

**JOÃO ANTÔNIO BONATTO COSTA**

**ANÁLISE DE DESEMPENHO, EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE  
CHOQUE TÉRMICO E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS  
PELO TREINAMENTO FÍSICO DE MUSCULAÇÃO EM  
INDIVÍDUOS JOVENS, E SUA REPERCUSSÃO NO PERFIL  
IMUNOLÓGICO E LIPÍDICO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas – Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas  
da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Alvaro Reischak de Oliveira

Porto Alegre

2005

**JOÃO ANTÔNIO BONATTO COSTA**

**ANÁLISE DE DESEMPENHO, EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE  
CHOQUE TÉRMICO E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS  
PELO TREINAMENTO FÍSICO DE MUSCULAÇÃO EM  
INDIVÍDUOS JOVENS, E SUA REPERCUSSÃO NO PERFIL  
IMUNOLÓGICO E LIPÍDICO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e analisada pela **Comissão Examinadora** formada pelos seguintes professores:

Orientadores:

---

Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr

---

Prof. Dr. Alvaro Reischak de Oliveira

**Comissão Examinadora:**

---

Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

---

Dra. Christiane Salbego

---

Dr. Luiz Cláudio Fernandes

*A mente que se abre a uma nova idéia,  
Jamais volta ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

A você que está lendo, e que, talvez sem saber, foi um dos destinatários desta pesquisa, pois um trabalho aplicado só tem sentido se atingir aqueles que realmente possam beneficiar-se dele, portanto, bom uso e muito obrigado por seu interesse.

Mas, realmente, o maior dos agradecimentos é Aquele que nos permitiu estarmos aqui e que nos colocou, de alguma forma, com esta sublime missão de pesquisar e de proporcionar aos nossos semelhantes, alguma forma de prevenir, amenizar, tratar ou confortar suas enfermidades. E chamo Este de DEUS. Nele confio e deposito minhas esperanças, anseios, frustrações e re-começos. Obrigado meu DEUS, por mais esta etapa da minha vida. Obrigado por cada dia, cada minuto que me permitiste colocar nesta empreitada. E acima de tudo, obrigado Senhor pela confiança que depositaste em mim.

E se me permitires....

Obrigado meu grande Orientador e amigo Pivo. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. És um iluminado, um combatente incansável. Só tu mesmo pra abraçar e depositar tanta confiança naqueles que, por vezes não sabem nem por onde começar. E é claro, diz um ditado que, *“por trás de um grande homem, existe uma grande mulher”*. A nossa incansável chefe. A grande Miriam. Obrigado por seres nossa colega e auxiliarnos aqui na UFRGS, e pela atenção dada a tua família e ao nosso Pivo. Que Deus ilumine a vossa família, e permita-vos muitas alegrias, saúde, e um futuro maravilhoso (e sem arteriosclerose – um viva para o lipocardium ®!).

Um agradecimento muito especial à minha amiga Direne (ok. É Daiane Janner). Direninha meu amor, muito obrigado pelo teu auxílio, pela tua dedicação e apoio. Desejo que sejas muito feliz na tua carreira, pois acredite, és uma excelente profissional de educação física e uma excelente pesquisadora. Tenho certeza farás um

ótimo mestrado, mas lembre-se, nossa profissão precisa de pesquisadores do teu nível, não nos deixe. Um beijão e obrigado.

Ao Lino (Ôh LINO, LINO). Caro AMIGÃO, que pena que só no final fomos passar as madrugadas juntos “*redescobrimo o GOSTO*” da pesquisa. Obrigado por tudo.

Damiana e Mariana. O último grupo permitiu a vocês conhecerem as madrugadas do laboratório e é claro, os “fantasmas da UFRGS”. Mas confessem, foi legal né? Obrigado meninas pelo apoio na reta final.

Demais companheiros de jornada (e é lógico que vou esquecer alguém. Quem não será...): a tia. B1 (Ângela Kolberg) valeu as “estraladinhas” nos momentos surtantes. A Elza, terminando seu mestrado. Felicidades amiga e obrigado por tudo. O Maurinei, quer dizer Maurício, a essas alturas, já Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia. O nosso Professor da Medicina. Valeu Maurinei. A minha antiga amiga, desde o mestrado, Jurema. Futura Dra. Lucila valeu a parceria esse tempo todo, beijos. O grande Lazoni, valeu Lazzarotto pelas orientações dadas, que Deus te ilumine. As meninas da tia: Bibiana e Juliane, valeu meninas. E, logicamente a tia Ritinha, que além daquele apoio indispensável na vidraria ainda saciava os famintos e sedentos do laboratório.

Acharam que eu esqueceria dos futuros mamãe e papai ??? Dedé e Baby esperando um baby. Quem será mais baby nesta baby família com baby baby chegando? Nossa até eu me atrapalhei. Mas não se preocupem, a gente sempre se atrapalha com o primeiro Baby. Beijão a vocês. E, Dedé, minha mãe diria “*que a N.Sra do Bom Parto te dê uma boa hora*” e eu também te desejo. Felicidades.

Aos amigos da Unisinos, em especial o Betinho, grande seco, pelo constante apoio dado e aos demais colegas da academia, onde realizamos grande parte deste projeto.

Bom, os outros eu acho que esqueci mesmo. Mas não fiquem tristes, é a tensão do momento. Já vi quem esquecesse de convidar o padre para o casamento! Obrigadão a todos que, de alguma forma me auxiliaram. Beijão do Tio João.

Como citei minha mãe, lembrei dela. Lembro do dia em que estava indo ao culto da minha formatura em educação física e minha mãe, com lágrimas nos olhos me parabenizava. A vida foi difícil para meus pais no começo de suas vidas. Naquele momento eu disse à ela: “*mãe, esta é minha primeira formatura, a primeira. Ainda quero te levar a mais 3, superiores a esta.*” Seriam, a especialização, o mestrado e o doutorado. Mãe, das três prometidas duas tu já participaste. Quero agora poder te convidar para mais esta, que será a terceira. Meus sinceros agradecimentos ao apoio de meus pais Aristeu Fornari Costa e Marlene Bonatto Costa. A educação que recebi dos meus pais foi, com certeza, superior a todas outras. Foi um pós-doutorado antes de qualquer graduação. Obrigado meus pais. E obrigado minhas irmãs pelo auxílio e confiança depositados.

A família é o alicerce do mundo, e Deus me presenteou com famílias lindas, maravilhosas. Numa eu nasci. A outra eu constituí, ao lado de minha amada. Nas vésperas de completarmos 10 anos de casamento (no oficial, fora o extra-classe) dia 11/11, estarei finalizando este doutoramento. Jeanne, tu sabes o quão importante foste pra mim durante este tempo de pesquisa. Desculpe as vezes que precisei passar as madrugadas e amanhecer no laboratório. Obrigado pelo constante apoio, principalmente quando eu fraquejava. Muito obrigado mesmo. Te Amo. E obrigado também ao meu lindo e abençoado filho Bernardo, o qual por vezes, passava horas jogando no laboratório para que pudéssemos trabalhar.

Por fim, sem deixar de citar, o meu grande amigo, ídolo e exemplo profissional a ser seguido. Poderia até mesmo dizer, o grande responsável por isto tudo. Aquele que abriu as portas, com seu jeito *sutil e delicado*, para que pudéssemos encarar novos desafios. Estamos aí de novo parceirão. Mais uma vez um grande obrigado meu, oficialmente, Co-Orientador Alvaro Reischak de Oliveira, o meu amigo sheep. Obrigado pela constante confiança, apoio, e esclarecimentos. Valeu mesmo magrão. Temos, agora, que tomar umas cervejas !!!! Um Beijão.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1. <i>PROTEÍNAS DE ESTRESSE</i> .....	16
1.2. <i>HSP, ESTRESSE OXIDATIVO E EXERCÍCIO FÍSICO</i> .....	18
1.3. <i>EXERCÍCIO FÍSICO E PERFIL IMUNOLÓGICO</i> .....	21
1.4. <i>HIPÓTESES A SEREM TESTADAS</i> .....	24
1.5. <i>OBJETIVOS</i> .....	25
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
2.1. <i>AMOSTRA:</i> .....	26
2.1.1. <i>Protocolo de Treinamento</i> .....	27
2.1.2. <i>Programa de Treinamento</i> .....	27
2.1.3. <i>Avaliação Cineantropométrica</i> .....	28
2.1.4. <i>Avaliação de Força e da resistência Muscular</i> .....	28
2.2. <i>ANÁLISE BIOQUÍMICA</i> .....	29
2.2.1. <i>Reagentes e Soluções</i> .....	29
2.2.2. <i>Coleta de Sangue e Preparação de Leucócitos</i> .....	30
2.2.3. <i>Hemólise de Eritrócitos Contaminantes</i> .....	31
2.2.4. <i>Determinação do Conteúdo Intracelular de GSH e GSSG</i> .....	31
2.2.5. <i>Análise das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	34
2.2.6. <i>SDS-PAGE e Western blotting para HSP-70</i> .....	35
2.2.7. <i>Determinação das Concentrações de Proteínas nas Amostras Analisadas</i> .....	38
2.2.8. <i>Análise da Função Imunológica</i> .....	39
2.3. <i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</i> .....	41
2.4. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
3.1. <i>COMPOSIÇÃO CORPORAL</i> .....	43
3.1.1. <i>Peso (massa total):</i> .....	44
3.1.2. <i>Índice de Massa Corporal - I M C</i> .....	46
3.1.3. <i>Percentual de Gordura</i> .....	48
3.1.4. <i>Percentual de Massa Magra (Massa Livre de Gordura)</i> .....	51
3.2. <i>PERFIL LIPÍDICO</i> .....	54
3.2.1. <i>Colesterol Total</i> .....	55
3.2.2. <i>Triacilglicerois</i> .....	56
3.2.3. <i>HDL – C</i> .....	57
3.2.4. <i>LDL – C</i> .....	58
3.2.5. <i>VLDL – C</i> .....	59
3.2.6. <i>Relação Colesterol Total / HDL-C</i> .....	61
3.3. <i>DESEMPENHO</i> .....	62
3.3.1. <i>Força</i> .....	62
3.3.2. <i>Resistência Muscular</i> .....	64
3.4. <i>ESTRESSE OXIDATIVO</i> .....	66
3.4.1. <i>TBARS</i> .....	66
3.4.2. <i>Análise da Glutathione</i> .....	69
3.5. <i>EXPRESSÃO DE HSP</i> .....	75
3.6. <i>PERFIL IMUNOLÓGICO</i> .....	79

<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>84</b>
4.1. <i>ANÁLISES MORFOLÓGICAS E DE DESEMPENHO</i> .....	84
4.2. <i>ANÁLISES BIOQUÍMICAS:</i> .....	92
4.2.1. <i>Perfil Lipídico:</i> .....	92
4.2.2. <i>Estresse Oxidativo</i> .....	96
4.2.3. <i>Análise da Expressão de HSP</i> .....	101
4.2.4. <i>Análise do Perfil Imunológico</i> .....	105
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>109</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>111</b>
<b>OBRAS CONSULTADAS</b> .....	<b>113</b>
<b>A N E X O S</b> .....	<b>122</b>
<i>QUESTIONÁRIO PAR-Q</i> .....	123
<i>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</i> .....	124
<i>GUIA DOS EXERCÍCIOS:</i> .....	127

## RESUMO

O exercício físico é constantemente utilizado como coadjuvante em tratamentos de saúde, funcionais ou até mesmo estéticos. Normalmente prescrito em séries múltiplas, o treinamento de musculação, a partir da década de 90, passou a ser praticado também em séries simples, com iguais objetivos de hipertrofia e desempenho físico. Entretanto, a melhor aptidão de saúde também passou a ganhar uma forte atenção, em especial para benefícios cardiovasculares e metabólicos. O exercício físico é uma forma de estresse celular, uma vez que incrementa o metabolismo oxidativo e proporciona a geração de espécies ativas do oxigênio que podem causar lesão celular dependendo da intensidade e duração da atividade física. Proteínas de choque térmico (HSP) são proteínas expressas universalmente nas células sob condições de estresse, como choque térmico, privação de glicose e exposição a agentes indutores de estresse oxidativo, como espécies ativas do oxigênio. Estes fatos justificam a expressão de HSP, particularmente da família de 70 kDa (HSP70), no tecido muscular após o exercício físico. Já a adaptação ao exercício físico reduz a expressão de HSP70 no músculo enquanto que indivíduos treinados mostram redução na expressão de HSP70 em leucócitos circulantes. Desta forma, investigamos, neste trabalho, a expressão da HSP70 em leucócitos circulantes de indivíduos submetidos a diferentes seriações em comparação com a funcionalidade do sistema imunológico e o estresse oxidativo induzido por este treinamento. Comparamos ainda, o desempenho físico e a composição corporal nas diferentes seriações, e correlacionamos os resultados de composição corporal com o perfil lipídico dos participantes. Voluntários adultos saudáveis foram treinados 3 vezes por semana a 75% da carga máxima (CM) em séries simples (SS) ou múltiplas (SM), por 12 semanas com incremento de carga a cada 4 semanas. Os indivíduos foram avaliados antes, durante e ao final do protocolo de treinamento. Foram avaliados a composição corporal, a força e a resistência muscular, o perfil lipídico, estresse oxidativo, a expressão de HSP70 e o perfil imunológico. Ao final das 12 semanas de treinamento o grupo SS melhorou a composição corporal, a resistência muscular, e o perfil lipídico. Durante o desenvolvimento do treinamento observou-se contínua melhora do estresse oxidativo e do perfil imunológico no grupo SS e melhora no perfil imunológico do grupo SM, sendo que o grupo SS obteve melhor desempenho imunológico que o SM. Quanto à indução de HSP70, observou-se que o grupo SS não induziu maior expressão, enquanto que, o grupo SM aumentou a expressão de HSP70. Desta forma, na intensidade e período utilizados para o treinamento, o grupo SS mostrou ser mais eficiente que o grupo SM para os parâmetros avaliados, incluindo melhora no perfil imunológico.

Palavras-chave: musculação – HSP – estresse oxidativo – composição corporal

## ABSTRACT

Physical exercise has usually been considered an adjuvant for health care, functional maneuvers and even static treatments. Often prescribed as multiple series, from the begin of the 90's decade strength training has also been practiced in simple series in order to produce muscle hypertrophy and physical fitness. Nevertheless, exercise-related health benefits have also gained strong attention, especially related to cardiovascular and metabolic issues. On the other hand, physical exercise is a type of cellular stress, once it augments oxidative metabolism and leave to the generation of oxygen reactive species which may cause cellular damage depending on the intensity and duration of a physical activity. Heat shock proteins (HSPs) are proteins ubiquitously expressed in cells under stress conditions, such as thermal (heat) shock, glucose deprivation and exposure to oxidative stress-inducing agents, as oxygen reactive species. These facts justify HSP expression particularly of 70-kDa family (HSP70) in muscle tissue after an exercise. Adaptation to physical exercise decreases HSP70 expression in the muscle whereas trained individuals were also shown to have a reduction in HSP70 in circulating leukocytes. Therefore, we investigated HSP70 expression in circulating leukocytes from volunteer subjects under different sets of strength training in comparison to immune system function and exercise-induced oxidative stress. Physical performance and lipidemic profile were also compared to body composition in the different sets. Adult healthy volunteers were trained 3 times a week at 75% max load (CM) in simple (SS) or multiple series (SM) schedules during 12 weeks with load increases each 4 weeks. The individuals were evaluated before, during and at the end of training protocol. Body composition, muscular force and endurance, blood lipid profiles, oxidative stress, HSP70 expression and immune system function were evaluated during this period. After 12 weeks, SS group improved body composition, muscular endurance and lipid profiles. During the development of training, a continuous improvement of oxidative stress and immune system function was observed in SS group, while SM was shown to improve immune function as well, although immune improvement was found to be better in SS related to SM group. In relation to HSP70 induction, SS group did not show enhancement of HSP expression, whereas SM did show. Hence, at least by using the periods and intensities tested herein, SS group was found to be more efficient than SM group for the parameters assessed, including improvement of immune system function.

Key-words: resistive exercise – HSP – Oxidative stress- body composition

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG-AC .....	Ligação antígeno-anticorpo
APC .....	Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês <i>Antigen-Presenting Cell</i> )
ATP .....	Trifosfato de Adenosina
Ca <sup>2+</sup> .....	Cálcio
Células Ta1 ou Th1 .....	Célula T auxiliar de tipo 1
Células Ta2 ou Th2 .....	Célula T auxiliar do tipo 2
Células Ts .....	Células T supressoras
CD (CD4, CD8) .....	Grupo de Diferenciação 4 e 8 (do inglês <i>Cluster of Differentiation</i> )
CK .....	Creatina Quinase
ConA .....	Concanavalina A
COX-2 .....	Ciclooxigenase-2
CPPG .....	Prostaglandinas Ciclopentenônicas
DNA .....	Ácido Desoxirribonucléico
CAM .....	Moléculas de Adesão Celular (do inglês <i>Cell Adhesion Molecule</i> )
CAT .....	Catalase
CSF .....	Fator de Estimulação de Colônias (do inglês <i>Colony Stimulating Factor</i> )
EAO .....	Espécies Ativas de Oxigênio
ERO .....	Espécies Reativas de Oxigênio
FC .....	Frequência Cardíaca
GH .....	Hormônio do Crescimento
GPx .....	Glutationa Peroxidase
GRP75 e GRP70 .....	Proteínas Reguladas por Glicose (do inglês <i>Glucose-regulated Proteins</i> )
GSSH .....	Glutationa Oxidada

GSH .....	Glutationa Reduzida
HIV-1 .....	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSE .....	Elemento de Choque Térmico (do inglês <i>Heat Shock Element</i> )
HSF .....	Fator de Choque Térmico (do inglês <i>Heat Shock Factor</i> )
HO-1 .....	Heme Oxigenase -1
HSP .....	Proteínas de Choque Térmico (do inglês, <i>Heat Shock Proteins</i> )
ICAM (ICAM-1, ICAM-2) .....	Molécula de Adesão Intercelular 1 e 2 (do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule 1 and 2</i> )
IFN .....	Interferon
Ig .....	Imunoglobulinas
IKK .....	Complexo IκB quinase
IL .....	Interleucina
iNOS .....	Óxido Nítrico Sintase Induzível
Linfócitos Tc .....	Linfócitos T citotóxicos
LPO .....	Lipoperoxidação
MAdCAM .....	Molécula de Adesão Celular Adressina das Mucosas (do inglês <i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule</i> )
MDA .....	Malondialdeído
MHC .....	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA .....	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NAD <sup>+</sup> .....	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, Forma Oxidada
NF-κB .....	Fator Nuclear κB (do inglês <i>Nuclear Factor-κB</i> )
NK .....	Células Citotóxicas Espontâneas ou Assassinas Naturais  (do inglês <i>Natural Killer</i> )
NO .....	Óxido Nítrico
PHA .....	Phytohemagglutinin
PMA .....	Forbol Miristato Acetato

RNS .....	Espécies Reativas ao Nitrogênio (do inglês <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
ROS .....	Espécies Reativas do Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RUV .....	Radiação Ultravioleta
SM .....	Série Múltipla
SS .....	Série Simples
SOD .....	Superóxido Dismutase
TBARS .....	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCR .....	Receptor de Célula T
TGSH .....	Glutathiona Total
TNF .....	Fator de Necrose Tumoral (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
TPA .....	Tetradecanoilforbol Acetato
VCAM-1 .....	Molécula de Adesão da Célula Vascular (do inglês <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> )
VO <sub>2</sub> máx. ....	Consumo Máximo de Oxigênio

## APRESENTAÇÃO

A constante busca por melhores padrões de saúde, aliados às buscas por melhores padrões de composição corporal têm levado novos adeptos ao treinamento físico. A todo o momento, novas modalidades são lançadas nas academias objetivando atingir este público e motivá-lo a permanecer nas academias. Pelo fato de o público alvo estar aumentando, e, quem sabe até, modificando-se, observamos atualmente, nas academias, pessoas de idade mais avançada e até mesmo aquelas que padecem de algum tipo de enfermidade, tais como cardiovasculares, metabólicas e até mesmo, ortopédicas.

Apesar das constantes inovações, observamos que o exercício de força, conhecido simplesmente por musculação, mantém-se sempre atual, reservando espaços, e atraindo adeptos. O que no passado era destinado apenas aos interessados em grandes aumentos na massa muscular, hoje é explorado por uma grande diversidade de interessados, e com os mais diferentes objetivos.

A musculação foi desmistificada, e é hoje utilizada não apenas para hipertrofia, mas também para perda de peso, aumentos médios da força, da resistência muscular e até mesmo, com objetivos terapêuticos, como no caso dos cardiopatas, diabéticos, obesos, idosos, pessoas com osteoporose ou alguma disfunção ortopédica, entre outras.

Entretanto, o grande vilão da continuidade é o mesmo vilão da sociedade atual. A falta de tempo. Face ao grande número de atividades às quais os cidadãos são submetidos, e nem sempre flexíveis com seus horários, os cuidados pessoais, em especial com a própria saúde, são deixados de lado.

Em vista disto, a partir da década de 90, novas estratégias de prescrição de séries foram sendo sugeridas, em especial a Série Simples, onde o aluno treinava a mesma intensidade com um volume muito menor e, conseqüentemente, menor tempo na academia.

Os resultados desta estratégia ainda não são consenso, necessitando de estudos mais aprofundados quanto aos objetivos desejados e o público ao qual é direcionado.

Desta forma, buscamos comparar as alterações morfológicas e bioquímicas, normalmente buscadas por indivíduos que fazem uso desta modalidade de treinamento, em duas seriações diferentes: a clássica série múltipla e a proposta série simples. Avaliando a composição corporal, a força e a resistência muscular, o perfil lipídico, o estresse oxidativo gerado pelo treinamento, a expressão de proteínas de choque térmico e finalmente o perfil imunológico.

Acreditamos que estes sejam parâmetros que interessem tanto para indivíduos saudáveis como para aqueles que já necessitam de alguma atenção especial. Ao mesmo tempo, observamos que estes parâmetros avaliados possuem alta relação entre si, demonstrando que a modificação de um deles influencia na de outro.

## INTRODUÇÃO

### **1.1. Proteínas de Estresse**

As células são continuamente expostas a situações que causam estresse agudo ou crônico, e, para adaptarem-se a essas variações ambientais, e sobreviverem à essas injúrias, células procarióticas e eucarióticas desenvolveram durante sua evolução, diferentes redes para detecção e controle dessas formas estressoras. Uma dessas respostas é conhecida como resposta ao choque térmico (SANTORO, 2000).

O aumento da síntese de algumas proteínas, imediatamente após a célula ter sido exposta ao choque térmico, foi detectado em células da glândula salivar de *Drosophila melanogaster*, em 1962 (RITOSSA, 1962). Este grupo de proteínas que respondem ao estresse térmico (SP), está entre as mais conservadas filogeneticamente, sendo que, as proteínas que respondem ao choque térmico (HSP), principalmente os genes da família 70 (HSP-72), apresentam grande similaridade, sendo que, os genes da HSP-72 da *drosophila* são 73% idênticos ao do ser humano (HUNT E MORIMOTO, 1985). O alto de grau de conservação destas SP são de vital importância para a função universal dessas proteínas.

A síntese das HSP ocorre rapidamente após a exposição do organismo a estresses externos, térmicos ou não, com o objetivo de manter a homeostase celular e a conformação das proteínas intracelulares, bem como evitar a desnaturação e a má-formação de proteínas durante sua síntese, além de proverem a organização, translocação e ação de *chaperonas* (acompanhantes de proteínas até seus sítios definitivos; FEHRENBACH E NIESS, 1999).

Em células de mamíferos, a indução da resposta ao choque térmico requer a translocação para o núcleo, de um ou mais fatores de transcrição, os quais controlam a expressão de genes específicos, como as HSP citoprotetoras.

Diversas condições fisiopatológicas podem estimular a resposta ao choque térmico, e contribuir, desta forma, para a estabilização de um estado citoprotetor em uma variedade de agentes agressores, tais como inflamações, infecções, isquemia, estresse oxidativo, exercício físico intenso, além de várias doenças humanas (SANTORO, 2000; FEIGE ET AL, 1996; LOCKE E NOBLE, 1995).

A regulação da expressão dos genes HSP, em células eucarióticas, requer a ativação e translocação de uma proteína regulatória para o núcleo, o fator de choque térmico (HSF), o qual reconhece uma seqüência de elementos no promotor do gene HSP, referida como elemento de choque térmico (HSE). O HSE consiste de uma série de unidades pentaméricas. Uma unidade funcional HSE consiste de pelo menos três pentâmeros, e unidades pentaméricas adicionais resultam em uma interação de maior afinidade entre o HSF e o HSE. Nos promotores dos HSP-70 e HSP-90, o HSE é composto, respectivamente, por cinco e seis unidades pentaméricas (SANTORO, 2000).

## **1.2. HSP, Estresse Oxidativo e Exercício Físico**

O exercício físico intenso promove o aumento de vários fatores indutores da expressão de HSP, tais como hipertermia, isquemia, oxidação biológica, estresse muscular, aumento de citocina, depleção de glicose, além de alterações no pH e nas concentrações de cálcio intracelulares. Estes achados levaram à descoberta de dois tipos de proteínas homólogas, mas que respondem a estímulos diferentes: as HSP, que são estimuladas por choque térmico e outros agentes estressores, e, as GRP (proteínas reguladas pela glicose), que são induzidas pela falta de glicose, anoxia, ionóforos de cálcio, entre outros, mas que não são induzidos por choque térmico (PELHAM, 1986; WELCH ET AL, 1983).

O processo de trimerização e ligação ao DNA ocorrem pela ativação de HSF, onde o HSF1 é ativado minutos após o choque térmico, hipóxia, depleção do ATP, alterações no pH, inibidores metabólicos, e exercício. O HSF2 é ativado por hemina e parece regular a expressão de HSP durante diferenciação celular e desenvolvimento (BENJAMIN ET AL, 1991; PETRONINI ET AL, 1992; LOCKE ET AL, 1995).

A ativação de HSF induzida por exercício, é observada em corações de ratos com a mesma similaridade da ativação do HSF em corações de animais submetidos ao choque térmico (LOCKE ET AL, 1995). A hipertermia induzida pelo exercício pode causar desacoplamento mitocondrial, e desta forma, elevar as concentrações de ubisemiquinona aumentando a geração de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). O  $O_2^{\cdot-}$  e o subsequente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) podem ser os agentes da expressão de HSP72 e outras SP (SALO ET AL, 1991). A adaptação oxidativa promovida pelo exercício físico aeróbio, induzida pela maior atividade de agentes anti-oxidantes endógenos, já é bem

conhecida (POWERS et al., 1999; JENKINS, 1988), e essa diminuição, principalmente de ânions superóxido, pode ser responsável pela redução da expressão de HSP em indivíduos com treinamento físico regular (BENONI et al., 1995). O treinamento físico regular diminui a expressão de HSP27-, HSP72 e a contagem de leucócitos positivos para HO-1 (Fehrenbach et al, 1998; Niess et al, 1999). Este fato pode ser devido a uma redução do grau de estresse oxidativo causada pela adaptação ao exercício, talvez por outros mecanismos antioxidantes endógenos.

Schneider et al. (2005) compararam indivíduos não-treinados e treinados e observaram que estes últimos apresentavam menor lipoperoxidação em diferentes intensidades de treinamento, além de uma maior atividade enzimática antioxidante avaliada nos eritrócitos.

