM, Eichner ER, Maughan RJ, Montain SJ, Stachenfeld NS. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. Med Sci Sports Exerc 2007; 39(2): 377-90.

85. Stachenfeld NS. Acute effects of sodium ingestion on thirst and cardiovascular function. Curr Sports Med Rep 2008; 7(Supl 4): S7-13.

86. Casa DJ. Exercise in the Heat. I. Fundamentals of Thermal Physiology, Performance Implications, and Dehydration. J Athl Train 1999; 34(3): 246-52.

87. Bergeron M. Sódio: o nutriente esquecido. Sports Science Exchange SP, 2001; 29; 1-6.

88. Nadel ER. Novas idéias para a reidratação durante e após os exercícios no calor. *Sports Science Exchange SP*, 1996; 7; 1-4.
89. Maughan R, Gleeson M, Greenhaff PL. *Bioquímica do exercício e do treinamento*. São Paulo: Manole, 2000; 34-38.
90. Coyle EF. Fluid and carbohydrate replacement during exercise: how much and why? *Sports Science Exchange C*, 1994; 7.
91. Senaratna T, McKersie BD. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals. *Am Soc Plant Biol*1986;77(2):472-4.
92. Sawka MN, Noakes TD. Does dehydration impair exercise performance? *Med Sci Sports Exerc*2007;39:1209-17.
93. Wendt LJ, Van L, Lichtenbelt WDT. Thermoregulation during exercise in the heat: strategies for maintaining health and performance. *Sports Med*2007;37:669-82.
94. Paik IY, Jeong MH, Jin HE, Kim Y-II, Suh AR, Cho SY, Roh HT, Jin CH, Suh SH. Fluid replacement following dehydration reduces oxidative stress during recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*2009;383:103-7.

95. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercício. Energia, nutrição e desempenho humano. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.175-266.
96. Andrew RJ. Treadmill four small laboratory animals. J Appl Physiol 1965;20:572-74.
97. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato e ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. Rev Bras Med Esporte 2006;12:259-62.
98. Cecchini R, Aruoma IO, Halliwell B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid reactive material from microsomes, liposomes, or from DNA damaged by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. Free Rad Res Commun 1990;10:245-58.
99. Buege JA, Aust D. Microsomal lipid peroxidation In: Methods in Enzymology. Academic Press, Inc San Diego 1978;2:302-10.
100. Gonzales-Flecha B, Llusuy S, Boveris A. Hidroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. Free radical Biology and medicine 1991;10:93-100.

101. Niki E. Free radical initiators as source of water-or-lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in enzymology*1990;186(Ed Lester Packer and Alexander N Glazer):100-8.
102. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*1996;255:107-17.
103. Matsudo SMV. Evidências da importância da atividade física nas doenças cardiovasculares e na saúde. *Diagnóstico e tratamento*2000;5:10-7.
104. Thompson P. Death during jogging or running: A study of 18 cases. *Journal of the American Medical Association*1979;242:1265-7.
105. Maron BJ. Sudden death in young athletes. *Circulation*1980;62:218-29.
106. Koplán TP. Cardiovascular deaths while running. *Journal of the American Medical Association*1979;242:2578.
107. Sadaniantz, Thompson P. The problem of sudden death in athletes as illustrated by case studies. *Sports Med*1990;9:199-204.
108. Leite PF. *Fisiologia do exercício, ergometria e condicionamento físico*. Ed Atheneu1986;2 ed(Rio de Janeiro):3.

109. Collucci WC. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997;80:15L-25L.
110. Pichardo J. PV, FARAHMAND F., SINGAL P.K. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem* 1999; 196:51-57.
111. Viaro F. NF, Evora P.R.B. Expressão dos óxido nítrico sintetases na fisiopatologia de doenças cardiovasculares. *Arg Bras Cardiol* 2000; 74:365-478.
112. Jiankang L. YCH, Övervik-Douki E., Hagen T., Doniger S.J., Chu D.W., Brooks G.A., Ames B.M. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl Physiol*, 2000; 89: 21-28.
113. Yoshioka T. SGT, Fantini G.A. Hypothermia relieves oxidative stress in reperfused skeletal muscle following partial ischemia. *J Surg Res* 1992; 53(4): 408-16.
114. Novelly G.P. AC, Gandini E., Orlandini S.Z., Papucci L., Formigli L. vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 1996; 172:206-9.
115. Oliveira FJA, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected

with leishamania (L) Chagasi. J Parasitol2000;86(5):1067-72.

