

TCC/UNICAMP
M738d
2393 FEF/893

AGNES MARGARETHE MOLNAR



“DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUCCINATO DESIDROGENASE EM ANIMAIS TREINADOS E NÃO TREINADOS. ANÁLISE DA POSSÍVEL CORRELAÇÃO DESTA ATIVIDADE COM A OCORRÊNCIA DE STRESS OXIDATIVO PARA OS ANIMAIS”

“DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUCCINATO DESIDROGENASE EM ANIMAIS TREINADOS E NÃO TREINADOS. ANÁLISE DA POSSÍVEL CORRELAÇÃO DESTA ATIVIDADE COM A OCORRÊNCIA DE STRESS OXIDATIVO PARA OS ANIMAIS”

Monografia apresentada como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciência do Esporte pela Universidade Estadual de Campinas, sob orientação da professora doutora Denise Vaz de Macedo e co-orientação da professora doutora Lúcia Pereira da Silva.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
1995

AGNES MARGARETHE MOLNAR

TCC/UNICAMP
M738d



1290002393

PROJ. 00, 11
PRCO. 00, 11
DATA
N.º CPD 52138

**“DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUCCINATO DESIDROGENASE
EM ANIMAIS TREINADOS E NÃO TREINADOS. ANÁLISE DA POSSÍVEL
CORRELAÇÃO DESTA ATIVIDADE COM A OCORRÊNCIA DE STRESS
OXIDATIVO PARA OS ANIMAIS”**

Dedico este trabalho aos meus Pais

pelo incentivo e apoio
Aos meus irmãos
Armindo
cooperando
minha irmã
Bia e
compreendendo
ajuda.

Monografia apresentada como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciência do Esporte pela Universidade Estadual de Campinas, sob orientação da professora doutora Denise Vaz de Macedo e co-orientação da professora doutora Lúcia Pereira da Silva.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
1995

*Dedico este trabalho aos meus Pais
pelo incentivo e o apoio,
Aos meus colegas, Cláudio, Soraya,
Armindo, Guilherme e Daniel pela
cooperação e em especial para
minha irmã Eva e para as amigas
Bia e Andréa pelo estímulo,
compreensão e principalmente pela
ajuda. Des a respeito do trabalho.*

*Essa convivência possibilitou um
grande aprendizado e me
mostrou o quão importante e
gratificante é a ciência.
Obrigada.*

RESUMO

Nesta pesquisa foi determinada a atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de ratos submetidos a um treinamento físico. Sabe-se que a atividade desta e de outras enzimas é alterada uma vez que o exercício físico induz adaptações bioquímicas extremamente importantes para o organismo, entre elas o aumento da atividade das enzimas do ciclo de Krebs.

Foram padronizadas algumas técnicas laboratoriais não rotineiras como o isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético e a determinação da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias intactas. O método de treinamento utilizado teve como modelo o de Negrão (1985), com algumas variações.

Na determinação da atividade enzimática da succinato desidrogenase em mitocôndrias de isolado de fígado de rato a velocidade da reação variou conforme esperado em função da concentração do substrato, além de ocorrer inibição quando na presença de malonato o que indica a especificidade da reação medida.

Após um período de treinamento onde a intensidade do esforço foi sendo aumentada gradativamente, observou-se que a atividade da enzima tanto em mitocôndrias isoladas de fígado de rato quanto em mitocôndrias de músculo esquelético de animais treinados e animais não treinados aumentou. Isso comprova a especificidade da adaptação que o exercício físico induz ao ciclo de Krebs a natureza do treinamento. A superoxidação foi medida somente em mitocôndrias de músculo esquelético de animais treinados e o seu valor foi nulo, reforçando a teoria de que exercícios aeróbicos não provocam a formação de radicais livres.

A realização e o êxito deste trabalho foi possível graças a ajuda e sabedoria de minha orientadora Denise Vaz de Macedo, que apesar da distância esteve sempre disponível esclarecendo e sugerindo questões a respeito do trabalho. Essa convivência possibilitou um grande aprendizado e me mostrou o quão importante e gratificante é a ciência. Obrigada.

RESUMO

SUMÁRIO:

Nesta pesquisa foi determinada a atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de ratos submetidos a um treinamento físico. Sabe-se que a atividade desta e de outras enzimas é alterada uma vez que o exercício físico induz adaptações bioquímicas extremamente importantes para o organismo, entre elas o aumento da atividade das enzimas do ciclo de Krebs.

Inicialmente foram padronizadas algumas técnicas laboratoriais não rotineiras como o isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético e a determinação da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias intactas. O método de treinamento utilizado teve como modelo o de Negrão (1985), com algumas variações.

Na determinação da atividade enzimática da succinato desidrogenase em mitocôndrias de isoladas fígado de rato a velocidade da reação variou conforme esperado em função da concentração do substrato, além de ocorrer inibição quando na presença de malonato o que indica a especificidade da reação medida. Após um treinamento de dois meses, onde a intensidade do esforço foi sendo aumentada gradativamente, determinou-se a atividade da enzima tanto em mitocôndrias isoladas de fígado como em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de animais treinados e animais não treinados. Observou-se então um aumento na atividade desta enzima em ratos submetidos ao treinamento físico, o que comprova a especificidade da adaptação que o exercício estimula e sendo esta enzima participante do ciclo de Krebs a natureza do treinamento seria aeróbico.

A lipoperoxidação foi medida somente em mitocôndrias de músculo esquelético de animais treinados e o seu valor foi nulo, reforçando a teoria de que exercícios aeróbicos não provocariam a formação de radicais livres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO

SUMÁRIO:

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTO	III
RESUMO	IV
INTRODUÇÃO	01
I- Atividade física e fornecimento de ATP	03
II- Oxidações biológicas: fonte de radicais livres de oxigênio	08
III- Adaptações bioquímicas induzidas pelo exercício	10
IV- O exercício físico e o stress oxidativo	12
V- Materiais e Métodos:	
Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	14
Padronização do isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético	14
Determinação do consumo de oxigênio	16
Padronização da atividade da enzima succinato desidrogenase	18
Padronização do método de treinamento	22
Avaliação do grau de peroxidação lipídica	23
RESULTADOS	25
CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

Figura 1. Processos biológicos que utilizam a energia do ATP, sintetizado por oxidação de nutrientes.

INTRODUÇÃO

O metabolismo energético dos seres vivos pode ser dividido esquematicamente em dois blocos: um que produz energia, através das reações do catabolismo e outro que utiliza esta energia formada (anabolismo) para a realização de trabalho mecânico como de contração muscular, osmótico, manutenção de gradientes iônicos e também de biossínteses. Assim a energia utilizada nas diversas formas de trabalho provém da transferência do bloco catabólico para o utilizador de energia, onde o primeiro produz ATP (pela fosforilação da molécula de ADP por fosfato inorgânico - Pi) e transfere essa energia pela quebra da molécula de ATP em ADP e Pi (figura 1). Desta forma a transferência de energia é regulada principalmente pela razão ADP/ATP celular.

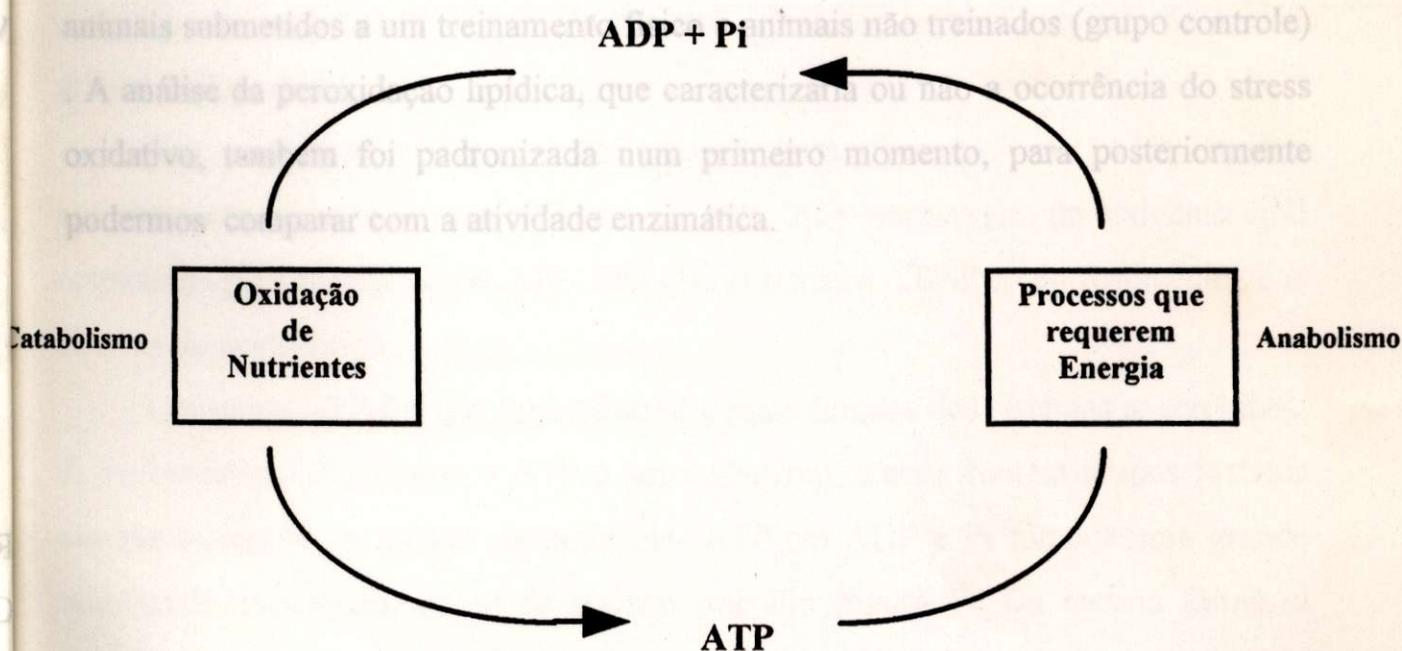


Figura 1. Processos biológicos que utilizam a energia do ATP, sintetizado por oxidação de nutrientes.