Está demonstrado que todo sistema de defesa antioxidante (endógeno e exógeno) atua em cooperação promovendo proteção ao organismo (PAL YU, 1994). Também está bem estabelecido que o estresse oxidativo ocorre em exercícios de alta intensidade (EBBELING AND CLARKSON, 1989; LOVLIN et al., 1987), entretanto, permanece por ser melhor esclarecida qual é esta intensidade e relacioná-la com o nível de condicionamento físico dos atletas submetidos às diferentes intensidades.

Já a atividade anaeróbia ainda não está bem estudada. Muitos aspectos sobre a influência do treinamento anaeróbio sobre a expressão de HSP e estresse oxidativo ainda necessitam de estudos mais aprofundados.

O treinamento de musculação, com objetivos de ganho de força e hipertrofia, são exercícios anaeróbios e causam estresse muscular e dano às membranas celulares, fatores estes associados ao aumento da expressão de SP, mesmo por que, também se sabe que o estado físico das membranas celulares pode controlar a expressão dos genes de HSP (VIGH et al., 1998).

O tipo de treinamento utilizado para se obter maiores ganhos de força, hipertrofia, e melhor composição corporal, vêm sendo discutidos. Alguns autores (HASS et al., 2000; BERGHOLM et al., 1999) defendem a opinião de que o treinamento utilizando séries simples obteriam o mesmo rendimento do que os treinamentos utilizando séries múltiplas, e com a vantagem de ganho de tempo.

Hass et al. (2000) mostraram que indivíduos praticantes de musculação obtiveram os mesmos resultados em aumento de força muscular, hipertrofia muscular esquelética, melhora no condicionamento físico e composição corporal, utilizando séries simples, com treinamentos a 75% da carga máxima, quando comparados com indivíduos utilizando o mesmo treinamento, porém com séries múltiplas.

Entretanto, a possível participação das HSP como marcadores do grau de condicionamento físico permanece por ser estudada.

Foi ainda observado que o perfil lipídico também apresenta melhora em indivíduos submetidos à programas de exercícios de força.

A análise do perfil lipídico é um importante instrumento para prevenção de doenças cardiovasculares. O colesterol total e suas frações nos oferecem diferentes informações acerca do perfil lipídico. O HDL-C exerce a função de remoção das moléculas de colesterol da periferia, as quais são indutoras do processo de aterosclerose. Já está bem estabelecido que a fração HDL-C aumentada oferece efeito protetor anti-aterosclerótico, da mesma forma que a fração LDL-C aumentada é fator de risco para o desenvolvimento e progressão desta enfermidade. Entretanto, a fração HDL-C pode oferecer melhor avaliação dos fatores de risco do que a fração LDL-C (PITANGA, 2001). Indivíduos com baixos valores de HDL-C parecem estar mais propensos a doenças isquêmicas do que aqueles que apresentam altos valores de LDL-C. Os valores de HDL-C alto oferecem efeitos protetores independente dos valores de colesterol total

e/ou sua fração LDL-C. O exercício físico exerce influência sobre perfil lipídico. Exercícios aeróbios de intensidade baixa a moderada modulam favoravelmente o perfil lipídico, pois aumentam a atividade da lipoproteína lipase induzindo o aumento dos níveis de HDL-C. Embora já bem demonstrado os efeitos do exercício aeróbio no perfil lipídico, os resultados desses efeitos induzidos por exercícios de força ainda são muito controversos.

### **1.3. Exercício Físico e Perfil Imunológico**

O corpo humano tenta, continuamente, manter a homeostase pela neutralização das atividades de organismos produtores de doenças, chamados de patógenos, ou suas toxinas. A habilidade do organismo em combatê-los é denominada de resistência, e esta, pode ser dividida em específica (imunidade, anticorpos) ou inespecífica (variedade de respostas contra a invasão do patógeno). Já a vulnerabilidade ou a perda destas resistências, chama-se suscetibilidade (TORTORA, 2000). O balanço entre a resistência e a suscetibilidade nos dá o perfil imunológico do organismo.

A influência do exercício físico no perfil imunológico de seres humanos é bastante variável, e descrito como dependente da intensidade, embora ainda não definitivamente explicado.

O exercício pode afetar a função imunológica de atletas, e desta forma, torná-los mais suscetíveis à infecções. Além disso, o treinamento durante períodos de incubação de doenças infecciosas poderia agravar o curso dessas doenças. Estes episódios são sugeridos pela diminuição da relação das células *T-helper*/*T-supressoras*,

do número de células *natural killer* (NK), e nos níveis de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), encontrados em atletas adultos após exercícios prolongados (WOLACH et al., 1998).

Já é bem conhecido que o exercício físico extenuante (maratonas, triatlon) é imunossupressor, e este efeito pode permanecer por horas, ou até mesmo dias, após a execução do exercício (NIEMAN,1997; NEHLSSEN-CANNARELLA et al., 1997), entretanto o seu mecanismo ainda não está bem conhecido. Da mesma forma, o exercício agudo também diminui a atividade imunológica, além de manter baixos os níveis de glutamina e outros marcadores do sistema imunológico por várias horas após a atividade física.

Exercícios intensos e de longa duração utilizam oxidação de aminoácidos para a ressíntese de ATP, embora esta não seja a principal fonte de energia, e a quebra desses aminoácidos promove um aumento na concentração de amônia plasmática. Por outro lado, a glutamina é um dos aminoácidos mais abundantes encontrados no músculo esquelético e o aumento da síntese e liberação da glutamina pelos músculos durante o exercício, pode ocorrer como recurso para prevenção do acúmulo de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e conseqüente intoxicação das células musculares esqueléticas (WILLIAMS et al., 1998; GUEZENNEC et al., 1998). Isto porque a glutamina é o principal meio de transporte de amônio em direção aos rins, onde é eliminado e aumentos na metabolização de aminoácidos tendem a aumentar o fluxo de glutamina para os rins através da incorporação de amônio a glutamato com geração de glutamina (CURI, 2000).

Babij et al. (1983), utilizando cicloergômetro na intensidade de 100% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , observaram que a concentração plasmática de glutamina aumentava no decorrer do exercício, fato este, corroborado por Curi (2000) avaliando esta concentração em

exercícios a 75% do  $VO_{2\ max}$  por 75 minutos. Estes pesquisadores observaram que existia uma correlação linear entre a intensidade do exercício e o aumento da concentração de glutamina no plasma. Também foi observado que esta concentração aumentada declina rapidamente nos primeiros 10 minutos após o término do exercício.

Já atletas de maratonas e praticantes de atividades intensas ou moderadas, mas por um longo tempo, apresentam diminuição das concentrações plasmáticas de glutamina ainda durante a prática da atividade. A concentração plasmática de glutamina em atletas com overtraining também foi diferente da encontrada em atletas com treinamento balanceado e período de recuperação adequado (CURI, 2000). Exercícios de moderada duração e com intensidade menor do que 60% do  $VO_{2\ max}$  estão associados com menor perturbação e menor estresse ao sistema imunológico, quando comparados com exercícios extenuantes e de longa duração (NIEMAN, 1997).

Entretanto, a performance imunológica durante os períodos de recuperação ainda não está esclarecida. Particularmente, o papel das HSP na citoproteção de células do sistema imunológico, durante o período de recuperação e após o programa de condicionamento físico, permanece por ser estudado.

Assim, conforme observamos, existem lacunas acerca da influência do treinamento de força, em especial nas diferentes seriações, sobre os padrões morfológicos e de desempenho, bem como em padrões bioquímicos, como a expressão de HSP, o estresse oxidativo, o perfil imunológico e o perfil lipídico.

Desta forma estabeleceremos nossas hipóteses.

#### **1.4. Hipóteses a Serem Testadas**

1. Como o exercício físico de musculação melhora a composição corporal e o desempenho de seus praticantes, nossa hipótese é que o treinamento em série simples, na intensidade proposta, também produza esses efeitos nos praticantes sem propiciar lesões musculares características do esforço suprafisiológico (como o observado nas séries múltiplas).
2. Se o exercício de musculação é capaz de diminuir o percentual de gordura de seus praticantes, nossa hipótese é que este percentual de gordura diminuído melhore o perfil lipídico dos praticantes.
3. Tendo em vista que os efeitos do treinamento físico envolvem adaptação e conseqüente redução da expressão de HSP, e considerando-se que foi verificado que o treinamento físico aeróbio em humanos reduz a expressão de HSP em leucócitos, é nossa hipótese que a expressão de HSP sirva como marcador do condicionamento físico, bem como de monitorador da intensidade do trabalho objetivado.
4. Como a expressão de HSP está associada à citoproteção e durante o treinamento físico ocorre adaptação na expressão de HSP em leucócitos, é possível que a produção de HSP esteja relacionada às alterações na resposta imunológica, como observada em indivíduos treinados aerobicamente.

## **1.5. Objetivos**

1. Comparar as alterações da composição corporal, através da massa total, do IMC, do percentual de gordura e massa magra, frente aos treinamentos propostos.
2. Comparar as alterações da força e da resistência muscular frente aos treinamentos propostos.
3. Comparar as alterações no perfil lipídico induzidos pelos diferentes sistemas de seriações no treinamento de musculação.
4. Avaliar o estresse oxidativo nos praticantes de musculação nas diferentes seriações.
5. Avaliar se os treinamentos propostos promovem adaptação na expressão de HSP70.
6. Avaliar as possíveis alterações do perfil imunológico dos praticantes de musculação nas diferentes seriações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **2.1. Amostra:**

Foram convidados a participar deste projeto, e selecionados, indivíduos adultos jovens do sexo masculino (n= 9 por grupo), com faixa etária entre 18 e 35 anos, saudáveis, isto é, que não apresentassem nenhuma enfermidade ósteo-muscular ou metabólica conhecida, não fumantes, não obesos, que não ingerissem bebidas alcoólicas em excesso, não possuíssem distúrbios alimentares, nem estivessem em dieta para ganho ou perda de peso, e nem fizessem uso de drogas (lícitas ou ilícitas). Também era importante que não estivessem praticando nenhum tipo de treinamento físico regular há pelo menos 40 dias.

A amostra foi oriunda de projetos implantados na Universidade do Vale do Rio dos Sinos (Unisinos), academia de musculação da ESEF-UFRGS, e de academias particulares.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unisinos. Estando de acordo com as considerações éticas da para pesquisas com seres humanos R. 196/96.

### **2.1.1. Protocolo de Treinamento**

Os treinamentos de musculação foram realizados em séries simples (SS) ou múltiplas (SM), a 75% da carga máxima (CM), objetivando hipertrofia muscular, e tiveram a duração de doze semanas. Os treinamentos foram realizados sempre no final da manhã e os voluntários eram aconselhados a não treinar em jejum.

Os indivíduos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos a seguir:

Grupo 1: Musculação, hipertrofia muscular (75% CM), em séries simples (SS);

Grupo 2: Musculação, hipertrofia (75% CM), em séries múltiplas (SM);

### **2.1.2. Programa de Treinamento**

Os exercícios utilizados nos programas de musculação foram os seguintes: supino reto (peitoral maior e tríceps); voador (peitoral maior); desenvolvimento frente (deltóide tríceps); rosca bíceps direta (bíceps braquial e braquial), roldana alta costas (grande dorsal, bíceps e adutores das escápulas) extensão de pernas (quadríceps), e pressão de pernas (quadríceps e glúteo), realizados 3 vezes por semana, durante doze semanas, e com incremento da carga de trabalho a cada 4 semanas. Os exercícios estão demonstrados em anexo, com o título Guia dos Movimentos.

Os indivíduos iniciaram o programa de condicionamento físico adequado a cada grupo. Antes e após o programa de doze semanas de treinamento, os indivíduos foram submetidos a avaliações cineantropométricas, de desempenho e coleta de sangue para análises bioquímicas.

### **2.1.3. Avaliação Cineantropométrica**

A avaliação cineantropométrica com o objetivo de medir a densidade corporal, o peso (massa total), o índice de massa corporal (IMC), o percentual de tecido gordo e magro, a hipertrofia muscular, a massa óssea, e o somatotipo, foi realizada através de medidas de dobras cutâneas com compasso científico, precisão de 0,1mm (Cescorf), circunferências de braço, tórax e coxa, com trenas milimetradas, peso (massa) com balança de precisão de 0,1 kg (Filizola) e altura com estadiômetro, precisão de 0,1mm.

### **2.1.4. Avaliação de Força e da resistência Muscular**

A avaliação da força muscular localizada foi realizada antes do início e após o final do programa de treinamento físico. Foi obtida através do teste de carga máxima, o qual é o resultado de uma única contração máxima possível com determinada carga. Estabeleceu-se como critério de maximalidade o exercício ser feito corretamente, dentro

de um tempo máximo de execução (fase concêntrica e fase excêntrica) de 3 segundos. A resistência muscular foi obtida após as 12 semanas de treinamento, verificando o número de repetições realizadas, utilizando-se a carga máxima obtida no primeiro dia de teste (FLECK E KRAEMER, 1999). O critério de repetição aceita obedeceu ao mesmo utilizado para o teste de carga máxima.

## **2.2. Análise Bioquímica**

### **2.2.1. Reagentes e Soluções**

*PBS* - Phosphate-buffered saline, NaCl 136,8 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mM em água milliQ, pH 7,4.

*Solução Hanks I* - NaCl 136,8 mM, KCl 5,4 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, HEPES 1 mM, EGTA 1 mM e albumina bovina (BSA, fração V, Sigma) 2 g/l em água destilada. Antes da adição do BSA, a solução foi gaseificada por 10 min em corrente de carbogênio (5% CO<sub>2</sub> /95%O<sub>2</sub>) tendo tido o pH ajustado para 7,4 com NaOH 10 M.

BHT (butylated hydroxytoluene, MW 220,4 g/mol) 65 x (29,5 mM) em etanol = 6,5 mg em 1 mL de etanol absoluto. Usar 10 µl por ensaio (10 µl/650 µl finais; 1:65; conc. final 0,454 mM = 0,01% m/v).

TCA 30% (ácido tricloroacético, 30 g/100 mL em água milliQ),

TBA 0,73% (ácido tiobarbitúrico, 730 mg/100 mL de água milliQ),

Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (FW 121,1 g/mol) = 12,11 mg de Tris base grau biologia molecular/10 mL em água milliQ; o pH foi acertado com HCl concentrado.

*Outros materiais e reagentes analíticos* - Os demais reagentes analíticos utilizados foram de procedência da Sigma Chemical Co. (P.O BOX 14508 St. Louis, MI, 63178 USA), Merck (Darmstadt, DR), Boehringer (Mannheim, DR), GIBCO (Scotland, UK), Ecibra Ind. e Com. de Produtos Químicos Ltda. (São Paulo) e Reagen (Rio de Janeiro) conforme indicado em cada caso. Todas as enzimas utilizadas foram obtidas junto à Sigma ou Boehringer.

### **2.2.2. Coleta de Sangue e Preparação de Leucócitos**

Nos momentos indicados, foram coletados 20 mL de sangue da veia intermédia do antebraço, em tubos citratados. Destes, 4 mL foram reservados e centrifugados a 16.000 x g por 30 segundos e separados os eritrócitos, e congelados para posterior análise. O sangue restante foi, imediatamente, centrifugado a 800 x g por 20 minutos à temperatura ambiente, em gradiente descontínuo de histopaque, conforme orientação do fabricante. Após a centrifugação a interface nebulosa contendo os leucócitos mononucleares foi coletada e lavada com PBS a 1000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado celular foi ressuspensão em meio de cultura RPMI 1640 e as células plaqueadas em garrafas ou placas estéreis para cultura a fim de se permitir a adesão de monócitos por 2 horas. Depois, o sobrenadante contendo essencialmente linfócitos foi reservado para posterior análise.

### 2.2.3. Hemólise de Eritrócitos Contaminantes

Para a remoção de eritrócitos contaminantes de preparações de linfócitos e macrófagos, as suspensões celulares brutas foram centrifugadas ( $1000 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ ) e os precipitados celulares ressuspensos em 10 mL (por  $10^7$ - $10^8$  células) do tampão Tris 17 mM/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  144 mM pH 7,4 e mantidos em banho de gelo no referido tampão por 5 min. Em seguida, as suspensões foram diluídas a 1:5 com 40 mL de PBS a  $4^\circ\text{C}$  e centrifugadas novamente. Este tipo de protocolo garante preparações celulares virtualmente isentas de eritrócitos, prestando-se, portanto, ao estudo acurado do metabolismo da glutathione, quando hemácias contaminantes representariam fonte considerável de erro.

### 2.2.4. Determinação do Conteúdo Intracelular de GSH e GSSG

Para a determinação dos conteúdos intracelulares de glutathione (GSH) e dissulfeto de glutathione (glutathione "oxidada", GSSG), foi utilizada uma técnica adaptada daquela descrita em Kolberg *et al.* (2005). Eritrócitos coletados de amostras de sangue periférico foram lavados duas vezes em PBS ( $4^\circ\text{C}$ ) e imediatamente rompidos em 200  $\mu\text{l}$  de ácido metafosfórico 5% (m/v) com homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (=DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de Anderson (1985). A rápida homogeneização das células em meio ácido é um passo de extrema importância

para a inativação das tiol-transferases e  $\gamma$ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo. Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (ANDERSON, 1985; AKERBOOM & SIES, 1981). Por outro lado, apesar de a auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixas (menos de 1% da concentração de GSH), o processamento das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais (AKERBOOM & SIES, 1981). A primeira parte do ensaio consistiu na determinação do conteúdo de glutathiona "total" (GSH+ GSSG) medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi, então, monitorada a 412 nm ( $\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Alternativamente, pode-se monitorar a taxa de consumo de NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ou fluorimetricamente (excitação a 366 nm/emissão de 400-3000 nm). O método empregado é bastante sensível, específico e reprodutível. Contudo, como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH+GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, podem levar, invariavelmente a falsos resultados. Por isso, além de ter sido utilizada sempre uma curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmol) com padrão de GSH precisamente preparado a cada ensaio, foram efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo os resultados obtidos idênticos aos observados para as amostras

separadamente. O ensaio foi iniciado pela adição de 10  $\mu\text{L}$  de amostra (em MPA 5%), 75  $\mu\text{L}$  de DTNB 14,1 mM (concentração final no ensaio 9,87 mM) em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5) e 10  $\mu\text{L}$  de NADPH 1,7 mM em  $\text{NaHCO}_3$  0,5% (concentração final 0,17mM). A reação teve início com a adição de 10 $\mu\text{L}$  de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/mL) sob agitação e as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 415 nm por cerca de 3 min num volume final 105  $\mu\text{L}$  em microplacas de 96 wells (0,232 cm de caminho óptico) a 37°C, em leitora termostaticada (Biorad mod. Benchmark, USA) com aquisição direta e processamento cinético automático.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" foram retiradas para conjugação da GSH presente com N-etilmaleimida (NEM, Fluka) segundo metodologia descrita em Akerboom & Sies (1981). Foram adicionados, então, 35  $\mu\text{L}$  de NEM 200 mM (concentração final 50 mM) diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura foi neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de KOH 2M em tampão de ácido piperazina-N,N'-bis-(etanossulfônico) (=PIPES, Boehringer, pKa= 6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. A inclusão de PIPES, ou outros agentes tamponantes como MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico), previne alcalinização local, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que, em concentrações tão baixas quanto 10  $\mu\text{M}$  inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% foi efetuado por extração com 500  $\mu\text{L}$  de acetato de etila 3 vezes, tendo o excesso de solvente sido evaporado em concentrador SpeedVac e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 25  $\mu\text{L}$  de amostra foram ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH, exceto que as

amostras foram inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorvância a 340 nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois, foi adicionado o DTNB, e as leituras, a 415 nm (produção de TNB) foram acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutathiona "total" e GSSG forneceu os valores dos conteúdos de GSH procurados:

$$[\text{GSH}] = \text{GSH total} - 2[\text{GSSG}]$$

## **2.2.5. Análise das Substâncias Reativas ao Ácido**

### **Tiobarbitúrico (TBARS)**

Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativo de peroxidação lipídica (a lipoperoxidação produz malondialdeído, MDA, que reage com o TBA formando um composto de cor rósea), 2 mL de sangue periférico citratado foram centrifugados (16.000 x g por 30 segundos à temperatura ambiente) e a papa de hemácias separada e diluída 1:3 com solução de Tris 10 mM. Desta suspensão foram reservados 250 µL de amostra (aproximadamente 40 µg de proteína) em tubo Eppendorf de 1,5 mL com furos na tampa, 200 µL de TCA 30%, 200 µL de Tris-HCl, foram centrifugados a 2500 x g por 10 minutos a 4°C, sendo posteriormente coletado 440 µL do sobrenadante. Foram adicionados 200 µL de TBA, 10 µL de BHT. Este material foi fervido a 100°C por 15 min., e lido espectrofotometricamente a 535 nm, diretamente contra mistura contendo 50 µL de água, 200 µL de TCA, 200 µL de Tris-HCl, 10 µL de BHT e 200 µL de TBA fervido paralelamente.

**Cálculos:**  $A_{535 \text{ nm}}/0,156 = \text{nmol de equivalentes de MDA/mL/cm}$ ;

Portanto, multiplicando-se pelo volume final na leitora de ELISA, obtém-se a quantidade de equivalentes de MDA presente nos 250  $\mu\text{L}$  ensaiados. Assim, não há necessidade de correção para as diluições no espectrofotômetro e a quantidade de equivalentes de MDA é dada por:

- **NA LEITORA DE ELISA ( 0,442  $\text{cm}^*$ , 200  $\mu\text{L}$ ) =**

$$\text{MDA (nmol/mg de proteína)} = A_{535 \text{ nm}} \times (650 \mu\text{L} / 440 \mu\text{L}) \times (450 \mu\text{L} / 440 \mu\text{L}) / (0,01379 \times 0,050 \text{ mL} \times \text{conc-prot}) =$$

$$= A_{535 \text{ nm}} \times 0,52088 / (0,01379 \times 0,050 \text{ mL} \times \text{conc-prot}) = \mathbf{A_{535 \text{ nm}} \times 37,77 / (0,050 \text{ mL} \times \text{conc-prot})}$$

ONDE conc-prot = concentração de proteínas em mg/mL.

\*Caminho óptico com placas de fundo chato = 0,221 cm/100  $\mu\text{L}$ .

## **2.2.6. SDS-PAGE e *Western blotting* para HSP-70**

Para análise da expressão de HSP70, os leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) do sangue periférico foram coletados e preparados conforme

descrito na seção 3.2.2., 6 horas após o término das atividades físicas, e 72 horas após a finalização do programa de treinamento físico (12 semanas). Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteína (cerca de 30 µg, determinada pelo método Bradford, abaixo) foram separadas durante 4 h (a 15 mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3, usando-se 1 cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β-mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Kolberg et al. (2005) e Santoro et al. (1989). Como marcador de peso molecular foi utilizada a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (BIO-RAD Kaleidoscope Polypeptide Standards) com as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), fosforilase *b* (92,5 kDa), BSA (69 kDa), ovalbumina (46 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e lisosima (14 kDa). Depois das corridas, os géis foram destacados das placas de suporte, tendo os géis de separação sido removidos dos géis de entrada (de empilhamento).

Após as corridas os géis foram corados e fixados sob agitação contínua com solução de Azul Comassie Brilhante 0,1% (m/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) durante 20 min e submetidos a descoloração com agitação por cerca de 2 h em solução de ácido acético glacial a 5% (v/v) até que fossem evidenciados os padrões de peso molecular (ainda fortemente corados contra o fundo já parcialmente descorado dos géis). Os géis foram, então, transferidos para filtro de papel Whatman 3MM, envoltos em película de PVC e secos a 80°C por 2 h em secador de géis BIO-RAD Gel Dryer a

vácuo programável. Depois de secos, os géis corados foram submetidos a densitometria no equipamento (Amersham Pharmacia Biotech) Video Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens.

As amostras contidas em géis destinados a processamento por *Western blotting*, como descrito em Elia & Santoro (1994), foram transferidas diretamente para membranas de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 70 V até um total de 150 V x h. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, foram evidenciadas pela coloração com Vermelho Ponceau, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM). Antes do “immunoblotting”, os filtros de nitrocelulose foram bloqueados com BSA a 1% (m/v) em água a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos ao filtro. Para o *Western blotting* das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 18 h sob agitação enérgica em tampão TEN-Tween 20 a 0,05% (v/v) na presença de anticorpo monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (Amersham), diluído a 1:1000, que reage especificamente com o polipeptídeo de 73 kDa, HSP73 (ou HSC70, proteína constitutiva) e com o de 72 kDa, HSP72 (ou HSP70 forma induzível). Depois disso, os filtros foram lavados três vezes sob agitação por 10 min com 5 mL de TEN-Tween e incubados por 1 h com 5 mL de solução contendo o segundo anticorpo, IgG RPN 1177 (de cabra, contra imunoglobulinas de camundongo, biotilado, Amersham) em TEN-Tween sob agitação. Depois disso, repetiu-se a lavagem dos filtros, como descrito acima e os filtros foram submetidos a reação com o segundo-anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (Sigma) sob agitação por 1 h

adicional. Após nova lavagem, as membranas foram submetidas a reação com o revelador 4-Cl-Naftol (BIO-RAD) em tampão contendo NaCl 83 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,4 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,15%. Imediatamente após o aparecimento das manchas de interesse com boa resolução, os filtros foram retirados do revelador, lavados com água a fim de evitar-se superexposição e submetidos a secagem em estufa por 30 min a 37°C. Conforme a necessidade em cada caso, as manchas foram registradas digitalmente (VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e as imagens analisadas para os cálculos posteriores.

### **2.2.7. Determinação das Concentrações de Proteínas nas Amostras Analisadas**

Para determinação das concentrações de proteínas nas amostras, quando demandado em cada caso, foram utilizados os métodos de Bradford (1976), conforme indicado. Nas determinações, foram utilizadas como padrão de referência, soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). O método de Bradford é baseado na ligação do Azul Comassie Brilhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5% (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm (BIO-RAD Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, GmbH, DR) e apresenta, na faixa de algumas dezenas de microgramas de proteína ensaiada, sensibilidade um pouco maior que o método de Lowry *et al.* Este, por sua vez, baseia-se na ligação do reagente de Folin-Ciocalteu a hidroxilas fenólicas presentes em amostras protéicas hidrolisadas previamente em meio alcalino, com

formação de complexo cromogênico que pode ser monitorado espectrofotometricamente a 750 nm.

### **2.2.8. Análise da Função Imunológica**

Vários parâmetros poderiam ter sido utilizados para avaliar-se a função imunológica das células obtidas dos voluntários. Optou-se pela análise em monócitos circulantes do índice de capacidade fagocítica dos macrófagos avaliados pela fagocitose de Zimosan. Nesta técnica, os macrófagos isolados fagocitam partículas de Zimosan (*Saccharomyces cerevisiae* opsonizados com sistema complemento do soro dos próprios voluntários) são contados, em microscópio óptico e o número de macrófagos contendo, no seu interior, pelo menos duas partículas fagocitadas, foi anotado.

