

ORIGINAL INVESTIGATION (ARTIGO ORIGINAL)

# PROTEÍNAS DE ESTRESSE “HSP70” ATUAM COMO MARCADORAS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS “WISTAR” SUBMETIDOS A TREINAMENTO INTERMITENTE DE CORRIDA PARA INDUÇÃO DE OVERREACHING

**Heat Shock Proteins as Oxidative Stress Markers in Rats Submitted to Exhaustive Intermittent Running Training**

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto<sup>1,2</sup>, Lúcia Pereira-da-Silva<sup>1</sup> & Denise Vaz de Macedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABEX), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP. <sup>2</sup>Laboratório de Estudos Multidisciplinares do Estresse, Faculdades Integradas Metropolitanas de Campinas, METROCAMP.

## Address for correspondence:

Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto  
Faculdades Integradas Metropolitanas de Campinas - METROCAMP.  
Laboratório de Estudos Multidisciplinares do Estresse (LEME). Rua Abolição, 2008, Bairro Ponte Preta, CEP 13041-443, Campinas – São Paulo. \*Contato: joaquim\_netho@yahoo.com.br

Submitted for publication: July 2008

Accepted for publication: August 2008

## Resumo

ANTUNES NETO, J. M. F.; PEREIRA-DA-SILVA, I.; MACEDO, D. V. Proteínas de estresse “HSP70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos “Wistar” submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. *Brazilian Journal of Biomotricity*, v. 2, n. 3, p. 160-175, 2008. A busca de procedimentos preditores de lesão celular induzida pelo exercício é um grande desafio às pesquisas de caráter molecular. Para a indução de níveis elevados de estresse oxidativo, foi formulado um protocolo de treinamento de corrida intermitente em esteira computadorizada para ratos “Wistar”, onde se buscou induzir adaptação e “overreaching” (estresse metabólico severo). Avaliou-se, em eritrócitos, as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione redutase (GR); dosou-se ainda marcadores plasmáticos de ataque oxidativo a lipídeos (TBARS) e proteínas (carbonilação de proteínas – PC). Para detecção de alterações musculares, analisou-se os níveis plasmáticos das enzimas creatina quinase (CK), aspartato transaminase (AST). A inovação do estudo foi comparar os níveis de estresse oxidativo com a expressão das proteínas de estresse “HSP70” detectadas em amostras de leucócitos totais. Os resultados mostraram que a fase de adaptação do protocolo induziu aumento da atividade antioxidante e adaptação aos níveis de ataque oxidativo; níveis de HSP70 modularam-se de acordo com as exigências do treinamento.

Contudo, quando os animais passaram a treinar, sobretudo, 3 a 4 sessões diárias, com diminuição severa do período de recuperação (fase de "overreaching"), a ação antioxidante decresceu e prevaleceu o aumento dos marcadores de ataque oxidativo. Como uma resposta à severidade do estresse induzido pelo treinamento, os níveis de HSP70 aumentaram significativamente, suportando nossa hipótese de que tal classe de proteínas de estresse atua como parte importante dos sistemas celulares de defesa antioxidante.

**Palavras-Chaves:** proteínas de estresse, estresse oxidativo, exercício físico.

#### Abstract

ANTUNES NETO, J. M. F.; PEREIRA-DA-SILVA, I.; MACEDO, D. V. Heat Shock Proteins as Oxidative Stress Markers in Rats Submitted to Exhaustive Intermittent Running Training. *Brazilian Journal of Biomotricity*, v. 2, n. 3, p. 160-175, 2008. A novel method to measure oxidative stress resulting from exhaustive Intermittent training in rats submitted to the treadmill running is presented. In this new procedure we evaluated the erythrocyte antioxidant enzymes, catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), the plasma oxidative attack markers, reactive carbonyl derivatives (RCD) and thiobarbituric reactive substances (TBARS). Muscular tissue damage was evaluated by monitoring plasma creatine kinase (CK) and aspartate transaminase (AST) concentrations. Also, we monitored total the level of the 70 Kda heat shock protein (HSP70) in leukocytes as a marker of oxidative stress. In the study we found a correspondence between oxidative stress markers and leukocyte HSP70 levels. The results showed that the adaptation phase induced an increase of antioxidant activity and stabilization in levels of oxidative attack markers; the HSP70 levels had modulation in accordance with the training conditions. However, when the rats had 3 and 4 sessions of training per day and a decrease in time of recovery (overreaching phase), the antioxidant activity suffered a decrease and the oxidative attack markers had a significative increase. As a response to the severity of the oxidative stress condition, the HSP70 levels had a significative increase, supporting the hypothesis that the HSPs acts as an important element of the cells antioxidant defenses.

**Key words:** heat shock proteins, oxidative stress, exercise, overreaching.

#### Introdução

Células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes através de uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas "proteínas de estresse" (LOCKE et al., 1990). O termo "proteína de estresse" tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (WELCH, 1993). As *Heat Shock Proteins* (HSPs) surgem na literatura como uma das classes de proteínas de estresse melhor estudadas. O aumento na expressão das HSPs foi inicialmente evidenciado em *Drosophila melanogaster* (RITOSSA, 1962), por meio de choque térmico (incubação em diferentes temperaturas elevadas). Hoje já se conhece que a resposta *heat shock* é uma propriedade geral de todas as células, tanto em condição de hipertermia quanto de demais estados de alteração homeostática, tais como exposição a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição de glicose para fornecimento de energia às células, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos, estresse oxidativo, presença de toxinas, etc. (SCHLESINGER, 1986; BIENZ, PELHAM, 1987; WELCH, 1992; YELLON, MARBER, 1994).