A partir disso lembramos que a atividade física faz parte destes processos que requerem energia (independentemente da intensidade e/ou da duração), recrutando assim os diferenciados metabolismos para o fornecimento de energia, podendo estes sofrerem adaptações provenientes de um treinamento físico.

Nesse trabalho nosso objetivo foi determinar o aumento na atividade da enzima do ciclo de Krebs - succinato desidrogenase (que sabidamente têm sua atividade afetada após um treinamento) ao longo de um treinamento de corrida feito segundo Negrão (1985, pg. 51). Como a determinação desta atividade enzimática não era ainda empregada em nosso laboratório como técnica rotineira, a primeira etapa do projeto foi justamente a padronização destas técnicas para as mitocôndrias isoladas intactas. Além disso, o isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético também teve de ser padronizado. Paralelo a isso pretendíamos analisar a possível correlação desta atividade enzimática com a ocorrência de stress oxidativo nos respectivos animais submetidos a um treinamento físico e animais não treinados (grupo controle). A análise da peroxidação lipídica, que caracterizaria ou não a ocorrência do stress oxidativo, também foi padronizada num primeiro momento, para posteriormente podermos comparar com a atividade enzimática.

São eles o sistema ATP-PC (do fosfagênio) e o sistema do ácido lático.

O sistema ATP-PC (do fosfagênio) é o mais simples dos sistemas anaeróbicos. A fosfocreatina (PC), como o ATP é um fosfagênio, ambos contém grupos fosfatos em sua formação. A quebra da molécula ATP em ADP e Pi fornece uma grande quantidade de energia, capaz de realizar trabalho (figura 1). Da mesma forma, a quebra da molécula de PC em fosfato inorgânico (Pi) e creatina fornece energia suficiente para produzir ATP (figura 2).

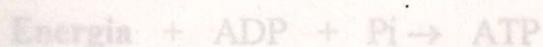


Figura 2 - Sistema ATP-PC ou do fosfagênio (esquema simplificado do sistema, segundo Fox, 1991)

A partir disso lembramos que a atividade física faz parte destes processos que requerem energia (independentemente da intensidade e/ou da duração), recrutando assim os diferenciados metabolismos para o fornecimento de energia, podendo estes sofrerem adaptações provenientes de um treinamento físico.

Nesse trabalho nosso objetivo foi determinar o aumento na atividade da enzima do ciclo de Krebs - succinato desidrogenase (que sabidamente têm sua atividade afetada após um treinamento) ao longo de um treinamento de corrida feito segundo Negrão (1985, pg. 51). Como a determinação desta atividade enzimática não era ainda empregada em nosso laboratório como técnica rotineira, a primeira etapa do projeto foi justamente a padronização destas técnicas para as mitocôndrias isoladas intactas. Além disso, o isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético também teve de ser padronizado. Paralelo a isso pretendíamos analisar a possível correlação desta atividade enzimática com a ocorrência de stress oxidativo nos respectivos animais submetidos a um treinamento físico e animais não treinados (grupo controle). A análise da peroxidação lipídica, que caracterizaria ou não a ocorrência do stress oxidativo, também foi padronizada num primeiro momento, para posteriormente podermos comparar com a atividade enzimática.

São eles o sistema ATP-PC (do fosfagênio) e o sistema do ácido láctico.

O sistema ATP-PC (do fosfagênio) é o mais simples dos sistemas anaeróbicos. A fosfocreatina (PC), como o ATP é um fosfagênio, ambos contém grupos fosfatos em sua formação. A quebra da molécula ATP em ADP e Pi fornece uma grande quantidade de energia, capaz de realizar trabalho (figura 1). Da mesma forma, a quebra da molécula de PC em fosfato inorgânico (Pi) e creatina fornece energia suficiente para produzir ATP (figura 2).

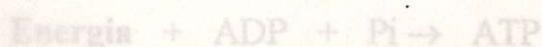


Figura 2 - Sistema ATP-PC ou do fosfagênio (esquema simplificado do sistema, segundo Fox, 1991)

CAPÍTULO I

ATIVIDADE FÍSICA E FORNECIMENTO DE ATP

O fornecimento de ATP para as células musculares depende da intensidade e da duração da atividade realizada e pode ocorrer de duas formas: aeróbica e anaerobicamente. Existem três processos comuns produtores de energia para a formação do ATP:

* sistema ATP-PC, ou do fosfagênio, onde a ressíntese do ATP provém da fosfocreatina;

* glicólise anaeróbica, também denominado de sistema do ácido láctico, onde a quebra da glicose ou do glicogênio proporciona a formação de ATP, além de também produzir ácido láctico no final do processo;

* sistema do oxigênio, também denominado de metabolismo aeróbico, onde o ATP pode ser formado através da oxidação total dos carboidratos ou de ácidos graxos a CO_2 e H_2O .

Dos sistemas produtores de energia para formação de ATP citados anteriormente, dois são *anaeróbicos*; ou seja, não necessitam do oxigênio que respiramos para ressíntese de ATP. São eles o sistema ATP-PC (do fosfagênio) e o sistema do ácido láctico.

O sistema ATP-PC (do fosfagênio) é o mais simples dos sistemas anaeróbicos. A fosfocreatina (PC), como o ATP é um fosfagênio, ambos contém grupos fosfatos em sua formação. A quebra da molécula ATP em ADP e P_i fornece uma grande quantidade de energia, capaz de realizar trabalho (figura 1). Da mesma forma, a quebra da molécula de PC em fosfato inorgânico (P_i) e creatina fornece energia suficiente para produzir ATP (figura 2).

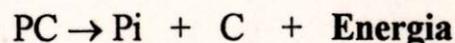


Figura 2 - Sistema ATP-PC ou do fosfagênio (esquema simplificado do sistema, segundo Fox, 1991)

A energia obtida nesse tipo de sistema é suficiente apenas para atividades de alta intensidade e curta duração (até 30 segundos), ou então no início de alguma atividade antes de serem requisitados os outros sistemas. Para restaurar as fontes energéticas de fosfocreatina nas células musculares é necessária a ressíntese de Pi e C, que poderá ocorrer somente através da energia de quebra do ATP na fase de recuperação após o exercício.

O outro sistema de produção de ATP na ausência de O_2 é a *glicólise anaeróbica*. Como no nosso organismo os carboidratos são transformados em glicose, que pode também ser armazenada como glicogênio; o nome glicólise vem do glico = glicose e lise = quebra. Esse sistema envolve a quebra incompleta (a quebra completa acontece no metabolismo aeróbico) de uma molécula de glicose (6C) em duas moléculas de ácido láctico (3C) com a produção de dois a três moles de ATP.

Esse metabolismo é encarregado de suprir necessidades energéticas durante cerca de 1 a 3 minutos de exercício físico, sem a necessidade de oxigênio (por isso o nome anaeróbica). O fato desse metabolismo não ser utilizado por tempos prolongados é o acúmulo de ácido láctico (sendo que o sangue e o músculo conseguem tolerar apenas cerca de 60 a 70g de ácido láctico, após essa quantidade o músculo começa entrar em fadiga). Além disso, o acúmulo de ácido láctico leva a um abaixamento do pH intracelular, que pode ocasionar a inibição de enzimas da glicólise, paralisando o processo de produção de energia.

O terceiro processo produtor de energia para a formação de ATP é o metabolismo aeróbico. Esse sistema é o principal responsável pelo fornecimento de energia para ressíntese de ATP no nosso organismo. Enquanto que os processos anaeróbicos de produção de energia ocorrem no citossol, os processos aeróbicos (ciclo de Krebs, sistema de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa) ocorrem dentro de organelas chamadas *mitocôndrias*.

A utilização desse sistema depende da presença do oxigênio, pois é assim que 1 mol de glicose será transformado em dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) liberando energia suficiente para ressíntese de 38 moles de ATP.

A *glicólise* apesar de parecer um sistema essencialmente anaeróbico, pode também ser utilizada na presença de oxigênio diferenciando-se apenas no que diz respeito ao acúmulo de ácido láctico (inibido na presença de oxigênio). Sendo assim, o produto final da glicólise aeróbica é o piruvato. Esse processo ocorre no citossol da célula.

Para cada mol de glicose utilizado são formados 2 moles de piruvato que entram na mitocôndria onde será convertido em acetil-CoA, através de uma descarboxilação oxidativa¹. Essa conversão do piruvato a acetil-CoA, conecta a glicólise ao ciclo de Krebs.

No *ciclo de Krebs* o acetil-CoA proveniente do piruvato, que por sua vez é originário da degradação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos; é totalmente oxidado a CO_2 (dióxido de carbono), com a paralela produção de coenzimas reduzidas².