Para preparação do Zimosan (sempre a fresco; no dia do experimento) 50 mg de Zimosan foram diluídos em 100 mL de PBS (concentração 0,50 mg/mL) e fervidos por 30 min. Foram lavados 3 vezes (15.000 x g por 10 segundos) à temperatura ambiente. Os *pellets* (Zimosan) foram reservados e os sobrenadantes descartados. O precipitado final foi ressuspensão com PBS para uma concentração de 40 X a concentração inicial (em torno de 1 mL para cada 20 mg iniciais = 50 µL para cada mg inicial de Zimosan).

Para opsonização com complemento (presente no soro), 0,5 mL de suspensão de partículas de Zimosan (a 20 mg/mL, acima) foram misturados em partes iguais (0,5 mL) com soro homólogo e incubados por 30 min a 37°C em banho-maria com agitação. Centrifugados e lavados 3 vezes (15.000 x g por 10 s no instantâneo das

microcentrífugas à temperatura ambiente). A preparação opsonizada de Zimosan foi ressuspendida em 5 mL de HBSS contendo BSA defatado a 2% m/v (20 mg/mL finais em termos de BSA).

### **2.2.8.1. Ensaio de Fagocitose**

#### MONÓCITOS/MACRÓFAGOS:

As células foram colocadas dentro de placas de 6 wells para cultura contendo lamínulas de vidro para microscópio 20x20 mm.

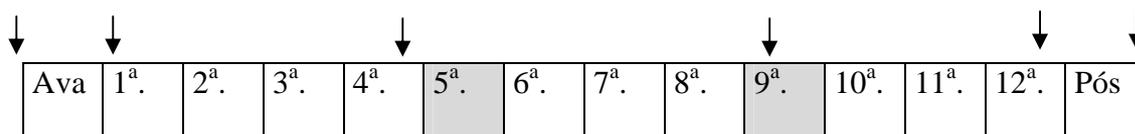
As células ( $5 \times 10^5$  monócitos/macrófagos no total ou 2 mL de suspensão fresca a  $2,5 \times 10^5$  células/mL) foram deixadas por 30 min em estufa incubadora a 37 °C em meio RPMI1640 contendo SFB a 10% (v/v) para aderirem ao vidro. Após a adesão dos macrófagos, o meio foi aspirado e substituído por 1 mL de HBSS pré-aquecido contendo BSA defatada a 2% (m/v) para iniciar o ensaio da fagocitose. Foi adicionado Zimosan opsonizado (pré-aquecido por 10 min a 37°C) num volume equivalente a 10% do volume de meio presente nas placas (por exemplo 200 µL para 2 mL de meio contendo BSA defatado) e misturado com o meio que continha as células (pré-aquecidas por 10 min a 37°C) e incubadas por mais 30 min a 37 °C sob agitação. A fagocitose foi interrompida colocando-se as placas de cultura (contendo as células) em gelo por 10 min e, depois, contando-se as partículas fagocitadas. A visualização das partículas fagocitadas foi feita através de microscópio. Foram contadas um total de 50 células e considerados para fagocitose a presença de 2 ou mais partículas de Zimosan por célula.

### **2.3. Protocolo Experimental**

Os indivíduos selecionados foram submetidos a anamnese clínica e nutricional. Concomitante a anamnese nutricional foi solicitado o preenchimento de um registro alimentar de três dias, a fim de se fazer uma melhor avaliação nutricional e observar possíveis interferências nutricionais na nossa análise. Os voluntários foram orientados a manter uma dieta normal. A fim de observarmos o comportamento nutricional dos nossos voluntários, repetiu-se o registro nutricional de três dias, entre a quinta e a sexta semana de treinamento.

Como complemento da avaliação clínica, foi solicitado o preenchimento do questionário Par-Q (em anexo), e, a fim de comprovar o adequado estado de saúde dos voluntários, foram solicitados exames laboratoriais sendo comum a todos: um hemograma completo, um teste de velocidade de hemossedimentação, além da análise do perfil lipídico, o qual foi utilizada para posterior análise.

Para avaliação da evolução física, os indivíduos foram avaliados dois momentos distintos: previamente ao início, e ao final do programa de treinamento físico. Para a avaliação bioquímica foram coletados 20 mL de sangue venoso (conforme descrito na seção 2.2.2.), antes do início das avaliações (avaliação controle), imediatamente após: o primeiro dia de treinamento (estresse agudo), o final da quarta semana (adaptação a intensidade treinada), o primeiro dia da nona semana (estresse agudo para nova carga em indivíduo treinado), o final da décima segunda semana (adaptação de carga e final do treino), e após final do programa de treinamento físico (verificação sem a influência do treinamento) (conforme tabela abaixo).



*As setas marcam as coletas de sangue, e as áreas sombreadas as semanas onde houve incremento de carga.*

## 2.4. Análise Estatística

Para análise estatística, os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média para cada fenômeno estudado.

Os resultados de evolução de cada grupo foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, complementado com teste de Tukey.

Os fenômenos que comparavam apenas os valores iniciais com os valores finais foram analisados através de teste "t" de Student bicaudado para dados pareados.

As diferenças entre os grupos foram comparadas com o teste "t" de Student para dados pareados e não-pareados, dependendo do caso.

As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou um risco  $\alpha$  para erro do tipo I de, no máximo,  $p \leq 0,05$ .

Foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.06 para Windows, como ferramenta computacional para a análise estatística dos dados.

## RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi feita de acordo com os fenômenos estudados em cada grupo experimental, sendo estes sorteados em grupo Séries Simples (SS) com idade média de  $20 \pm 2,2$  anos, e grupo Séries Múltiplas (SM) com idade média de  $22 \pm 4,6$  anos. Não houve diferença estatística de idade entre os dois grupos testados ao acaso.

Serão apresentados os resultados da análise da composição corporal e do perfil lipídico, do desempenho muscular, do estresse oxidativo, da expressão de HSP e do perfil imunológico.

Os dados estão expressos em termos da média  $\pm$  erro padrão da média.

### ***3.1. Composição Corporal***

Para análise da composição corporal foram utilizadas as medidas do peso (massa total), percentual de gordura e de massa magra, obtidos através das medidas das dobras cutâneas e massa corporal. Foi ainda observado o resultado da alteração do percentual de gordura.

Os resultados foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (n=9 por grupo) e avaliados através de teste  $t$  de Student pareados ou não pareado, dependendo da situação.

### **3.1.1. Peso (massa total):**

O grupo que treinou em Série Simples iniciou com peso de 69,7 kg  $\pm$  3,2 e finalizou com peso de 69,8 kg  $\pm$  3,6, não sendo esta diferença considerada significativa ( $p > 0,05$ ).

O grupo que treinou em Série Múltipla iniciou com peso de 67,3 kg ( $\pm$  3,1) e finalizou com peso de 67,8 kg ( $\pm$  2,8), não sendo esta diferença considerada significativa ( $p > 0,3$ ).

Não existe diferença entre os grupos quando comparados os resultados iniciais e finais ( $p > 0,5$ ) (fig 01).

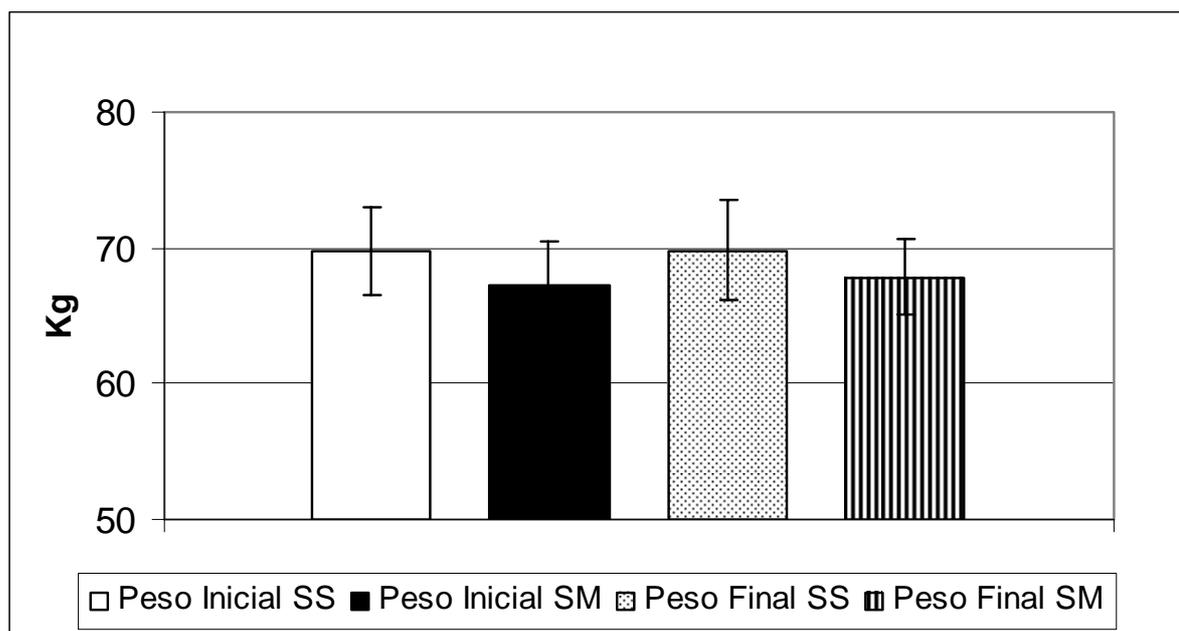


Figura 01: Avaliações dos pesos iniciais e finais dos grupos SS e SM.

Foi realizado teste t de Student pareado e não pareado, respectivamente. Não há diferença entre os valores iniciais e finais intragrupos e nem tampouco intergrupos.

### 3.1.2. Índice de Massa Corporal - I M C

Apesar de existirem inúmeras maneiras de se avaliar o ganho de massa magra em relação à massa total durante o treinamento físico, o índice de massa corporal (IMC) ainda é considerado de boa robustez e foi utilizado no presente estudo. Trata-se da relação entre a massa em quilogramas pelo quadrado da altura em metros, de sorte que as medidas aqui mostradas são dadas em  $\text{kg/m}^2$ .

O grupo que treinou em Série Simples iniciou com IMC de  $22,9 \pm 0,6 \text{ kg/m}^2$  e finalizou com IMC de  $22,9 \pm 0,8 \text{ kg/m}^2$ . Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

O grupo que treinou em Série Múltipla iniciou com IMC de  $21,6 \pm 0,7 \text{ kg/m}^2$  e finalizou com IMC de  $21,8 \pm 0,5 \text{ kg/m}^2$ . Não houve diferença significativa ( $p > 0,5$ ).

Assim, conclui-se que não existe diferença entre os grupos quando comparados os resultados iniciais e finais ( $p > 0,5$ ) (fig 02).

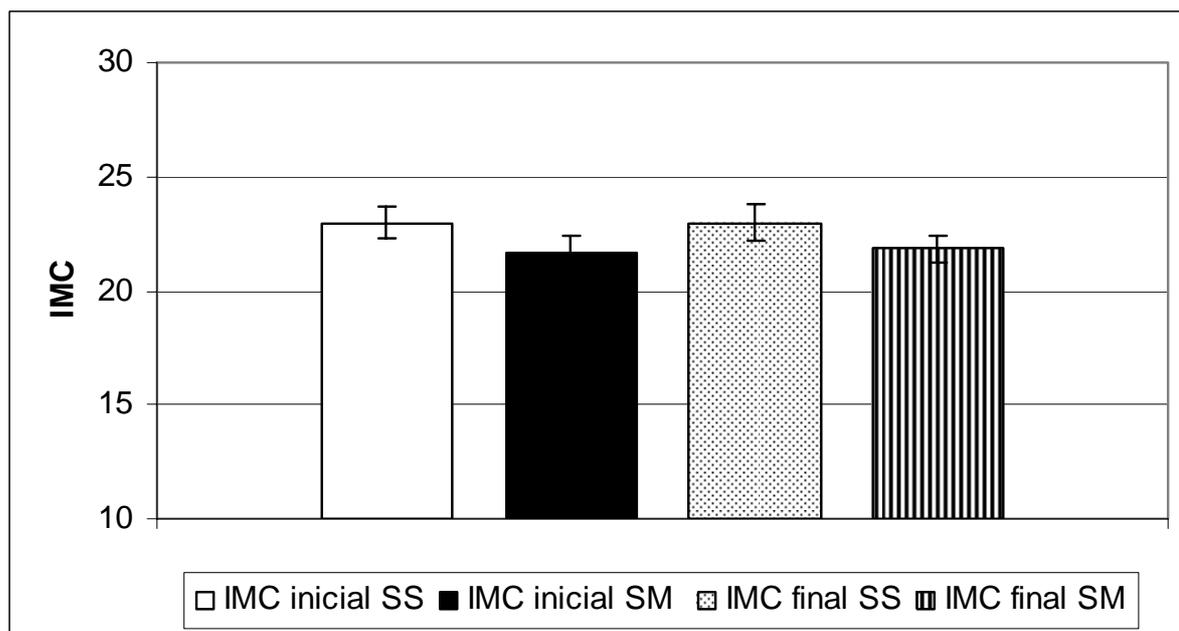


Figura 02: Avaliações dos pesos iniciais e finais dos grupos SS e SM.

Foi realizado teste t de Student pareado e não pareado, respectivamente, e observou-se não haver diferença entre os valores iniciais e finais intragrupos e nem tampouco intergrupos

### 3.1.3. Percentual de Gordura

O grupo que treinou em Série Simples iniciou com média de 14,54 %  $\pm$  1,71 de gordura e finalizou com média de 12,33 %  $\pm$  1,49 de gordura, sendo esta diferença extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

O grupo que treinou em Série Múltipla iniciou com média de 11,43 %  $\pm$  1,85 de gordura e finalizou com média de 10,82 %  $\pm$  2,08 de gordura, sendo esta diferença considerada não significativa ( $p = 0,3$ ).

Não foi observada diferença estatística entre os grupos quando comparados os resultados iniciais ( $p > 0,2$ ) (fig 03).

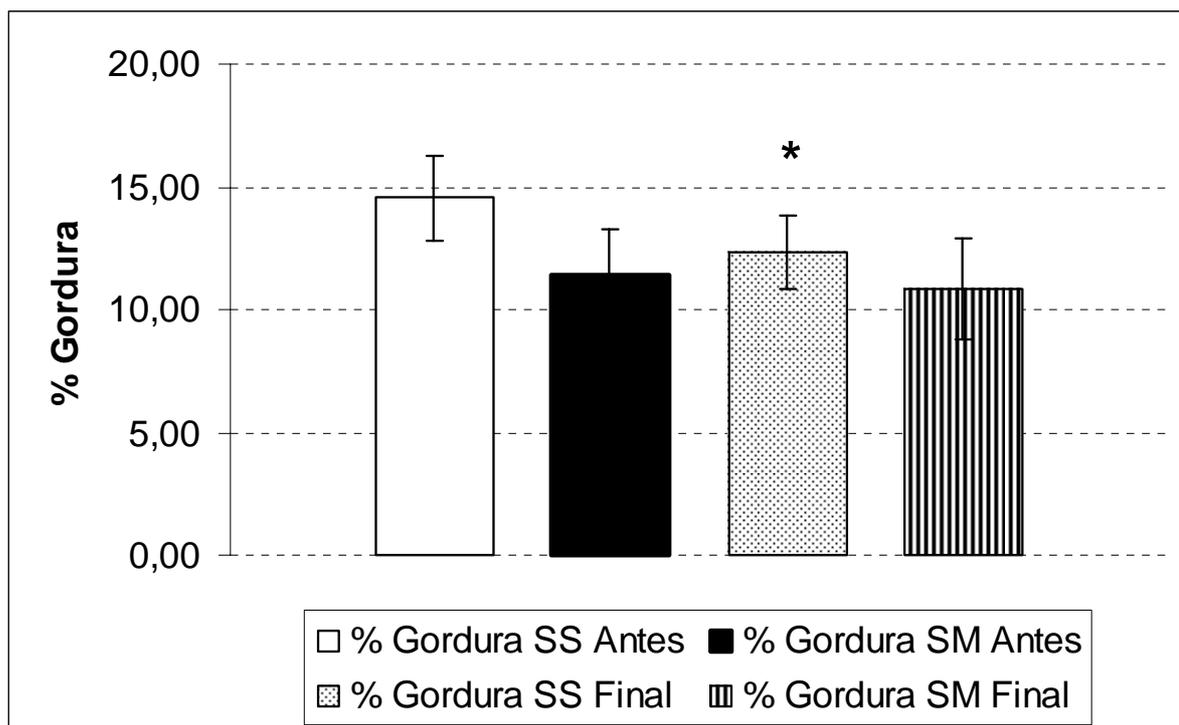


Figura 03: Avaliações iniciais e finais dos percentuais de gordura dos grupos SS e SM.

Foi realizado teste t de Student pareado e observou-se significativa redução deste percentual para o grupo SS ( $p= 0,0001$ ).

Na média, em pontos percentuais, observa-se ainda que o grupo que treinou em Série Simples obteve resultado significativamente maior do que o grupo que treinou em Série Múltipla ( $SS= 2,21 \pm 0,23$  e  $SM= 0,61 \pm 0,63$ ) ( $p=0,01$ ) (fig. 04).

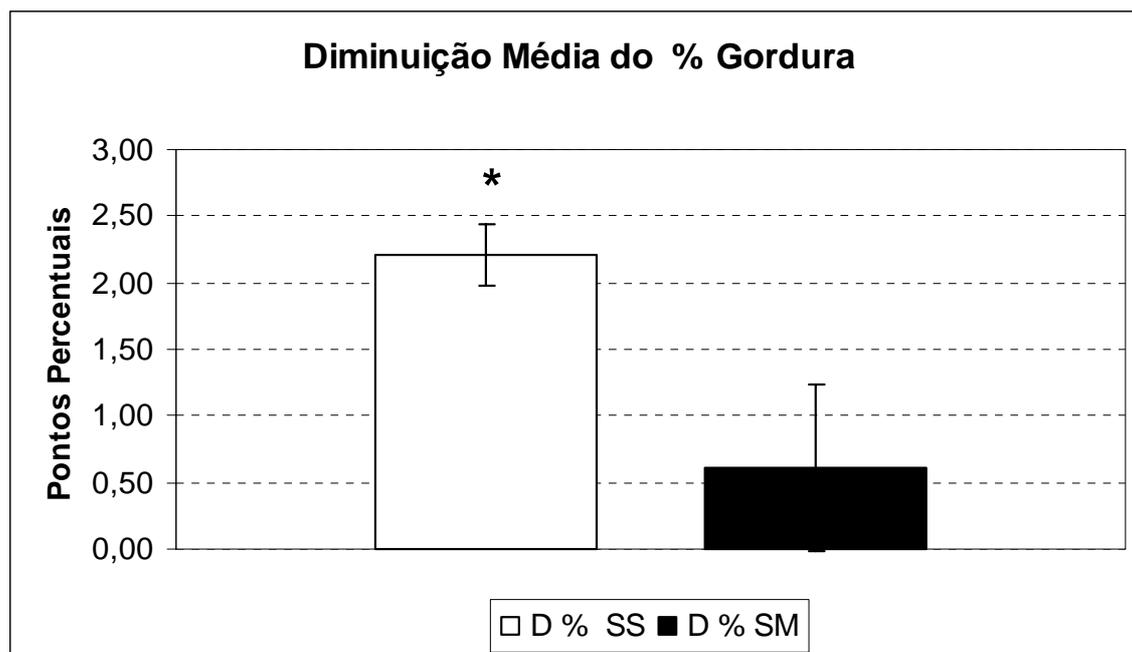


Figura 04: Diferença, em pontos percentuais, da queda do percentual de gordura dos grupos SS e SM. As médias foram avaliadas através de teste  $t$  de Student e observou-se significativa diminuição deste percentual no grupo SS ( $p= 0,01$ ).

### **3.1.4. Percentual de Massa Magra (Massa Livre de Gordura)**

O grupo que treinou em Série Simples iniciou com média de 83,24 %  $\pm$  2,67 de massa livre de gordura e finalizou com média de 85,45 %  $\pm$  2,57 de massa livre de gordura, sendo esta diferença extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

O grupo que treinou em Série Múltipla iniciou com média de 88,56 %  $\pm$  1,85 de massa livre de gordura e finalizou com média de 89,18 %  $\pm$  2,08 de massa livre de gordura, sendo esta diferença considerada não significativa ( $p = 0,3$ ).

Não foi observada diferença estatística entre os grupos quando comparados os resultados iniciais ( $p > 0,2$ ) (fig. 05).

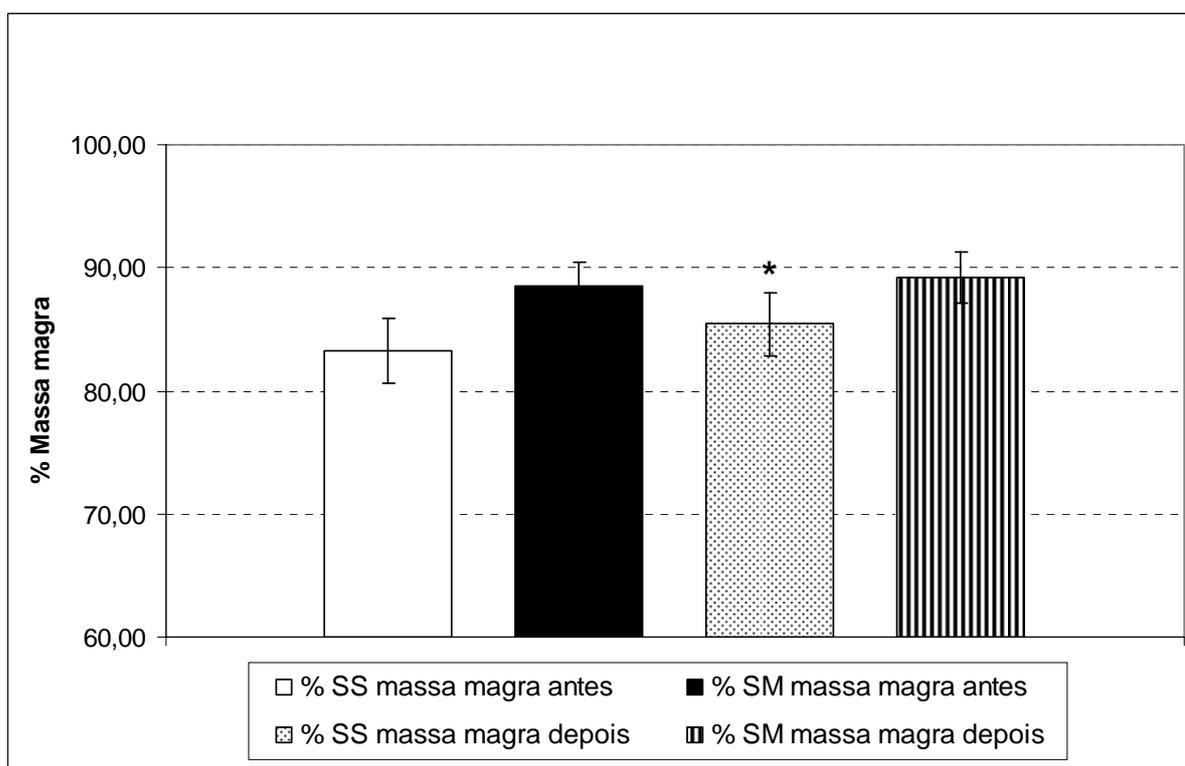


Figura 05: Avaliações iniciais e finais dos percentuais de massa magra dos grupos SS e SM. Os valores foram avaliados através de teste t de Student e observou-se significativo aumento deste percentual apenas no grupo SS ( $p=0,0001$ ).

Na média, em pontos percentuais, observa-se que o grupo que treinou em Série Simples obteve resultado significativamente maior do que o grupo que treinou em Série Múltipla ( $SS= 2,21 \pm 0,23$  e  $SM= 0,61 \pm 0,63$ ) ( $p=0,01$ ) (fig. 06).

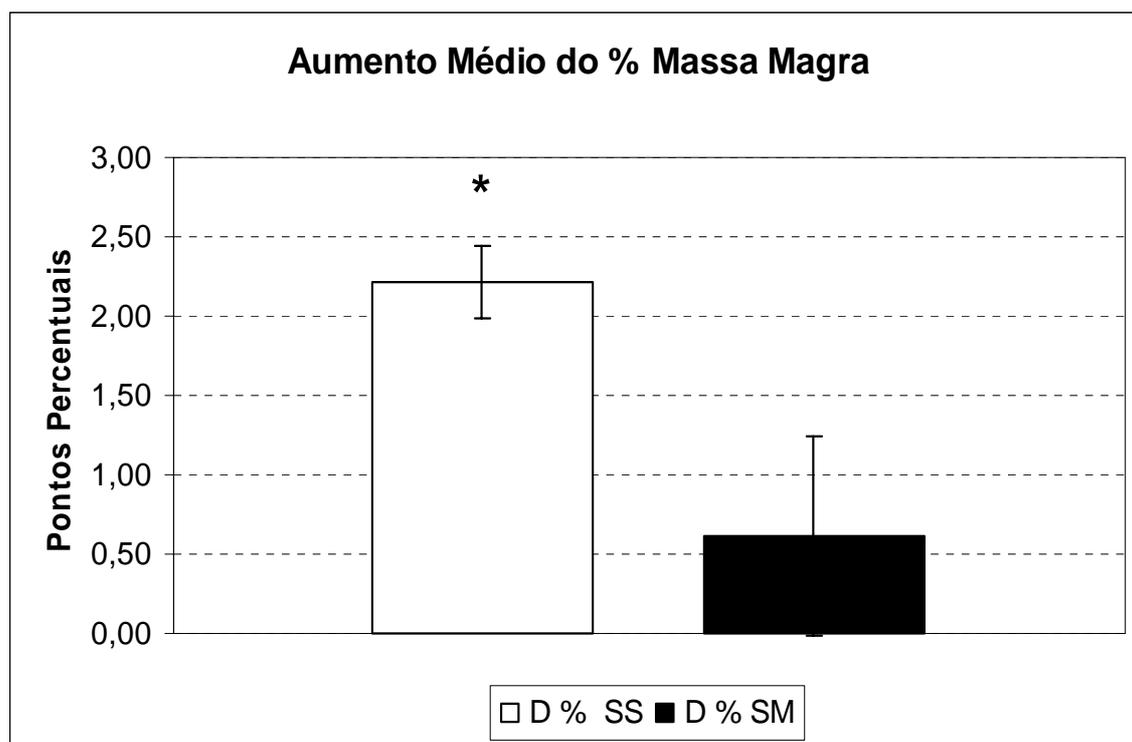


Figura 06: Diferença, em pontos percentuais, do aumento dos percentuais de massa magra dos grupos SS e SM. Foi aplicado o teste  $t$  de Student e observou-se significativo aumento do grupo SS quando comparado com o grupo SM ( $p= 0,01$ ).

### **3.2. Perfil Lipídico**

O perfil lipídico foi avaliado nos grupos Série Simples (n=8) e Série Múltipla (n=8) através de método enzimático automatizado (kits Labtest Diagnóstica) realizados no Laboratório Senhor dos Passos – Porto Alegre / RS.

Foram avaliados, antes do início do programa de condicionamento e imediatamente após o seu final, o colesterol total, o triacilglicerol e as frações HDL-C, LDL-C, VLDL-C e a Relação Colesterol Total / HDL-C. As médias iniciais e finais foram comparadas e avaliadas através de teste *t* de Student pareado.