As HSPs são de fundamental importância para a sobrevivência das células, não apenas em condição de estresse, onde se vê aumento na síntese de proteínas dirigidas à reparação de danos celulares, mas também em eventos

de transporte e enovelamento (*fold*ing) de proteínas em formação (NEUPERT et al., 1990; GETHING, SAMBROOK, 1992; CRAIG, 1993; MORIMOTO, 1993; STUART et al., 1994; TERLECKY, 1994). Algumas classes de proteínas de estresse são constitutivas, sendo denominadas de *proteínas cognatas*. As proteínas cognatas são membros constitutivos de famílias de proteínas de estresse que funcionam em condição fisiológica normal. Por exemplo, a Hsc70 é uma proteína cognata da classe HSP70. As famílias de proteínas com pesos moleculares de 72 kDa, 73 kDa e 90 kDa correspondem às maiores classes de proteínas de estresse expressas pelo organismo (WELCH et al., 1993).

Sobre a atividade das proteínas de estresse em situação de exercício físico pouco se sabe ainda. Muitas condições bioquímicas e fisiológicas, juntamente com a elevação de temperatura, poderiam estimular a expressão de proteínas de estresse no exercício, dentre elas depleção de glicose, hipóxia, concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  elevada e decréscimo de pH (LOCKE et al., 1990). Existem evidências também que espécies reativas de oxigênio (EROs), numa condição de estresse oxidativo, poderiam também participar como sinalizadores na síntese de HSPs (WELCH, 1992; ANTUNES NETO et al., 2006). O estresse oxidativo no exercício físico caracteriza-se pelo aumento da produção de EROs por vias mitocondriais, pela ativação da enzima xantina oxidase, pela ativação de eventos inflamatórios e até pela formação de peroxinitrito por intermédio de óxido nítrico (TIIDUS, 1998; REID, 1996; JENKINS, GOLDFARB, 1993; SJÖDIN et al., 1990); porém, o quadro de estresse oxidativo demanda uma queda acentuada da atividade dos sistemas de defesa antioxidante, sobretudo das enzimas catalase e glutathione redutase e dos níveis de glutathione endógeno (ANTUNES NETO et al., 2006). Esta condição pode levar ao ataque de regiões celulares específicas, principalmente fosfolípidios de membranas celulares e subcelulares, proteínas e DNA nuclear e mitocondrial (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1989).

Hernando e Manso (1997) relataram que ratos sedentários submetidos ao exercício intenso tiveram aumentos significativos de HSP72 no músculo sóleo. Locke e colaboradores (1990) também mostraram que o estresse oxidativo induzido por um exercício exaustivo em esteira seria um estímulo suficiente para induzir síntese de HSP72 e HSP90 em células do músculo sóleo, do baço e em linfócitos. Analisando também a condição muscular, Antunes Neto e colaboradores (2006) propuseram que o aumento da expressão de HSPs poderia ser compreendido como um sistema secundário de defesa antioxidante celular.

O objetivo deste estudo foi detectar, por técnica de “Western Blot”, a quantidade de proteínas de estresse HSP70 induzida por um protocolo intermitente que levasse a uma condição de “overreaching” e relacionar sua expressão com os eventos de estresse oxidativo. O inovador deste trabalho é propiciar a análise de HSPs no sangue, especificamente em leucócitos totais, o que possibilita a abertura de um novo campo de marcadores de estresse oxidativo menos invasivos, em relação a realização de biópsias musculares. A detecção de marcadores moleculares, como é o caso das HSPs, propicia identificar uma condição anterior à instalação de quadros lesivos que podem

ser severos a um atleta, circunstância que vem a validar este campo de pesquisa.

### Materiais e Métodos

**Animais.** Utilizamos ratos machos Wistar, obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP, com 2 meses de idade no início do protocolo de treinamento. Durante toda a execução do protocolo, os ratos foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 18-22°C e foto-período invertido de 12 horas, estando providos de ração de laboratório e água *ad libitum*. Os experimentos foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética Animal da Instituição.

**Proposta de Protocolo de Treinamento Intermitente/Intervalado para Indução de "Overreaching".** O protocolo de exercício intermitente ou intervalado (Tabela 1) foi realizado em esteira computadorizada específica para ratos (LABEX), com -3° de inclinação. As primeiras 4 semanas (S4) tiveram aumento progressivo na velocidade e tempo de corrida; da quinta a oitava semana (S8), houve manutenção da carga de corrida obtida em S4; nas semanas 9, 10 e 11 ocorreram 2 (2x/dia), 3 (3x/dia) e 4 (4x/dia) sessões diárias de corrida, respectivamente.

**Preparo das Amostras dos Ensaios de Estresse Oxidativo.** Após o animal ter sido anestesiado com hidrato de cloral (10%) via intraperitoneal, realizamos uma secção abdominal de forma que pudéssemos alcançar a veia hepática e coletar todo o sangue possível, que era depositado em tubos heparinizados. Para o preparo das amostras, 2/3 do sangue total obtido de cada animal foram reservados para o isolamento dos leucócitos totais, adicionando Histopaque (1119 - SIGMA Diagnostics). Plasma e hemáceas foram obtidos após centrifugação, por 10 min a 3000 rpm, do sangue restante. As hemácias foram 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.

**Tabela 1** - Protocolo de treinamento intermitente para indução de "overreaching" (protocolo elaborado pelos pesquisadores do LABEX).