O próximo passo do metabolismo aeróbico é o *sistema de transporte de elétrons* (também conhecida como cadeia respiratória), finalizando a degradação dos combustíveis celulares H_2O e fornecendo a energia suficiente para a síntese de ATP (figura 3).

Figura 3. Esquema simplificado do processo de obtenção de energia através do metabolismo aeróbico: a oxidação dos nutrientes leva a redução de coenzimas, que são oxidadas por O_2 , produzindo ATP.

¹ Segundo Bayardo e Marzzoco (1990) descarboxilação oxidativa é a transferência de um radical acetil, proveniente do piruvato, para coenzima A

² coenzimas: componentes orgânicos que muitas enzimas necessitam para exercer sua atividade, esses componentes atuam como aceptores de determinados grupos funcionais ou de átomos retirados do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos em outra reação. A palavra reduzida refere-se às coenzimas FAD e NAD^+ que no ciclo de Krebs recebem prótons e elétrons passando a coenzimas reduzidas FADH_2 e NADH .

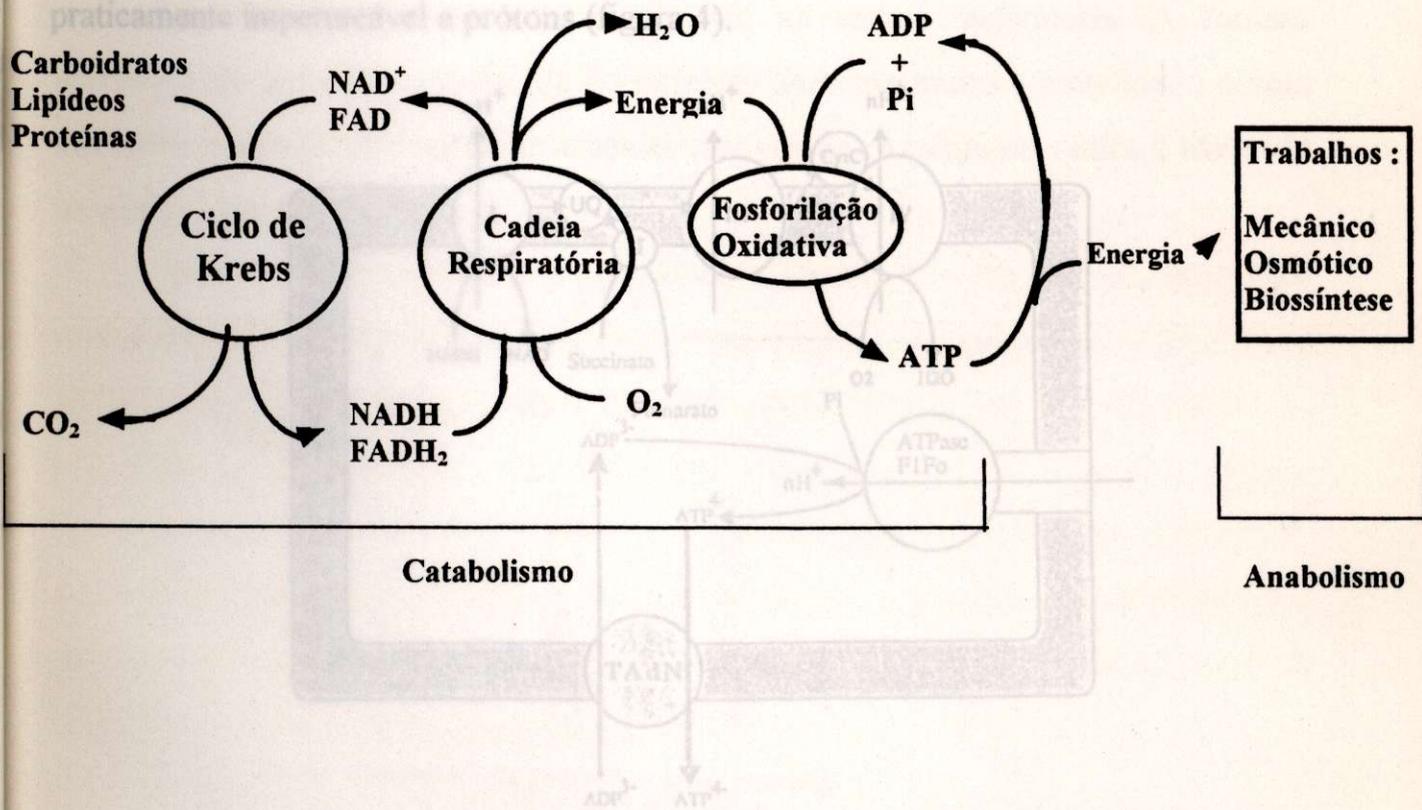


Figura 3. Esquema simplificado do processo de obtenção de energia através do metabolismo aeróbico: a oxidação dos nutrientes leva a redução de coenzimas, que são oxidadas por O_2 , produzindo ATP.

CAPÍTULO II

Através da reoxidação de coenzimas às custas do oxigênio molecular, com a passagem de elétrons pelas proteínas da cadeia respiratória, ocorre o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o citossol. O gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) formado vai ser utilizado para síntese de ATP pela enzima $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATP}$ sintetase, que associa a reentrada de prótons com a fosforilação do ADP em ATP dentro da matriz mitocondrial. Assim, um pré-requisito fundamental para o funcionamento deste sistema é que a membrana interna das mitocôndrias seja praticamente impermeável a prótons (figura 4).

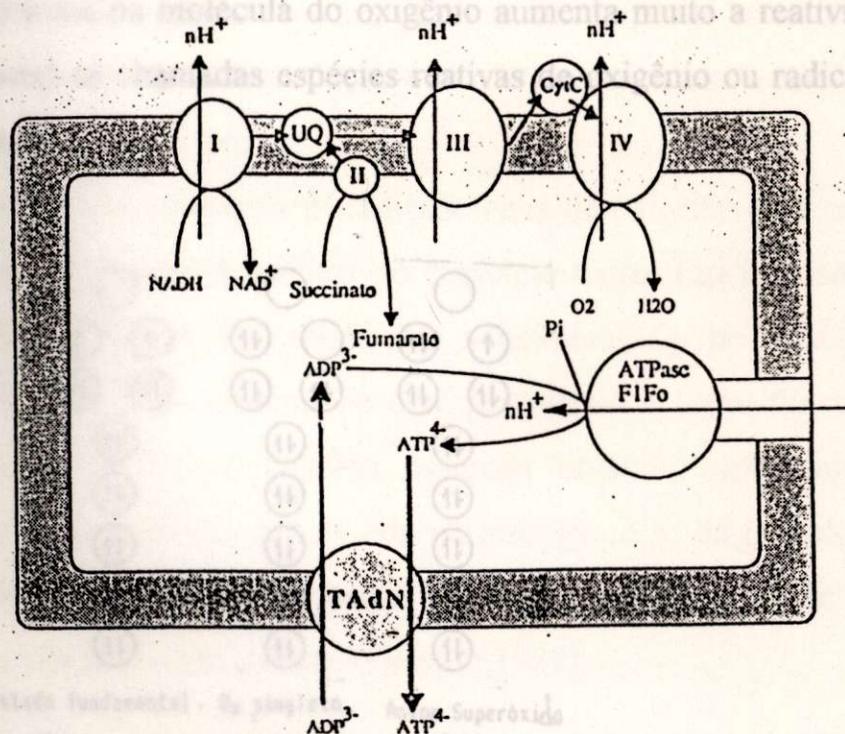


Figura 4 . Representação esquemática da membrana mitocondrial interna compreendendo a cadeia respiratória (complexos I a IV , ubiquinona (UQ) e citocromo c (cit c), F_1F_0 ATP sintetase e o transportador de nucleotídeos de adenina(TAdN)).

A entrada de um elétron apenas produz o ânion superóxido (O_2^-). Duas moléculas de ânion superóxido dismutam devido a ação da enzima superóxido dismutase. Esta reação consome dois prótons e produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, como agente oxidante é considerado fraco. Entretanto, o principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente membranas celulares e ao receber mais

CAPÍTULO II

OXIDACÕES BIOLÓGICAS: fonte de radicais livres de oxigênio

O oxigênio, por ter a particularidade de ser uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais necessita receber seus elétrons um a um. Normalmente esta redução é feita a nível de citocromo oxidase (aa_3), que aceita os quatro elétrons univalentemente mas produz H_2O como único produto final da reação. Entretanto, sabemos que ocorrem vazamentos de elétrons quando estes estão sendo transportados de um sítio para outro na cadeia respiratória. A entrada univalente de elétrons na molécula do oxigênio aumenta muito a reatividade destas moléculas e produz as chamadas espécies reativas de oxigênio ou radicais livres de oxigênio (Figura 5).

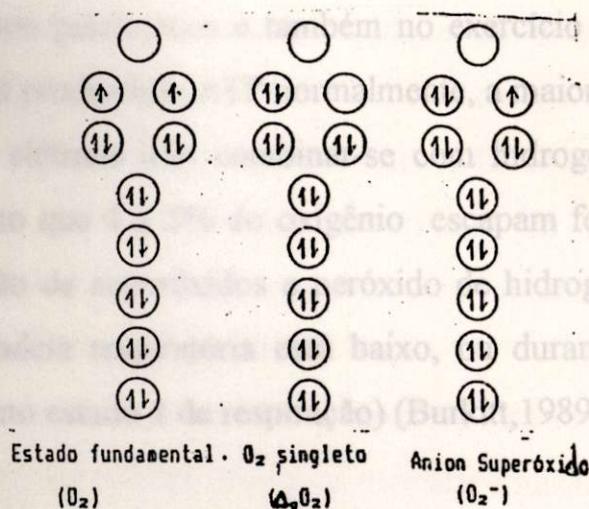


Figura 5 - Distribuição eletrônica do oxigênio

A entrada de um elétron apenas produz o ânion superóxido (O_2^-). Duas moléculas de ânion superóxido dismutam devido a ação da enzima superóxido dismutase. Esta reação consome dois prótons e produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, como agente oxidante é considerado fraco. Entretanto, o principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente membranas celulares e ao receber mais

um elétron, normalmente proveniente do Fe^{2+} ou Cu^+ dá origem ao radical hidroxila, das espécies radicalares conhecidas uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar.

