

BIOMARCADORES DE ESTRESSE NO FUTEBOL - PARTE 2: DOSAGEM SANGUÍNEA DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVOJoaquim Maria Ferreira Antunes Neto^{1,2}Bruna Bergo Nader¹Caio Cesar Donadon³Daniela Cristina Sandy Turolle¹Elaine Ribeiro^{1,2}**RESUMO**

A divulgação dos métodos científicos sempre foi um grande dilema na pesquisa aplicada. As informações tendem a ser resumidas, uma vez que é consenso que um mesmo setor da comunidade científica compartilhe de um mesmo *know-how*. Contudo, é normal que pesquisadores em fase inicial de contato com procedimentos metodológicos tão diversos da área da Bioquímica do Exercício possam ter dificuldades de compreensão e execução de determinadas análises. O objetivo deste trabalho é apresentar argumentos teóricos sobre a importância do estresse oxidativo no desencadeamento da fase de *overreaching* (estresse metabólico) no futebol, bem como descrever pormenorizadamente os passos para análise de importantes biomarcadores desta categoria de estresse.

Palavras-Chave: Estresse oxidativo, Futebol, Avaliação bioquímica, Treinamento, Biomarcadores.

ABSTRACT

Stress Biomarkers in Soccer - Part 2: Dosage of Oxidative Stress Blood Levels.

The dissemination of scientific methods has always been a great dilemmas in applied research. The information tend to be brief, since the consensus is that a sector of the scientific community share the same know-how. However, it is normal for early stage researchers in contact with methodological procedures as diverse area of Biochemistry of Exercise may have difficulties in understanding and implementation of specific analyzes. The objective of this paper is to present theoretical arguments about the importance of oxidative stress in the onset phase of *overreaching* (metabolic stress) in soccer, as well as detail the steps for analysis of important biomarkers of stress in this category.

Key words: Oxidative stress, Soccer, Biochemical evaluation, Training, Biomarkers.

1-Instituto de Ensino Superior de Itapira (IESI). Núcleo de Estudos Multidisciplinares do Estresse (NEME).

2-Instituto de Ensino São Francisco (Mogi Guaçu). Cursos de Enfermagem e Nutrição.

3-Programa de Pós-Graduação Latu Sensu da Universidade Gama Filho

E-mail:

joaquim_netho@yahoo.com.brbergonader@hotmail.comcaio88@gmail.com

Endereço para correspondência:

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto

Instituto de Ensino Superior de Itapira

Avenida Rio Branco, 99

Centro, Itapira-SP, CEP: 13970-070

INTRODUÇÃO

A fase inicial do *overtraining* é descrito na literatura como *overreaching* e se instala quando o período de repouso entre um treinamento e outro ou competição é insuficiente (Bruin e colaboradores, 1994, Tiidus, 1998; Lehmann e colaboradores, 1998).

Apesar desta condição também induzir fadiga prematura, uma vez que a recuperação é incompleta, verifica-se ser facilmente revertida com um ou dois dias de pouco ou nenhum treino. Entretanto, como pouco é

conhecido em relação à quantidade ótima de treinamento e os fatores que influenciam a recuperação e supercompensação (Figura 1), ainda hoje existem um componente muito grande de empirismo na aplicação dos métodos de treinamento, os quais tendem a ser empregados com base científica simplificada (Antunes Neto e colaboradores, 2003).

No caso do futebol, a ocorrência de campeonatos simultâneos, bem como a disputa de duas a três partidas na mesma semana, dificulta ainda mais a recuperação do atleta.

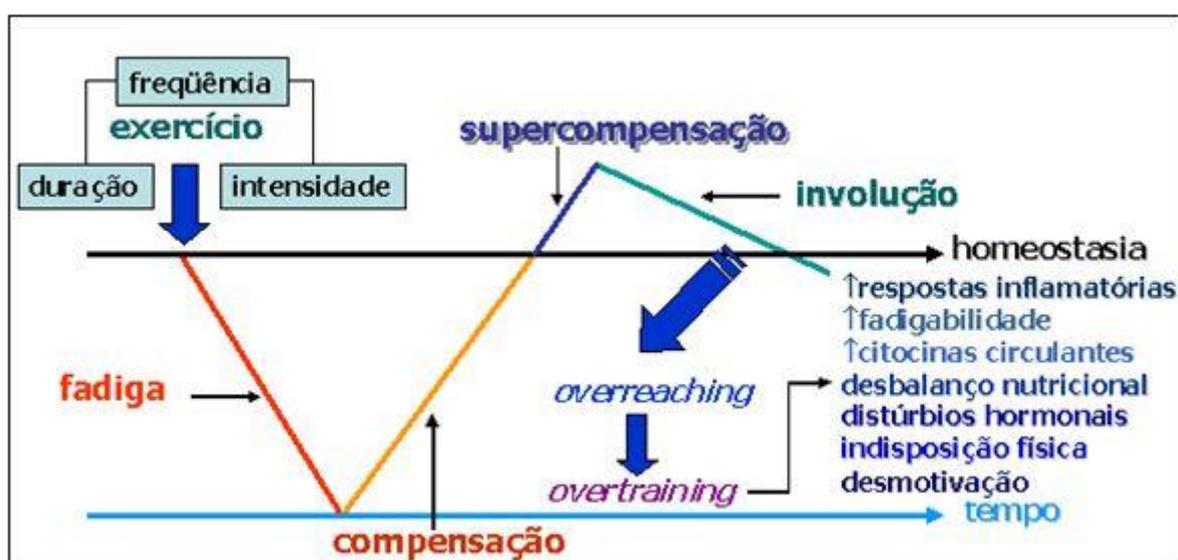


Figura 1 - A influência do estímulo estressor do exercício físico nas regulações de supercompensação e na instalação de *overreaching* e *overtraining*.