Semanas	Velocidade (m/min)	Tempo do Exercício (min)	Pausa (min)	Número de Repetições	Número de sessões diárias
1	20	5	2	4	1
2	30	2,5	1	4	1
3	32,5	2,5	1	6	1
4	35	2,5	1	6	1
5 a 8	35	2,5	1	6	1
9	35	2,5	1	6	2
10	35	2,5	1	6	3
11	35	2,5	1	6	4

## Dosagens Enzimáticas

**Creatina Quinase.** A dosagem deste parâmetro foi realizada espectrofotometricamente em absorvância de 334 nm (Boehringer Mannheim MPR 3 kit CK NAC-activated), através de 50 µL de plasma misturados com a solução reagente.

**Aspartato Transaminase.** As análises de aspartato transaminase (AST) foram realizadas no aparelho Autolab PM 4000, através de kits de análises clínicas QUIMIAST (Boehringer Mannheim).

**Catalase.** A preparação da amostra iniciava-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 era adicionado ao meio básico de reação, que continha tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mM. A medida da atividade da CAT ocorre através da velocidade com que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzido pela ação da enzima, provocando uma diminuição no valor da absorvância em 240 nm (AEBI, 1984). A unidade final expressou-se em k/gHb/min.

**Glutaciona Redutase.** O ensaio foi conduzido de acordo com Smith et al. (1988). A preparação da amostra dava-se da mesma forma para a análise de CAT. Deste hemolisado, 5 µL era adicionado a um meio de incubação contendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M e EDTA 2 mM, em pH 7,0. Adicionávamos, 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 foi acompanhada por espectrofotômetro (Beckman - modelo DU 640) a 412 nm de absorvância. A unidade final expressou-se em UI/gHb/min.

**Dosagem de Hemoglobina no Hemolisado.** A determinação da concentração de hemoglobina (Hb) no hemolisado torna-se fundamental para a obtenção dos valores finais das atividades das enzimas do sistema antioxidante. Os valores foram obtidos através do método de Drabkin (BEUTLER, 1975).

## Dosagens de Oxidações Celulares

**Peroxidação Lipídica (TBARS).** Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias plasmáticas que reagem ao ácido tiobarbitúrico (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). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva-padrão de tetraetoxipropano e os resultados foram expressos em nmol/mL de plasma.

**Carbonilação de Proteínas.** Os alcenos insaturados, produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal, podem reagir com os grupos sulfidril formamdo tioesteres, que possuem grupos carbonila. O método utilizado foi o

proposto por Lafond e Paure (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 foram realizadas em amostras de plasma e os valores expressos em  $\mu\text{M}$ .

**Eletroforese para Detecção de Expressão das Proteínas de Estresse em Leucócitos Totais.** As proteínas totais das amostras de leucócitos foram dosadas pelo método de Bradford (1976). A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada pelo método descrito por Laemmli (1970). O gel de empacotamento tinha concentração de 5% de acrilamida, sendo 11% a concentração do gel de separação (running gel). As placas eram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque (Bio Rad, CA, USA) a 30% e N-N-metileno-bisacrilamida estoque (Bio Rad, CA, USA) a 0,8%, ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore - Water Corporation, MA, USA), filtradas em papel de filtro (Whatman número 1) e mantidas a 4°C em frasco âmbar. As eletroforeses SDS-PAGE foram realizadas em sistema SE 400 (16x14 cm) da Hoefer (CA, USA). A eletroforese ocorria utilizando-se tampão de corrida (Tris-HCL 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1%, sendo o pH desta solução não acertado). A voltagem utilizada compreendia 90V e 200V (SE-400) para o gel de empacotamento e gel de corrida, respectivamente. O gel do sistema de placas foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v) durante três horas. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v). Para a realização do "Western Blot", o gel não foi corado, passando diretamente para o procedimento de transferência para a membrana de nitrocelulose.

**Western Blot.** A técnica de Western Blot permite que proteínas, separadas em gel de poliacrilamida, possam ser transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose ou PVDF. As bandas transferidas são passíveis de análise por autoradiografia, imunodetecção e eluídas para análise de aminoácidos ou seqüência da cadeia polipeptídica (LEGENDRE, MATSUDAIRA, 1988). O tampão de transferência foi preparado com 2,2g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900ml de água, com pH 11 acertado com NaOH 2N, e o volume final completado a 1 mL com 100mL de metanol. O gel foi colocado sobre a membrana em suporte plástico e a transferência ocorria a 400mA por 60 min a 15°C em sistema refrigerado da série TE (Hoefer,CA,USA). Para a imunodetecção, a membrana foi bloqueada com tampão (pH 7,6) Tris HCL 0,02M, NaCl 0,15M, Twen 0,05% (TBST), contendo 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas em agitação suave e, em seguida, lavada 3 vezes com TBST (10 min cada lavagem) e incubada "overnight" com anticorpo policlonal contra HSP70 (SPA-810, StressGen, Canadá), diluição 1:1000 em TBST. Em seguida, lavávamos a membrana 3 vezes com TBST, por 10 min cada lavagem. Como segundo anticorpo, foi utilizado um anticorpo "anti-rabbit" conjugado com peroxidase (Bio Rad, CA, USA) diluído 1:2000 no tampão TBST, deixando-se incubar por 6 horas, seguido por 3 lavagens de 10 min com TBST. Para a revelação, diluímos 50mg do substrato 3-3' diaminobenzidina em 50 ml de tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,9%, pH 7,4, e adicionamos 1mL de peróxido de hidrogênio 30%. Esta solução foi colocada

em contato com a membrana até a definição visual da banda protéica em estudo. A reação de revelação foi interrompida com a lavagem da membrana por H<sub>2</sub>O destilada.