Fica claro que estas espécies reativas de oxigênio, para se estabilizarem devem doar ou receber elétrons de uma molécula, tornando esta agora uma espécie também radicalar. Como os radicais livres são moléculas bastante instáveis, eles atacam alvos celulares com o objetivo de se estabilizarem; a consequência disto é a oxidação dos fosfolípidos de membranas celulares e subcelulares, DNA, núcleo e proteínas. Normalmente os organismos vivos possuem mecanismos de defesa eficientes contra a ação destas espécies reativas de oxigênio, mas toda vez que houver um desequilíbrio entre a produção e os sistemas de defesa está estabelecido nas células um "stress" oxidativo.

Postula-se que a formação de radicais livres de oxigênio está envolvida em vários processos patológicos e também no exercício físico. Em uma situação onde organismo está produzindo ATP normalmente, a maioria do O_2 no final da cadeia de transporte de elétrons irão combinar-se com hidrogênio e formarão moléculas de H_2O , enquanto que 4 a 5% do oxigênio escapam formando superóxidos. Porém a maior produção de superóxidos e peróxido de hidrogênio se dá quando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória está baixo, ou durante a limitação de ADP (mais conhecido como estado 4 de respiração) (Burkitt, 1989).

Por exemplo em músculos de corredores de média e longa distância, ciclistas e nadadores e envolve vários tipos de fibras musculares (fibras glicolíticas, oxidativas e mistas) (Holloszy, 1976). Nessas adaptações estão incluídas, além da melhora do sistema cardio-respiratório, um aumento na capacidade de oxidar ácidos graxos de cadeia longa e carboidratos e da capacidade de gerar ATP via fosforilação oxidativa (Dillard, 1978).

Embora as adaptações sejam muito discutidas, ainda não foram associados os mecanismos responsáveis pela melhora da saúde e resistência a doenças associadas a uma situação de treinamento físico.

CAPÍTULO III

ADAPTAÇÕES BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO

Nosso organismo está constantemente sofrendo adaptações, mudanças estas, decorrentes de exigências físicas e psicológicas.

Muitas são as definições que encontramos atualmente sobre esse tipo de mudança. Segundo Weineck (1991, p.22), adaptação é:

"...uma reorganização orgânica e funcional do organismo, frente a exigências internas e externas; adaptação é a reflexão orgânica, a adoção interna de exigências."

O exercício induz adaptações bioquímicas extremamente importantes para o funcionamento adequado do organismo. A natureza do estímulo do exercício determina o tipo de adaptação. O aumento da capacidade respiratória do músculo varia conforme a duração e a intensidade do exercício. Isto fica claro quando imaginamos que o exercício aeróbico aumenta em até 35 vezes a demanda energética do repouso (Astrand, 1977). Um treinamento físico, com utilização do metabolismo aeróbio, induz um aumento na capacidade do músculo esquelético para o metabolismo oxidativo, com o aumento concomitante na resistência do organismo como um todo (Gollnick *et al*, 1973).

Este aumento na capacidade oxidativa ocorre por exemplo em músculos de corredores de média e longa distância, ciclistas e nadadores e envolve vários tipos de fibras musculares (fibras glicolíticas, oxidativas e mistas) (Holloszy, 1976). Nessas adaptações estão incluídas, além da melhora do sistema cardio-respiratório, um aumento na capacidade de oxidar ácidos graxos de cadeia longa e carboidratos e da capacidade de gerar ATP via fosforilação oxidativa (Dillard, 1978).

Embora as adaptações sejam muito discutidas, ainda não foram associados os mecanismos responsáveis pela melhora da saúde e resistência a doenças associadas a uma situação de treinamento físico.

Ao longo do tempo foram demonstrados aumentos na atividade de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos (Mole, 1971), das enzimas envolvidas na oxidação de corpos cetônicos (Winder, 1974), das enzimas do ciclo de Krebs (Dohm, 1973) e componentes da cadeia respiratória (Davies, 1981).

Existem duas adaptações subcelulares principais que contribuem para aumentar a capacidade das células musculares oxidarem os carboidratos após um treinamento aeróbico: aumento no nível de atividade ou concentração das enzimas envolvidas no ciclo de Krebs e no sistema de transporte de elétrons (Gillespie, 1982), além de um aumento no número, no tamanho, e na área superficial da membrana das mitocôndrias de músculo esquelético (Benzi, 1975).

O treinamento também promove algumas adaptações anaeróbicas, como o aumento das reservas musculares de ATP-PC, principalmente em atividades de curta duração, já que o sistema ATP-PC (dos fosfagênicos) é utilizado quando necessitamos de uma rápida obtenção de energia. Paralelo a isso há o aumento de algumas enzimas deste mesmo sistema (enzima ATP-ase, mioquinase e creatina quinase), enzimas estas importantes para a reposição de ATP a partir de ADP e fosfocreatina.

Além destas adaptações há ainda o aumento da capacidade glicolítica que é demonstrada desde o aumento da atividade de enzimas chave da glicólise em atletas de endurance e em atletas velocistas (Fox, 1991), onde encontramos uma relação entre o tipo de atividade praticada e o metabolismo que a mesma recruta, tornando assim evidente as adaptações próprias de cada tipo de atividade.

Como há um aumento da capacidade glicolítica ao longo do treinamento de velocidade, é importante observar que a quantidade de ácido láctico acumulado também deverá aumentar, ou seja, o músculo apresenta uma grande habilidade em acumular ácido láctico após um processo de treinamento.

CAPÍTULO IV

EXERCÍCIO FÍSICO E O STRESS OXIDATIVO

O exercício físico parece ter uma relação única com a teoria dos radicais livres, pois a demanda por oxigênio (Priestly, 1984), nesta situação, está cerca de 10 a 15 vezes aumentada quando comparada com o repouso. Isto sugere que com o exercício, os radicais livres sejam produzidos também em maior proporção. Entretanto, dados da literatura mostram que a ocorrência ou não de um "stress" oxidativo para as células parece estar mais relacionada ao tipo de exercício físico empregado, onde utilizam-se dois tipos de metabolismos: aeróbico, anaeróbico e o misto que é uma mescla dos metabolismos anteriores.

De um lado, o treinamento físico, de característica aeróbica induz um aumento na capacidade oxidativa do músculo esquelético para o metabolismo oxidativo, com o aumento concomitante na resistência do organismo como um todo, além das diversas adaptações bioquímicas e fisiológicas descritas anteriormente.

Por outro lado, todos os resultados obtidos com animais submetidos a um exercício físico até a exaustão, situação tão comum entre os "atletas de fim-de-semana" sugerem um aumento nos danos celulares. Nesta situação, de exercício exaustivo, foram demonstrados sensibilidade aumentada a agentes oxidantes, diminuição nos valores de controle respiratório e níveis aumentados de produtos da lipoperoxidação, uma das consequências do ataque de radicais livres aos fosfolípidos das membranas. Além disso, foi também demonstrado que este tipo de exercício diminui a atividade de várias enzimas mitocondriais quando aplicado tanto em animais sedentários quanto em animais já treinados. Um aumento na liberação de Fe^{2+} livre associado a um aumento nos produtos de lipoperoxidação levaram Jenkins (1993) e seu grupo a proporem o abaixamento do pH intracelular como o responsável pelo aumento na formação de radicais livres nesta situação de exercício exaustivo.

Uma questão que nos chama atenção é o fato de que numa situação de treinamento físico o metabolismo aeróbico responde por 100% da produção de energia das células. Por outro lado, toda situação de exercício exaustivo requer o metabolismo anaeróbico como principal fonte de energia. Neste caso, o acúmulo de ácido láctico (produto final do metabolismo anaeróbico) leva a um abaixamento de pH intracelular, que em algumas situações pode chegar a valores tão baixos quanto 6,3. Assim, é interessante notar que, todo exercício misto (que envolve os dois metabolismos, aeróbico e anaeróbico) simula um processo de "isquemia-reperfusão" e aparentemente este é um fato relevante quando estudamos a ocorrência ou não de um "stress" oxidativo numa situação de exercício físico.