116. Araújo E.M.C. Estresse oxidativo induzido por isquemia e reperfusao em musculo soleus de rato: estudo histológico e bioquímico. Dissertação de Doutorado Faculdade de Botucatu U, Botucatu, 2002.

117. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol1990;186:1-85.

118. Jòsko A, Faff J, Sieradzan-Gabelska B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. Eur J Appl Physiol 1996;74:470-4.

119. Benderitter M, Hadji-Saad F, Lhuissier M, Maupoil V, Guilland JC, Rochette L. Effects of exhaustive exercise and vitamin B₆ deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. . Free Rad Biol & Med1996;21(4):541-49.

120. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel ALL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. J Appl Physiol 1978;45:927-32.

121. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Biochem & Biophys. Res Communications1982;31:1198-205.

122. Sardinha WE. Isquemia e reperfusão da musculatura esquelética em ratos: Inibição das lesões lipoperoxidativas medidas por radicais livres pela desferroxamina. Tese1994;São Paulo(Escola Paulista de Medicina).

123. Corbucci GG, et al. Biochemical and metabolic aspects of oxyradical pathology in the hypoxic-ischemic reperfused human skeletal muscle tissue. . Minerva Anestesiol2000;66(12):855-60.

124. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. J Appl Physiol1998;64:1333-6.

125. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Arch Biochem Biophys1988;263:137-49.

126. Gasbarrini A, Pasini P, Nardo B, Notariis S, Simoncini M, Cavallari A, et al. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. Free Radical & Medicine1998;24:211-6.

127. Cadenas E, Sies H. Low level of chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence and lipid peroxidation. Em J Biochem1982;124:349-56.

128. Cadenas E, Biveris A, Chance BBJ-. Low level chemiluminescence of

bovine heart submitochondrial particles. 1980:659-67.

129. Concannon MJ, Kester CG, Welsh CF, Puckett CL. Patterns of free radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. *Plast Reconstr Surg*1992;89(5):846-52.

130. Woitaske MD, McCarter RJ. Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*1998;102(6):2052-63.

131. Verbunt RJAM, Egas JM, Arnoud VDL. Risk of overrestimation of free malondialdehyde in perfused rat hearts due to homogenization artifacts. *Cardiol Res*1996;31(4):603-6.

132. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: Gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem*1997;245(2):161-6.

133. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In Halliwell, B. Gutteridge, J M C. editors. *Free radicals in biology and medicine*1999;Oxford(Oxford University Press):246-350.

134. MAcCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New England J of Med*1985;312:159-63.

135. Cadenas E, Wefers H, Sies H. Low level chemiluminescence of isolated

hepatocytes. . Em J Biochem1981;119:531-6.

136. Venditti P & Di Meo. Antioxidants and endurance in trained and untrained young male rats. Arch Biochem Biophys 1996; 331:630-66.

137. Kim JD, Yu BP, M. MRJ, Lee SY, Herlihy JT. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. Free Radic Biol Med1996;20:83-8.

138. De Angelis KLD, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG. Exercise training in aging: hemodynamic, Metabolic and Oxidative stress evaluation. . Hypertension1997;30(3):767-71.

139. Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS, Naito H, Fletcher LA. Exercise training reduces Myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. Med Sci Sports Exerc1998;30(8):1211-16.

140. Jui-Sheng S, Yang-Hwei T, I-Jen C, Wan-Ching H, Yishiong H, Fung-Jou L. An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. Burns1998;24:225-31.

141. Prasad K, Lee P, Mantha SV, Kalra J, Prasa M, Gupta JB. Detection of ischemia-reperfusion cardiac injury by cardiac muscle chemiluminescence. Mole Cell Biochem1992;115:49-58.