### 3.2.1. Colesterol Total

Foi observado que o grupo SS iniciou com valor médio de  $188,33 \pm 11,15$  e finalizou com valor médio de  $163 \pm 10,44$  sendo esta diferença (em torno de 11%) considerada significativa ( $p= 0,01$ ). O grupo SM iniciou com valor médio de  $183,38 \pm 11,42$  e finalizou com valor médio de  $177,13 \pm 7,93$ , não apresentando diferença estatística ( $p= 0,8$ ) (fig. 07).

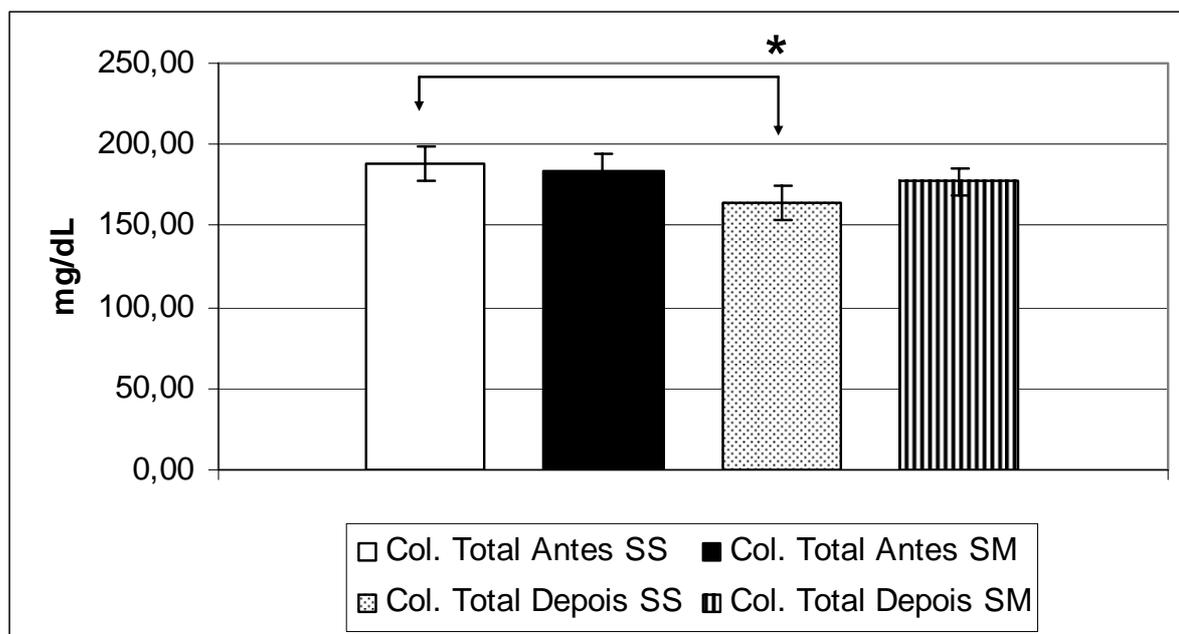


Figura 07: Análise do Colesterol Total inicial e final de ambos os grupos. Foi aplicado teste t de student e observou-se diminuição significativa deste parâmetro no grupo SS ( $p= 0,01$ ).

### 3.2.2. Triacilglicerois

Foi observado que o grupo SS iniciou com valor médio de  $97 \pm 21,4$  e finalizou com valor médio de  $98,1 \pm 21,64$  não sendo esta diferença considerada significativa ( $p=0,7$ ). Já o grupo SM iniciou com valor médio de  $127,3 \pm 31,06$  e finalizou com valor médio de  $87,57 \pm 17,4$ , sendo observada uma queda, embora não estatisticamente diferente, em torno de 30% do valor inicial. ( $p= 0,1$ ) (fig. 08).

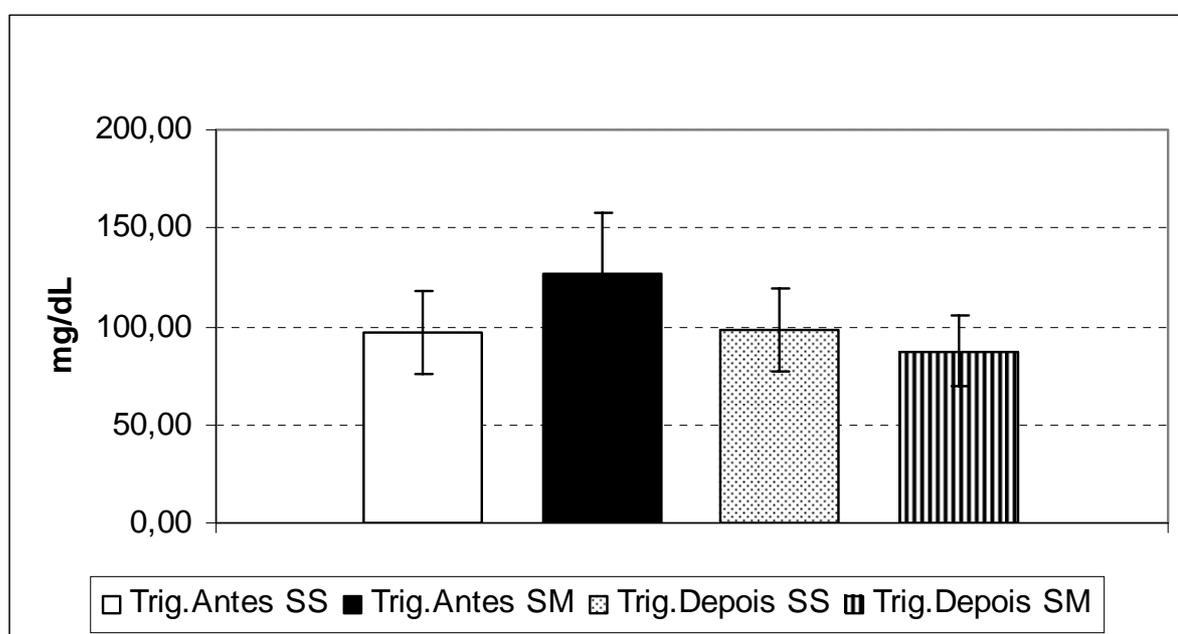


Figura 08: Análise dos triacilglicerois iniciais e finais de ambos os grupos. Foi aplicado teste t de Student e não se observou diferença estatística entre os parâmetros avaliados em nenhum dos grupos analisados.

### 3.2.3. HDL – C

Foi observado que o grupo SS iniciou com valor médio de  $45,75 \pm 3,19$  e finalizou com valor médio de  $53,25 \pm 3,88$  sendo esta diferença considerada altamente significativa ( $p= 0,004$ ).

O grupo SM iniciou com valor médio de  $48,12 \pm 2,17$  e finalizou com valor médio de  $48,5 \pm 2,87$  não havendo diferença entre os parâmetros avaliados. (fig. 09)

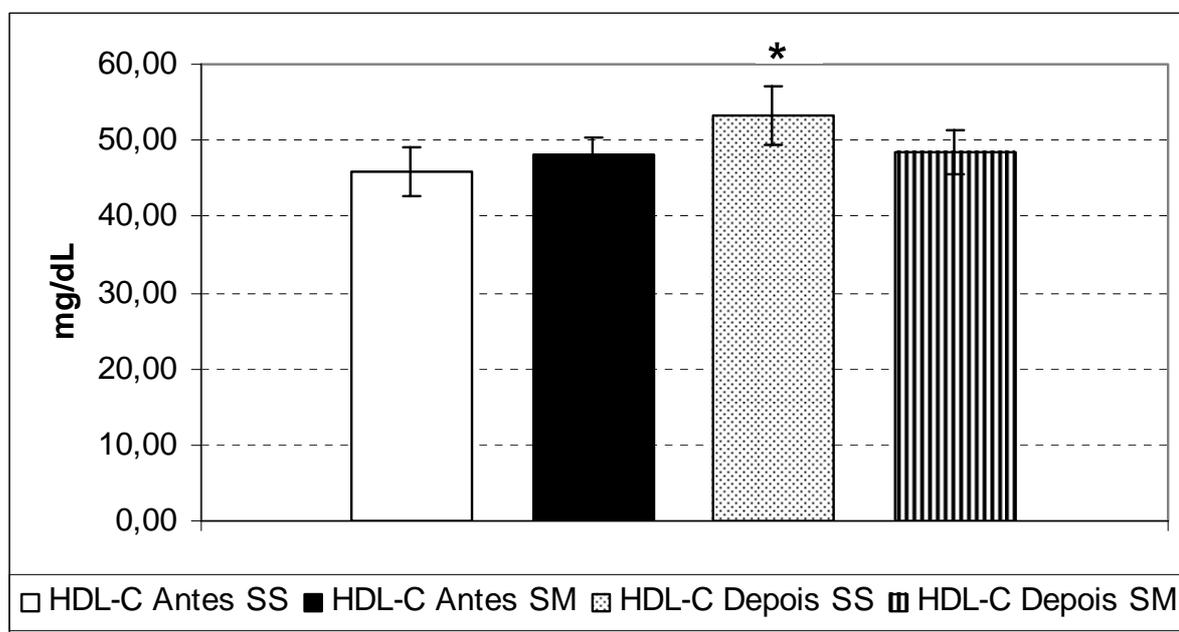


Figura 09: Análise dos valores de HDL-C iniciais e finais de ambos os grupos. Foi aplicado teste t de Student e observou-se significativo aumento deste parâmetro no grupo SS.

### 3.3.4. LDL – C

Foi observado que o grupo SS iniciou com valor médio de  $120,25 \pm 7,0$  e finalizou com valor médio de  $102,38 \pm 8,07$  sendo esta diferença considerada significativa ( $p < 0,05$ ).

O grupo SM iniciou com valor médio de  $110,58 \pm 9,2$  e finalizou com valor médio de  $111,08 \pm 8,6$ , não sendo esta diferença considerada significativa ( $p = 0,9$ ) (Fig. 10).

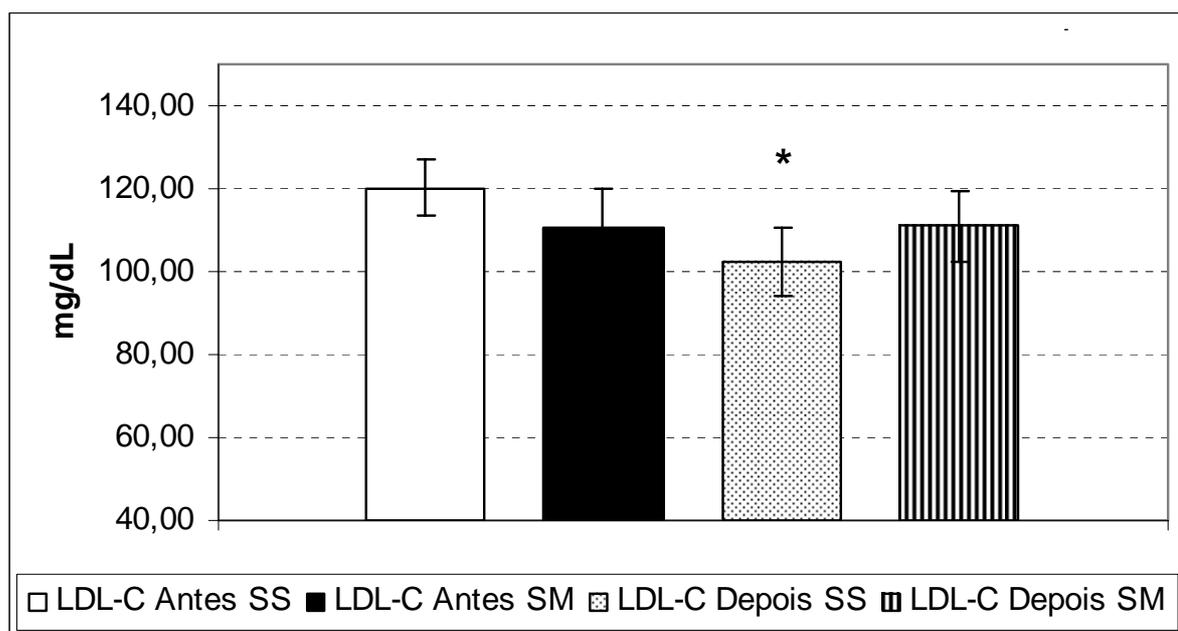


Figura 10: Análise dos valores de LDL-C iniciais e finais de ambos os grupos. As médias foram avaliadas através de teste t de Student e observou-se diminuição significativa deste parâmetro avaliado no grupo SS ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.5. VLDL – C

Na análise do VLDL-C, o protocolo de treinamento, tanto em SS quanto em SM, não induziu alterações. Foi observado que o grupo SS iniciou com valor médio de  $19,45 \pm 4,28$  e finalizou com valor médio de  $19,75 \pm 4,33$ , não sendo esta diferença considerada significativa ( $p= 0,6$ ).

O grupo SM iniciou com valor médio de  $25,34 \pm 6,2$  e finalizou com valor médio de  $17,34 \pm 3,46$ , demonstrando uma diminuição em torno de 32% dos valores iniciais, embora não sendo esta diferença considerada estatisticamente significativa ( $p=0,1$ ) (fig. 11).

Esta diferença assemelha-se àquela encontrada nos valores de triacilglicerois para o mesmo grupo SM.

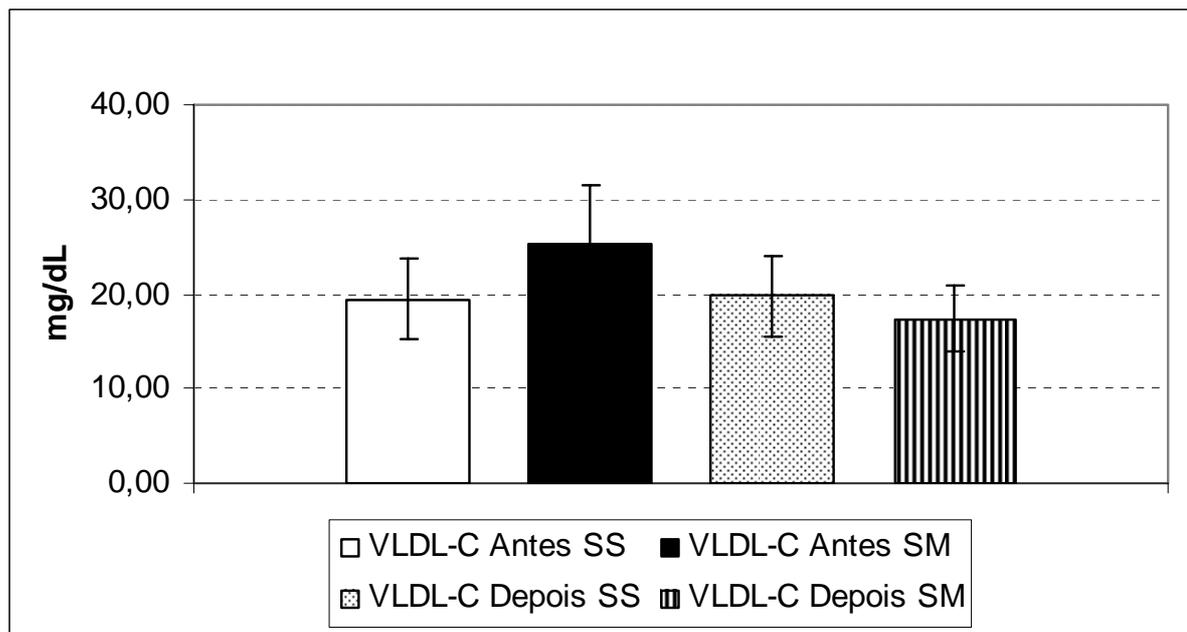


Figura 11: Análise dos resultados iniciais e finais de VLDL-C de ambos os grupos. Em análise por teste  $t$  de Student, não se observou alteração estatística deste parâmetro em nenhum dos grupos avaliados.

### 3.2.6. Relação Colesterol Total / HDL-C

Foi observado que o grupo SS iniciou com valor médio de  $4,26 \pm 0,46$  e finalizou com valor médio de  $3,26 \pm 0,36$  sendo esta diferença considerada altamente significativa ( $p= 0,003$ ).

O grupo SM iniciou com valor médio de  $3,85 \pm 0,31$  e finalizou com valor médio de  $3,78 \pm 0,32$  não havendo diferença entre os parâmetros avaliados (fig. 12).

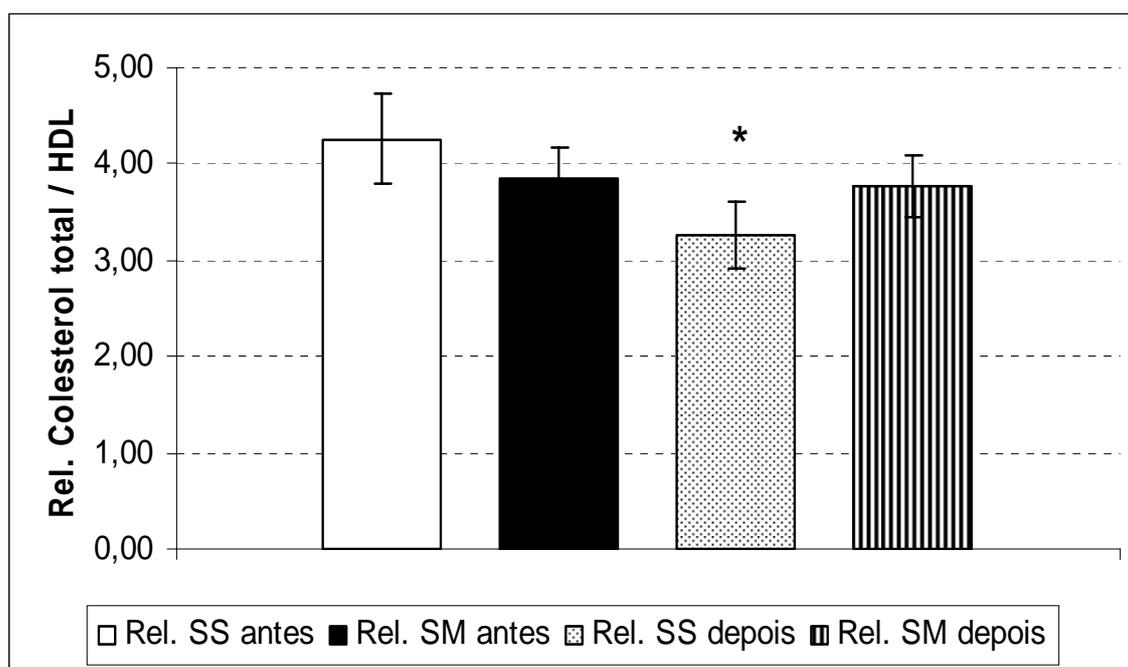


Figura 12: Análise da relação Colesterol Total / HDL de ambos os grupos. As médias foram analisadas através de test *t* de Student e observou-se que o grupo que treinou em SS obteve significativa diminuição deste parâmetro avaliado ( $p= 0,003$ ).

### **3.3. Desempenho**

Na avaliação de desempenho muscular comparamos os resultados obtidos na força e na resistência muscular

#### **3.3.1. Força**

A força muscular foi avaliada em ambos os grupos (n=9 por grupo), comparando os valores obtidos através da diferença entre as cargas máximas avaliadas após e antes do protocolo de treinamento desenvolvido. Os exercícios avaliados foram o de supino reto vertical, voador, rosca bíceps, roldana alta e pressão de pernas.

Os resultados foram analisados e comparados através de teste *t* de Student.

Ambos os grupos mostraram aumento da força em todos os exercícios avaliados, entretanto o grupo Série Múltipla, no exercício voador, apresentou maior aumento ( $p < 0,001$ ) do que o grupo Série Simples.

Os demais exercícios não apresentaram diferença entre os grupos (fig. 13).

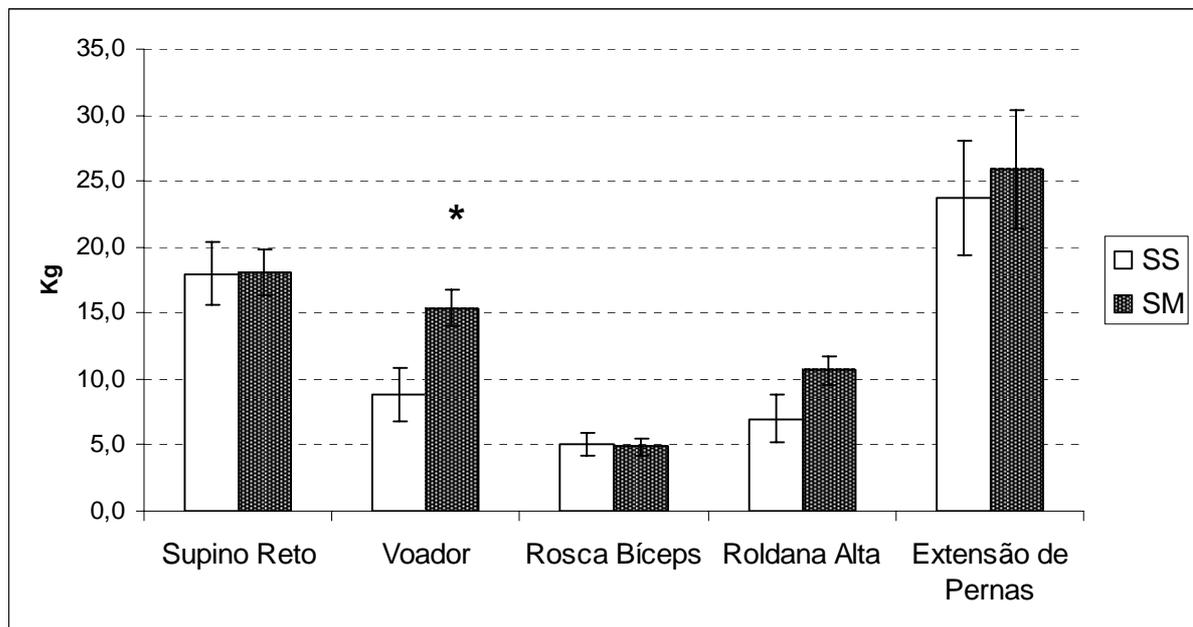


Figura 13: Avaliação do aumento da força dos grupos SS e SM. Observa-se que o grupo que treinou em SM obteve resultados significativamente maiores nos exercício voador. Nos demais exercícios não houve diferença entre os grupos testados.

### 3.3.2 Resistência Muscular

A resistência muscular foi avaliada em ambos os grupos (n=9), utilizando o número máximo de repetições realizadas, utilizando a carga máxima obtida no primeiro dia, para cada um dos exercícios avaliados. Os exercícios avaliados foram o de supino reto vertical, voador, rosca bíceps, roldana alta e pressão de pernas.

Os resultados foram analisados e comparados através de teste t de Student pareado.

Ambos os grupos mostraram aumento da resistência muscular em todos os exercícios avaliados, entretanto no exercício de supino reto o grupo Série Simples apresentou resultados significativamente maiores do que o grupo Série Múltipla ( $p= 0,01$ )(fig. 14).

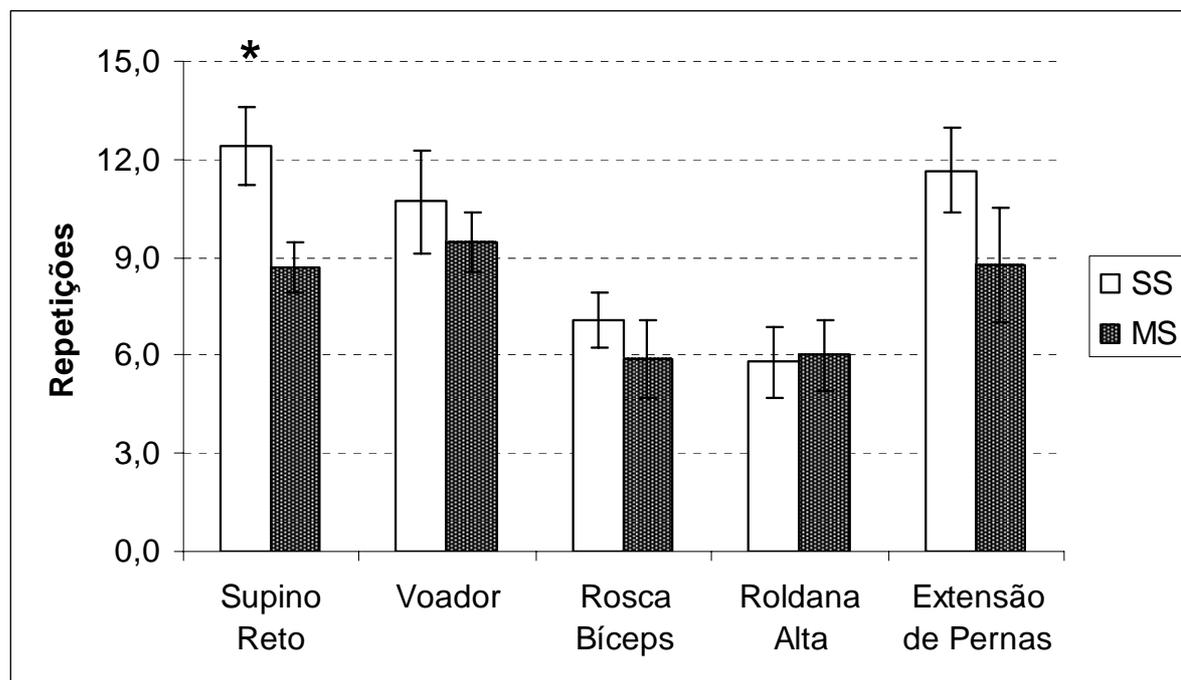


Figura 14: Avaliações da resistência muscular dos grupos SS e SM. Observa-se que o grupo que treinou em SS obteve melhor resultado na resistência muscular para o exercício Supino Reto ( $p= 0,01$ ). Nos demais exercícios não se observaram diferenças entre os grupos avaliados.

### **3.4. Estresse Oxidativo**

#### **3.4.1. TBARS**

O estresse oxidativo foi avaliado através das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Os resultados foram avaliados ao longo do treinamento, buscando observar a partir de que tempo de treinamento já poderíamos obter alguma alteração.

O grupo que treinou em Série Múltipla manteve valores semelhantes durante todo o período de treinamento, não sendo observado alterações significativas entre as avaliações.

Os resultados (n=7) foram analisados através de análise de variância (Anova) com teste complementar de Tukey e não foi observada alteração significativa entre os parâmetros avaliados. (fig 15).