CAPÍTULO V

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de Mitocôndrias de Fígado de Rato

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo Schneider e Hogeboom (1967) centrifugação fracionada do homogenato de fígado de ratos Wistar machos, pesando 180- 200g, mantidos em jejum por 12 horas e sacrificados por concussão cerebral. O fígado, retirado imediatamente após a morte do animal, foi lavado em solução de sacarose 250mM tamponada com Hepes 10 mM, pH 7,4, contendo EGTA 0,5mM, picado delicadamente com uma tesoura e homogeneizado três vezes em homogenizador tipo Potter-Elvehjem. Este material foi submetido a uma primeira centrifugação a 700xg por 10 minutos e o sobrenadante resultante centrifugado a 10000xg por 10 minutos. A fase lipídica superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o sedimento ressuspense na mesma solução de sacarose 250mM (sem EGTA), obtendo-se uma suspensão mitocondrial com concentração aproximada de 100mg/ml. Todo o procedimento será realizado a uma temperatura entre 0°C e 4°C. A dosagem proteica foi feita pelo método de Biureto, utilizando-se albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

Padronização do Isolamento de Mitocôndrias de Músculo Esquelético

Para o isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético utilizamos os músculos gastrocnêmio e sóleo de ratos Wistar, machos, pesando entre 180-200g. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação fracionada, com algumas modificações, segundo Bhattacharya *et al* (1991).

Inicialmente o animal foi anestesiado com 1ml de hidrato de cloral (1%), após a depilação das pernas iniciou-se o processo de extração dos músculos gastrocnêmio e sóleo realizando-se uma microcirurgia.

O músculo extraído foi colocado sobre um papel de filtro embebido em meio de KCl 46mM, sacarose 100mM, tamponado com Tris-HCl 100mM, pH 7,4, contendo EDTA 10mM, para a retirada de vestígios de gordura. Feito isso o músculo foi emergido em solução gelada idêntica a anterior na quantidade de 10 vezes o peso do músculo, foi picado em pequenos pedaços com uma tesoura e colocado sob agitação por 5 minutos na presença de Nagarse 20mg% e BSA 0,5%. A Nagarse é uma protease que têm a função de digerir as miofibrilas que podem contaminar o preparado.

Após a lavagem os músculos foram homogeneizados 3 vezes em homogeneizador Potter-Elvehjem (velocidade mais rápida do aparelho), na mesma solução onde foi agitado. O homogenato assim obtido foi filtrado em gaze (a fim de separar as miofibrilas, que estão presentes em maior concentração no homogenato) e centrifugado a 12000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, pois contém Nagarse; e o sedimento foi ressuspenso em 30ml de meio contendo sacarose 100mM, KCl 46mM tamponado com Tris-HCl 100mM (pH 7.4) na presença de BSA 0,5% na velocidade mais lenta do homogeneizador. O homogenato foi centrifugado a 1300xg por 5 minutos, e o sobrenadante resultante centrifugado a 12000xg por 10 minutos. Após limpar bem o tubo o sedimento foi ressuspenso em 1,5ml de meio (sem EGTA e sem BSA) manualmente. Todo procedimento foi feito entre 0° C e 4° C .

Determinação do Consumo de Oxigênio

A respiração mitocondrial foi medida através do consumo de oxigênio, determinado com eletrodo de O_2 tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), sensível a variação de O_2 do meio. A qualidade da preparação mitocondrial foi deduzida diariamente em função dos valores do controle respiratório (CR), obtido após o término do isolamento das mitocôndrias. O CR é definido como a razão entre a velocidade de consumo de O_2 no estado respiratório 3 (estado de fosforilação, obtido após a adição de ADP) e o estado respiratório 4 (respiração de repouso, subsequente ao término da fosforilação do ADP) (Chance, 1956). A suspensão mitocondrial foi utilizada para os experimentos quando obteve-se um CR igual ou superior a 5,0 (figura 6).

A importância de uma boa preparação mitocondrial é a permeabilidade da membrana mitocondrial, para que desta forma os sistemas de bombeamento de prótons sejam eficientes, garantindo o bom funcionamento do processo de produção de energia.

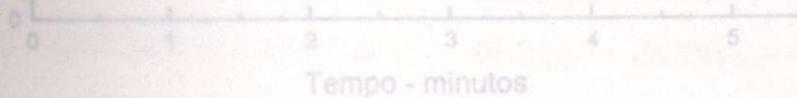


Figura 6 - Gráfico do controle respiratório de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético.

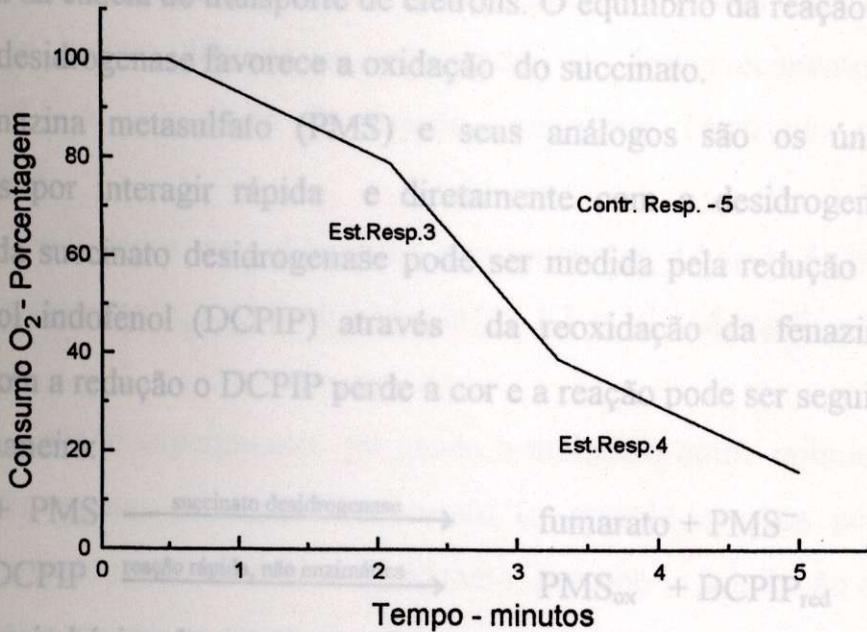
Padronização da Atividade da Enzima Succinato Desidrogenase

A succinato desidrogenase é uma enzima intramitocondrial do ciclo de Krebs e está localizada na membrana interna. É uma flavoproteína que contém FAD como grupo prostético e desempenha um papel central no mecanismo de transporte de elétrons e produção de energia nas células aeróbicas. Ela catalisa a oxidação do succinato a fumarato com redução do FAD a FADH₂, que é reoxidado pela ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons. O equilíbrio da reação catalisada pela succinato desidrogenase favorece a oxidação do succinato.

Fenazina metassulfato (PMS) e seus análogos são os únicos aceptores conhecidos por interagir rápida e diretamente com a succinato desidrogenase. Assim, a atividade da succinato desidrogenase pode ser medida pela redução do corante 2,6 diclorofenol indol (DCPIP) através da reoxidação da fenazina metassulfato (PMS). Com a redução o DCPIP perde a cor e a reação pode ser seguida a 600nm da seguinte maneira:

succinato + PMS → fumarato + PMS⁻

PMS⁻ + DCPIP → PMS^{ox} + DCPIP^{red}



O meio básico de reação consiste em sacarose 125 mM, KCl 65mM, Hapes 10 mM (pH7.6), rotenona 1uM, antimicina 1uM, PMS(1%) e BSA(3%). Utiliza-se Figura 6- Gráfico do controle respiratório de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético. A cadeia respiratória inclui-se também o BSA (soro albumina bovina) para sequestrar vestígios de ácidos graxos.

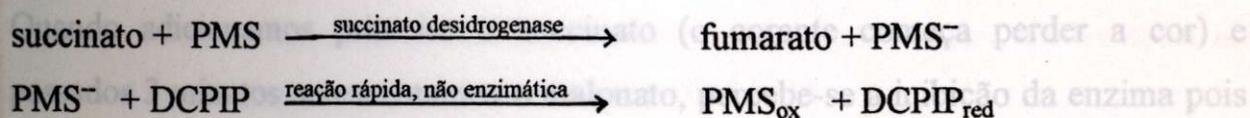
Após 2 minutos de adição da suspensão mitocondrial (1mg/ml), acrescentou-se o DCPIP 33mM, deixando estabelecer uma linha de base, e então o succinato a fim de iniciar a reação.

A medida da atividade da succinato desidrogenase se dá através da velocidade com que o PMS reduz o DCPIP que ao perder sua cor provoca uma

Padronização da Atividade da Enzima Succinato Desidrogenase

A succinato desidrogenase é uma enzima intramitocondrial do ciclo de Krebs e está localizada na membrana interna. É uma flavoproteína que contém FAD como grupo prostético e desempenha um papel central no mecanismo de transporte de elétrons e produção de energia nas células aeróbicas. Ela catalisa a oxidação do succinato a fumarato com redução do FAD a FADH_2 , que é reoxidado pela ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons. O equilíbrio da reação catalisada pela succinato desidrogenase favorece a oxidação do succinato.

Fenazina metassulfato (PMS) e seus análogos são os únicos aceptores conhecidos por interagir rápida e diretamente com a desidrogenase. Assim, a atividade da succinato desidrogenase pode ser medida pela redução do corante 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP) através da reoxidação da fenazina metassulfato (PMS). Com a redução o DCPIP perde a cor e a reação pode ser seguida a 600nm da seguinte maneira:



O meio básico de reação consiste em sacarose 125 mM, KCl 65mM, Hapes 10 mM (pH7.6), rotenona 1uM, antimicina 1uM, PMS(1%) e BSA(3%). Utiliza-se um inibidor de 2º sítio (antimicina A) para impedir a reoxidação de FADH_2 pela cadeia respiratória. Inclui-se também o BSA (soro albumina bovina) para sequestrar vestígios de ácidos graxos.

Após 2 minutos de adição da suspensão mitocondrial (1mg/ml), acrescentou-se o DCPIP 33mM, deixando estabelecer uma linha de base, e então o succinato a fim de iniciar a reação.