142. Caraceni P, Gasbarrini A, Van Thiel DH, Borle ABG-G. Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation: scavenging effect of albumin. *Am J Physiol* 1984;266:G451-G8.
143. Caraceni P, Rosenblum ER, Van Thiel DH, Borle AB. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1984;66:G799-G806.
144. Nunes FA, Kumar C, Chance B, Brass C-. Chemiluminescence measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. *Dig Dis Sc* 1995;40(5):1045-53.
145. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N-. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: Evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1992;15(3):507-14.
146. Netto Jr J. Influência do calor na análise morfológica e no estresse oxidativo no miocárdio de ratos submetidos a treinamento físico. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP 2007; Tese de Doutorado.
147. Ascensão A, et al. Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol* 2003;22(5):651-78.
148. Antoniades C, Tousoulis D, Tentolouris C, Toutouzas P, Stefanadis C. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. *Herz* 2003;28:628-

38.

149. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*2006;13:129-42.

150. Stocker R, Keaney JFJ-. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*2004;84(4):1381-478.

151. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*2006;13:129-42.

152. Lorgeryl M, Salen P, Accominotti M. Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure: insights into the potential importance of selenium in heart failure. . *Eur J Heart Fail*2001;3(6):661-9.

153. Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*2006;6(1):1-19.

154. Hermann J, Lerman A. The endothelium: dysfunction and beyond. *J Nucl Cardiol*2001;8:197-206.

155. Polidori MC, Mecocci P, A. C, Senin U. Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med*2000;21:154-7.

156. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? . *Trends Mol Med*2001;7:55-62.
157. Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Romaguera D, Drobnic F, Pujol P. Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *Br J Sports Med*2009;43(3):186-90.
158. Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med*2008;44(2):169-79.
159. De Waard MC, Van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. . *Circ Res*2007;100:1079-88.
160. De Waard MC, Van Haperen R, Soullié T, Tempel D, De Crom R, Duncker DJ. Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full e NOS expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*2010;48:1041-9.
161. Hussain k, Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. . *Biochim Biophys Acta*2002;1587(1):75-82.

162. Taylor RP, Ciccoli JT, Starnes JW. Effect of exercise training on the ability of the rat to tolerate hydrogen peroxide. *Cardiol Res*2003;58:575-81.
163. Yamashita N, et al. Exercise provides direct biphasic cardiooooooprotectioc via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med*1999;189:1699-706.
164. Schneider CD, Et al. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol*2005;30(6):723-34.
165. Lee IM, Hsieh C, Paffenbarger R. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study *JAMA*1995;273:1179-84.
166. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*2005;120:483-95.
167. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*2005;1:259-71.
168. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. . *J Clin Invest*2006;116:615-22.

169. Kelly DP, Scarpulla R C. 18: 357-368. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. . *Genes Dev*2004;18:357-68.
170. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*1999;98:115-24.
171. Valle I, Varez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M-, 2005. . PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial.
172. M J, McGee SL, Gibala MJ. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. . *J Physiol* 2008;586:R151-60.
173. Gibala M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. . *Appl Physiol Nutr Metab*2009;34:R428-32.
174. Safdar A, Little JP, Stokl AJ, P. HA, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise Increases Mitochondrial PGC-1a Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis. . *The Journal of Biological Chemistry*2011;286(12):10605-17.
175. Shephard RJ, Balady G. Exercise as cardiovascular therapy.

Circulation1999;99:963-72.

176. Akar S, Akcay F, Dane S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. . Comparative Biochemistry and Physiology2006;143:239-45.

177. Kakarla P, Vadluri G, Reddy KS, C. L. Vulnerability of the mid aged rat myocardium to the age-induced oxidative stress: influence of exercise training on antioxidant defense system. 2005;39(11):1211-7.

178. Powers SK, Quindry J, Hamilton K. Aging exercise, and cardioprotection. Ann N Y Acad Sci2004;119:462-70.

179. Michels A, Kanon B, Konings A, Obtsuka K, Bensaude O, Kampinga H. HSP 70 and HSP 40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. J Biol Chem1997;272:33283-89.

180. Locke M, Tanguay R, Klabunde R, Ianuzzo D. Enhanced postischemic myocardial recovery following induction of HSP 72. Am J Physiol heart Circ Physiol1995;269:320-25.

181. Taylor RP, Harris M, Starnes J. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. Am J Physiol heart Circ Physiol1999;276:1098-102.

8 APÉNDICE