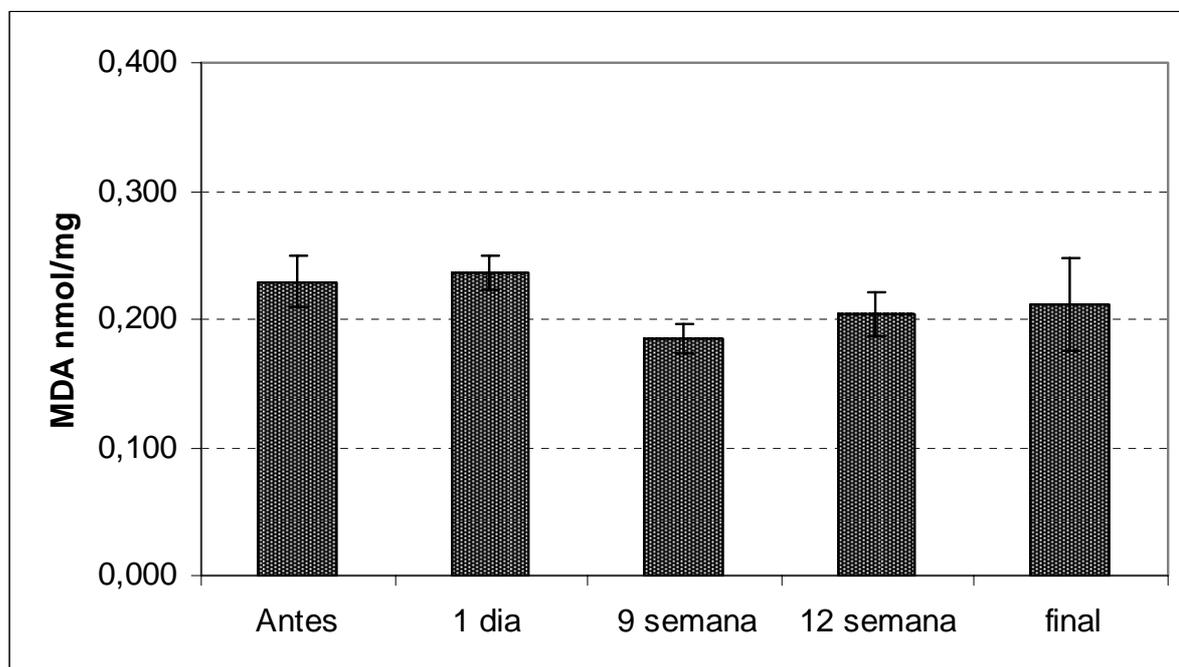


Figura 15: Análise evolutiva do TBARS do grupo Série Múltipla. Não se observa alteração significativa durante o período de treinamento e nem após este período.

O grupo que treinou em Série Simples obteve redução do estresse oxidativo, quando comparado com os valores iniciais, ao decorrer do treinamento, evidenciando condicionamento (adaptação) ao treinamento proposto.

Os resultados (n=7) foram analisados através de análise de variância (Anova) complementado com teste de Tukey, sendo significativos: antes com 9ª semana ( $p<0,01$ ); antes com a 12ª. semana ( $p<0,05$ ) e antes com a final ( $p<0,05$ ). (fig. 16)

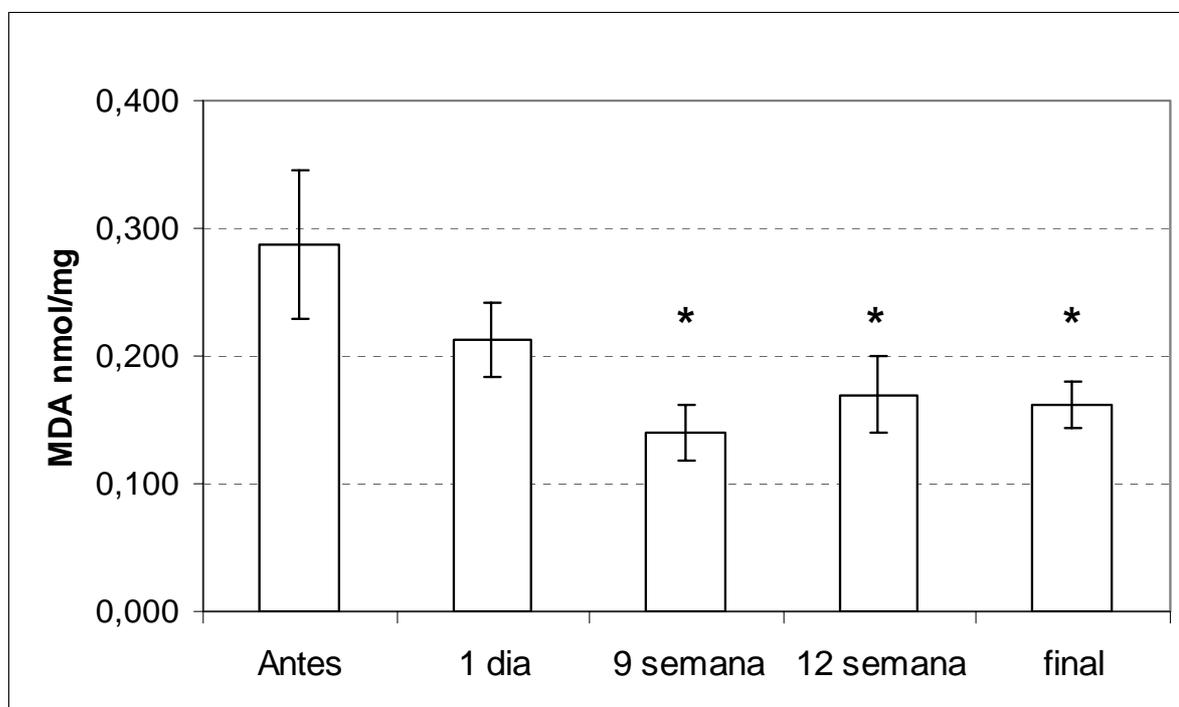


Figura 16: Análise evolutiva do TBARS do grupo Série Simples. Observa-se significativa adaptação temporal já a partir da 9ª semana de treinamento, mantendo nas avaliações subsequentes. Foi realizada anova complementado com teste de Tukey, sendo significativos: antes com 9ª semana ( $p<0,01$ ); antes com a 12ª. semana ( $p<0,05$ ) e antes com a final ( $p<0,05$ ).

### 3.4.2. Análise da Glutaciona

O perfil da glutaciona, o qual nos oferece um bom parâmetro para a análise do estado redox celular, o qual foi avaliado pela produção da glutaciona reduzida (GSH), pela conversão deste em glutaciona oxidada (GSSG), e, conseqüentemente, a relação GSSG / GSH, considerada o melhor índice do estado redox celular.

Os resultados foram avaliados em eritrócitos, tendo em vista estes oferecerem uma boa informação das alterações do estado redox sistêmico. Foram comparados diferentes momentos do programa de treinamento, buscando observar o estresse agudo, a adaptação ao programa de treinamento e o resultado em repouso.

#### 3.4.2.1. Análise da GSSG

Na análise da glutaciona oxidada (GSSG), observamos que ambos os grupos demonstraram alterações induzidas pelo treinamento, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

Os resultados (n=4) foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e teste *t* de student, conforme a necessidade. A ANOVA demonstrou haver significativa diferença em ambos os grupos ( $p < 0,05$ ).

O grupo SS apresentou significativa diferença quando comparados o resultado inicial com o 1º dia ( $p < 0,05$ ), o inicial com a 12ª semana ( $p = 0,01$ ) e o inicial com o final ( $p < 0,001$ ). Não foram observadas diferenças entre os valores intermediários. Já no grupo SM observamos forte tendência à diferença quando comparado o valor inicial com o primeiro dia de treinamento ( $p > 0,05$ ), entretanto, foi

observada diferença entre os valores inicial e 12<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ) e inicial com final ( $p = 0,009$ ) (Fig. 17).

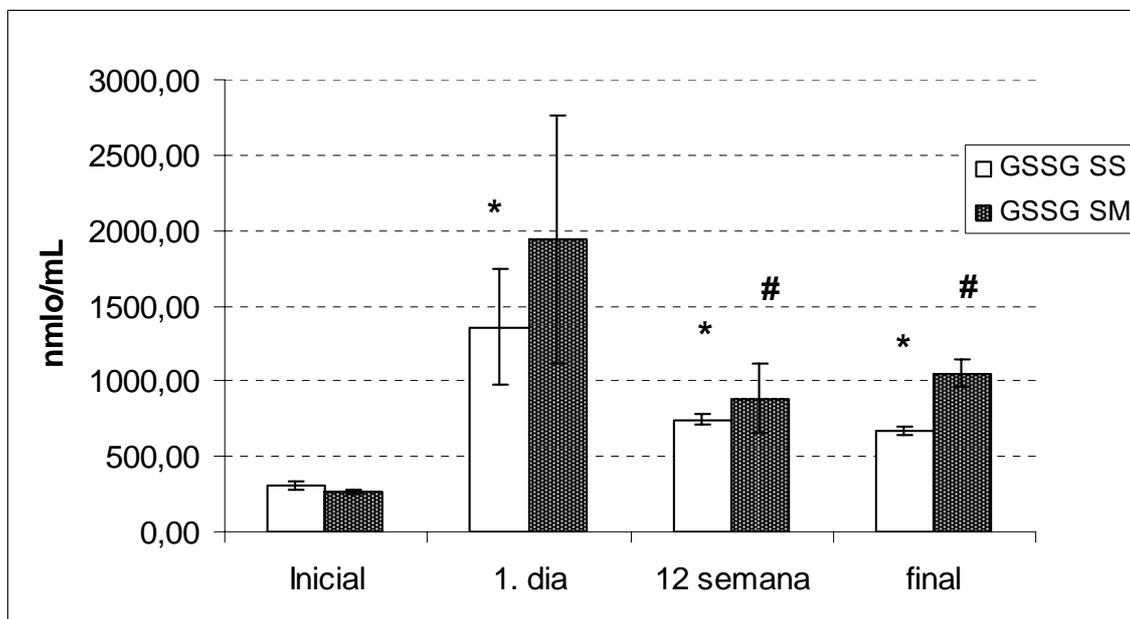


Figura 17: Análise do perfil da glutatona oxidada (GSSG) em eritrócitos, dos grupos SS e SM. Observamos que ambos os grupos demonstraram alterações significativas induzidas pelo treinamento, quando comparados os valores iniciais com os demais, sem haver diferença estatística entre os grupos avaliados.

O grupo SS (\*) apresentou significativa diferença quando comparados o resultado inicial com o 1<sup>o</sup> dia ( $p < 0,05$ ), o inicial com a 12<sup>a</sup> semana ( $p = 0,01$ ) e o inicial com o final ( $p < 0,001$ ). O grupo SM (#) apresentou forte tendência à diferença quando comparado o valor inicial com o primeiro dia de treinamento ( $p = 0,07$ ), foi observada diferença entre os valores inicial e 12<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ) e inicial com final ( $p = 0,009$ ).

### 3.4.2.2. Análise da GSH

Na análise da Glutathiona reduzida (GSH) os resultados (n=4) foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste *t* de Student, conforme a necessidade. A ANOVA demonstrou haver significativa diferença em ambos os grupos (SS  $p= 0,01$  e SM  $p< 0,05$ ). O grupo SS apresentou significativa diferença quando comparados o resultado inicial com o com a 12<sup>a</sup> semana ( $p< 0,05$ ) e com o final ( $p< 0,05$ ). Foram, ainda, observadas diferenças entre os valores intermediários, sendo o 1<sup>o</sup> dia de treinamento e o final, diferentes ente si ( $p= 0,05$ ). A análise estatística mostrou que o grupo que treinou em SM apresentou significativa redução dos valores de GSH durante o transcorrer do programa de treinamento, entretanto o teste completar não foi capaz de identificar entre quais avaliações estava esta diferença. (fig. 18)

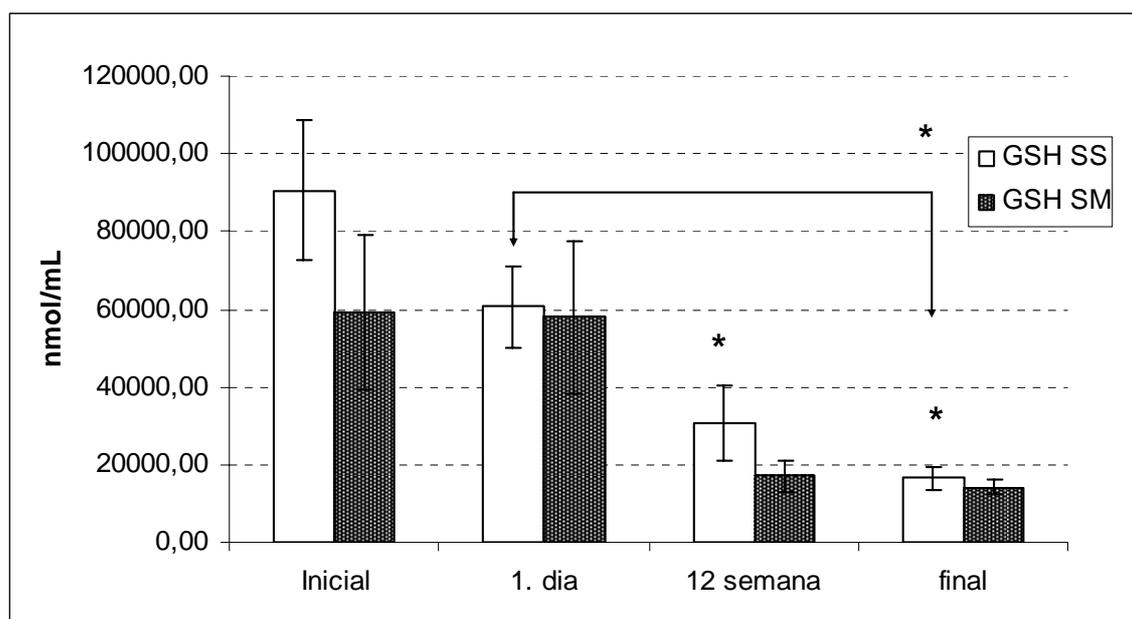


Figura 18: Análise do perfil da glutathiona reduzida (GSH) em eritrócitos, dos grupos SS e SM. Observamos que ambos os grupos demonstraram significativas redução da GSH induzidas pelo treinamento. O grupo SS apresentou significativa diferença quando comparados o resultados inicial com 12<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ) e inicial com final ( $p < 0,05$ ), apresentou, ainda, diferença entre o 1<sup>o</sup> dia e o final ( $p = 0,05$ ). O grupo SM apresentou significativa queda da GSH, entretanto o pós-teste não identificou onde está localizada esta diferença.

### 3.4.2.3. Análise da Relação GSSG/GSH

Relação GSSG/GSH mostra-nos o consumo (oxidação) da GSH e a re-conversão de GSSG à GSH quando ocorre alguma interferência na homeostasia celular. Este parâmetro evidencia-nos o estado redox celular.

Para a verificação da Relação GSSG/GSH os resultados (n=4) foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste *t* de student, conforme a necessidade. A ANOVA demonstrou haver significativa diferença em ambos os grupos (SS  $p < 0,05$  e SM  $p = 0,008$ ). O grupo que treinou em SS apresentou significativa diferença quando comparados o resultado inicial com o com o final ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores intermediários. Já o grupo que treinou em SM apresentou significativa diferença entre os resultados iniciais e 12<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ) e dos resultados inicial com o final ( $p < 0,01$ ). Foi possível, ainda observar significativas diferenças entre os grupos avaliados. Ficou evidenciado que o grupo que treinou em SM apresentou maior relação GSSG/GSH final do que o grupo que treinou em SS (SS=  $0,045 \pm 0,011$  e SM=  $0,076 \pm 0,006$  -  $p = 0,02$ ). (fig. 19)

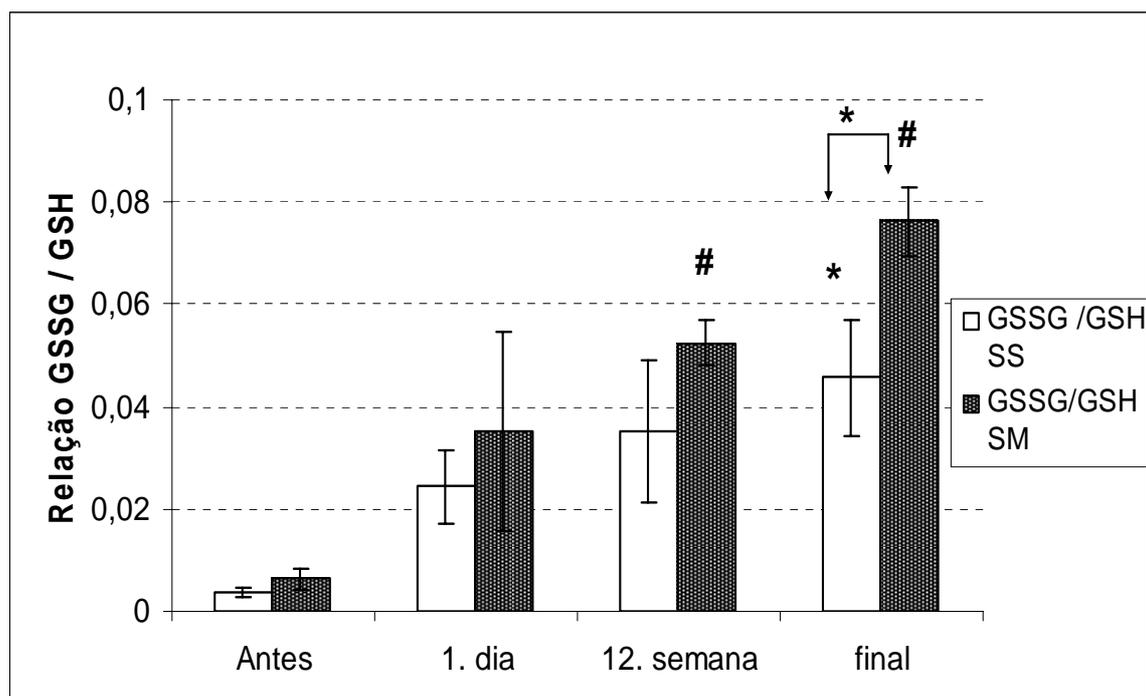


Figura 19: Análise da Relação GSSG/GSH em eritrócitos, dos grupos SS e SM. Ambos os grupos demonstraram significativos aumentos da Relação GSSG/GSH induzidas pelo treinamento. O grupo SM (#) apresentou significativo aumento da Relação GSSG/GSH, quando comparados os valores iniciais com 12<sup>a</sup> semana ( $p < 0,05$ ), e iniciais com finais ( $p < 0,01$ ). Já o grupo SS (\*) apresentou significativa diferença quando comparados o resultados inicial com o final ( $p < 0,05$ ). O grupo SM apresentou maior relação GSSG/GSH final do que o grupo que treinou em SS (SS=  $0,045 \pm 0,011$  e SM=  $0,076 \pm 0,006$  -  $p = 0,02$ ).

### 3.5. Expressão de HSP

A análise da expressão de HSP-70, pela técnica do SDS-PAGE e *Western blotting* foi feita em linfócitos, os quais foram coletados, nos dias de treinamento, 6 horas após o seu término, bem como coletados antes e ao final do programa de treinamento (72h após). A análise foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras contidas nos géis foram transferidas diretamente para membranas de nitrocelulose, onde, na presença de anticorpos específicos, evidenciava-se a fixação destas proteínas. (fig. 21).

As manchas foram registradas digitalmente em VDS e as imagens quantificadas foram analisadas.

Os resultados foram avaliados ao longo do treinamento, buscando observar a partir de que tempo de treinamento já poderíamos obter alguma alteração.

Os resultados (n=5) foram analisados através de análise de variância (ANOVA) complementado com teste de Tukey e teste *t*, quando necessário.

Observamos que, o grupo que treinou em Série Simples não demonstrou alteração significativa na expressão da HSP ao longo do tempo, entretanto, o grupo que treinou em Série Múltipla aumentou a expressão já no primeiro dia treinamento, bem como nos períodos de incremento de carga e reduzindo esta expressão nos momentos em que evidenciava-se adaptação muscular à carga de trabalho.

Observa-se significativa alteração desta expressão no primeiro dia ( $p= 0,05$ ) e na 9ª semana ( $p< 0,05$ ), quando comparadas com os valores iniciais. Observa-se ainda que, na nona semana de treinamento os valores de SM ultrapassam os valores de SS significativamente ( $p= 0,004$ ) (fig. 20).

É possível ainda observar que embora não haja alteração estatística, o grupo SS apresenta resultados com comportamento semelhantes ao SM, porém com defasagem temporal.

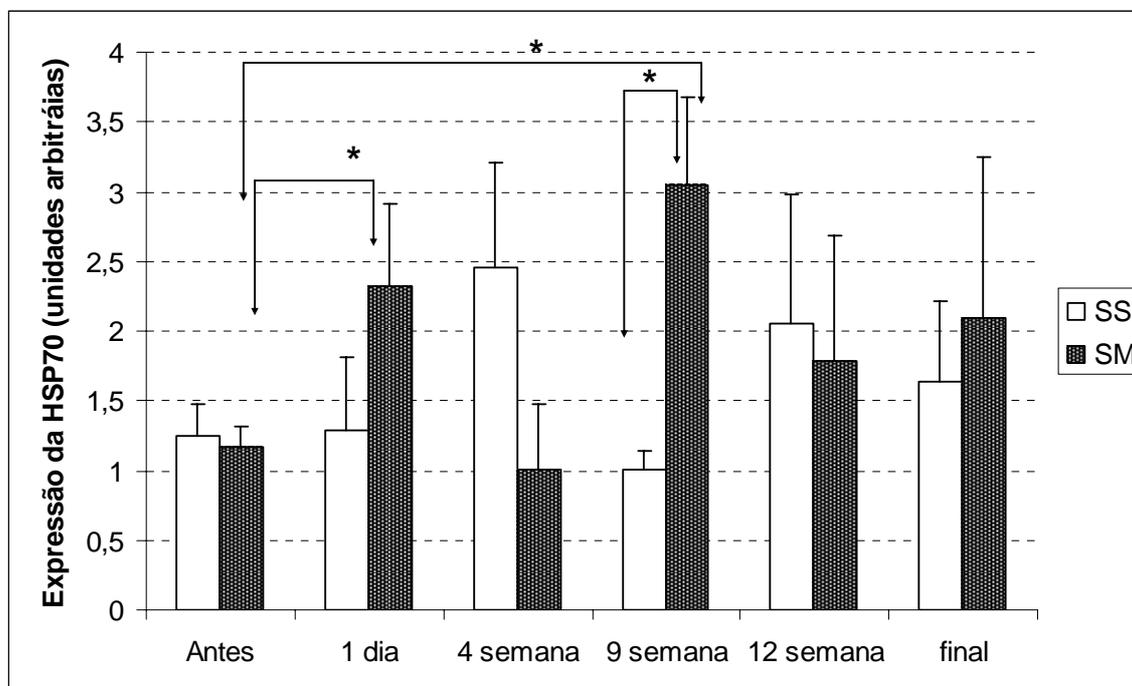


Figura 20: Análise da progressão da expressão de HSP70 em ambos os grupos. O grupo que treinou em Série Simples não apresentou alteração estatística dos valores expressados, enquanto que o grupo que treinou em Série Múltipla apresentou significativa diferença já no primeiro dia de treinamento ( $p= 0,05$ ) e posterior incremento na nona semana ( $p< 0,05$ ), onde ocorreu incremento de carga. Observa-se ainda que nesta semana o grupo SM difere do grupo SS ( $p= 0,004$ ).

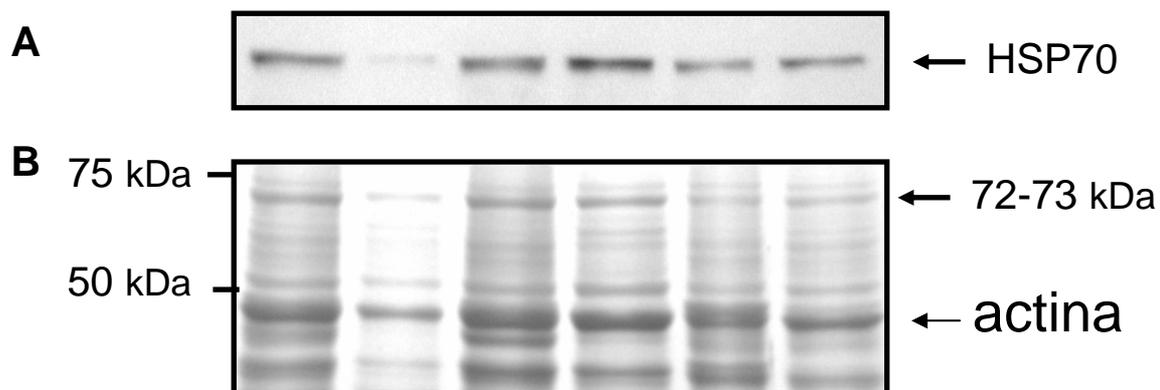


Figura 21: Análise representativa da expressão de HSP do grupo SS.

No quadro “A” observa-se uma análise por western blotting da expressão de HSP70 com a utilização de anticorpos monoclonais contra as formas constitutiva (73 kDa) e induzível (72 kDa) da HSP70a adesão das HSP70 em membrana de nitrocelulose.

No quadro “B” observa-se um gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue, evidenciando as manchas da HSP72 e HSP73 e a  $\beta$ -actina.

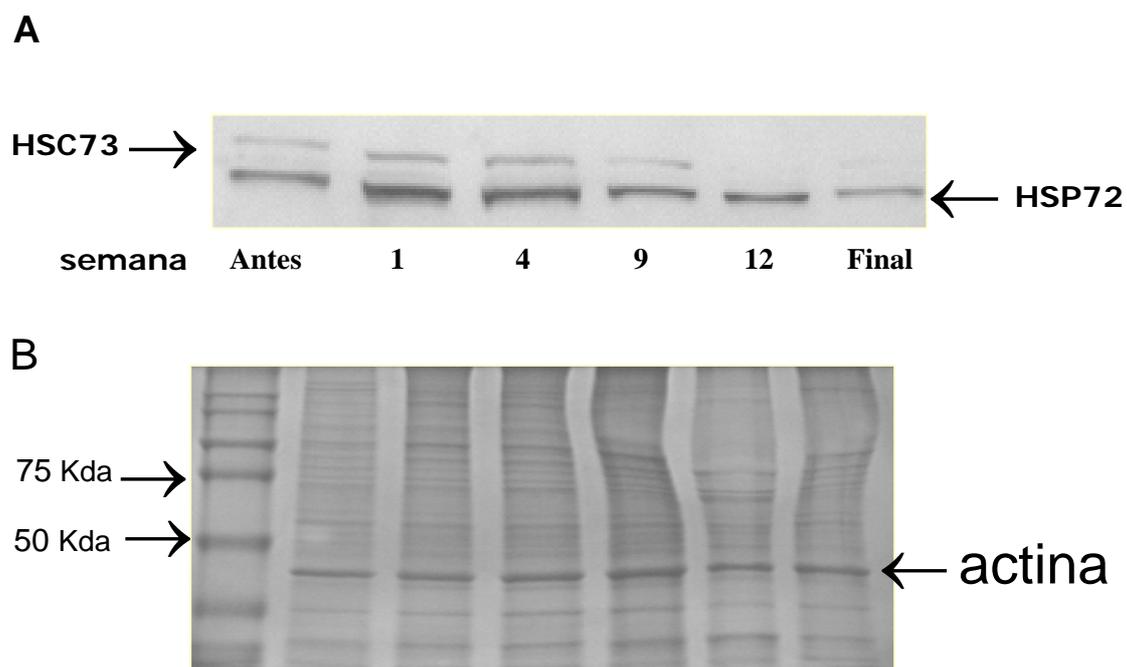


Figura 22: Análise representativa da expressão de HSP do grupo SM.

No quadro “A” observa-se uma análise por western blotting da expressão de HSP70 com a utilização de anticorpos monoclonais contra as formas constitutiva (73 kDa) e induzível (72 kDa) da HSP70a adesão das HSP70 em membrana de nitrocelulose.