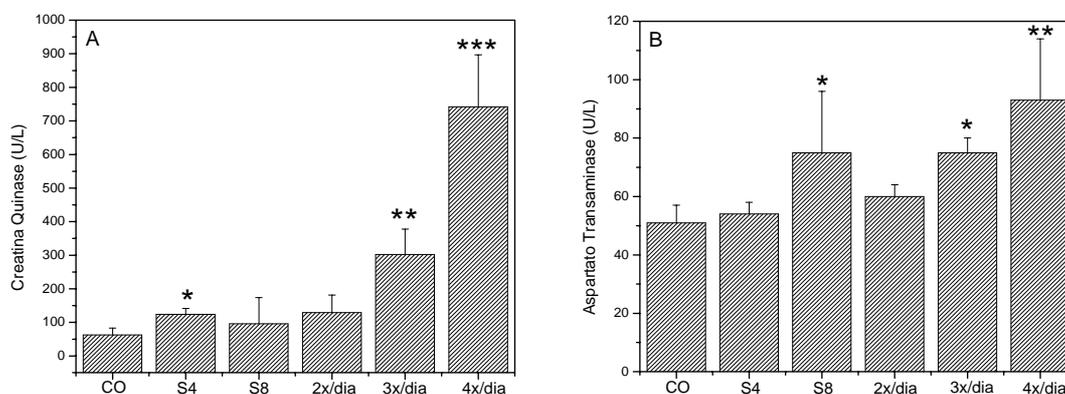
**Análises Densitométricas.** Análises densitométricas foram realizadas para quantificação das HSPs, utilizando-se o Sharp-Scanner para aquisição de imagem e o programa "Image Master 1D Elite" (Amershan Pharmacia, Uppsala, Suécia) para análise e processamento dos dados.

**Análises Estatísticas.** As análises estatísticas foram feitas através do programa GraphPad InStat® (San Diego, CA). Utilizamos o teste ANOVA para amostras pareadas e, como pós-teste, foi adotado o teste de Tukey. Valores de  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

## Resultados

### Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Biomarcadores de Alteração Muscular

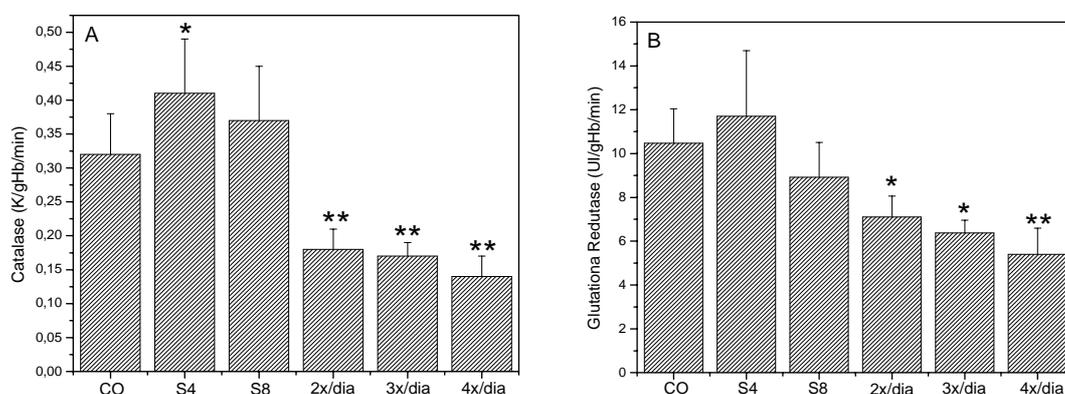
A **figura 1-A** mostra que a liberação da enzima creatina quinase no plasma acompanha o aumento da carga de treinamento, uma vez que obtivemos elevações significativas em S4 ( $p < 0.05$ ), 3x/dia ( $p < 0.01$ ) e 4x/dia ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo CO. Os valores de liberação de aspartato transaminase (**figura 1-B**) também mostraram elevados em S8 e 3x/dia ( $p < 0.05$ ) e em 4x/dia ( $p < 0.01$ ).



**Figura 1** - Concentração plasmática das enzimas creatina quinase (U/L) – A e aspartato transaminase (U/L) – B dos ratos submetidos a protocolo de treinamento contínuo por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida. Dados representados em média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 8$ ). Onde: A= $*p < 0.05$  CO vs. S4;  $**p < 0.01$  em relação a CO, S4, S8 e 2x/dia;  $***p < 0.001$  em relação a todas as análises. B= $*p < 0.05$  em relação a todas as análises;  $**p < 0.01$  em relação a todas as análises.

### Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Marcadores de Defesa Enzimática Antioxidante