Sabe-se que os jogadores de futebol são normalmente submetidos a cargas de esforço muito altas, com pouco tempo de recuperação, para não se pecar pela falta de estímulo, sendo impossível prever se a carga de esforço exigida da equipe está excedendo o limite individual de estresse que o organismo pode suportar.

Tudo isso torna o limiar entre um treinamento ideal e o *overtraining* muito tênue. Um dos maiores problemas é que ainda não existem descritos na literatura marcadores completamente confiáveis, nem de adaptação, nem de *overreaching*, que ajudem a diagnosticar esse limite individual de estresse que impeça a instalação do *overtraining* (Antunes Neto e colaboradores, 2006).

Além disso, a literatura é carente de protocolos de exercícios que se preocupem em estabelecer esse quadro de desbalanço entre exercício/repouso em animais de laboratório, o que também dificulta o estudo da sensibilidade de biomarcadores nessa situação (Lazarim e colaboradores, 2009).

O objetivo deste artigo é apresentar como os marcadores de estresse oxidativo podem ser confiáveis para predição do quadro de *overreaching* no futebol, possibilitando preparadores físicos e equipe médica realizarem intervenções iniciais nas ações de treinamento do jogador.

ESTRESSE OXIDATIVO E EXERCÍCIO FÍSICO

Formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Radicais livres são espécies químicas independentes, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Isto implica em uma grande instabilidade e, frequentemente, elevada reatividade. Como necessitam completar seus pares de elétrons para se estabilizarem, comportam-se ou como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons. Nesta definição incluem-se os átomos de hidrogênio, vários íons metálicos de transição (ferro e cobre) e o oxigênio molecular (Halliwell, Gutteridge, 1989).

O oxigênio molecular (O_2) possui dois elétrons desemparelhados, localizados em dois orbitais p^*2p . Esses elétrons têm spins iguais, tornando o O_2 bastante estável, pois restringe sua redução ou a moléculas que possuam dois elétrons de spins antiparalelos ou a uma redução univalente, com um elétron de cada vez. A este fenômeno chamamos restrição de spin. Esta restrição limita a reatividade do oxigênio, permitindo que em uma atmosfera de 21% de O_2 , como a da Terra, ocorram moléculas constituídas de cadeias carbônicas altamente reduzidas (Halliwell, Gutteridge, 1989).

Nos organismos aeróbios, o O_2 é utilizado nas mitocôndrias como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido a H_2O no complexo IV ou citocromo a_3 . Por força da restrição de spin, o O_2 só pode ser reduzido unieletronicamente (ver Figura 2).

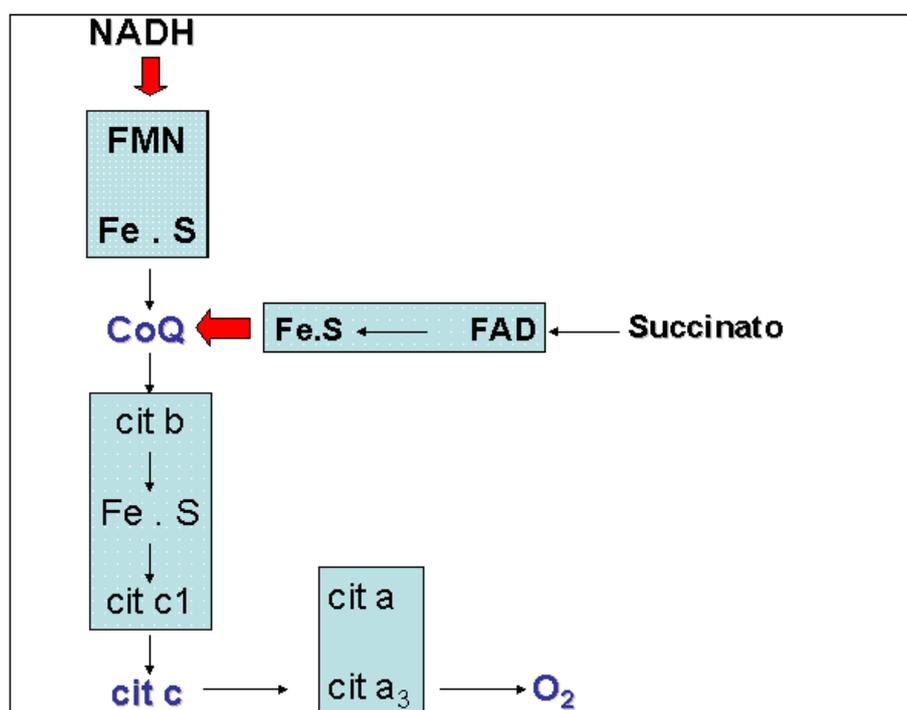


Figura 2 - Complexos componentes da cadeia transportadora de elétrons (CTE), adaptado de Antunes Neto e colaboradores (2012).