No quadro “B” observa-se um gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue, evidenciando as manchas da  $\beta$ -actina.

### **3.6. Perfil Imunológico**

O perfil imunológico foi analisado pelo o índice de capacidade fagocítica dos macrófagos avaliados pela fagocitose de Zimosan. Nesta técnica os macrófagos isolados fagocitam partículas de *Saccharomyces cerevisiae* opsonizados e é contado, em microscópio, o número de macrófagos contendo, no seu interior, pelo menos duas partículas fagocitadas.

Foi avaliada a resposta dos grupos SS (n=4) e SM (n=4) frente a progressão do protocolo de treinamento.

Os grupos foram avaliados através de ANOVA para medidas repetidas com teste complementar de Tukey.

Esta atividade fagocítica pode ser visualizada na figura 23, onde observamos não só as partículas de zimosan fagocitados, como a aproximação do macrófago.

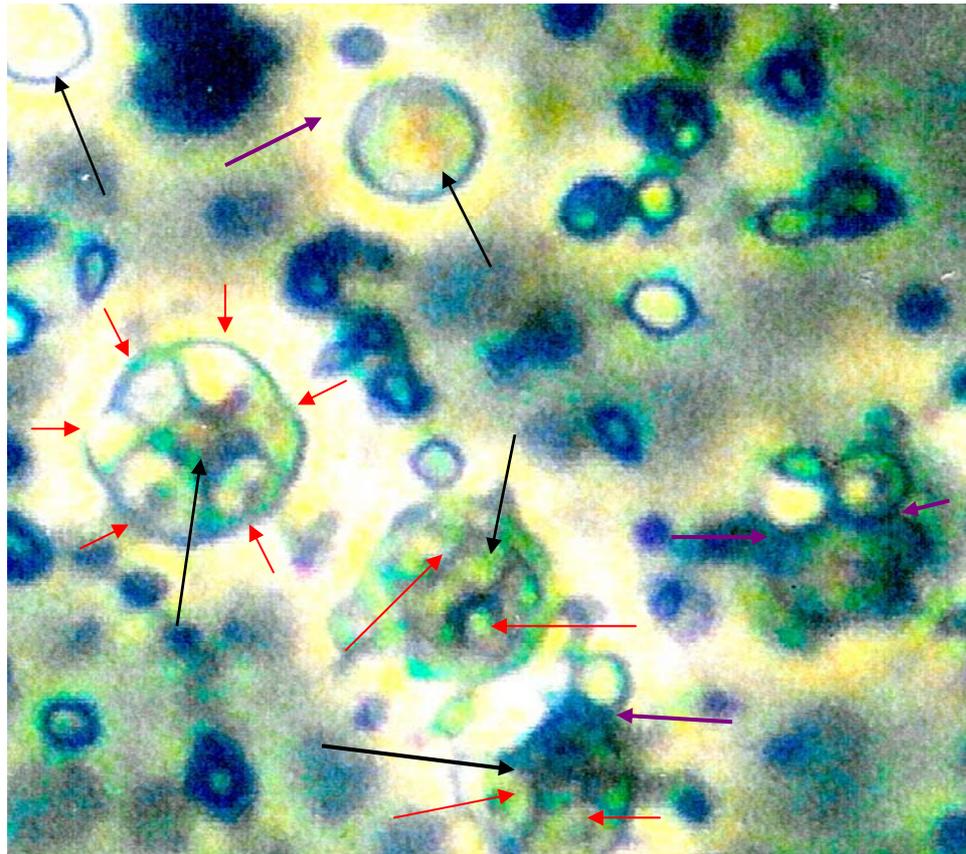


Figura 23: Observam-se diversos macrófagos (setas pretas) em atividade fagocítica. É possível observar as partículas de zimosan fagocitadas pelos macrófagos (setas vermelhas) e a atividade de aproximação do macrófago para fagocitar o zimosan (setas roxas).

O grupo que treinou em SS obteve uma alteração altamente significativa na capacidade fagocítica dos macrófagos ( $p < 0,0001$ ). O teste complementar evidenciou diferenças entre: 1º dia e a 12ª semana ( $p < 0,05$ ); 1º dia e o final ( $p < 0,001$ ); 4ª semana e o final ( $p < 0,001$ ) e 12ª semana com o final ( $p < 0,05$ ) (figura 24).

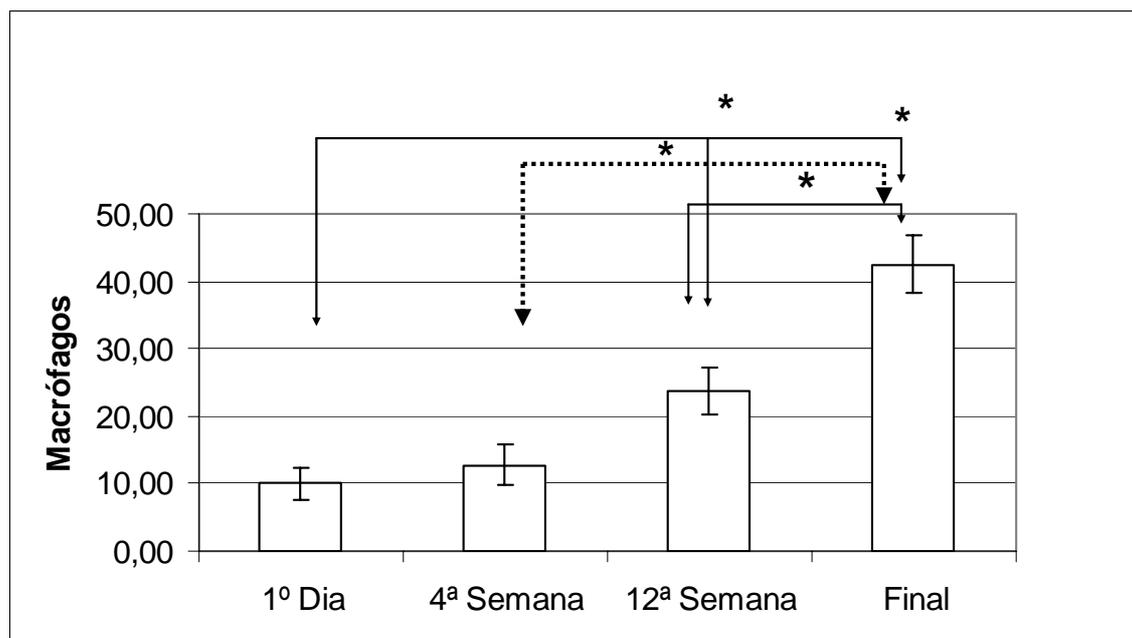


Figura 24: Análise da progressão do índice de fagocitose de Zimosan induzidas pelo treinamento em Séries Simples. A ANOVA demonstrou significativo aumento do índice da atividade fagocítica ( $p < 0,0001$ ). Houve aumento entre o 1º dia e a 12ª semana ( $p < 0,05$ ), o 1º dia e o final ( $p < 0,001$ ), a 4ª semana e o final ( $p < 0,001$ ) e a 12ª semana e o final ( $p < 0,05$ ).

O grupo que treinou em SM também obteve significativa alteração ( $p < 0,008$ ), evidenciando diferenças entre: 1º dia e a 12ª semana ( $p < 0,05$ ); 1º dia e o final ( $p < 0,05$ ) e 4ª semana com a 12ª semana ( $p < 0,05$ ) (fig. 25).

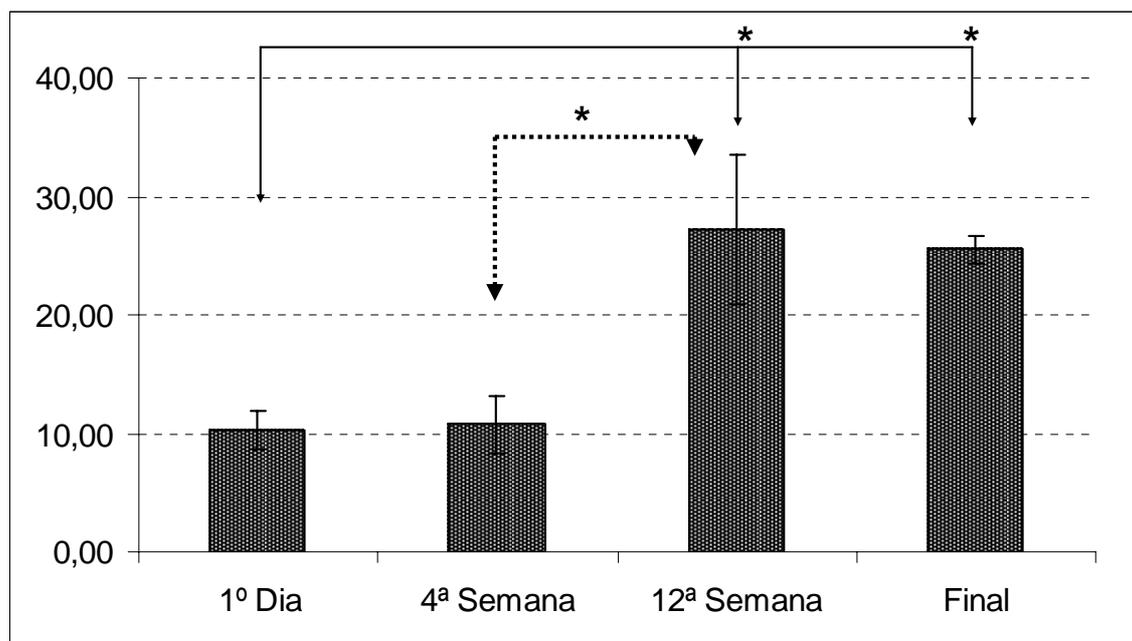


Figura 25: Análise da progressão do índice de fagocitose de Zimosan induzidas pelo treinamento em Séries Múltiplas. A ANOVA demonstrou significativo aumento do índice da atividade fagocítica ( $p < 0,008$ ). Houve aumento entre o 1º dia e a 12ª semana ( $p < 0,05$ ), o 1º dia e o final ( $p < 0,05$ ), a 4ª semana e a 12ª semana ( $p < 0,05$ ).

Quando comparados apenas os valores finais, observa-se que o grupo SS finalizou com  $42,5 \pm 4,23$  e o grupo SM com  $25,5 \pm 1,2$ . Estes resultados foram analisados através de teste t demonstrando significativa diferença entre os grupos ( $p=0,028$ ) (fig. 26).

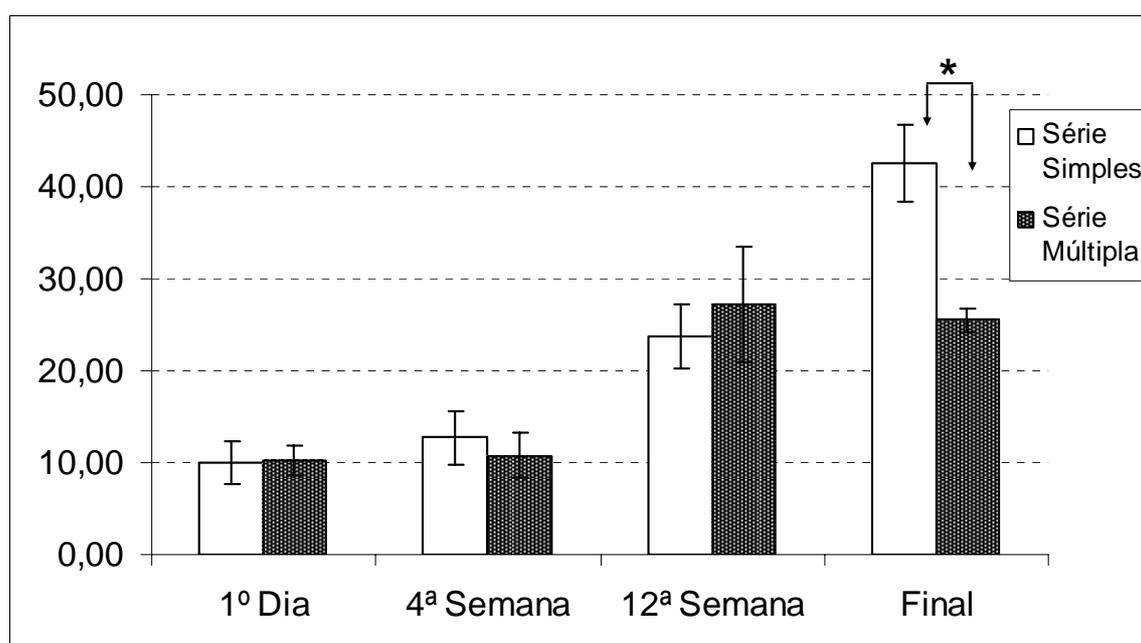


Figura 26: Análise comparativa da progressão do índice de fagocitose de Zimosan induzidas pelos treinamentos em Séries Simples e Série Múltipla. Observa-se significativa diferença nos valores finais. O grupo SS apresentou maior atividade fagocítica do que o grupo SM ( $p=0,028$ ). Não foram observadas diferenças entre os demais dias.

## **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

### ***4.1. Análises Morfológicas e de Desempenho***

O treinamento de força, ou simplesmente musculação, é uma modalidade amplamente utilizada em academias. Os objetivos iniciais de quem procura esta modalidade de treinamento baseiam-se no aumento da força e/ou hipertrofia muscular, ou ainda, perda de peso.

Com o avançar do conhecimento sobre os benefícios desta técnica, novos adeptos foram surgindo e os objetivos buscados diversificaram-se. Hoje em dia é comum observar indivíduos cardiopatas, por exemplo, beneficiando-se do treinamento de força, fato este até mesmo contra-indicado em outros tempos (WINETT & CARPINELLI, 2001). Entretanto, tendo em vista novos adeptos, e estando estes, sujeitos aos empecilhos do dia-dia, novas formas de praticar este treinamento foram sendo introduzidas. Com objetivos de ganho de tempo, séries menores foram sendo introduzidas. Também foi possível observar o fracionamento do treino, priorizando a cada dia um segmento corporal diferente.

Na década de 90 houve a introdução do treinamento em séries simples, o qual poderia proporcionar ao aluno (paciente) trabalhar os grandes segmentos corporais na mesma sessão (WELSCH et al.,1994; BERGHOLM et al., 1999).

Desta forma, novas pesquisas sobre os benefícios deste tipo de seriação de treinamento foram surgindo. Hass et al (2000) e Bergholm et al (1999) corroboram com esta inovação e afirmam que estes treinamentos, utilizando séries simples, apresentam o mesmo rendimento do que os treinamentos utilizando séries múltiplas, mas com vantagem de ganho de tempo.

Hass et al (2000) mostraram que indivíduos praticantes de musculação obtiveram os mesmos resultados em aumento de força muscular, hipertrofia muscular esquelética, e melhora no condicionamento físico, utilizando séries simples, com treinamentos a 75% da carga máxima, quando comparados com indivíduos utilizando o mesmo treinamento, porém com séries múltiplas.

Os nossos resultados também demonstram esses benefícios, porém com vantagens na seriação simples, visto que, os resultados por nós encontrados demonstraram valores significativamente melhores tanto na composição corporal, apresentando menor percentual de gordura ao final do treinamento do que o grupo SM, e melhores padrões de desempenho, pois em um dos exercícios foi observado maior resistência muscular quando comparados com o grupo SM.

Um dos fatores sugeridos para este melhor resultado seria o da relação de anabolismo e catabolismo protéico.

Está descrito que o músculo necessita de um estímulo, um gatilho, que sinalizaria à necessidade de hipertrofiar, e esta, relacionada com o total de proteínas degradadas durante um treinamento, esta degradação será produto tanto do catabolismo muscular quanto das micro-lesões induzidas pelo estresse mecânico (BADILLO &

AYESTARÁN, 2001). De acordo com os autores citados, a massa de proteína catabolizada durante um exercício pode se apresentar como o produto do índice de catabolismo de proteína por repetição e pelo número de repetição. Em altas intensidades ocorre alto catabolismo protéico por repetição, mas só é possível realizar 1 ou 2 repetições, gerando um trabalho mecânico muito baixo e, por conseqüência um índice de degradação protéico muito baixo. Por outro lado, em intensidades muito baixas, se obtém o mesmo baixo índice de degradação, pois existe alto trabalho mecânico, mas um catabolismo protéico por repetição muito baixo. Desta forma, a sugestão seria de trabalhos que sustentassem uma cababolização relativamente alta, num alto trabalho mecânico, produzindo desta forma uma considerável taxa de degradação de proteínas.

A degradação protéica também é originada de micro-lesões teciduais. Estas micro-lesões relacionam-se com a ação das células satélites, localizadas às margens das membranas basais das células musculares. Estas células têm a função de atuar na recuperação da fibra muscular. Músculos esqueléticos adultos possuem uma notável habilidade de recuperação após miotraumas. Desta forma, a micro-lesão estimularia as células satélites a migrarem para dentro das fibras musculares, criando novos núcleos, regenerando a fibra, formando novas miofibrilas e por conseqüência, hipertrofiando o músculo (HAWKE & GARRY, 2001; VIERCK et al., 2000).

Esta injúria celular libera, ainda, fatores de sinalização, os quais estimulam a migração de células do sistema imunológico a migrarem para o local da lesão, estimulando, desta forma, a proliferação dessas células satélites (VIERCK et al. 2000).

O exercício ainda aumenta o débito cardíaco, gerando um aumento do fluxo sangüíneo para os músculos. Esta hiperemia, associada a um potencial dano tecidual, poderia iniciar uma cascata de reações resultando no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, bem como um processo inflamatório. Estes estímulos também podem estar

relacionados com maior atividade das células satélites (SNYDER et al., 1992; STWART et al., 1997). Entretanto, maiores discussões sobre o sistema imunológico ocorrerão mais adiante.

Tendo em vista a necessidade deste ponto ideal de degradação muscular, e relacionando-o com os achados de nosso experimento, parece evidente que, os exercícios realizados em séries múltiplas estejam ultrapassando este ponto de sinalização ideal, e a lesão tecidual esteja além da necessária, exigindo, desta forma, um gasto muito grande para a recuperação do tecido, ou até mesmo, não recuperando a contento e induzindo ao maior catabolismo protéico.

Esta sugestão, quando correlacionada com os resultados bioquímicos deste trabalho, parece fazer muito sentido, pois parece haver adaptação dos parâmetros avaliados em SS, tais como o estresse oxidativo avaliado por TBARS, o que não ocorreu no grupo SM. É sabido que o estresse oxidativo influi negativamente na atividade das células satélites bem como na atividade miogênica (VIERCK et al., 2000 ; HAWKE et al., 2001; LEE et al., 2002).

Outro fator amplamente sugerido para o aumento da força e da resistência muscular baseia-se na coordenação neuromuscular, a qual está ligada ao melhor recrutamento de fibras musculares, bem como, a adequada frequência de estímulos, sincronização e atividade reflexa do músculo e inibição de mecanismos inibitórios da contração muscular (BADILLO et al, 2001; FLECK & KRAEMER,1999; RHEA et al., 2002).

Quando um indivíduo inicia um programa de treinamento força, ele é submetido a movimentos aos quais não está habituado, causando um estresse muscular que sinalizará ao sistema neuromuscular a necessidade de adequar-se a esse novo movimento. Uma vez criada a adequação necessária, esses movimentos passam a ser

feitos com menor esforço, necessitando de um aumento de carga para produzir novo estresse (SELYE, 1974; MORITANI et al., 1979; RUBE et al., 1990).

Esta análise também é útil para justificar os aumentos de força e resistência, principalmente pelo fato dos voluntários deste trabalho serem sedentários. Desta forma, o treinamento proposto representaria um grande agente estressor sinalizador. Da mesma forma, a avaliação da carga máxima no primeiro dia de treinamento representou um esforço inicial acima do real, visto estes indivíduos não estarem adaptados ao exercício proposto. Entretanto, cabe ressaltar que este estresse inicial foi apresentado igualmente aos dois grupos de trabalho, não justificando, desta forma, qualquer benefício a qualquer grupo.

Isto poderia justificar o grande aumento de força em ambos os grupos, pois não apenas ocorreu um real aumento da força, mas também ocorreu a adequação neuromuscular, otimizando desta forma, o esforço produzido. Contudo, o grupo SM, no exercício voador, apresentou melhor resultado do que o grupo SS, sem no entanto, apresentar qualquer diferença nos demais exercícios avaliados.

Por outro lado, era de se esperar que o grupo SM apresentasse melhor resultado de resistência muscular do que o grupo SS, visto ter treinado num volume maior do que o grupo SS, e este parâmetro utiliza-se muito bem de grandes repetições, ou seja, volume de treinamento. Esta análise da resistência se justifica pelo fato de demonstrar a habilidade do praticante para realizar suas atividades diárias, por exemplo. E parece que, para essa maior resistência, também existe um ponto ideal de estímulos, principalmente no que diz respeito ao volume de treinamento.

Esta suposição parece fazer sentido, pois Rhea et al. (2002) compararam grupos de treinamento em SS e SM, concluindo que o grupo SM obteve melhor rendimento do que o grupo SS, entretanto, eles utilizaram voluntários com no mínimo 2

anos de academia. No nosso trabalho foram utilizados apenas indivíduos sedentários, ocorrendo, desta forma, uma adaptação bem diferente do trabalho anteriormente citado. Outra variável muito significativa diz respeito ao volume e tempo do treinamento. Nesse trabalho de Rhea et al. o grupo SS, tendo em vista o menor tempo final de treinamento, mantinha-se em atividade, com outros exercícios não avaliados, até completar o mesmo tempo de treinamento do grupo SM. Não se pode avaliar a influência que este tempo a mais, numa atividade diferente, poderia estar influenciando nos resultados obtidos. Além disso, os resultados demonstraram não haver diferenças na composição corporal, fato este será discutido adiante.

Já Hass et al. (2000), também utilizaram sujeitos já praticantes (e em atividade) de exercícios de força, acompanhado-os por treze semanas, e avaliando parâmetros morfológicos e de desempenho. Neste trabalho foi evidenciada melhoria nos parâmetros avaliados em ambos os grupos, sem, no entanto, demonstrar diferença entre os grupos avaliados.

Desta forma, pode-se observar que o fato do indivíduo ser sedentário ou estar em atividade não desqualifica os resultados obtidos em nosso trabalho, evidenciando que a evolução obtida pelo treinamento em série simples se dá em qualquer grupo estudado, entretanto, a depender do modo como é analisado, pode prevalecer um ou outro, mas ambos demonstram benefícios significativos.

Estes fatos podem ser corroborados por Welsch et al. (1994), acompanhando grupos em SM e SS por 14 semanas e avaliando o torque na extensão do joelho e demonstrando aumento significativo em ambos os grupos sem haver diferença significativa entre os grupos.

Powers e Howley (2000) destacam que embora haja uma relação entre intensidade/volume de treinamento e os ganhos de força, o volume ideal do treinamento

para aumentar a força ainda é desconhecido, e que é possível que este varie de acordo com a idade e os níveis de condicionamento dos praticantes. Além disso, esses autores ainda relatam que os treinamentos extremamente intensos para ganho ideais de força são desnecessários.

Quanto à composição corporal, nosso trabalho apresenta divergência do que normalmente é encontrado na literatura. Autores citados anteriormente, e que trabalharam com composição corporal encontraram resultados semelhantes em SS ou SM, entretanto, nosso trabalho demonstrou que, o grupo que treinou em SS obteve significativa redução do percentual de gordura, com conseqüente aumento da massa livre de gordura, após o período de treinamento proposto, enquanto que esta diferença não foi observada no grupo que treinou em SM. Um dos mecanismos sugeridos para esta diferença poderia ser que, devido à alta intensidade e volume de treinamento realizado pelo grupo SM, este estaria com atividade catabólica muito grande e com conseqüente perda de massa magra, o que, no final do programa de treinamento representaria uma composição corporal menos favorável. Já o grupo que treinou em SS, obteve uma atividade anabólica possivelmente maior do que o grupo SM, obtendo, conseqüentemente, uma melhor composição corporal. É sabido que o tecido muscular é metabolicamente ativo, o que poderíamos sugerir que o grupo que treinou em SS ainda obteve uma taxa metabólica de repouso possivelmente maior do que o grupo SM, fato este que corroboraria com a diferença encontrada.

Atualmente sabe-se que o tecido adiposo não é simplesmente um depósito de energia. Ainda não está completamente esclarecido, mas, este tecido já está sendo considerado um importante órgão endócrino, responsável pela secreção de diversas substâncias, tais como, o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleucina 6 (IL-6), Angiotensina II, Leptina e Adiponectina, entre outros. Estes últimos, em especial, estão

relacionados com a saciedade alimentar, e regulação da insulina e metabolismo lipídico respectivamente. Baixos níveis de leptina diminuem a sensação de saciedade. E, baixos níveis de adiponectina estão associados à obesidade e diminuem a oxidação dos ácidos graxos musculares e aumentam a insulina plasmática. Também se sabe do seu envolvimento com inflamações e na manutenção da homeostasia (GIL-CAMPOS et al., 2004). Desta forma, parece fazer sentido que o treinamento em SM possa, realmente estar induzindo maior inflamação e induzindo ao maior consumo de adiponectina, o que, por sua vez diminuiria a oxidação dos ácidos graxos, e desta forma diminuiria a possibilidade de emagrecimento efetivo.

Se a adaptação neuromuscular poderia justificar semelhantes melhoras no desempenho entre os dois grupos, dispensando até mesmo um verdadeiro aumento de proteínas contráteis geradoras de força, esta não se aplicaria para justificar os melhores índices obtidos na avaliação da composição corporal do grupo SS quando comparado ao grupo SM.

Essa justificativa é amparada por Wilmore e Costill (2001) que relatam nas primeiras 8 – 10 semanas de treinamento, que a hipertrofia muscular tem pouca influência sobre a força, contudo, esta contribuição aumenta progressivamente até tornar-se a principal contribuinte após 10 semanas de treinamento. Tendo em vista que o nosso protocolo era de 12 semanas de treinamento, significa que entramos, então, em um período onde a hipertrofia poderia fazer diferença, e como não encontramos esta diferença entre os grupos, poderíamos supor que o grupo SS obteve melhor resposta ao treinamento proposto, e talvez maior síntese de massa magra (metabolicamente ativa).

## **4.2. Análises Bioquímicas:**

### **4.2.1. Perfil Lipídico:**

O colesterol total e suas frações são constantemente analisados com o objetivo de verificar o adequado estado de saúde dos indivíduos. Esta preocupação deve-se ao fato de que, o indivíduo dislipidêmico está potencialmente mais suscetível às doenças vasculares, tais como a aterosclerose e as conseqüentes isquemias, as quais podem causar infartos e seqüelas transitórias (ou permanentes), e até mesmo levar à morte.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que, em torno de 30% da população mundial sofrerá e morrerá de causas vasculares. No Rio Grande do Sul, conforme noticiado no 60º Congresso Brasileiro de Cardiologia, promovido pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, este número fica em torno de 35% e nos Estados Unidos, 40%. Desta forma, o adequado acompanhamento destes parâmetros pode prevenir e/ou retardar o surgimento dessas enfermidades.