A medida da atividade da succinato desidrogenase se dá através da velocidade com que o PMS reduz o DCPIP que ao perder sua cor provoca uma

diminuição no valor da absorbância em 600nm. Esses experimentos foram feitos em espectrofotômetro BECKMAN DU 640.

No experimento onde variamos as concentrações do substrato nota-se que a reação enzimática atinge sua velocidade máxima em 5mM de concentração, e após isso a velocidade não apresenta variações.

Para calcularmos a velocidade da reação enzimática foi usada fórmula $A = E \cdot c \cdot l$: onde A é a absorbância , onde $E = 21 \cdot 10^3 \text{ M min}^{-1}$, c é a concentração do corante e l o caminho óptico da cubeta (1cm). Obtínhamos assim as concentrações de DCPIP em dois tempos diferentes e portanto a diferença dessas concentrações nesse intervalo de tempo, fornece a velocidade de desaparecimento do corante, proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela succinato desidrogenase.

As velocidades nas diferentes concentrações (2.5mM, 5.0mM e 20mM) foram, respectivamente: $0,53 \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$; $1,1 \times 10^{-6} \text{ M min}^{-1}$ e $0,92 \times 10^{-6} \text{ M min}^{-1}$.

No segundo experimento foi usado o malonato como inibidor competitivo. Quando adicionamos primeiro o succinato (o corante começa perder a cor) e passados 3 minutos acrescentamos o malonato, percebe-se a inibição da enzima pois o corante passa manter-se numa absorbância estável, sem perder sua cor. Este efeito comprova que a atividade enzimática medida é a da succinato desidrogenase.

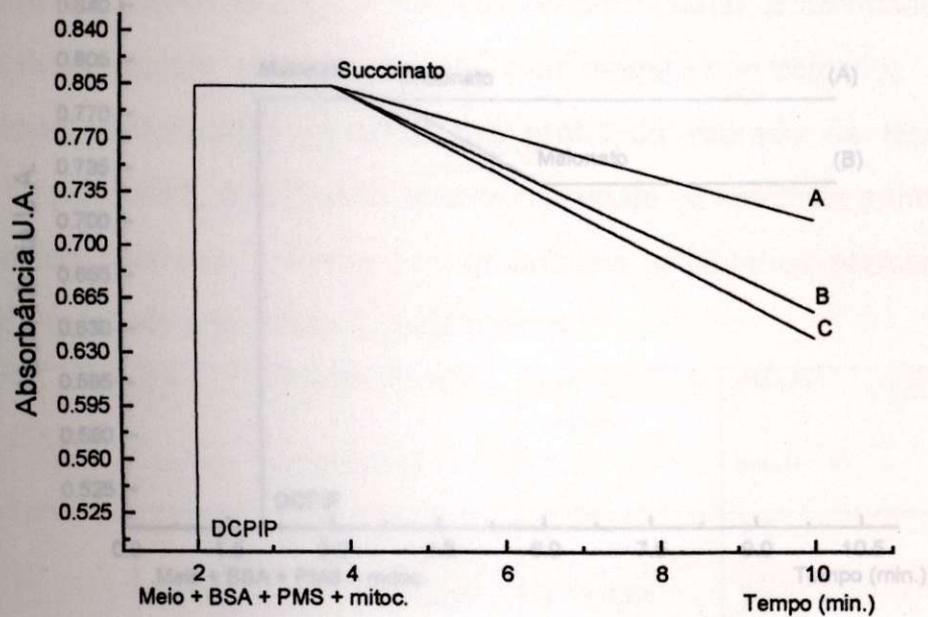


Figura 7. Gráfico da velocidade da atividade da enzima succinato desidrogenase, com variações nas concentrações dos substratos. (A) 2,5mM (B) 20mM (C) 5,0mM.

Padronização do Método de Treinamento

Um dos primeiros objetivos do projeto foi a padronização do método de treinamento. Para esse trabalho propõe avaliar a atividade da enzima succinato desidrogenase em animais não treinados.

Para isso, foi utilizado um protocolo retirado da tese de Carlos Eduardo Negrão (1985), no qual os animais seriam submetidos a um treinamento de 8 semanas, conforme tabela 1 e os animais sedentários permaneceriam em repouso.

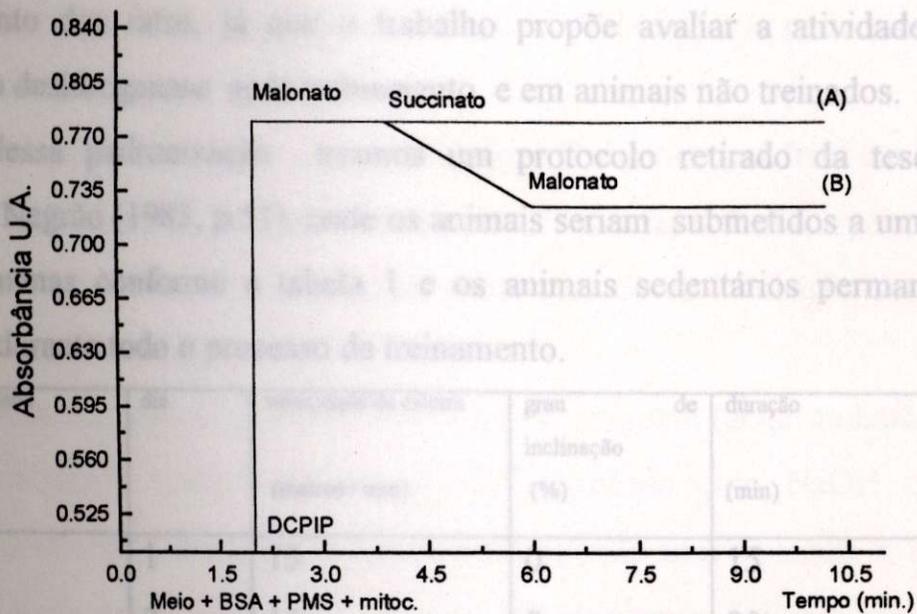


Figura 8. Representação esquemática da atividade da enzima succinato desidrogenase (comprovação através da dosagem de um inibidor competitivo - malonato). (A) malonato 5mM adicionado antes do succinato 5mM ou na ausência deste, (B) malonato 5mM adicionado após o succinato 5mM.

		grau de inclinação (%)	de duração (min)
1	Meio + BSA + PMS + mitoc.	0	20
2	1-2	0	30
3	1-3	0	40
4	1-4	0	50
5	1-5	0	60
3	1-3	5	60
	4-5	10	60
4	1	10	60
	2-5	15	60
S-8	1-5	15	60

Tabela 1. Método de treinamento segundo Negrão (1985).

Padronização do Método de Treinamento

Os produtos finais da peroxidação lipídica são aldeídos de baixo peso molecular. Um dos primeiros objetivos do projeto foi a padronização do método de treinamento dos ratos, já que o trabalho propõe avaliar a atividade da enzima succinato desidrogenase após treinamento e em animais não treinados.

Nessa padronização usamos um protocolo retirado da tese de Carlos Eduardo Negrão (1985, p.51), onde os animais seriam submetidos a um treinamento de 8 semanas conforme a tabela 1 e os animais sedentários permaneceriam em repouso durante todo o processo de treinamento.

semana	dia	velocidade da esteira (metros / min)	grau de inclinação (%)	duração (min)
1	1	15	0	15
	2	15	0	20
	3	15	0	25
	4	15	0	30
	5	20	0	30
2	1	25	0	30
	2	26.8	0	30
	3	26.8	0	40
	4	26.8	0	50
	5	26.8	0	60
3	1-3	26.8	5	60
	4-5	26.8	10	60
4	1	26.8	10	60
	2-5	26.8	15	60
5-8	1-5	26.8	15	60

Tabela 1. Método de treinamento segundo Negrão (1985).

Avaliação do Grau de Peroxidação Lipídica

Os produtos finais da peroxidação lipídica são aldeídos de baixo peso molecular, entre eles o malondialdeído (MDA), que reagem com o ácido tiobarbitúrico, formando um complexo colorido (TBARs) que pode ser quantificado por fluorimetria.

A incubação da suspensão mitocondrial (1mg/ml) será feita em meio aerado contendo KCl 150mM, Tris-HCl 10mM, pH7,2, succinato 5mM, rotenona 5 μ M e Pi 5mM, por 20 minutos. Após o término deste período de incubação será acidificada em 3ml de H₂SO₄ 0,08N.

A este material adicionaremos 1,5 ml do reagente (ácido tiobarbitúrico 0,8% diluído em ácido acético glacial, pH 3,5, ajustado com NaOH e SDS 2%), butilhidroxitolueno 5 μ M e FeCl₃ 50 μ M. Esta solução será aquecida a 100°C por 30 minutos. Após seu imediato resfriamento adicionaremos 3ml de butanol agitamos vigorosamente. Este material será centrifugado a 4000rpm por 10 minutos para separar as duas fases. Os valores de fluorescência da camada orgânica serão lidos em espectrofluorímetro SLM-Aminco SPF 5000TM a 515 nm de excitação e 555nm de emissão. Para quantificação das espécies que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), usaremos uma curva padrão feita com 1.1.3.3 tetraetoxipropano (TEP), que se transforma linearmente em MDA, uma das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico produzindo TBARs e que normalmente é utilizada como padrão para quantificar lipoperoxidação. A figura 9 mostra a leitura de varredura no espectrofluorímetro, com excitação fixa em 515 nm varrendo-se a emissão de 520 a 600 nm. Podemos observar pelo espectro formado um pico em 555 nm, tanto na amostra proveniente da quebra do TEP, como na proveniente da indução de peroxidação lipídica em suspensão mitocondrial, aparentemente são formadas as mesmas substâncias (TBARs) e isto nos possibilita o uso da curva padrão de TEP (figura 10) para quantificar a concentração de TBARs formada em nossas amostras.