As quatro etapas de redução ocorrem no interior do complexo IV mitocondrial, liberando H_2O como único produto final da reação. No entanto, está bem documentado na literatura que cerca de 5% do oxigênio consumido é reduzido ao radical ânion superóxido (O_2^-), uma forma muito comum de

formação de radicais livres nos meios biológicos.

O exercício físico aumenta em torno de 25 vezes o volume de oxigênio total consumido (VO_2) e 100 vezes nas fibras musculares ativas (Astrand, 1992; Sjodin e colaboradores, 1990), permitindo que o O_2 possa ser formado de várias maneiras

(Beckman e colaboradores, 1990; Sjödin e colaboradores, 1990; Jenkins, Goldfarb, 1993; Reid, 1996; Tiidus, 1998), tal como na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, pela ação da enzima xantina oxidase, por meio da atividade dos neutrófilos durante o processo inflamatório e no músculo esquelético.

O músculo esquelético produz óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido arginina, pela reação da enzima óxido nítrico sintase. O óxido nítrico pode reagir com O₂⁻, formando peroxinitrito, um intermediário instável, de alta reatividade (Reid, 1998). Evidências experimentais mostram que o NO pode influenciar no balanço oxidante/antioxidante intramuscular (Reid, 1998; Reid, 2002).

Oxidação das Estruturas Lipídicas Celulares

Como os radicais livres são espécies de alta instabilidade, atacam regiões celulares específicas, principalmente fosfolípidios de membranas celulares e subcelulares, proteínas e DNA nuclear e mitocondrial, com o objetivo de se estabilizar (Halliwell, Gutteridge, 1989).

A oxidação de lipídeos, processo conhecido como peroxidação lipídica, pode iniciar-se em membranas celulares e subcelulares, especialmente na membrana interna das mitocôndrias, quando o OH[·] abstrair o hidrogênio das ligações das cadeias dos ácidos graxos poliinsaturados. Os carbonos dos fosfolípidios, uma vez oxidados, passam a possuir elétrons desemparelhados, desencadeando uma cascata de eventos destrutivos no interior da célula.

Os radicais lipídicos desemparelhados (L[·]) rearranjam-se molecularmente em dienos conjugados, que ao reagir com O₂ formam radicais peróxi (LOO[·]); radicais peróxi, pelo fato de serem oxidantes potentes, abstraem um segundo átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, dando continuidade aos processos degenerativos na membrana.

Assim, o radical iniciador começa um processo autocatalítico, que converte a maioria dos ácidos graxos dos fosfolípidios das membranas em hidroperóxidos. Os hidroperóxidos lipídicos formados, na presença de Fe²⁺, podem ainda ser oxidados a radicais alcoxi (LO[·]), vindo a sofrer quebra na ligação C – C seguinte e originar aldeídos de baixo peso molecular (malonaldeído, b-

hidroxinonenal e hidrocarbonetos, como etano e n-pentano).

Esses aldeídos de baixo peso molecular reagem com ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexos que podem ser quantificados em virtude da coloração obtida. Tais complexos, utilizados como biomarcadores de peroxidação lipídica em sistemas biológicos (tecidos e plasma) são medidos por espectrofotometria ou por fluorescência (Yagi, 1976; Ohkawa e colaboradores, 1979).

A peroxidação lipídica traz conseqüências homeostáticas severas para as membranas atacadas, refletidas, principalmente, na perda de sua integridade, devido à alteração na sua permeabilidade a íons e pequenas moléculas e perda nas suas características de fluidez (Halliwell, Gutteridge, 1989).

Oxidação das Estruturas Protéicas Celulares

No caso das proteínas, os aminoácidos também se constituem num alvo importante da ação das EROs, tendo suas estruturas secundárias e terciárias rompidas, com subsequente aumento de hidrofobicidade e perda de função. O OH[·] é particularmente proteotóxico, pois pode reagir com o carbono α de qualquer aminoácido (Halliwell, Gutteridge, 1989).

Além de modificar a função protéica, sua oxidação também pode marcá-las para serem degradadas em peptídeos e, eventualmente, em aminoácidos. Muitos produtos associados com perda ou alteração morfofuncional protéica podem ser obtidos após ataque oxidativo de EROs, entre eles hidroxilação de aminoácidos aromáticos, oxidação de aminoácidos que possuem enxofre (cisteína), peroxidação de aminoácidos alifáticos e formação de grupos carbonila (Dean, 1987).

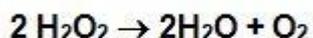
Funcionalidade do Sistema de Defesa Antioxidante

A atividade biológica das EROs é limitada por uma série de antioxidantes endógenos e proteínas relacionadas ao estresse (Buczynski e colaboradores, 1990; Goldfarb, 1993; Smolka e colaboradores, 2000; Reid, Durham, 2002).