O exercício físico é constantemente indicado como coadjuvante para o tratamento ou prevenção de doenças lipídicas e vasculares. Pelo fato dos exercícios aeróbios de baixa intensidade utilizarem os Ácidos Graxos Livres (AGL) como principal substrato para ressíntese de energia, utilizando rotas lipolíticas, foram eleitos para estudos sobre sua influência no comportamento do perfil lipídico. O fato da confirmação de sua adequada influência, demonstrando aumento de HDL-C e

diminuição do LDL-C, fizeram com que sua utilização fosse ampliada (LeMURA et al., 2000; KRAEMER et al. 1997).

De acordo com DiPietro, 1995 (apud LeMura et al. 2000), entre as adaptações necessárias para haver alterações lipídicas pelo exercício estão: a aumentada hidrólise da gordura subcutânea estimulada pela adrenalina; a aumentada capacidade do músculo para oxidar lipídios; a aumentada hidrólise dos triacilglicerois em músculos treinados; a aumentada hidrólise dos triacilglicerois circulantes pela atividade da lipoproteína lipase; e a diminuída concentração de insulina, a qual é um fator inibitório da mobilização lipídica.

Tendo em vista que as alterações acima descritas ocorrem em exercícios onde a lipólise seria a principal rota metabólica, os exercícios de força não mereceram a mesma atenção e apreciação, visto serem exercícios anaeróbios, utilizando prioritariamente a creatina fosfato ou a glicose, e não, a lipólise como principal fonte de energia.

Os resultados existentes sobre o comportamento do perfil lipídico em praticantes de musculação ainda são bastante controversos. Kokkinos et al. (1991), afirma que o treinamento de força por 20 semanas em homens de meia idade, com perfil lipídico elevado, não foi suficiente para induzir qualquer alteração favorável nos padrões lipídicos avaliados. Entretanto, Johnson et al. (1982) ao treinar um grupo semelhante, porém, por 12 semanas, encontrou diminuição do colesterol total e LDL-C, além do aumento do HDL-C, sem, no entanto observar alterações nos resultados de triacilglicerois.

Resultados em ambos os sexos também foram avaliados. Goldberg et al. (1984), avaliaram homens e mulheres que praticaram treinamento de força por 16

semanas e observaram, em ambos, significativa redução do colesterol total, triacilgliceróis e LDL-C, além da elevação das concentrações de HDL-C.

No nosso trabalho concordamos com todos os dados apresentados pela literatura consultada, pois também tivemos resultados antagônicos nos diferentes grupos treinados. Pretendemos, inclusive, sugerir alguns dos motivos pelos quais existe esta contradição.

Entre os parâmetros avaliados, foi observada, após o protocolo de 12 semanas de treinamento, uma diminuição em torno de 11% no colesterol total do grupo SS, enquanto que o grupo que treinou em SM não obteve modificação significativa dos resultados obtidos inicialmente.

As frações HDL-C, LDL-C e a relação colesterol total / HDL-C, também sofreram favoráveis alterações no grupo que treinou em SS, mas não no grupo que treinou em SM.

Desta forma, mais uma vez observamos que parece existir uma forte relação entre a intensidade de treinamento e a estimulação gerada. Acreditamos que este ponto “ideal” de estimulação poderia estar estimulando algum receptor de lipoproteínas, talvez receptores de LDL, ou transportadores de colesterol, e desta forma, captando mais colesterol e/ou LDL, diminuindo assim, essas frações citadas, e conseqüentemente favorecendo o aumento das frações de HDL-C. Entretanto, para comprovar esta hipótese seriam necessários trabalhos futuros, utilizando marcadores moleculares radioativos, a fim de verificarmos o real aumento da atividade desses receptores.

Uma outra hipótese, sugerida por LeMura et al. (2000), seria de que as reduções nas lipoproteínas poderiam estar associadas a exercícios que causassem diminuição do percentual de gordura. Além da já conhecida maior atividade das lipoproteínas lipase, tanto em músculo quanto em tecido adiposo.

Observamos que no nosso trabalho o grupo que treinou em SS obteve diminuição do percentual de gordura e também melhorou o perfil lipídico, confirmando, então esta hipótese. De outra forma, o grupo que treinou em SM não obteve diminuição do percentual de gordura, e por consequência, também não obtiveram alterações no perfil lipídico.

Esta autora trabalhou com mulheres por 16 semanas, sendo um grupo aeróbio, um grupo combinado aeróbio e anaeróbio, e um grupo de força, avaliando o perfil lipídico em diferentes momentos. No grupo que treinou aerobicamente (o único a apresentar alterações no perfil lipídico), na avaliação da oitava semana ainda não era perceptível qualquer alteração no perfil lipídico de suas voluntárias, o que demonstra que o tempo é outra variável importante para a obtenção desses resultados. O fato de não ter encontrado alterações no perfil lipídico nas praticantes de treinamento de força, reforça a hipótese deste trabalho, visto que, os grupos por ela avaliados, também não obtiveram nenhuma alteração na composição corporal, o qual parece ser necessária, tendo em vista a forte correlação do percentual de gordura com o perfil lipídico. Cabe ainda salientar que, no trabalho desenvolvido por esta autora e seus colaboradores, no que diz respeito ao treinamento de força proposto, foram utilizadas séries múltiplas, corroborando desta forma com nossos achados, onde o grupo SM também não obteve nenhuma melhora do perfil lipídico.

#### 4.2.2. Estresse Oxidativo

Durante a respiração celular, o oxigênio recebe, através da enzima citocromo oxidase, quatro elétrons de uma só vez, mas devido a sua configuração eletrônica, ele tem forte tendência a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos denominados de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO). Entre estas, encontramos os Radicais Livres do Oxigênio (RL) (MENEHINI, 1987).

Sabe-se que as ERO atacam os lipídios de membrana num processo chamado lipoperoxidação (LPO). Este é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares, as quais são formadas, em grande parte, por lipídios insaturados e proteínas. Essas membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo, podendo haver modificação das propriedades da membrana, da permeabilidade e capacidade de transporte e liberação de enzimas que degradam os lisossomos, destruindo células. As EROs podem também levar à destruição de proteínas, através da oxidação de grupamentos sulfidríla, além de poderem oxidar o ácido desoxirribonucléico (DNA) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Entretanto, existem sistemas capazes de minimizar e/ou neutralizar os possíveis danos causados pela formação dessas EROs, são os chamados sistemas antioxidantes, os quais dividem-se em endógenos (principalmente enzimáticos) e os exógenos (vitaminas e grupos fenóis). Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação de ERO e a atividade antioxidante, definimos como estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Atualmente tem sido relatada a atuação das HSP na defesa oxidante e danos celulares.

Já está bem estabelecido que o exercício físico leva a um aumento da formação dessas EROs, entretanto, o treinamento contínuo induz a maior atividade de agentes antioxidantes endógenos, o que pode levar a um menor estresse oxidativo (Powers et al., 1999; Jenkins, 1988). Há também a formação dessas ERO em processos inflamatórios e reperfusões pós-isquêmicas (McCord, 1985).

Schneider et al., 2005, compararam indivíduos não-treinados e treinados e observaram que estes últimos apresentavam menor lipoperoxidação em diferentes intensidades de treinamento, observaram também maior atividade enzimática antioxidante.

No nosso protocolo trabalhamos apenas com uma intensidade (75% de 1 RM), embora tenhamos diferentes volumes de trabalho, visto termos trabalhado em SS (1x10 repetições) ou em SM (3x10 repetições), e observamos que o grupo que treinou em SS obteve melhor adaptação ao treinamento proposto com conseqüente diminuição do estresse oxidativo, fato este que não ocorreu no grupo que treinou em SM.

Segundo Schneider e Oliveira (2004), alguns dos mecanismos relacionados para aumento das EROs pelo exercício físico estão as interrupções das bombas de ATP cálcio dependentes, aumentando as concentrações intracelulares de cálcio; períodos de isquemia causados por exercícios intensos, seguidas de reperfusões pós-isquêmicas; e maior atividade dos leucócitos, em resposta às lesões musculares induzidas pelo exercício. Desta forma poderíamos, então, ratificar nossa hipótese de que o treinamento em SM, com maior volume de treino, embora na mesma intensidade, esteja induzindo à maior lesão tecidual e, possivelmente, maiores períodos de isquemia, gerando, desta forma, maior estresse oxidativo.

Esta nossa hipótese, inclusive, vem ao encontro dos resultados morfológicos já discutidos, onde observamos melhores respostas para o treinamento em SS.

Muito embora estejamos apenas “culpando” o treinamento em SM pelo maior estresse oxidativo observado, ainda assim não podemos deixar de sugerir que, talvez, também esteja ocorrendo, concomitantemente, uma maior atividade antioxidante induzida pelo treinamento em SS, associado com menor atividade pró-oxidante, e talvez, esta última seja a maior responsável por estas respostas.

Bloomer et al. (2004) observaram que atividade anaeróbia de alta intensidade resulta em modificação oxidativas tanto no músculo quanto no sangue, induzindo adaptações capazes de atenuar o dano oxidativo causado por esse tipo de exercício. Sugerindo ainda que poderia ser, tanto pelo aumento das defesas antioxidante quanto pela diminuição da geração de pró-oxidantes, durante e após o exercício. Bloomer et al. (2005) também observaram que após 30 minutos de exercícios combinados (anaeróbio e aeróbio), em indivíduos treinados, aumentaram, em diferentes magnitudes, marcadores sanguíneos de estresse oxidativo. Já Goldfarb et al. (2005) analisaram o exercício excêntrico em mulheres não treinadas e observaram que aumentava o estresse oxidativo analisado no sangue, porém a suplementação com antioxidantes, tais como vitamina C e selênio, atenuaram o efeito do exercício.

No nosso trabalho observamos que, 6 horas após o treinamento proposto, o estresse oxidativo, avaliado por TBARS, aumentava significativamente em ambos os grupos, quando comparados com os valores de pré-treinamento.

Lee et al. (2002) examinaram o efeito do exercício numa série simples de 60 repetições excêntricas e avaliaram o comportamento da glutathione em diferentes momentos após o exercício e não observaram alterações no conteúdo de GSH, entretanto observaram forte tendência de diminuição da concentração de glutathione, a qual manteve baixo nível até 96 horas após o final do treino. Já a glutathione oxidada não

demonstrou aumento em nenhum dos momentos avaliados, concluindo que este tipo de estresse não foi suficiente para alterar o status da glutathiona.

Já em nosso trabalho, observamos que, independente do protocolo utilizado, a GSSG aumenta no primeiro dia de treinamento, entretanto, os níveis de GSH mantêm-se, não alterando, desta forma, o status da glutathiona no primeiro dia de treinamento. Nas análises subseqüentes observamos alterações tanto na GSSG, quanto na GSH, de ambos os grupos. Entretanto, as alterações na relação da GSSG/GSH puderam ser observadas na 12ª semana e na final, para o grupo SM, mas, só foram observadas na final para o grupo SS, onde ainda observa-se, neste período do protocolo, significativa diferença entre os grupos, mostrando que o grupo que treinou em SM estava mais injuriado.

As semelhanças com o trabalho de Lee et al. (2002), esgotam-se com a continuidade do treinamento. Este autor trabalhou com uma única série de exercícios, de forma aguda, ao passo que o nosso trabalho se prolonga por 12 semanas, e é justamente onde encontramos a justificativa para esta alteração. É possível que o constante estresse ao qual as células estejam submetidas, de alguma forma influencia no metabolismo da glutathiona, quem sabe na  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase, enzima chave para a síntese de glutathiona, a qual não foi testada para poder confirmar esta hipótese, ou ainda alguma outra enzima.

A análise da concentração de glutathiona, mesmo que sem as dosagens dos tempos intermediários (4ª e 9ª semana), foi importante, pois já foi observado que existe estreita relação entre o estado redox celular e o balanço da glutathiona, com a diferenciação celular para a formação de novas fibras musculares, a miogênese. De acordo com Ardite et al (2004), a depleção das reservas de GSH após a estimulação para diferenciação celular anula a miogênese. E esses efeitos revertem-se após a

estabilização da GSH. O motivo disto é que baixos níveis de GSH permitem a ativação do NF- $\kappa$ B, e os níveis de GSH restaurados contribuem para a formação de miotubos provenientes das células satélites, mantendo inativado o NF- $\kappa$ B.

Além de a diferenciação celular ficar diminuída, a própria proliferação das células satélites é afetada. De acordo com Renault et al. (2002), o estresse oxidativo diminui drasticamente o número de células aptas para a proliferação, da mesma forma como encontrado em pessoas idosas, onde se observa significativa diminuição das células satélites. O estresse oxidativo pode induzir prematuramente este estado senil nas células satélites.

Neste trabalho a análise do estresse oxidativo por TBARS apresentou adaptação, e conseqüente diminuição do estresse oxidativo, no grupo SS, podendo, neste caso, favorecer a ação das células satélites.

Desta forma, pode-se concluir que, os praticantes de SS realmente treinaram num volume que gerou o estímulo adequado para proporcionar um melhor estado redox, justificando, assim, os resultados morfológicos encontrados nesse grupo, os quais eram superiores aos do grupo que treinou em SM.

Podemos ainda atribuir que, uma melhor atividade das células satélites, em função do menor estresse oxidativo, favoreceu a uma melhor recuperação muscular, e quem sabe, maior hipertrofia resultando em melhor desempenho funcional e morfológico encontrado.

Acreditamos que, realmente, o maior estresse oxidativo gerado no grupo SM possa ter interferido na adequada ação e proliferação das células satélites não favorecendo a melhores resultados. Outrossim, a melhor relação GSSG/GSH final, encontrada no grupo SS, quando comparado com o SM, pode corroborar com esta nossa hipótese.

Embora não tenha sido avaliado nenhum tipo de citocina circulante neste trabalho, ou ainda a ativação do próprio NF- $\kappa$ B, acreditamos que o grupo SM tenha sofrido maiores danos inflamatórios do que o grupo SS.

Tendo em vista que, tanto processos inflamatórios, quanto estresse oxidativo e citocinas circulantes possam intervir na adequada função miogênica muscular, e estes induzirem a expressão de HSP, é possível que os resultados da expressão de HSP deste trabalho possam servir de suporte para esta hipótese, como também já observado em outros modelos experimentais desenvolvidos por nosso grupo (KOLBERG et al., 2005).

#### **4.2.3. Análise da Expressão de HSP**

Quando uma célula é injuriada, uma série de reações ocorre para buscar minimizar ou até mesmo neutralizar o dano ocorrido. A síntese das HSP ocorre rapidamente após a exposição do organismo a estresses externos, térmicos ou não, com o objetivo de manter a homeostase celular e a conformação da proteína, bem como evitar a desnaturação e a má-formação de proteínas, além de proverem a organização, translocação e ação de *chaperonas* (FEHRENBACH & NIESS, 1999).

Diversas condições fisiopatológicas podem estimular a resposta ao choque térmico, e contribuir, desta forma, para a estabilização de um estado citoprotetor em uma variedade de agentes agressores, tais como inflamações, infecções, isquemia, estresse oxidativo, exercício físico intenso, além de várias doenças humanas (SANTORO, 2000; FEIGE et al., 1996; LOCKE & NOBLE, 1995).

Isquemias, depleção de glicose, alterações no pH e conteúdo celular de cálcio também são potentes indutores da expressão de HSP em diferentes tecidos (FEHRENBACH & NIESS, 1999).

Já foi observado que as HSP atuam como sinalizadoras para resposta imunológica, e que uma série destas proteínas já se sabe associada à indução de respostas imunológicas pró-inflamatórias, bem como, para a entrega de peptídeos antigênicos para células apresentadoras de antígenos (MOSELEY, 2000).

Durante o exercício físico parece haver elevação com conseqüente adaptação da expressão das HSP. Liu et al. (2004) observaram as alterações na expressão destas proteínas, no músculo vasto lateral, em dois distintos momentos: 3 semanas de treinamento de força (alta intensidade) e, após 1 semana de repouso, mais 3 semanas de treinamento de resistência (baixa intensidade). Foi observado que a expressão de HSP70 aumentou no treinamento de força, diminuiu no período de intervalo e não tornou a subir no treinamento de resistência, sugerindo que realmente existe esta adaptação. Entretanto, não pode ser descartada a hipótese de que a utilização do mesmo grupo, ainda mais iniciando com o treinamento mais intenso, possa ter interferido na adequada análise de dados, e pode, inclusive ter mascarado os possíveis resultados.

Pelo fato de que vários fatores possam influenciar na expressão das HSPs, e tendo em vista a possível adaptação da sua expressão, é sempre conveniente trabalhar com grupos distintos. No nosso trabalho, um grupo treinou em SS e o outro treino em SM, e os indivíduos permaneceram durante todo o tempo no mesmo grupo. O intervalo adotado por Liu entre os treinamentos, de apenas 1 semana, também pode ter interferido nos resultados, pois sabe-se que músculos treinados necessitam de intensidades maiores para a ativação de alguns sinalizadores. No caso deste trabalho, selecionamos apenas

voluntários sedentários e tivemos o cuidado de observar que nenhum deles estivesse fazendo qualquer tipo de treinamento há, pelo menos, 40 dias, o que dá em torno de 6 semanas. Cabe ainda ressaltar que, embora este período fosse critério de seleção deste trabalho, todos os indivíduos participantes estavam há mais de 2 meses sem qualquer treinamento.

A intensidade do treinamento também é um fator relevante para a expressão das HSP. O recrutamento das fibras sugere alterações na sobrecarga muscular resultante da mudança de intensidade do exercício, e este é um importante componente para a expressão de HSP70 (MILNE & NOBLE, 2002).

Se este recrutamento ocorrer por fadiga, podemos acreditar que o grupo que treinou em SM apresentava um índice de fadiga bem maior do que o grupo SS, visto o volume de treinamento, o qual, provavelmente, fazia um maior recrutamento total de fibras nas 3 séries, diferente da SS que fatigava e não utilizava mais aquele grupo muscular naquele exercício.

No nosso trabalho, observamos que o grupo que treinou em SS não apresentou alterações na expressão de HSP, enquanto que o grupo que treinou em SM aumentou significativamente esta expressão no primeiro dia e na 9ª semana de treinamento (sendo neste dia inclusive maior que o grupo SS).

Como a síntese de HSP, também se sabe, é regulada pela progressiva depleção do glicogênio muscular, e do progressivo aumento do lactato, desta forma, é possível que o maior volume de treinamento do grupo SM induza a estas duas variáveis citadas, e desta forma, também justifique a diferença encontrada.

O nível de lesão induzida também está relacionado com a possível expressão de HSP, entretanto, já foi observado que, intensidades muito elevadas estimulem um quadro inflamatório muito violento. Sugere-se que o estresse moderado seja suficiente

para induzir a ativação das vias das HSP, enquanto que estresses de maior intensidade sejam necessários para ativar o NF- $\kappa$ B (SANTORO, 2000). Assim, acreditamos que o treinamento em SS não esteja atingindo um ponto de estímulo capaz de gerar aumento da expressão de HSP, até mesmo tendo em vista a adaptação ao estresse oxidativo observada neste grupo. Ao contrário, o treinamento em SM pode estar atingindo este ponto de estimulação, e quem sabe até, ultrapassando, pois não se observa adaptação na expressão destas proteínas e nem tampouco no estresse oxidativo.

Shastri et al. (2002) corroboram com nossa hipótese. Eles avaliaram a expressão de HSP70 e HSP90 em indivíduos treinados, submetidos a 1 hora de corrida em esteira a 70% do  $VO_2$  *max* e não observou alterações na expressão dessas proteínas, sugerindo que, realmente, este não tenha sido um estímulo suficiente para expressar estas proteínas em leucócitos. Outra hipótese sugerida por este autor, e que também vem ao encontro do que apresentamos e sugerimos, está a relação entre a expressão destas proteínas e o estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo induzido pelo treinamento parece responder pelo aumento da expressão das HSP.

#### 4.2.4. Análise do Perfil Imunológico

O exercício físico exerce ação direta no perfil imunológico de seus praticantes. É sabido que o exercício físico pode exercer ação de imunossupressão, durante e imediatamente após o seu término, a depender da intensidade e, principalmente, duração dos exercícios. Atletas de maratona, por exemplo, experimentam depressão do sistema imunológico, a qual pode durar por horas ou até mesmo dias após o término da atividade. Já exercícios de menor intensidade e duração, causam menor perturbação ao sistema imunológico, podendo, inclusive, estimular a ação deste sistema (NIEMAN, 1997).

Neste trabalho utilizamos apenas exercícios de musculação, tendo dois distintos grupos: o grupo SS e o grupo SM, os quais fizeram 7 estações.

Tendo em vista que o tempo de duração de uma única execução de um exercício qualquer levava no máximo 2 segundos, e como as séries eram de 10 repetições, podemos assumir que cada série consistia de, no máximo, 15-20 segundos. Guardando o tempo de repouso entre uma série e outra (em torno de 2 minutos), e o número de estações, podemos assumir que o tempo total do treinamento em SS era em torno de 15 minutos. E o tempo total de treinamento em SM aproximadamente 40 minutos. Como a intensidade era a mesma em ambos os grupos (75% CM), o fator volume de treinamento (tempo) pode ser um dos fatores que influenciou nos resultados obtidos.

Durante e após o exercício físico inicia-se uma fase denominada de leucocitose, e esse aumento na proliferação dos leucócitos atende ao chamado de sinalizadores químicos, possivelmente estimulados por lesões induzidas pelo esforço e

iniciando um processo inflamatório. Essas alterações parecem estar relacionadas com a ação de hormônios, tais como, o hormônio do crescimento, o cortisol e a adrenalina (PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000. ; WILMORE & COSTILL, 2001).

Durante o exercício de musculação encontramos a liberação desses hormônios citados, além da testosterona, durante e após o treinamento, e de acordo com Wilmore & Costill (2001), para iniciar o processo de reparação celular, tendo em vista a quantidade de lesão sugerida para esta prática.

Pelos resultados encontrados no estresse oxidativo, podemos sugerir que estas lesões realmente ocorrem, entretanto, a magnitude delas se mostrou bastante diferente nos dois modelos estudados (SS x SM).

Se já é consenso que o exercício continuado e intenso pode levar a imunossupressão, e até mesmo a infecções e outras enfermidades nos seus praticantes, parece haver também um meio de adaptação e até mesmo imunoestimulação, visto que, indivíduos que possuem hábitos regulares de exercícios físicos, apresentam menor suscetibilidade a infecções e lesões (PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000).

O exercício leve ou moderado, com frequência regular, também é estimulante do sistema imunológico, entretanto, não está bem descrito como isto ocorre.

Malm et al. (1999) avaliaram os efeitos do exercício excêntrico nas mudanças no sistema imunológico de 12 homens, de 22 a 35 anos de idade, e foi verificado um aumento nos leucócitos, monócitos e neutrófilos. Nenhuma mudança foi observada no número de basófilos, eosinófilos, células B e T, além de uma queda de NK após o exercício.

Desta forma, podemos observar que exercícios de musculação estão, também, envolvidos nestas alterações.

No nosso trabalho avaliamos a atividade do sistema imunológico através da ação dos monócitos em sua forma ativa, neste caso, macrófagos, e a sua capacidade de ação fagocítica.

Nas análises realizadas, foi observado que ambos os grupos melhoraram a capacidade fagocítica dos macrófagos, durante a progressão do treinamento. Entretanto, na última análise, o grupo que treinou em SS obteve um resultado significativamente maior do que o grupo SM. Cabe salientar que na última análise não havia treinamento prévio, o que determinou que, esses indivíduos estavam com seu sistema de defesa mais “alerta” do que o grupo SM.

O dano provocado nas miofibrilas libera agentes que estimulam a atração de macrófagos e linfócitos para o tecido injuriado. Os macrófagos participam da ação de remoção dos fragmentos celulares, e este é considerado um importante passo para a manutenção da estrutura celular durante sua reparação. Nesta fase também são produzidas citocinas que ativam macrófagos e linfócitos. Linfócitos T, em particular, são estimulados a moverem-se para interior da área afetada onde são ligados à moléculas de adesão na regeneração da miofibrila. Estes processos estimulam a atividade das células satélites durante o processo de regeneração e hipertrofia muscular (VIERCK et al., 2000; HAWKE & GARRY, 2001).

Observamos que, de fato, a atividade dos macrófagos apresentou-se maior em ambos os grupos, entretanto, parece haver uma forte ligação entre os dados encontrados na composição corporal, resistência muscular, estresse oxidativo e perfil imunológico do grupo SS, evidenciando melhores resultados nesses parâmetros citados, quando comparados com o grupo SM. Sendo assim, a cada resultado favorável encontrado e analisado, podemos confirmar que, o treinamento em SS realmente parece induzir um nível de estresse mais favorável para a obtenção dos resultados avaliados,

enquanto que, o grupo SM parece ultrapassar este ponto “ideal” de treinamento, e possivelmente induzir a um processo de lesão e catabolismo mais acentuado.

## CONCLUSÕES

- No que diz respeito à composição corporal, observamos que o grupo que treinou em SS obteve melhores resultados do que o grupo que treinou em SM. O grupo que treinou em SS diminuiu o percentual de gordura e aumentou o percentual de massa magra, fato este que é constantemente buscado por quem pratica exercícios.
- Quanto às análises de desempenho, observamos que o grupo que treinou em SS obteve melhores resultados do que o grupo que treinou em SM. Quanto à análise da resistência, não apenas observamos valores similares, mas, inclusive em um dos exercícios avaliados o grupo SS obteve melhor resultado. Estes parâmetros de composição corporal e desempenho podem estar relacionados à ação das células satélites, e, conseqüentemente, do processo anabolismo/catabolismo protéico e influenciando na taxa metabólica de repouso.

- No que diz respeito ao perfil lipídico observamos que o grupo que treinou em SS obteve melhores resultados do que o grupo que treinou em SM. O primeiro obteve diminuição do colesterol total, do LDL-C e da relação Colesterol total / HDL-C, além de aumento das frações de HDL-C. O grupo que treinou em SM não alterou nenhum dos parâmetros avaliados. É possível que esta melhora tenha relação com os resultados verificados na composição corporal observada no grupo SS, a qual também melhora.
- Quanto ao estresse oxidativo induzido pelo exercício e sua constante adaptação, observamos que o grupo que treinou em SS apresentou melhor adaptação com conseqüente diminuição dos valores obtidos inicialmente. Este fato sugere que, o grupo que treinou em SM ultrapassou o limite necessário para a adequada sinalização celular e conseqüente adaptação.
- No que diz respeito à expressão de proteínas de choque térmico observamos que o grupo que treinou em SS não aumentou a expressão destas proteínas, enquanto que o grupo que treinou em SM aumentou esta expressão. E o fato do estresse oxidativo também ter aumentado neste grupo parece que realmente houve correlação destes resultados.
- Na análise do perfil imunológico observamos que ambos os grupos obtiveram melhor atividade fagocítica dos macrófagos, quando comparados com os resultados do primeiro dia. Entretanto, o grupo que treinou em SS obteve melhor resultado final do que o grupo que treinou em SM, indicando um melhor estado de alerta das células imunológicas.

## PERSPECTIVAS

- Tendo em vista que os grupos utilizados consistiam de indivíduos saudáveis e jovens, poderíamos investigar se estes resultados repetir-se-iam numa população mais velha e com algum tipo de enfermidade, como cardiopatas, por exemplo, ou ainda, em indivíduos que já estivessem praticando algum tipo de treinamento.
- Os resultados morfológicos e de desempenho encontrados no grupo SS poderiam estar relacionados a uma melhor atividade das células satélites, desta forma, a investigação quanto a proliferação e ação destas células poderia ser realizada.
- O fato de termos observado melhor perfil lipídico final no grupo SS sugere-nos verificar a ação da lipoproteína lipase neste tipo de treinamento, bem como, observarmos a atividade dos receptores de colesterol celulares.