RESULTADOS

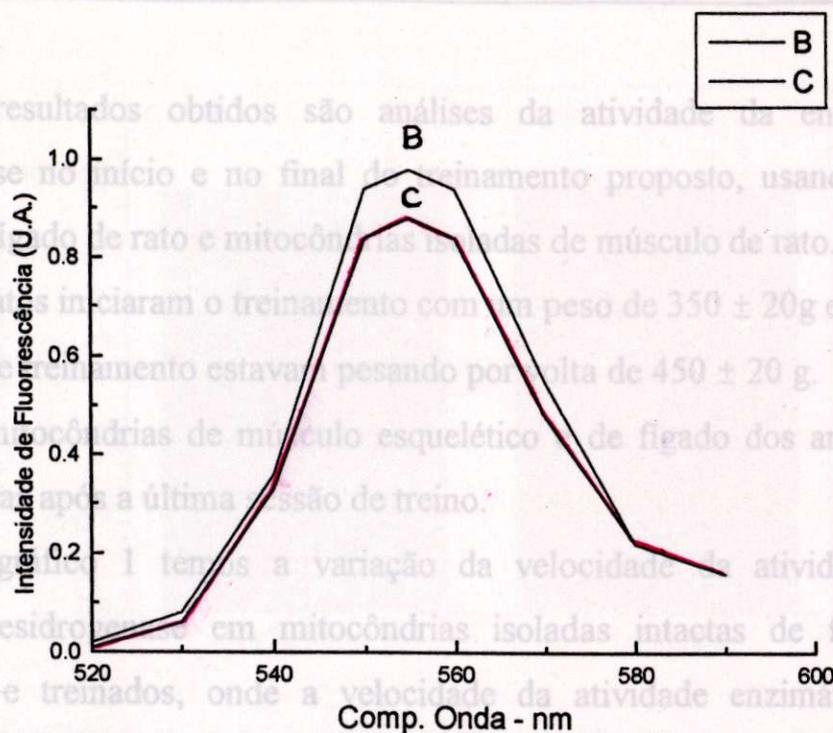


Figura 9. Espectros de varredura em espectrofluorímetro dos TBARS formados pela transformação linear do TEP (B) e pela peroxidação lipídica de suspensão mitocondrial (1mg prot./mL) induzida por $FeSO_4$ (0,5 mM) (C).

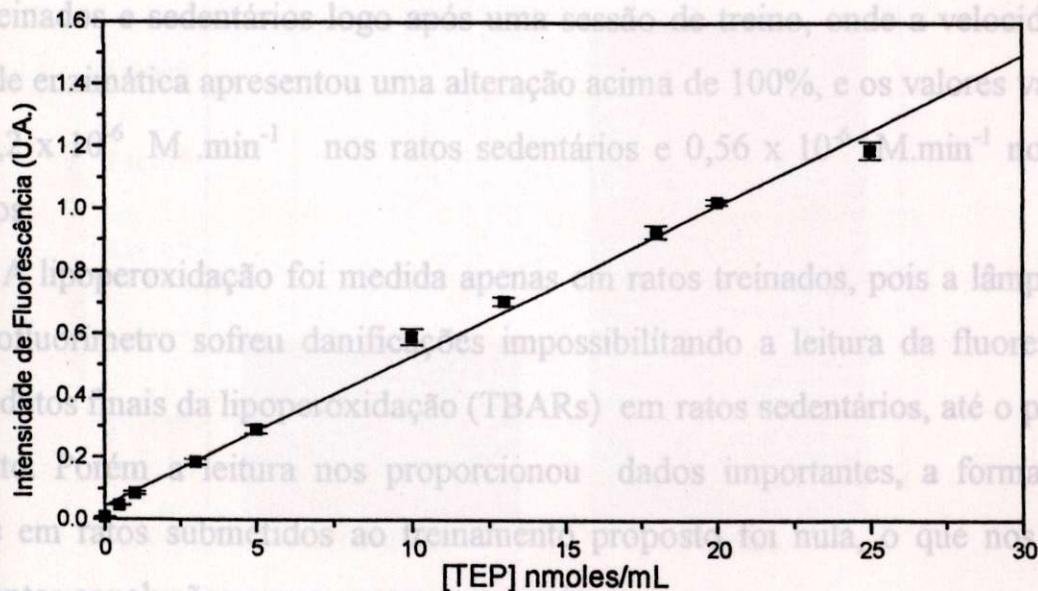


Figura 10 - Curva Padrão de TEP - A metodologia empregada está descrita acima. O gráfico representa a média de 5 experimentos com os respectivos desvios padrão.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são análises da atividade da enzima succinato desidrogenase no início e no final do treinamento proposto, usando mitocôndrias isoladas de fígado de rato e mitocôndrias isoladas de músculo de rato.

Os ratos iniciaram o treinamento com um peso de 350 ± 20 g em média e após 8 semanas de treinamento estavam pesando por volta de 450 ± 20 g.

As mitocôndrias de músculo esquelético e de fígado dos animais treinados foram isoladas após a última sessão de treino.

No gráfico 1 temos a variação da velocidade da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias isoladas intactas de fígado de ratos sedentários e treinados, onde a velocidade da atividade enzimática não sofreu alterações relevantes, onde os valores da atividade enzimática variaram entre $0,48 \times 10^{-6}$ M. min⁻¹ e $0,50 \times 10^{-6}$ M. min⁻¹.

Já no gráfico 2 temos a variação da velocidade da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias isoladas intactas de músculo esquelético de ratos treinados e sedentários logo após uma sessão de treino, onde a velocidade da atividade enzimática apresentou uma alteração acima de 100%, e os valores variaram entre $0,2 \times 10^{-6}$ M. min⁻¹ nos ratos sedentários e $0,56 \times 10^{-6}$ M. min⁻¹ nos ratos treinados.

A lipoperoxidação foi medida apenas em ratos treinados, pois a lâmpada do espectrofluorímetro sofreu danificações impossibilitando a leitura da fluorescência dos produtos finais da lipoperoxidação (TBARs) em ratos sedentários, até o presente momento. Porém a leitura nos proporcionou dados importantes, a formação de TBARs em ratos submetidos ao treinamento proposto foi nula, o que nos leva a importantes conclusões como veremos a seguir.

Gráfico 2. Velocidade da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias intactas de músculo esquelético de rato.

CONCLUSÕES

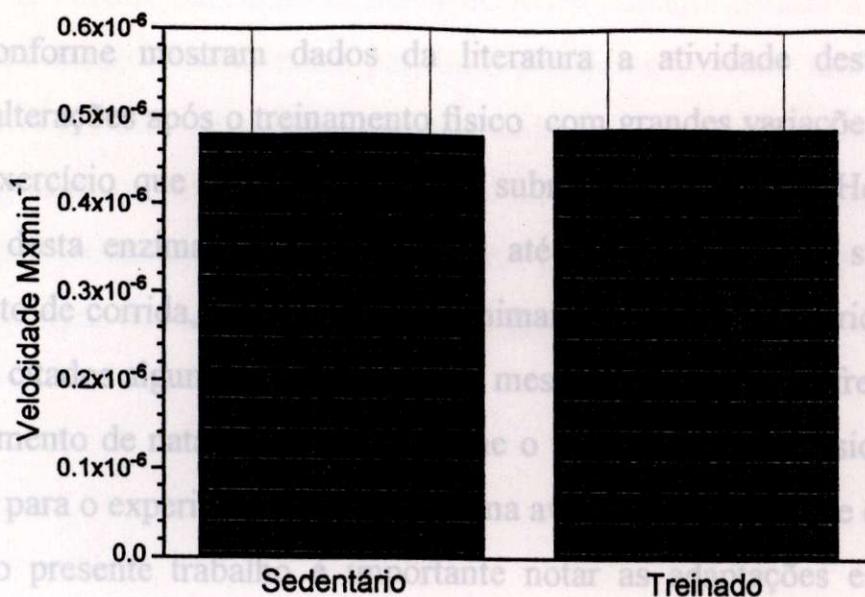


Gráfico 1. Velocidade da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias intactas de fígado de rato.