Os principais sistemas de defesa endógenos compreendem as *vitaminas antioxidantes* (vitaminas A, C e E), *ácido úrico*, *glutathione reduzida* (GSH), *grupamentos sulfidrilos livres* e *enzimas antioxidantes* (superóxido dismutase, catalase e sistema glutathione peroxidase/glutathione reductase). As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular, pois eliminam $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e hidroperóxidos que poderiam oxidar os substratos celulares, prevenindo as reações em cadeia dos radicais livres, através da diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo (Yu, 1994).

A primeira defesa contra o radical $O_2^{\cdot-}$ é a enzima *superóxido dismutase* (SOD). A SOD, como já apresentando, dismuta o radical $O_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 e O_2 . Nos mamíferos, existem duas isoenzimas de SOD; a Cu-Zn-SOD, que se localiza primariamente no citosol e a Mn-SOD encontrada de forma mais pronunciada na matriz mitocondrial (Halliwell, Gutteridge, 1989). Ambas as enzimas catalisam a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ com eficiência similar (Powers e colaboradores, 1999).

A literatura indica que a atividade da SOD é mais pronunciada nos músculos com capacidade oxidativa elevada (maior porcentagem de fibras do tipo I e IIa), em comparação com músculos com baixa capacidade oxidativa (com grande percentual em fibras do tipo IIb) (Criswell e colaboradores, 1993; Powers e colaboradores, 1994). O H_2O_2 é desidratado enzimaticamente a H_2O e O_2 molecular pela enzima *catalase* (CAT), conforme mostrado abaixo:

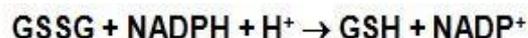


A CAT é encontrada, sobretudo, nos hepatócitos e eritrócitos, estando presente em grandes concentrações nos peroxissomas e em baixas concentrações nas mitocôndrias (Halliwell, Gutteridge, 1989). Sua atividade também é maior nos músculos com capacidade oxidativa mais elevada (Powers e colaboradores, 1994). A outra enzima responsável pela detoxificação do H_2O_2 , *glutathione peroxidase* (GPX), tem menos especificidade para o substrato, reduzindo também hidroperóxidos a álcool. O Km para H_2O_2 da CAT e GPX também são diferentes. Enquanto a GPX atinge sua V_{max} em baixas

concentrações, a CAT só atinge sua velocidade máxima de catálise em altas concentrações de H_2O_2 (Powers e colaboradores, 1999). Nas duas reações catalisadas pela GPX, a glutathione reduzida (GSH) funciona como doador de elétrons:



A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Quando GSH é oxidada pela reação da GPX, há a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, com formação de glutathione oxidada (GSSG). Queda nos níveis de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão GSH/GSSG alta. Para isso, a GSSG formada é reduzida novamente a GSH, à custa de NADPH, pela ação da enzima *glutathione reductase* (GR):



Em muitos tecidos, o NADPH é produzido pela enzima glicose-6 fosfato desidrogenase. Contudo, na musculatura esquelética a via principal advém da ação da enzima isocitrato desidrogenase (Powers e colaboradores, 1999).

A atividade da GPX é variada, estando presente tanto nas fibras musculares mais oxidativas (tipo I) quanto nas mais glicolíticas (tipo IIb) (Ji e colaboradores, 1988).

Similarmente a SOD, GPX está localizada no citosol e na mitocôndria. No músculo esquelético, aproximadamente 45% da atividade da GPX é encontrada no citosol, sendo que os demais 55% de atividade ocorrem na mitocôndria (Ji e colaboradores, 1988).

A GR possui uma distribuição similar a GPX. Embora não seja considerada uma das enzimas principais do sistema enzimático antioxidante, ela é fundamental para a atuação normalizada da GPX.

Estresse Oxidativo, Sistema Enzimático Antioxidante e Treinamento Físico

Embora a maior parte do O_2 combine-se com hidrogênio formando H_2O , cerca de 4% a 5% de O_2 formarão radicais $O_2^{\cdot-}$ com os elétrons que escapam da cadeia respiratória (Jenkins, Goldfarb, 1993).

Esta situação de vazamento de elétrons tem maior ocorrência quando há um aumento desproporcional no consumo mitocondrial de O₂, circunstância que também confere uma elevação na produção de radicais livres.

Portanto, existe uma relação diretamente proporcional entre aumento na taxa respiratória mitocondrial e indução na produção de espécies reativas de O₂, principalmente em casos que envolvem treinamento de resistência aeróbia utilizando-se métodos intervalados intensivos (Criswell e colaboradores, 1993), circunstância bem evidente na preparação física no futebol.

A explicação para tal fato parece relacionar-se com o elevado consumo total de O₂ durante o intervalo da atividade, o que favorece a ocorrência de um processo conhecido por *isquemia-reperfusão* (Alessio, 1993).

Fica evidente que a sobrevivência celular frente ao ataque dos radicais livres dependerá de um equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação das espécies reativas. Qualquer circunstância que desequilibre estes dois processos induzirá a instalação de estresse oxidativo, quando prevalecerá a formação de oxidantes aos antioxidantes (Alessio, 1993).

Neste caso, o acúmulo de reações de oxidação pode induzir alterações severas em várias estruturas celulares.