- Como foi observado que o grupo SS obteve melhor avaliação do estresse oxidativo, poderíamos investigar a ação das enzimas antioxidantes, bem como as precursoras da glutathione, nesta modalidade de treinamento
- O melhor perfil imunológico proporcionado por este treinamento, e em especial no grupo SS, poderia estar, inclusive, proporcionando uma maior proliferação dos linfócitos, ou, no mínimo favorecendo a citoproteção dos mesmos com conseqüências diretas para a melhoria da performance do sistema imunológico destes indivíduos.

## OBRAS CONSULTADAS

**ACMS – AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE.** Prova de esforço e prescrição de exercício. Ed. Revinter: Rio de Janeiro, 2000.

**ANDERSON, M.E.** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* . 113: 548-555, 1985

**AKERBOOM, T. P. M. & SIES, H.** Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, 77: 373-82, 1981.

**ARDITE, E. BARBERA, J.A. ROCA, J. FERNÁNDEZ-CHECA, J.C.** Gutathione Depletion Impairs Myogenic Differentiation of Murine Skeletal Muscle C2C12 Cells through Sustained NF- $\kappa$ B Activation. *American Journal of Pathology* 165:719-728, 2004.

**BABJI, P. MATTHEWS, S.M. RENNIE, M.J.** Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *Eur. J. Appl. Physiol.* 50: 405-411, 1983

**BENJAMIN, I.J. HORIE, S. GREENBERG, M.L. ALPERN, R.J. WILLIAMS, R.S.** Induction of stress protein in cultured myogenic cells. Molecular sigals for the activation of heat shock transcription factor during ischemia. *J. Clin. Invest.* 89: 1685-1689. 1992.

**BLOOMER, R.J. & GOLDFARB, A.H.** Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can. J. Appl. Physiol.* 29 (3): 245-263, 2004 – Abstract.

**BLOOMER, R.J. GOLDFARB, A.H. WIDEMAN, L. MCKENZIE, M.J. CONSITT, L.A.** Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J. Strength Cond Res:* 19 (2): 276-285, 2005.

**BRADFORD, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54, 1976.

**BUEGE, J.A. & AUST, S.D.** Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*, 52:302-310. 1978.

**CURI, R.** Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: *Sprint*, 2000.

**DRAPER, H.H., SQUIRES, E.J., MAHMOODI, H., WU, J., AGARWAL, S., HADLEY, M.** A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad. Biol. Med.*, 15:353-363. 1993.

**DELAVIER, F.** Guia dos movimentos de musculação – uma abordagem anatômica. Segunda edição. São Paulo: *Manole*, 2000.

**FEHRENBACH, E. PASSEK, F. NIESS, A.M. POHLA, H. WEINSTOCK, C. DICKHUTH, H. NORTHOFF, H.** HSP expression in human leucocytes is modulated by endurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(3): 592-600, 2000.

**FEHRENBACH, E., NIESS, A.** Role of heat shock protein in the exercise response. *Exercise Immunology Review*, 5: 57-77, 1999.

**FEIGE, U. MORIMOTO, R.I. YAHARA, I. POLLA, B.S. (Eds.)** *Stress-inducible cellular response*. Birkhäuser-Verlag, Basel-Boston-Berlin, 1996.

**FLECK, S.J. KRAEMER, W.J.** Fundamentos do treinamento de força muscular. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: *Artes Médicas Sul*, 1999.

**FURASTÉ, P.A.** Normas técnicas para o trabalho científico. Explicitação das normas da ABNT. 13<sup>a</sup> ed. – Porto Alegre: s.n., 2005.

**GIL-CAMPOS, M. CAÑETE, R. GIL, A.** Adiponectina, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical Nutrition*: 23, 963-974, 2004.

**GUEZENNEC, C.Y.** Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. *Int. J. Sports Med.* 19: 323-327, 1998.

**GOLDBERG, L. ELLIOT, D.L. SCHUTZ, R.W. KLOSTER, F.E.** Changes in lipid and lipoprotein levels after weight training. *J Am Med Assoc.* 252: 504-506, 1984.

**GOLDFARB, A.H. BLOOMER, R.J. MCKENZIE, M.J.** Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med. Sci Sport Exerc.* 37(2): 234-239, 2005.

**HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M.** Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>th</sup> ed. *Oxford University Press*, 1999.

**HASS, C.J. GARZARELLA, L. DE HOYOS, D. POLLOCK, M.L.** Single versus multiple sets in long-term recreational weightlifter. *Med. Sci. Sports Exerc.* 235-242, 2000.

**HAWKE, T.J. & GARRY, D.J.** Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl Physiol.* 91: 534-551, 2001

**HUNT, C. MORIMOTO, R. I.** Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6455-6459.

**JOHNSON, C.C. STONE, M.H. LOPEZ, S.A. HERBERG, J.A. KILGORE, L.T. BYRD, R.J.** Diet and exercise in middle-age men. *J Diet Assoc.* 81: 695-701, 1982

**KRAMER, J. B. STONE, M. H. O'BRYANT, H. S.** Effects of single vs. multiple sets of weight training: impact of volume intensity, and variation. *J Strength Cond. Res.* 11:143-147, 1997.

**KRAEMER, W.J. VOLEK, J.S. CLARK, K.L. GORDON, S.E. INCENDON, T. PUHL, S.M. McBRIDE, J.M. WILL, S. DEVANE-BELL, J. GOLDBERG, A.P.** Physiological adaptations to a weight-loss dietary regimen and exercise programs in women. *J Appl Physiol* 83: 270-279, 1997.

**KOLBERG, A. ROSA, T.G. PULH, M.T. SCOLA, G. JANNER, D.R. LAGRANHA, D.J. MASLINKIEWICZ, A. HECK, T.G. CURI, R. HOMEM DE BITTENCOURT, JR. P.I.** (2005) Low expression of MRP/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochemistry and Function*, 23:1-17. (Published online in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1027/cbf.1290)

**KOKKINOS, P.F. HURLEY, B.F. SMUTOK, M.A. FARMER, C. REECE, C. SHULMAN, R. CHARABOGOS, C. PATTERSON, J. WILL, S. DEVANE-BELL, J. GOLDBERG, A.P.** Strength training does not improve lipoprotein-lipid profiles in men at risk for CHD. *Med Sci Sports Exerc.* 23: 1134-1139, 1991.

**LEE J; GOLDFARB AH; RESCINO MH; HEGDE S; PATRICK S; APPERSON K.** Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc.*34(3): 443- 448 - 2002

**LeMURA, L.M. von DUVILLARD, S.P. ANDREACCI, J. KLEBEZ, J.M. CHELLAND, S.A. RUSSO, J.** Lipid and lipoprotein profiles, cardiovascular fitness, body composition, and diet during and after resistance, aerobic and combination training in young women. *Eur J Appl Physiol.* 82: 451-458, 2000.

**LIU, Y. LORMES, W. WANG, L. REISSNECKER, S. STEINACKER, J.M.** Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *Eur J Appl Physiol.* 91 (2-3): 330-335, 2004.

**LOCKE, M. NOBLE, E.G.** Stress proteins: the exercise response. *Can. J. Appl, Physiol.* 20(2): 155-167. 1995.

**LOCKE, M. NOBLE, E.G. TANGUAY, R.M. FEILD, M.R. IANUZZO, S.E. IANUZZO, C.D.** Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am. J. Physiol.* 268:C 1387-1394. 1995.

**MALM C.; LENKEI R.; SJÖDIN B.** Effects of eccentric exercise on the immune system in men. *J. Appl. Physiol.*86 (2): 461-468, 1999.

**MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C.** Glutathione transferase. *Methods Enzymol.*, 77:231-5, 1981.

**McCORD, J.M.** Oxygen-derived free radicals in postischemic injury. *N. Eng. J. Med.* 312: 159-163, 1985.

**MENEGHINI, R.** A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, 5: 56-62, 1987.

**MILNE, K. & NOBLE, E.G.** Exercised-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J. Appl. Physiol.* 93: 561-562, 2002.

**MOSELEY, P.I.** Exercise, stress and immune conversation. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 28: 128-132, 2000.

**MORITANI, T. DeVRIES, H.** Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. *Am. Journal of Physica. Medicine.* 58: 115-119. 1979.

**NEHLSSEN-CANNARELLA, S. FAGOAGA, O. FOLZ, J. GRINDE, S. HISEY, C. THORPE, R.** Fighting, fleeing and having fun: The immunology of physical activity. *Int. J. Sports Med.* 18 (1): S8-S21, 1997.

**NIEMAN, D.C.** Exercise immunology: practical applications. *Int. J. Sports Med.* 18: S91-S100, 1997.

**NIESS, A.M. PASSEK, F. LORENZ, I. SCHNEIDER, E.M. DICKHUTH, H. NORTHOFF, H. FEHRENBACH, E.** Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes – acute and adaptational response to endurance exercise. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 184-192. 1999.

**PELHAM, H.R.** Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell.* 46: 959-961. 1986.

**PEDERSEN B. K.; HOFFMAN-GOETZ L.** Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiological Reviews.* 80:1055-1081, 2000.

**PETRONINI, P.G. ALFIERI, C. CAMPANINI, C. BORGHETTI, A.F.** Effect of an alkaline shift on induction of the heat shock response in human fibroblast. *J. Cell Physiol.* 162: 322-329. 1995.

**POWERS, S.K. Ji L.L., LEEUWENBURGH C.** Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31(7): 987-997, 1999.

**POWERS, S.K. and HOWLEY, E.T.** Fisiologia do Exercício – Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. Terceira Edição. *Ed. Manole.* São Paulo. 2000.

**RENAULT, V. THORNEL, L.E. BUTLER-BROWNE, G. MOUNLY, V.** Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and mitotic clock. *Experimental Gerontology:* 37: 1229-1236, 2002.

**RHEA, M.R. ALVAR, B.A. BALL, S.D. BURKETT, L.N.** Three sets of weight training superior to 1 set with equal intensity for eliciting strength. *J Strength Cond. Res.* 16 (4):525-529, 2002.

**RUBE, N. and SECHER, N.** Effect of central factor on fatigue following two- and one-leg static exercise in man. *Acta Phys.Scandinavica.* 141: 87-95. 1990.

**SALO, D.C. DONOVAN, C.M. DAVIES, K.J.** HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 239-246. 1991.

**SANTORO, M. G.** Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology,* 59: 66-63, 2000.

**SELYE, H.** Stress without distress. New York: J.B. Lippincott Company, 1974.

**SCHNEIDER, C.D. & OLIVEIRA, A.R.** Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte,* 2004.

**SCHNEIDER, C.D.; BARP, J.; RIBEIRO, J.L.; BELLÓ-KLEIN, A.B.; OLIVEIRA, A.R.** Oxidative stress after three different intensities of running. *Can. J. Appl Phys* (no prelo).

**SHASTRY, S.; TOFT, D.O.; JOYNER, M.J.** HSP70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol Scand*, 175: 139-146. 2002.

**SNYDER, G.K. FARRELY, C. COELHO, J.R.** Capillary perfusion in skeletal muscle. *Heart Circ.Physiol.* 31: 828-832, 1992.

**STEWART, N.T. FOSS, M. CARRARO, U.** Muscle regeneration is modulate by satellite cell-machrophage interactions at the site of muscle injury: Prospective clinical applications. *J. Equine Vet Sci.* 17: 172-219, 1997 – Abstract.

**TERBIZAM & BARTELS.** The effect of set-repetition combinations on strength gain in females age 18-35. *Med. Sci Sports Exercise*, 17: 267 – 1985.

**THOMPSON, H.S.; CLARKSON, P.M.; SCORDILIS, P.** The repeated bout effect and heat shok proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol Scand*, 174: 47-56. 2002.

**TISSIÈRES, A. MITCHELL, H. K. TRACY, U.M.** Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: relation to cromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84: 389-398.

**TORTORA, G.** Corpo Humano - Fundamentos de Anatomia e Fisiologia. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

**VIERCK, J. O'REILLY, B. HOSSNER, K. ANTONIO, J. BYRNE, K. BUCCI, L. DODSON, M.** Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell. Biology Internationa*. 24 (5): 263–272, 2000.

**WELCH, W.J. GARRELS, J.I. THOMAS, G.P. LIN, J.J. FERAMISCO, J.R.** Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and  $\text{Ca}^{2+}$  - ionophore-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* 258: 7102-7111. 1983.

**WELSCH, M.A. BRECHUE, W.F. POLLOCK, M.L.** Effect of reduced training volume on bilateral isometric knee/extension torque. *Med.Sci Sports Exercise*. 26: S189, 1994.

**WILLIAMS, B.D. CHINKES, D.L. WOLFE, R.R.** Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. *Med. Sci. Sports Exerc*, 30: 1053-1058. 1998.

**WILMORE, J.H. and COSTILL, D.L.** Fisiologia do Esporte e do Exercício. *Segunda Edição. Ed. Manole*. São Paulo. 2001.

**WINETT, R.A. & CARPINELLI, R.N.** Potential health-related benefits of resistance training. *Preventive Medicine* 33: 503-513, 2001.

**WOLACH B. ELIAKIM, A. GAVRIELI, R. KODESH, E. YAROM, Y. SCHESINGER, M. FALK, B.** Aspects of leukocyte function and the complement system following aerobic exercise in young female gymnasts. *Scand J Med Sci Sports*, 8: 91-97. 1998.

**A N E X O S**

**QUESTIONÁRIO PAR-Q**

1. Algum médico já disse que você possui algum problema de coração e que só pode realizar atividades física supervisionada por profissionais de saúde?  
 SIM  NÃO
2. Você sente dores no peito quando pratica atividade física?  
 SIM  NÃO
3. No último mês você sentiu dores no peito quando praticava atividade física?  
 SIM  NÃO
4. Você apresenta desequilíbrio devido a tontura e/ou perda de consciência?  
 SIM  NÃO
5. Você possui algum problema ósteo ou articular que poderia ser piorado pela atividade física?  
 SIM  NÃO
6. Você toma atualmente algum medicamento para pressão arterial e/ou problema de coração?  
 SIM  NÃO
7. Sabe alguma outra razão pela qual você não deva realizar atividade física?  
 SIM  NÃO

Declaro-me ainda, em perfeitas condições mentais e emocionais, não estando sob nenhum tipo de pressão. Desta forma, ratifico como verdadeiras as informações prestadas neste questionário PAR-Q, responsabilizando-me por qualquer informação omitida e isentando os pesquisadores de qualquer responsabilidade decorrente desta falta de informação.

-----  
Nome completo e RG abaixo e assinatura na linha.

## ***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido***

Prezado Senhor:

Meu nome é João Antônio Bonatto Costa, sou educador físico e gostaria de lhe convidar para participar da pesquisa que estou realizando sobre exercício físico. O objetivo dela é determinar a influência dos exercícios de musculação na expressão de proteínas de choque térmico, estresse oxidativo e perfil imunológico, sendo realizada, concomitantemente na Universidade do Vale do Rio dos Sinos, e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estas proteínas são expressas universalmente sob condições de estresse, ao mesmo tempo em que, ao serem submetidas constantemente ao mesmo tipo de estresse criam mecanismos de adaptação, diminuindo assim, a sua expressão, e por terem sido descobertas quando submetidas ao estresse térmico, receberam esta denominação. O exercício físico já foi identificado como um dos agentes estressores, indutores da síntese dessas proteínas, e o entendimento quanto ao tipo de exercício estressor, a sua intensidade e a sua adaptação permanecem por ser identificado.

Para que possamos contar com sua presença, será necessária a sua participação em uma série de testes e avaliações a seguir descritos, desta forma, por favor, leia com atenção as informações descritas abaixo:

**1** A minha participação na pesquisa iniciará após a leitura, o esclarecimento de possíveis dúvidas e do meu consentimento livre e esclarecido por escrito. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será em duas vias, permanecendo uma delas comigo.

**2** Serei informado sobre os procedimentos e resultados da minha participação na pesquisa e receberei esclarecimento sobre as dúvidas que possam surgir dela.

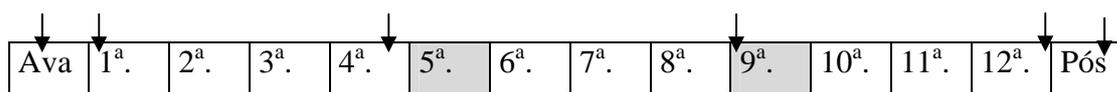
**3** As informações coletadas na pesquisa não serão vinculadas a minha identidade, ou seja, permanecerei no anonimato. Apenas o pesquisador João Bonatto Costa ou alguém autorizado por ele terá acesso aos meus dados de identificação.

**4** Durante a minha participação na pesquisa serei acompanhado pelo pesquisador João Bonatto Costa ou por alguém de sua equipe, tornando mínima a possibilidade de quaisquer riscos a minha saúde.

**5** A minha participação na pesquisa envolverá as seguintes fases: entrevista, avaliação cineantropométrica, inquérito e avaliação nutricional, coletas periódicas de sangue, avaliação nos aparelhos de musculação, realização de exercícios nos aparelhos de musculação e novas avaliações nos aparelhos de musculação e cineantropométrica.

**6** A entrevista abordará aspectos relacionados a minha saúde, hábitos diários, uso de drogas lícitas ou ilícitas, exercício físico e dietas, sendo realizada num local isolado e privativo e não ocorrendo a sua gravação e ou filmagem.

**7** A primeira coleta de sangue (20 mililitros) acontecerá após a entrevista. Posteriormente, será coletada a mesma quantidade 6 horas após: o primeiro dia de treinamento, o final da quarta semana, o primeiro dia da nona semana, e o final da décima segunda semana, e a última coleta, após final do programa de treinamento físico (conforme tabela abaixo). Esta coleta será feita por um profissional capacitado, entretanto, poderá causar algum desconforto no momento ou depois da coleta, como por exemplo, dor e inchaço no braço.



*As setas marcam as coletas de sangue, e as áreas sombreadas as semanas onde serão reavaliadas as cargas*

**08** A avaliação nos aparelhos de musculação será executada através do teste de carga máxima (1RM). Ao término desta avaliação o pesquisador estabelecerá minha carga de trabalho para o treinamento.

**09** Os treinamentos de musculação utilizarão os exercícios de supino reto, voador, desenvolvimento frente, rosca bíceps direta, roldana alta costas, pressão de pernas e extensão de pernas. Serão realizadas 3 sessões por semana, com intervalo mínimo de 48 horas entre elas, durante doze semanas, e com reavaliação da carga de trabalho a cada 4 semanas.

**10** Durante a realização dos exercícios terei a orientação e o acompanhamento do pesquisador João Bonatto Costa ou de outro pesquisador, membro desta equipe, e devidamente capacitado.

**11** No transcorrer ou após os exercícios poderão ocorrer alguns desconfortos como cansaço, cãibra e dores musculares, as quais tornar-se-ão menos freqüentes e intensas, à medida que eu me adapte e adquira melhor condicionamento físico.

**12** A minha participação na pesquisa será voluntária. Não serei obrigado a responder a todas as perguntas nem realizar todas as avaliações e exercícios, podendo interromper ou cancelá-los a qualquer momento. A minha participação em todos os procedimentos da pesquisa não implicará no pagamento de qualquer taxa. Os meus custos da academia e exames laboratoriais de sangue serão pagos pelo pesquisador João Bonatto Costa.

**14** Necessitando quaisquer esclarecimentos sobre a pesquisa ou querendo cancelar a minha participação nela, entrarei em contato pessoal com o pesquisador ou pelo número de telefone (51) 9123.5874.

Data:

Nome do participante:

Assinatura do participante:

Nome do pesquisador responsável: João Antonio Bonatto Costa

Assinatura do pesquisador responsável:

## Guia dos Exercícios:

(Retirado de Frédéric Delavier, 2000).

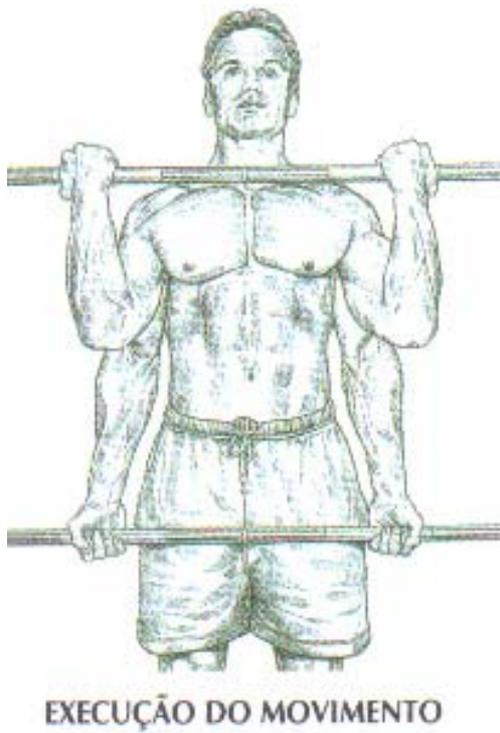


Figura 1 – Exercício Rosca Bíceps Direta.

Desenvolvimento com Barra pela Frente

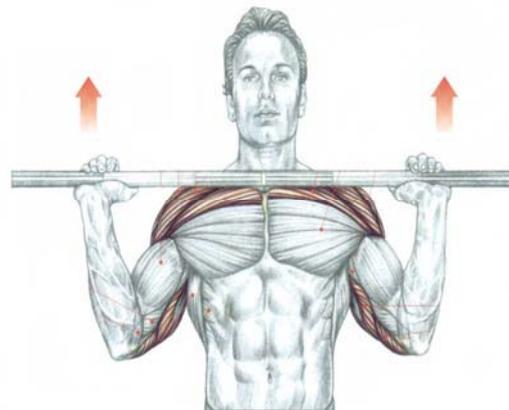


Figura 3 – Exercício de desenvolvimento frente

Voador

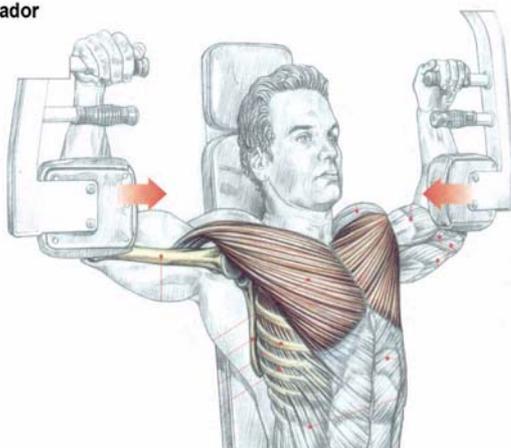


Figura 2 – Exercício do Voador

Leg Press  
Inclinado

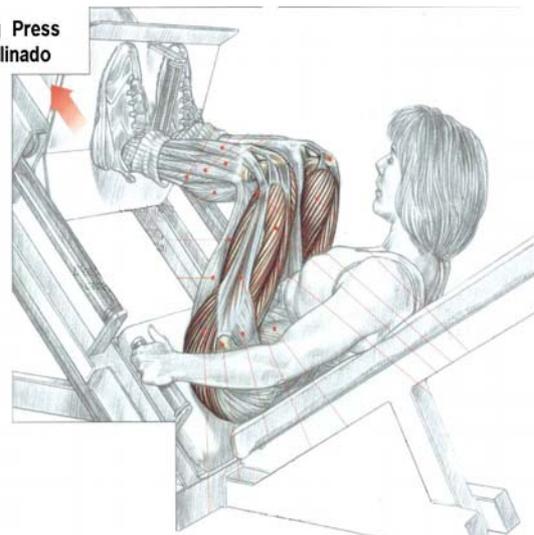


Figura 4 – Exercício do Leg Press (pressão de pernas)

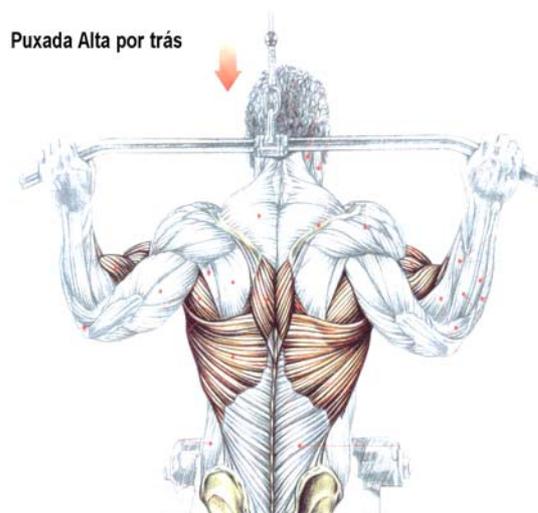


Figura 5 – Exercício Roldana Alta

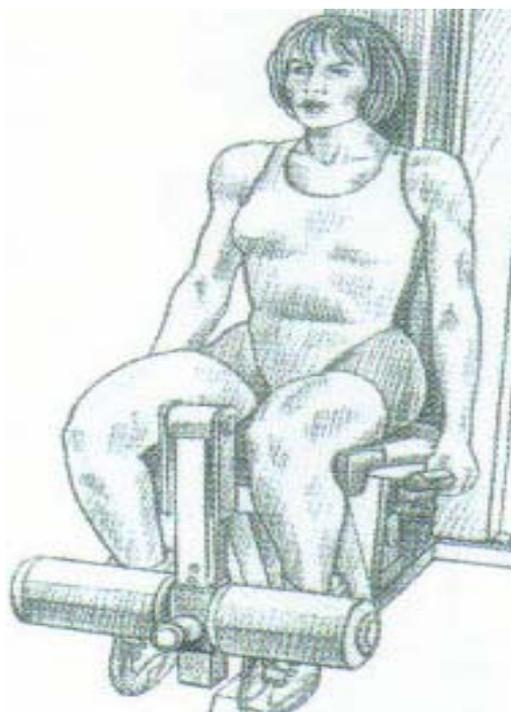


Figura 6 – Exercício de Extensão de Pernas

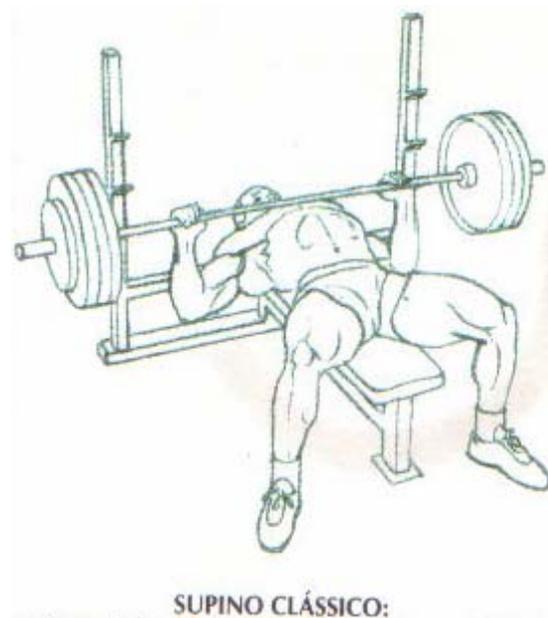


Figura 7 – Exercício do Supino Clássico

Neste exercício executamos uma variante, que é o supino vertical. Trabalha os mesmos grupos musculares, entretanto é realizado sentado em aparelhos (semelhante ao voador) e não deitado e com barra, conforme estamos demonstrando.