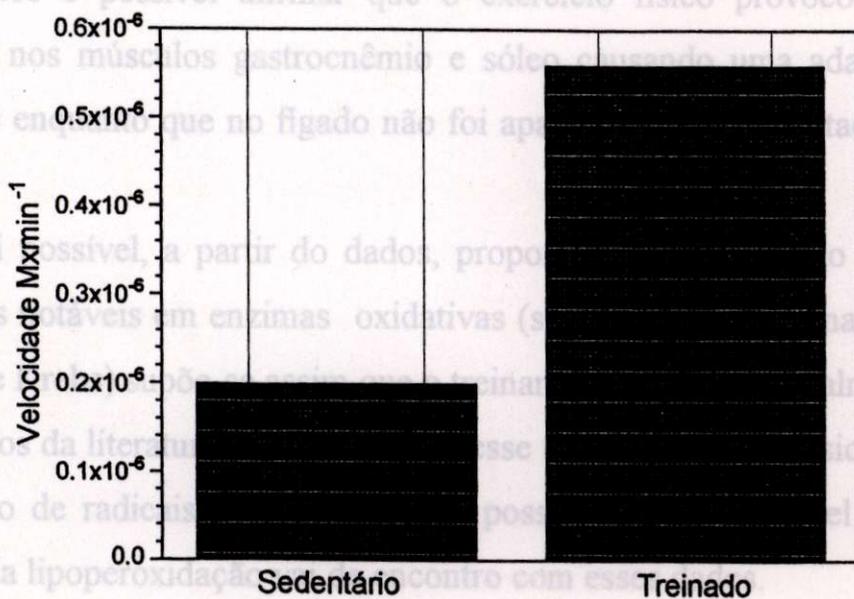


Gráfico 2. Velocidade da atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias intactas de músculo esquelético de rato.

CONCLUSÕES

Conforme mostram dados da literatura a atividade desta enzima sofre algumas alterações após o treinamento físico com grandes variações dependendo do tipo de exercício que os animais foram submetidos. Segundo Holloszy (1967) a atividade desta enzima é aumentada em até 80% em animais submetidos a um treinamento de corrida, comparado com animais controle (sedentários); neste mesmo relato são citados alguns trabalhos, onde a mesma enzima não sofreu variações após um treinamento de natação. É possível que o tipo de atividade física e os músculos utilizados para o experimento influenciem na avaliação da atividade desta enzima.

No presente trabalho é importante notar as adaptações específicas que o exercício proporciona, pois a atividade da enzima succinato desidrogenase teve uma variação muito significativa nas mitocôndrias isoladas intactas de músculo esquelético de ratos treinados e sedentários, enquanto que em mitocôndrias isoladas intactas de fígado de ratos sedentários e treinados a variação foi irrelevante. A partir destes dados é possível afirmar que o exercício físico provocou um estímulo específico nos músculos gastrocnêmio e sóleo causando uma adaptação muscular importante enquanto que no fígado não foi aparente alguma adaptação causada pelo exercício.

Foi possível, a partir do dados, propor que o treinamento utilizado causou adaptações notáveis em enzimas oxidativas (succinato desidrogenase é uma enzima do ciclo de Krebs) supõe-se assim que o treinamento seria essencialmente aeróbico e já que dados da literatura nos propõe que esse tipo de atividade física não provocaria a formação de radicais livres, o que foi possível medir em nível de formação de produtos da lipoperoxidação vai de encontro com esses dados.

Sendo assim as controvérsias sobre que tipo de exercício físico (aeróbico, anaeróbico ou misto) provocaria a formação de radicais livres, vão aos poucos sendo esclarecidas.

Paralelo a esse trabalho de monografia, outro treinamento foi iniciado onde a atividade da enzima succinato desidrogenase está sendo medida a cada semana do treinamento desde o início deste para que possamos verificar em que momento a enzima sofre grande variação em sua atividade ou se esta atividade vai sofrendo um aumento gradativo, juntamente a essa medida estão sendo dosadas as atividades de enzimas anti-oxidantes (catalase, glutathiona peroxidase, etc) que nos darão pistas sobre a formação de radicais livres no decorrer deste mesmo treinamento.

BARNARD, R.J. Long term effects of exercise on skeletal muscle. Biochemical and histological properties *J. Appl. Physio.* v.28, p.762-766, 1970.

MAYARDO, T e MARZOCCO, A. Bioquímica Básica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.87-125, 1990.

GENZI, G *et al.* Mitochondrial enzymatic adaptation of skeletal muscle to endurance training. *J. Appl. Physio.* v.38 (4), p. 565-569, 1975.

BHATTACHARYA, S.K. *et al.* Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamsters using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic and asagarse. *Anal. Bioch.* v.192, p. 344-349, 1991.

BOOTH, F.W. and THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. *Physiological Reviews.* v.71, p. 541-585, 1991.

BROOKS, G.A and FAHEY, T. D. Fundamentals of human performance. Macmillan Publishing Company. 1987.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUEGE, J. and AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Biochem. J.* v.52, p.302-310, 1979.
- ALESSIO, H.M. Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci.Sports.Exerc.* v.25, p.218-224, 1993.
- WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* v.17, p.65-134, 1956.
- ASTRAND, P.O and RODAHL, K. Textbook of work physiology. Mac Graw-Hill, 1977.
- S, K.J.A, PACKER, L. and BROOKS, G.A. Biochemical Adaptation of Mitochondria, Muscle, and Whole-Animal Respiration to Endurance Training. *J. Appl. Physiol.* v.65, p.134-144, 1988.
- BARNARD, R.J. Long term effects of exercise on skeletal muscle. Biochemical and histological properties *J. Appl. Physio.* v.28, p.762-766, 1970.
- QUINTANILHA, A.T., BROOK, G.A. and PACKER, L. Free radical production and lipid peroxidation in skeletal muscle during endurance training. *J. Appl. Physiol.* v.45, p. 927-932, 1978.
- BAYARDO, T e MARZOCCO, A. Bioquímica Básica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.87-125, 1990.
- BENZI, G *et al.* Mitochondrial enzymatic adaptation of skeletal muscle to endurance training. *J. Appl. Physio.* v.38 (4), p. 565-569, 1975.
- BHATTACHARYA, S.K. *et al.* Isolation of skeletal muscle mitochondria from hamsters using an ionic medium containing ethylenediaminetetraacetic acid and naganase. *Anal.Bioch.* v.192, p. 344-349, 1991.
- BOOTH, F.W. and THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. *Physiological Reviews.* v.71, p. 541-585, 1991. 4^{ed.} Guanabara-Koogan, 1991.
- BROOKS, G.A and FAHEY, T. D. Fundamentals of human performance. Macmillan Publishing Company. 1987.
- of treadmill training. *Med. Sci. Sport Exerc.* v. 14(6), p. 461-466, 1982.

- BUEGE, J. and AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol.* v.52, p.302-310, 1979.
- CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* v.17, p.65-134, 1956.
- DAVIES, K.J.A, PACKER, L. and BROOKS, G.A. Biochemical Adaptation of Mitochondria, Muscle, and Whole-Animal Respiration to Endurance Training. *Arch. Bioch. Bioph.* v.209, n° 02, p.539-554, 1981.
- HOLLOSZY, J.O. Biochemical adaptations in muscle. *J. Biol. Chem.* v. 242, p. 2278-2282.
- QUINTANILHA, A.T., BROOK, G.A. and PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* v.107, p.1198-1205, 1982.
- DILLARD, C.J., LITOV, R.E., SAVIN, W.M. and TAPPEL, A.L. Effect of exercise, vitamin E and ozone in pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* v.45, p. 927-932, 1978.
- DOHM, G.L., HUSTON, R.L., ASKEW, E. W. and FLESHOOD, H. L. Effects of exercises, training and diet on muscle citric acid cycle enzyme activity. *Can. J. Bioch.* v.51, p. 849-855, 1973.
- FOX, E.L., BOWERS, R.W. and FOSS, M.L. Bases fisiológicas da educação física e dos desportos. Rio de Janeiro- 4ªed. Guanabara-Koogan, 1991.
- GILLESPIE, A.C., FOX, E.L. and MEROLA, A.J. Enzyme adaptations in rat skeletal after two intensities of treadmill training. *Med. Sci. Sport Exer.* v. 14(6), p. 461-466, 1982.

- GOLLNICK, P.D., ARMSTRONG, R.B., SALTIN, B., SAUBERT, C.W., SEMBROWICH, W.L. and SHEPERD, R.E.. Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* v.34, p. 107-111, 1973.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, G.J. and DAID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* v.177, p.751-757, 1949.
- HOLLOSZY, J.O. Biochemical adaptations in muscle. *J. Biol. Chem.* v. 242, p. 2278-2282, 1967.
- _____, BOOTH, F.W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Ann. Rev. Physiol.* v. 34, p. 273-291, 1976.
- JENKINS, R.R. and GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.25, p.210-212, 1993.
- MOLE, P., OSCAI, L., and HOLLOSZY, L. Adaptation of muscle to exercise: increase in levels of palmityl CoA synthetase, carnitine palmityltransferase, and palmityl CoA dehydrogenase and in the capacity to oxidize fatty acid. *J. Clin. Invest.* v.50, p.2323-2330, 1971.
- NEGRÃO, C.E. Metabolic consequences of D and L carnitine administration in chronically trained and untrained rats. *Univer. Wisconsin-Madison*, 1985
- OHKAWA, H., NOBUKO, O., and YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* v.95, p.351-358, 1979.

ROLFE, D. F. S., HULBERT, A. J. and BRAND, M. D. Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Bioch. Biophys. Act.* v.1118, p.405-416, 1994.

SCHNEIDER, W.C. and HOGEBROOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* v.183, p.123-128, 1950.

VEEGER, C., DE VARTANIAN, D. V. and ZEYLEMAKER, W. P. Succinate Dehydrogenase. *Methods in Enzymology.* v.XIII, p.81-90, 1969.

WEINECK, J. *Biologia do Esporte - São Paulo/ Manole* p.22-30, 1991.

WINDER, W. N., BALDWIN, K. M. and HOLLOSZY, J. O. Enzymes involved in ketone utilization in different types of muscles: adaptations to exercise. *Eur.J. Biochem.* v.47, p.461-467, 1974.

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