A ação das EROs sobre o sistema enzimático antioxidante parece ter relação direta com seu nível de produção (Alessio, 1993; Smolka e colaboradores, 2000).

Vários trabalhos da literatura mostraram que indivíduos ou animais adaptados a um protocolo de treinamento possuíam níveis mais elevados de enzimas antioxidantes e certos oxidantes não enzimáticos no músculo, demonstrando uma resistência maior ao estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (Sen, 1995; Radák e colaboradores, 1999; Smolka e colaboradores, 2000).

Por outro lado, vários autores também mostraram um efeito inibitório na atividade dessas enzimas numa situação de exercício exaustivo, com aumento na concentração de produtos de ataque oxidativo (Davies e colaboradores, 1982; Sjödin e colaboradores, 1990; Ji e colaboradores, 1992; Smolka e

colaboradores, 2000; Zoppi e colaboradores, 2006).

A modulação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em resposta ao treinamento físico tem sido descrita principalmente para o treinamento de *endurance*, caracterizado por volumes maiores e intensidades moderadas (Alessio, 1993; Goldfarb, 1993; Ji e colaboradores, 1988; Laughlin e colaboradores, 1990; Criswell e colaboradores, 1993; Sen, 1995; Powers e colaboradores, 1994; Tiidus, 1998). Já o treinamento de alta intensidade raramente é abordado quanto a sua influência sobre a modulação da defesa antioxidante, sendo pobremente descrito, com resultados ainda discrepantes.

Powers e colaboradores (1994) mostraram que ratos treinados exibiam alterações na atividade de enzimas antioxidantes específicas para cada músculo, encontrando também relação entre duração das sessões de treinamento maiores do que 60 min com o aumento da atividade da SOD no músculo sóleo e da GPX no músculo gastrocnêmio vermelho.

Criswell e colaboradores (1993) compararam um treinamento intervalado (a aproximadamente 80-95% do VO₂max) com um treinamento contínuo de menor intensidade (70% do VO₂máx), identificando aumentos na atividade da GPX no músculo sóleo apenas para o grupo intervalado, enquanto a SOD teve sua atividade no músculo sóleo aumentada para os dois tipos de treinamentos.

Atalay e colaboradores (1996) observaram aumentos nos níveis de glutatona total e nas atividades das enzimas GPX e GR em músculos de fibras rápidas e mistas de ratos submetidos a um treinamento de alta intensidade. Hellsten e colaboradores (1996) observaram em humanos aumentos nas atividades das enzimas GPX e GR no músculo após 7 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade em bicicleta.

Antunes Neto e colaboradores (2006) mostraram que após 8 semanas, o treinamento de *endurance* foi mais eficiente que o treinamento intermitente em aumentar a atividade das enzimas CAT e GR no músculo sóleo de ratos, com um efeito inverso sobre a atividade da enzima citrato sintase como marcador de capacidade oxidativa. Ou seja, o treinamento de *endurance* induziu um

aumento menor na capacidade oxidativa que o treinamento intermitente, sugerindo que durante esse tipo de treinamento as próprias enzimas pudessem estar sendo atacadas pela maior quantidade de EROS formada (Smolka e colaboradores, 2000).

Todas essas evidências demonstram a importância da análise do potencial de estresse oxidativo em modalidades, como o futebol, que exigem alternância entre estímulos de alta frequência e intensidade e períodos de recuperação curtos durante a ação do jogo.

Procedimentos Metodológicos para Análise do Potencial de Estresse Oxidativo

Uma das grandes dificuldades enfrentadas por pesquisadores iniciantes nas práticas laboratoriais bioquímicas é a compreensão dos protocolos para investigação do potencial de estresse oxidativo. A grande maioria dos artigos científicos apenas indica a referência do método utilizado, sem descrição pormenorizada quanto aos procedimentos de bancada. Desta forma, vamos compartilhar nossos protocolos para melhor entendimento das técnicas e viabilizar a estruturação de novos núcleos de estudo e pesquisa, sobretudo para o futebol.

Coleta de Sangue. Coleta-se 5mL de sangue para realização completa das análises de estresse oxidativo. Plasma e hemáceas são obtidos após centrifugação, por 10 min a 3000 rpm. O plasma obtido é separado e armazenado a -80°C depois de tratado com butilhidroxitolueno (BHT) 90µM, este que atua como um seqüestrador específico de EROs. As hemácias são lavadas com solução gelada de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e centrifugadas a 3000 rpm, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo é repetido três vezes. Alíquotas de 500 µL são retiradas e hemolisadas com água destilada na proporção 1:1 (v/v), com posterior armazenamento a -80°C para as seguintes análises: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteínas carboniladas (PC).

Dosagem de Hemoglobina no Hemolisado. A determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no hemolisado torna-se

fundamental para a obtenção dos valores finais de CAT e GR. Os valores são obtidos através do método de Drabkin (Beutler, 1975), em que a Hb (100 µL da amostra preparada a partir do hemolisado 1:20, descrito no método da CAT), em presença de reagente de Drabkin (2 mL), forma um composto, a cianometahemoglobina, que é absorvida a 540 nm e cujo coeficiente de extinção milimolar é 11,5 M⁻¹.cm⁻¹.