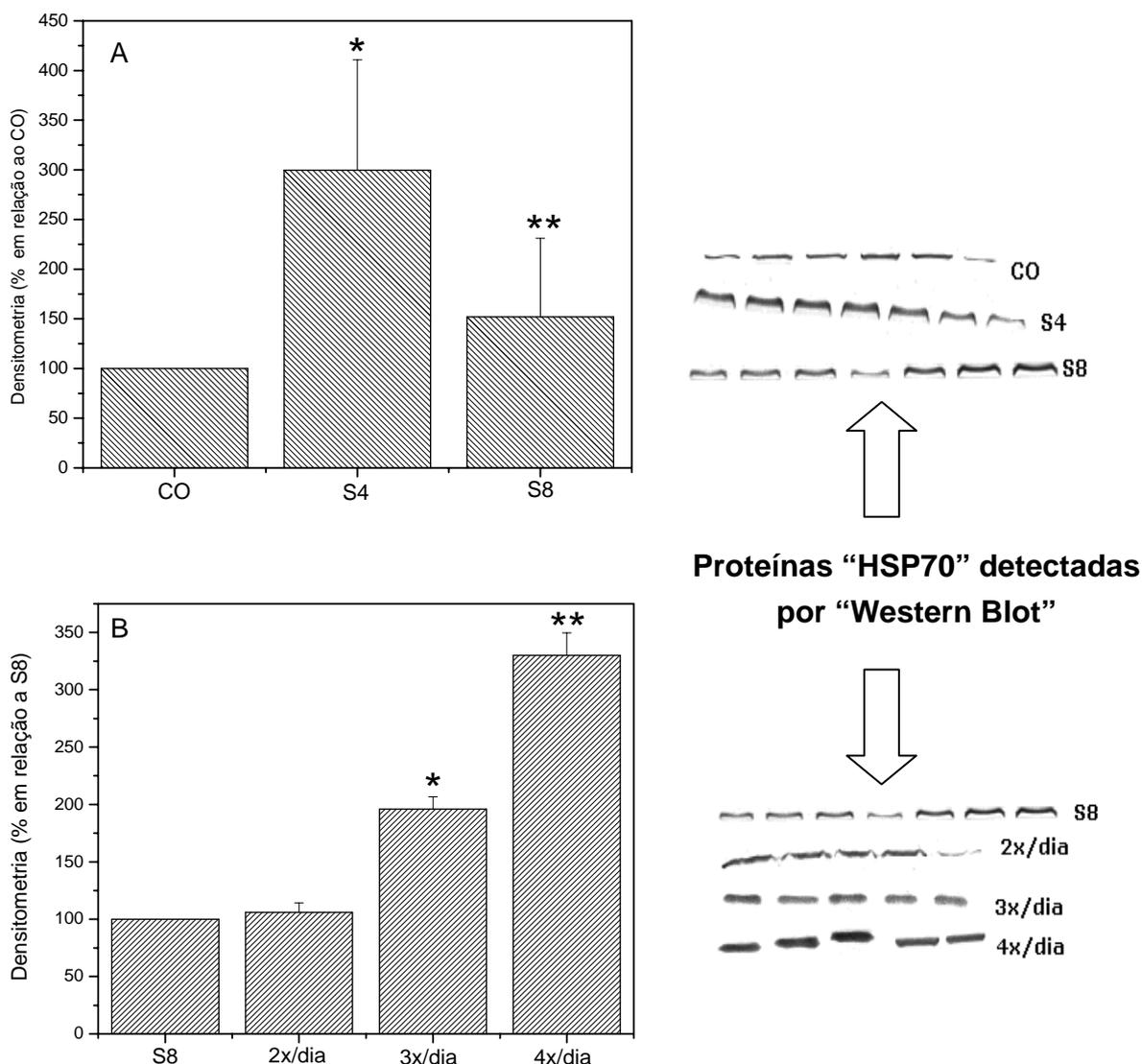
A figura 2-A apresenta a atividade da enzima antioxidante catalase. Note que, com o aumento da carga, em S4, há elevação significativa da atividade enzimática ( $p < 0.01$ ), tal como uma estratégia de adaptação. O mesmo quadro é observado para a enzima antioxidante glutatona redutase (**figura 2-B**) no mesmo período de treinamento. Com a proposta de indução de “overtraining”, os níveis enzimáticos sofrem queda drástica para as duas enzimas, com decréscimos significativos para catalase em 2x/dia, 3x/dia e 4x/dia ( $p < 0.01$ ) e para glutatona redutase em 2x/dia e 3x/dia ( $p < 0.01$ ) e 4x/dia ( $p < 0.001$ ). Os dados de significância foram calculados em relação ao grupo CO, mas, tal como para todos os parâmetros estudados, as diferenças percentuais vistas para cada momento tornam-se evidentes com o incremento da carga de treinamento.



**Figura 2** - Atividade em hemolisado das enzimas catalase – A (k/gHb/min) e glutatona redutase – B (U/gHb/min) dos ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento na frequência diária de corrida. Dados representados em média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 8$ ). Onde: A= \* $p < 0.01$  S4 vs. CO; \*\* $p < 0.001$  em relação às demais análises. B= \* $p < 0.01$  em relação a CO, S4 e S8; \*\* $p < 0.001$  em relação a CO, S4 e S8.

### Efeito do Treinamento Intermitente Sobre os Níveis da Proteína de Estresse “HSP70”

Os níveis de detecção da proteína de estresse “HSP70” sofreram alterações significativas ao longo do desenvolvimento do protocolo. A **figura 3-A** mostra que, com o aumento da carga de corrida, em S4, há elevação significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo CO, com um decréscimo em S8, porém mantendo-se ainda mais elevado do que os valores de referência controle ( $p < 0.01$ ). Com o aumento progressivo nas sessões diárias e no volume de corrida (**figura 3-B**), notamos que houve grande expressão de HSP70, sobretudo nos momentos 3x/dia e 4x/dia ( $p < 0.001$ ).

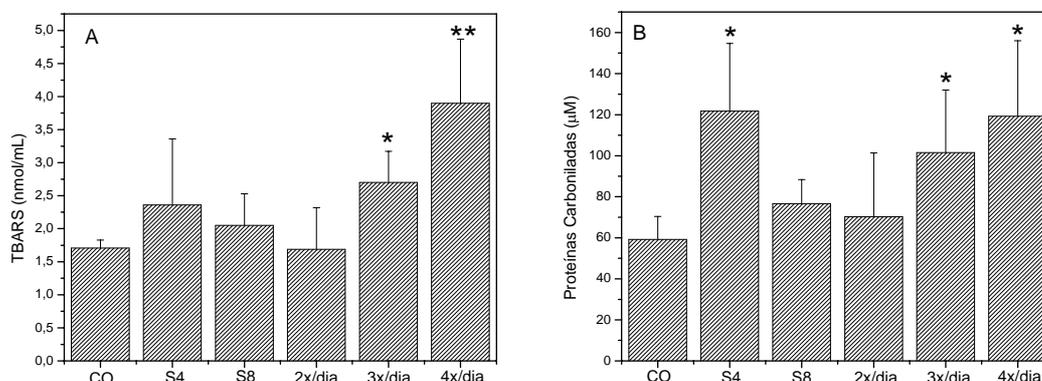


**Figura 3.** Níveis percentuais e imagens de "western blot" das proteínas de estresse "HSP70" em leucócitos totais de ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas (A) e ao aumento na frequência diária de corrida (B). Onde: A= \* $p < 0.001$  CO vs. S4; \*\* $p < 0.01$  CO vs. S8; B= \* $p < 0.01$  S8 vs. 2x/dia e 3x/dia; \*\* $p < 0.001$  CO em relação às demais análises. **Nota:** A análise S8 foi escolhida como padrão de comparação das sessões de "overreaching" pelo fato de representar níveis de proteínas de animais adaptados ao treinamento.

### Efeito do Treinamento Intermitente Sobre Marcadores de Ataque Oxidativo

A **figura 4-A** apresenta níveis de peroxidação lipídica através do método de dosagem de TBARS. Observa-se um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) em 2x/dia em relação ao grupo CO, com pico máximo ( $p < 0.001$ ) no momento de maior

carga de corrida (4x/dia). Os valores para carbonilação de proteínas são vistos na **figura 4-B**. Note que houve uma mesma tendência de aumento tal como para TBARS. Valores significativos ( $p < 0.01$ ) são notados nos momentos S4, 3x/dia e 4x/dia. Uma queda nos índices de oxidação protéica ocorreu em S8 ( $p < 0.05$ ), talvez em virtude da adaptação ao protocolo de treinamento.



**Figura 4.** Concentração plasmática de TBARS - A (nmol/mL) e proteínas carboniladas - B ( $\mu\text{M}$ ) em ratos submetidos a protocolo de treinamento intermitente por 8 semanas e ao aumento da frequência diária do exercício. Dados representados em média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 8$ ). Onde: A= \* $p < 0.05$  S4 vs.CO; \*\* $p < 0.001$  4x/dia vs CO, S4, S8, 2x/dia. B= \* $p < 0.01$  em relação às demais análises.

## Discussão

Torna-se interessante iniciarmos pelas análises de alterações musculares (CK e AST – Figura 1), para chegarmos à compreensão dos eventos de estresse oxidativo e “overreaching”. Houve uma tendência de aumento na concentração plasmática de CK na análise da quarta semana de treinamento, refletindo a elevação progressiva da sobrecarga. Contudo, a estabilização da sobrecarga induziu manifestou queda no valor médio para próximo do obtido para o grupo CO. A análise da concentração de AST também demonstrou que tal enzima possui liberação tardia no plasma em situação de treinamento IT, sendo que o pico obtido foi visto no momento da análise da oitava semana (S8). Podemos considerar que as alterações nas estruturas musculares surgidas são em decorrência do aumento no volume e intensidade do exercício.

Sendo assim, quando os animais foram submetidos a uma estrutura mais severa de treinamento, com incremento de sessões de corrida no mesmo dia e, desta forma, redução no tempo de recuperação, houve novamente uma grande elevação na concentração plasmática de CK, nas análises 3x/dia e 4x/dia, e de AST, sobretudo na análise 4x/dia. Esses aumentos suplantaram aqueles obtidos nas análises da quarta semana (para CK) e oitava semana (para AST). Smith (2000) considera a hipótese de que a presença constante de microlesões no sistema músculo-esquelético e sua persistência podem ser um indicio da instalação da síndrome do “overtraining”.

A detecção da síndrome do “overtraining” é uma tarefa difícil e complexa, dependente da análise de multi-fatores, sejam da ordem bioquímica, fisiológica ou comportamental. Porém, poucos são os estudos na literatura que se utilizam de protocolos intermitentes. Mas parece existir um consenso de que exercícios realizados em alta intensidade (com predomínio do metabolismo anaeróbico) e intercalados por pausas curtas (com predomínio do metabolismo aeróbico) possam simular um quadro de isquemia-reperfusão (anoxia-reoxigenação), o qual é conhecido como grande gerador de EROs (SJÖDIN et al., 1990; ANTUNES NETO et al., 2006). Smolka e colaboradores (2000), neste direcionamento, com dados obtidos em nosso laboratório, sugerem que animais treinados por protocolo intermitente podem ser mais vulneráveis a uma situação de estresse oxidativo em comparação a animais submetidos a treinamento contínuo. Apesar desta maior tendência relatada de o treinamento intermitente instalar um quadro de estresse oxidativo, Hellsten e equipe (1996) demonstraram, através de treinamento intermitente de ciclismo em humanos, que é possível a indução da elevação da capacidade anaeróbia de geração de energia e, sobretudo, aumentar os níveis de proteção enzimática antioxidante muscular. Vale novamente ressaltarmos que há a necessidade de levarmos em conta as diferenças entre os protocolos e os sujeitos de cada estudo.