Catalase. A preparação da amostra inicia-se com a adição de 900 µL de tampão fosfato, pH 7,4, a 100 µL do hemolisado (1:1), obtendo-se, assim, uma diluição 1:20 da amostra inicial. Deste hemolisado, 1 µL é adicionado ao meio básico de reação, que contém tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da enzima, provocando uma diminuição no valor da absorvância em 240 nm. A diferença na leitura das absorvâncias a 240nm, em um intervalo de tempo (15 segundos), permite a determinação da velocidade de redução do H₂O₂, que é proporcional a velocidade da reação enzimática catalisada pela CAT (Aebi, 1984):



O cálculo da atividade da CAT é feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log a_1/a_2)$, onde Δt é a variação do tempo de reação (15 s), a é o volume de hemolisado na cubeta, b é a concentração de hemoglobina da amostra em g/dL, a_1 é o valor da absorvância no tempo zero ($t = 0$) e a_2 é o valor da absorvância no tempo final ($t = 15$ s). A unidade final expressa-se em k/gHb/min.

Glutationa Redutase. O ensaio é conduzido de acordo com Smith e colaboradores (1988). A preparação da amostra ocorre da mesma forma para a análise de CAT. Deste hemolisado, 5 µL é adicionado a um meio de incubação contendo KH₂PO₄ 0,2 M e EDTA 2 mM, em pH 7,0. Adicionamos, ainda, para a ocorrência da reação, 50µL de NADPH 2 mM, 250µL de DTNB 3 mM e 50µL de GSSG 20 mM. A formação de TNB é acompanhada por espectrofotômetro (Beckman - modelo DU 640) a 412 nm de absorvância. A unidade final se expressa em UI/gHb/min.

Dosagem de Grupamentos Sulfidríla Totais no Plasma. Uma alíquota de 50 µL do plasma é misturada em 1 mL de tampão Tris-EDTA (1 mM), sendo feita uma primeira leitura a 412 (leitura A1). Após essa leitura foi adicionado 20 µL de 5,5'- ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 10 mM, diluído em metanol. Espera-se 15 minutos à temperatura ambiente e faz-se nova leitura (leitura A2). O branco (B) contém somente DTNB e tampão Tris-EDTA. A unidade final é expressa em µM. Os grupamentos sulfidríla totais são calculados de acordo com o coeficiente de absorção molar = 13,600 cm⁻¹ M⁻¹ (Faure, Lafound, 1995):

$$(A2 - A1 - B) \times 1,57 \text{ mM}$$

Peroxidação Lipídica (TBARS). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff.

Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (Yagi, 1976). 20µL de plasma foram diluídos em 4 mL de H₂SO₄ (0,04M). Adicionamos a esta diluição 0,5 mL de ácido fosfotungstíco 10% e aguardamos 5 min para a centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante é descartado e suspendemos o precipitado em 2 mL de H₂SO₄ (0,04 mL), seguindo da adição de 0,3 mL de ácido fosfotungstíco 10%.

Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, descartamos novamente o sobrenadante e dissolvemos o precipitado em 0,5 mL de H₂O deionizada. Adicionamos a essa mistura 1 mL da solução composta de ácido tiobarbitúrico 0,67% em ácido acético 50%. A amostra é incubada em banho maria 90°C por 1 hora. Após o resfriamento, é efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com 5 mL de butanol. A medida da emissão da fluorescência da fase orgânica é feita a 553 nm, enquanto que o comprimento da onda de excitação é 515nm (espectrofluorímetro modelo SPF-500CTM SLM Aminco - SLM Instruments, Inc). O cálculo da concentração de TBARS é feito por meio de uma curva-padrão de tetraetoxipropano e os resultados expressos em nmol/mL de plasma.

Proteínas Carboniladas. Os alcenos insaturados, produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal, podem reagir com os grupos sulfidríla formando tioésteres, que possuem grupos carbonila. O método utilizado é o proposto por Faure e Lafond (1995), onde o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) complexa-se com os grupos carbonila das proteínas, formando bases de Schiff que absorvem a 380 nm de comprimento de onda. As análises de proteínas carboniladas (PC) são realizadas em amostras de plasma e os valores expressos em µM.

Aplicabilidade das Análises de Estresse Oxidativo

Como descrito no artigo anterior (Antunes Neto e colaboradores, 2012), as análises de estresse oxidativo foram aplicadas em uma equipe da primeira divisão do Campeonato Brasileiro de Futebol 2001. Ao todo foram realizadas cinco análises, sendo a primeira no período pré-competitivo e as outras quatro análises ao longo do Campeonato. A intenção foi monitorar e testar a aplicabilidade e prever o potencial de instalação de lesões musculares mais severas, pois os eventos de estresse oxidativo são considerados os "gatilhos" para desencadeamento de eventos lesivos e patológicos (Rahman e colaboradores, 2012; Antunes Neto e colaboradores, 2005).

As análises ocorreram nos meses de agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro. Na análise de setembro, realizada logo após o período pré-competitivo e início do torneio, quatro jogadores foram diagnosticados em situação de estresse oxidativo, que se resume no desbalanço entre sistema de defesa antioxidante e produtos oxidativos celulares (Tabela 1).

Após a detecção das alterações, os jogadores tiveram a carga de esforço diminuída e o tempo de recuperação aumentado por 2 semanas, sendo reavaliados novamente ao final deste período (primeira análise = 17/7; segunda análise 31/7). Interessante notar que os biomarcadores estudados sofrem modulações a curto prazo. Tal ajuste regulatório é de extrema importância para adaptações duradouras e estáveis, o que indica a influência do potencial oxidativo na indução de atividade sintética do DNA e expressão de RNA mensageiro para

expressão de novas enzimas e estruturas da célula muscular (Antunes Neto e colaboradores, 2006).

Para a manutenção de respostas adaptativas duradouras, os parâmetros de intensidade, duração e frequência do estímulo de treinamento deverão interagir com as condições de adaptabilidade do organismo.

Portanto, os ajustes regulatórios

podem desempenhar uma primeira etapa indutora para que haja aquisição de alterações compensatórias estáveis. As adaptações estáveis, deste modo, necessitam de um período a longo prazo para se expressarem, pois seus fatores atuam em atividades com diferentes latências e intensidades, visando as alterações morfofuncionais (Antunes Neto, 1998).

Tabela 1 - Análises de Parâmetros de Estresse Oxidativo Realizadas em Três Jogadores Detectados em Situação de *Overreaching*.

Parâmetros	MG	Análise 1				Análise 2			
		J1	J2	J3	J4	J1	J2	J3	J4
CAT	0.4	0.2	0.15	0.19	0.18	0.6	0.6	0.4	0.5
GR	10.0	5.0	4.5	5.5	6.0	16.0	10.0	11.5	12.0
GST	465	384	298	340	365	454	498	500	495
TBARS	2.0	3.7	4.5	5.6	5.3	1.9	2.3	2.0	1.7
PC	160	380	328	290	412	171	176	150	158

Onde: MG = média do grupo; J = jogador; CAT = Catalase (K/gHb/min); GR = Glutathione Redutase (UI/gHb/min); GST = Grupamento Sulfidril Total (μ M); TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; PC = Proteínas Carboniladas.

Importante observar que a caracterização de estresse oxidativo ou de um quadro de *overreaching* se deu pelo fato da atividade antioxidante apresentar-se abaixo da média do grupo, enquanto que os metabólitos oxidativos (peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas) sofreram precipitada elevação.

Os fatores exógenos que contribuíram para tal condição foram o acúmulo de atividades de treinamento na fase preparatória para o Campeonato Brasileiro e os próprios jogos da etapa inicial. Todos esses fatores diminuem o tempo de recuperação do jogador logo numa fase onde os eventos adaptativos encontram-se em ajustes regulatórios;

CONCLUSÃO

A metodologia para detecção de limiar de estresse permitiu compreender o estágio de estresse de cada jogador em relação a si próprio e a todo o grupo, de forma que o preparador físico, em posse destes resultados, pudesse individualizar as cargas de treinamento e aperfeiçoar a recuperação de eventuais processos de lesões musculares. A disponibilização dos procedimentos metodológicos de forma mais descritiva possibilita, por parte de pesquisadores em fase inicial de contato com a Bioquímica do Exercício aplicada, maior interesse pelo

desenvolvimento de estratégias importantes e já validadas nas Ciências do Esporte.

REFERÊNCIAS

- 1-Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. Vol. 105. p. 121-126. 1984.
- 2-Alessio, H. M. Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 25. p. 218-224. 1993.
- 3-Antunes Neto, J. M. F. Modificações morfofuncionais do tecido muscular induzidas pela atividade excêntrica: um estudo global dos processos adaptativos. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas. 1998.
- 4-Antunes Neto, J. M. F. Estudo da relação entre estresse oxidativo e síntese de proteínas de estresse "HSP70" em animais submetidos a diferentes níveis de exercício físico. *Tese de Doutorado*. UNICAMP. Instituto de Biologia. Departamento de Bioquímica. 2003.
- 5-Antunes Neto, J. M. F.; Nader, B. B.; Donadon, C. C.; Macedo, D. V. Biomarcadores de estresse no futebol: dosagem sanguínea dos níveis de creatina quinase. Vol. 4. Num. 12. p. 87-97. 2012.