Nossos resultados mostraram que o treinamento IT induziu uma discreta elevação na atividade da CAT na quarta semana de treinamento, mantendo-se ainda elevada, em relação ao grupo CO, na análise S8. Com o aumento no número de sessões de treino, tanto CAT quanto GR (Figura 2) sofreram quedas consideráveis de atividade, sendo que os grupos analisados tornaram-se muito homogêneos. Isso reflete que houve uma influência latente e abrangente a todos os animais dos níveis de estresse oxidativo alcançados nessa fase severa do treinamento, impedindo uma resposta adaptativa satisfatória. Esses resultados novamente corroboram com a premissa de que a modulação das enzimas antioxidantes é um evento dependente da concentração e do tempo de exposição celular frente às EROs (JI et al., 1990; POWERS et al., 1994). O que nos fica claro, portanto, é que há um limiar adaptativo ótimo para a ocorrência de alterações favoráveis no sistema antioxidante, pois o estímulo primário para tal ocorrência é um aumento na produção de EROs. Se esse aumento ultrapassar um nível satisfatório, o sistema entra em desbalanço e há a instalação de uma situação de estresse oxidativo. Um estudo de Barclay e Hansel (1991) afirma que a presença de EROs acelera fadiga muscular durante atividades que alternam alta intensidade de exercícios e pausas recuperativas. Ao longo do tempo, podemos especular que o efeito acumulativo dessas EROs pode vir a gerar uma impossibilidade de recuperação do organismo e interferir na condição adaptativa do sistema enzimático antioxidante.

Fechando a análise do sistema de defesa antioxidante, observamos que o comportamento da expressão de HSP70 (Figura 3). Em termos de quantificação pela análise densitométrica, o aumento médio em expressão na quarta semana de treinamento foi extremamente significativo ( $p < 0.001$ ). Deve ser ressaltado que os níveis de atividade das enzimas antioxidantes, na quarta semana de treinamento, não sofreram aumentos tão significativos em

comparação ao grupo CO. Esses resultados novamente sugerem que as HSPs estariam atuando como um sistema protetor auxiliar ou secundário das proteínas celulares danificadas oxidativamente. Os resultados da análise da oitava semana sugerem que há uma resposta adaptativa na expressão das HSP70, mediada pela atenuação dos níveis de ataque oxidativo e na estabilização da sobrecarga de treinamento. Nesse caso vale novamente pontuar os pressupostos de Ryan e colaboradores (1991) e Antunes Neto e colaboradores (2006), os quais sugerem que a quantidade de HSP70 sintetizada parece ser dependente da severidade do estresse submetido ao organismo e do nível celular de HSPs existente anteriormente à condição de estresse. Esta resposta adaptativa, vista na análise da oitava semana, enquadra-se no conceito primário da literatura de “termo-tolerância adquirida” (GERNER, SCHENEIDER, 1975), o qual supõe que a síntese de HSPs torna-se reduzida quando as mesmas são expostas a um segundo estresse térmico.

O conceito de “termo-tolerância adquirida” também pode ser observado na análise 2x/dia (Figura 3-B). Nota-se que, quando comparamos essa análise com a do grupo de animais adaptados (grupo S8, o qual classificamos nesta análise como grupo CO, pois apenas haverá “overreaching” em organismos que passaram por uma estrutura de treinamento), não há alteração nos níveis expressos de HSPs. Isso significa que organismos adaptados a certas condições de exposição ao estresse desenvolvem estratégias de resistência a uma segunda exposição até mais severa. Porém, com o aumento na frequência de corrida diária, nas análises 3x/dia e 4x/dia, houve uma resposta diretamente proporcional entre sobrecarga e expressão de HSPs. Os aumentos crescentes dos índices de ataque oxidativo com os decréscimos evidentes de atividade das enzimas antioxidantes geraram uma condição de estresse oxidativo que colaborou para uma maior expressão de HSPs.

Contudo, em situações severas de estresse, torna-se difícil compreender a exata função das HSPs. O dilema é compreender o seguinte paradoxo: a elevação exacerbada da síntese de HSPs representa que a célula é capaz de defender-se dos altos níveis de estresse por meio de seu aparato de síntese nuclear ou que a super expressão de HSPs indica que está havendo uma danificação tão drástica de proteínas a ponto de gerar um quadro de difícil reversibilidade das respostas induzidas pelo estresse? Samali e Orrenius (1998) indicaram que o acúmulo de proteínas danificadas pode não somente sinalizar a indução de HSPs, mas também iniciar um programa de auto-destruição celular, conhecido como apoptose. A apoptose é um processo inato e evolutivo pelo qual as células, sistematicamente, inativam seus componentes estruturais e funcionais. Ocorre normalmente durante o desenvolvimento dos organismos multicelulares através de um programa regulado geneticamente ou durante alterações do sistema imunológico. Condições de estresse como calor, radiação, hipóxia, oxidantes e exposição a metais pesados podem induzir o programa apoptótico (EDWARDS, 1998; SAMALI, ORRENIUS, 1998; RAHA, ROBINSON, 2001). No caso do nosso protocolo, os marcadores de estresse oxidativo indicaram que houve uma progressão drástica das alterações celulares, podendo ser entendido que a expressão elevada das HSPs foi um dispositivo a mais da célula em “denunciar” os níveis abruptos de estresse aos

quais ela estava sendo submetida.

Já colocamos que houve um aumento nos níveis de ataque oxidativo no momento do treinamento severo. Tanto as análises de PC quanto às de TBARS (Figura 4) sofreram uma elevação progressiva, em comparação ao grupo de animais treinados (S8), nessa fase do treinamento. O acréscimo em sobrecarga de exercícios induziu um aumento na produção de EROs, o que resultou em dificuldade de modulação do sistema enzimático antioxidante, com uma efetiva queda de atividade das enzimas CAT e GR, e no aumento de oxidações das estruturas lipídicas e protéicas. Analisando os resultados obtidos no momento 4x/dia, podemos sugerir que houve a instalação de um quadro de estresse oxidativo.

Outro momento onde detectamos elevação na concentração plasmática de TBARS e, sobretudo, de PC foi na análise da quarta semana. Essa condição deve-se ao fato do aumento progressivo de intensidade, duração e frequência de corrida: houve uma modulação positiva das enzimas antioxidantes estudadas, o que não chega a refletir, portanto, uma situação de estresse oxidativo. Valores de TBARS muito próximos daqueles obtidos pelo grupo CO e uma sensível queda na concentração plasmática de PC foram vistos na oitava semana, sugerindo que os animais treinados estavam respondendo de forma positiva aos estímulos do protocolo.

Concluindo, podemos inferir que o protocolo IT foi satisfatório, até a análise da oitava semana, para induzir adaptações positivas na capacidade antioxidante. A continuidade de um treinamento com tais exigências pode ser um agravante, pois a característica metabólica de isquemia-reperfusão gerada nessa condição de exercício tende a induzir uma maior produção de EROs. Isso pode conduzir a uma situação mais pronunciada de estresse oxidativo e alterações musculares graves, de difícil recuperação.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisas de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa.

#### Referências Bibliográficas

ADKISON, D.; HÖLLWARTH, M. E.; BENOIT, J. N. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 126, p. 101-107, 1986.

AEBI, H. Catalase. In: *Methods in Enzymology*. Packer, L (editor). Florida: Academic Press, v. 105, p. 121-126, 1984.

ANTUNES NETO, J. M F.; TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, 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*, v. 9, p. 107–115, 2006.

BARCLAY, J. K.; HANSEL, M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 69, p. 279-284, 1991.

BEUTLER, E. Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods*. London: Grune & Stratton Publishers, 1975.

BIENZ, M.; PELHAM, H. R. B. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Advances in Genetics*, v. 24, p. 31-72, 1987.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUIN, G.; KUIPERS, H.; KEIZER, H. A.; VANDERVUSSE, G. J. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. *Journal of Applied Physiology*, v. 76, p. 1908-1913, 1994.

CRAIG, E. A. The heat shock response. *Critical Reviews in Biochemistry*, v. 18, p. 239-280, 1985.

EDWARDS, M. J. Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links? *Cell Stress & Chaperones*, v. 03, p. 213-220, 1998.

GERNER, E. W.; SCHENEIDER, M. J. Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature*, v. 256, p. 500-502, 1975.

GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. *Nature*, v. 355, p. 33-45, 1992.

GRANGER, D. N.; HÖLLWARTH, M. E.; PARKS, D. A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 126, p. 47-63, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HELLSTEN, Y.; AHLBORG, G.; JENSEN-URSTAD, M. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise in man. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 137, p. 341-345, 1988.

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*, v. 157, p. 191-197, 1996.

HERNANDO, R.; MANSO, R. Muscle fiber stress in response to exercise. *European Journal of Biochemistry*, v. 243, p. 460-467, 1997.

JENKINS, R. R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 25, p. 210-212, 1993.

JI, L. L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *American Journal of Physiology*, v. 258, p. R918-R923, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAFOND, J. L.; PAURE, P. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier and editors. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Berlin, 1995.

LEGENDRE, N.; MATSUIDAIRA, P. Direct protein microsequence from imobilon-P transfer membrane. *Biotechniques*, v. 6, p. 1154-1159, 1988.

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

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, v. 259, p. 1409-1410, 1993.

NEUPERT, W.; HARTL, F. U.; CRAIG, E. A. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell*, v. 63, p. 447-450, 1990.

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L. L.; MARTIN, D.; HERB, R. A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, v. 266, p. R-375-R380, 1994.

RAHA, S.; ROBINSON, B. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American Journal of Medical Genetics*, v. 106, p. 62-70, 2001.

REID, M. B. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News of Physiology and Science*, v. 11, p. 114-119, 1996.

RYAN, A. J.; GISOLFI, C. V.; MOSELEY, P. L. Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. *Journal of Applied Physiology*, v. 70, p. 466-471, 1991.

SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress & Chaperones*, v. 3, p. 228-236, 1998.

SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins: the search for functions. *Journal Cell Biology*, v. 103, p. 321-325, 1986.

SJÖDIN, B.; WESLING, H.; APPLE, S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine*, v. 10, p. 236-254, 1990.

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*, v. 175, p. 408-413, 1988.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 32, p. 317-331, 2000.

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*, v. 279, p. R1539-R1545, 2000.

STUART, R. A.; CYR, D. M.; NEUPERT, W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experimentia*, v. 50, p. 1002-1011, 1994.

TERLECKY, S. R. Hsp70s and lysosomal proteolysis. *Experimentia*, v. 50, p. 1021-1025, 1994.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 76, p. 533-538, 1998.

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

WELCH, W. J. How cells respond to stress. *Scientific American*, v. 268, p. 34-41, 1993.

YAGI, K. A. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemistry and Medicine*, v. 15, p. 212-216, 1976.

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