Revista Brasileira de Futsal e Futebol

ISSN 1984-4956 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbff.com.br

- 6-Antunes Neto, J. M. F.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. Vol. 13. Num. 2. 2005. p. 73-79.
- 7-Antunes Neto, J. M. F.; Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Boscherio, A. C.; Pereira-da-Silva, L.; Macedo, D. V. Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stress*. Vol. 9. p. 107-115. 2006.
- 8-Åstrand, P. O. Why exercise? *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 24. p. 153-162. 1992.
- 9-Atalay, M.; Marnila, P.; Lilius, E. M. Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function in rats. *European Journal of Applied Physiology*. Vol. 74. p. 342-346. 1996.
- 10-Beckman, J. S.; Beckman, T.; Freeman, B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 87. p. 1620-1624. 1990.
- 11-Beutler, E. Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods*. London: Grune & Stratton Publishers, 1975.
- 12-Bruin, G.; Kuipers, H.; Keizer, H. A.; Vandervusse, G. J. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 76. Num. 5. p. 1908-1913. 1994.
- 13-Buczynsky, A.; Blaszczyk, J.; Kedziora, J. Blood platelet superoxide dismutase activity and malonyldialdehyde concentrations in healthy men following 112 submaximal physical exercise. In: Nazar, K.; Terjung, R. L.; Uscilko, H. K. e colaboradores. (orgs.). *International perspectives in exercise physiology*. Champaign: Human Kinetics, 1990.
- 14-Criswell, D.; Powers, S.; Dodd, S.; Lawler, J.; Edwards, W.; Renshler, K.; Grinton, S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 25. p. 1135-1140. 1993.
- 15-Davies, K.J. A.; Quintanilha, A. T.; Brooks, G. A.; Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 107. p. 1198-1205. 1982.
- 16-Dean, R. T. A mechanism for accelerated degradation of intracellular proteins after limited damage by free radicals. *FEBS Letter*. Vol. 220. p. 278-282. 1987.
- 17-Faure, P.; Lafond, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A.E.; Cadet, J.; Kalyanaraman, B.; Fontecave, M.; Pierre, J. L. (eds.) *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel: Birkhäuser Verlag. p. 237-248. 1995.
- 18-Goldfarb, A. H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 25. p. 232-236. 1993.
- 19-Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- 20-Hellsten, Y.; Hansson, H. A.; Johnson, L. Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*. Vol. 157. p. 191-197. 1996.
- 21-Jenkins, R. R.; Goldfarb, A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 25. p. 210-212. 1993.
- 22-Ji, L. L.; Mitchell, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 73. p. 1854-1858. 1992.
- 23-Ji, L. L.; Stratman, F.; Lardy, H. Antioxidant enzymes system in rat liver and skeletal muscle: influence of selenium deficiency acute exercise and chronic training. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 263. p. 150-160. 1988.

- 24-Laughlin, M. H.; Simpson, T.; Sexton, W. L.; Brown, O. R.; Smith, J. K.; Korthuis, R. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 68. p. 2337-2343. 1990.
- 25-Lazarim, F. L.; Antunes Neto, J. M. F.; Silva, F. O. C.; Nunes, L. A. S.; Bassani-Cameron, A.; Cameron L, Alves, A. A., Brenzikofer, R.; Macedo, D. V. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. *Journal of Science and Medicine in Sport*. Vol. 12. Num. 1. p. 85-90. 2009.
- 26-Lehmann, M.; Foster, C.; Dickhuth, H. H.; Gastmann, U. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 30. Num. 7. p. 1140-1148. 1988.
- 27-Ohkawa, H.; Nobuko, O.; Yagi, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. Vol. 95. p. 351-358. 1979.
- 28-Powers, S. K.; Criswell, D.; Lawlwe, J.; Ji, L. L.; Martin, D.; Herb, R. A.; Dudley, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*. Vol. 266. p. R375-380. 1994.
- 29-Powers, S. K.; Ji, L. L.; Leeuwenburgh, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 31. p. 987-997. 1999.
- 30-Radáč, Z.; Tahara, S.; Nakamoto, H.; Ohno, H.; Sasvári, M.; Nyakas, C.; Goto, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 27, p. 69-74. 1999.
- 31-Rahman, T.; Hosen, I.; Towhidul, I.; Shekar, H. U. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. Vol. 3. p. 997-1019. 2012.
- 32-Reid, M. B. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News of Physiology and Science*. Vol. 11. p. 114-119. 1996.
- 33-Reid, M. B. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiologica Scandinavica*. Vol. 162. p. 401-409. 1998.
- 34-Reid, M. B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 90. p. 724-731. 2001.
- 35-Reid, M. B.; Durham, W. J. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle – potential impact on aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. Vol. 959. p. 108-116. 2002.
- 36-Sen, C. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 79. p. 675-686. 1995.
- 37-Sjödín, B.; Weling, H.; Apple, S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine*. Vol. 10. p. 236-254. 1990.
- 38-Sjödín, B.; Westing, Y. H. Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. *International Journal of Sports and Medicine*. Vol. 11. p. 493-495. 1990.
- 39-Smith, I. K.; Vierheller, T. L.; Thorne, C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*. Vol. 175. p. 408-413. 1988.
- 40-Smolka, M. B.; Zoppi, C. C.; Alves, A. A.; Silveira, L. R.; Marangoni, S.; Pereira-da-Silva, L.; Novello, J. C.; Macedo, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology*. Vol. 279. p. R1539-1545. 2000.
- 41-Tiidus, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 76. p. 533-538. 1998.
- 42-Yagi, K. A. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemistry and Medicine*. Vol. 15. p. 212-216. 1976.

Revista Brasileira de Futsal e Futebol

ISSN 1984-4956 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbff.com.br

43-Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. Vol. 74. p. 139-162. 1994.

44-Zoppi, C. C.; Hohl, R.; Silva, F. C. C.; Lazarim, F. L.; Antunes Neto, J. M. F.; Stancanneli, M.; Macedo, D. V. Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. Vol. 3. Num. 2. p. 37-44. 2006.

Recebido para publicação em 27/01/2013

Aceito em 30/01/2013

Segunda versão em 20/10/2013