

SUSANA MERINO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE PARÂMETROS DO
SISTEMA ANTIOXIDANTE NO PÓS-EXERCÍCIO DE CAMUNDONGOS TREINADOS**

UBERABA

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

Susana Merino

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE PARÂMETROS DO
SISTEMA ANTIOXIDANTE NO PÓS-EXERCÍCIO DE CAMUNDONGOS TREINADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e Exercício” (Linha de Pesquisa: Aspectos Biodinâmicos e Metabólicos do Exercício Físico e Esporte), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador.: Dr. Guilherme Vannucchi Portari

Uberaba

2013

Susana Merino

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE PARÂMETROS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE NO PÓS-EXERCÍCIO DE CAMUNDONGOS TREINADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e Exercício” (Linha de Pesquisa: Aspectos Biodinâmicos e Metabólicos do Exercício Físico e Esporte), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 11 de março de 2013

Banca Examinadora:

Dr. Guilherme Vannucchi Portari – orientador

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Dr. Fábio Lera Orsatti

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Dr. Rafael Deminice

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Edmundo e Tânia, pelo amor e cuidado sempre expressos e pela constante dedicação aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por se mostrar presente em minha vida em todos os momentos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari pelos conhecimentos transmitidos, pelos desafios lançados, pela paciência e incentivo.

Ao Professor Dr. Fábio Lera Orsatti pela excelente recepção no BioEx, ensinamentos e contribuições durante esses dois anos e por aceitar compor minha banca.

Ao Professor Dr. Rafael Deminice pelo exemplo de conhecimento em estresse oxidativo e exercício, e por aceitar gentilmente compor minha banca, contribuindo com meu trabalho.

À técnica de laboratório Ellen pela amizade e auxílio constante, juntamente com os técnicos Luciano e Diógenes que contribuíram nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas Karina, Bruna, Maiara e Monalisa pela fundamental presença em meu trabalho e pela descontração no laboratório.

Aos meus pais Edmundo e Tânia pela dedicação, amor e incentivo de todos os momentos.

Aos meus avós Edmundo e Elvira, e à minha irmã Lidia, pelas ligações, carinho e cuidado com minha vida.

Ao Célio Luisi Jr. pelo amor, paciência e constante presença.

À CAPES- REUNI pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A prática regular de atividade física associada a uma dieta balanceada é importante na promoção da saúde. Entretanto, a realização de exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos pode gerar danos como lesões, fadiga crônica e *overtrainig*, parcialmente em razão da elevada síntese de espécies reativas de oxigênio. Em contrapartida, o treinamento físico exerce capacidade protetora à essa resposta através da produção adaptativa endógena de antioxidantes.

O sistema antioxidante é uma maquinaria que controla as ações dos radicais livres em prol da manutenção da homeostasia celular dos organismos aeróbios, podendo ser enzimáticos e não enzimáticos, endógenos e exógenos. O ácido α -lipóico e sua forma reduzida, ácido dihidrolipóico, agem como potentes antioxidantes e eliminam radicais livres.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de ácido α -lipóico sobre biomarcadores de estresse oxidativo de camundongos treinados no pós-exercício exaustivo. O treinamento consistiu em 6 semanas de natação, em que o último dia correspondeu à uma sessão exaustiva com sobrecarga de 10% do peso corporal preso à calda do animal. Os animais do grupo Suplementado receberam 100mg/kg/dia de ácido α -lipóico, enquanto os do grupo Controle receberam veículo placebo. A eutanásia se deu em 3 diferentes momentos, Basal (animais que não realizaram exercício exaustivo), 0 e 4h pós-exaustão.

As dosagens de biomarcadores de estresse oxidativo foram realizadas, obtendo-se uma diminuição simultânea das concentrações de glutathiona reduzida (GSH), vitamina E após 4h de exercício exaustivo no grupo Suplementado, sugerindo o consumo destes em prol da redução da peroxidação lipídica, percebida pela redução das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) no mesmo grupo e período do protocolo experimental. Em contrapartida, houve um aumento de óxido nítrico (ON) no grupo Suplementado e a capacidade antioxidante total permaneceu inalterada. Dessa forma, apenas esses dois últimos parâmetros vão de encontro à nossa hipótese.

Desta maneira, conclui-se que a suplementação com ácido α -lipóico resultou em uma proteção contra o estresse oxidativo provocado pelo exercício exaustivo.

Palavras chave: exercício exaustivo, estresse oxidativo, ácido α -lipóico, espécies reativas de oxigênio (EROs), suplementação, antioxidante.

ABSTRACT

The regular practice of physical activity associated with a balanced diet is important in health promotion. However, the physical exercises of high intensity or exhaustive exercises can cause damage, like chronic fatigue and overtraining, partially due to the high synthesis of reactive oxygen species. In contrast, physical training exerts protective capacity of this adaptive response through the production of endogenous antioxidants.

The antioxidant system is a machinery that controls the actions of free radicals for the maintenance of cellular homeostasis of aerobic organisms, and may be enzymatic and non-enzymatic, endogenous and exogenous. The α -lipoic acid and its reduced form, dihydrolipoic acid, act as potent antioxidant and eliminates free radicals.

This study aimed to evaluate the effect of supplementation of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in trained mice in post-exhaustive exercise. Training consisted of 6 weeks swimming. At the last day an exhaustive session with 10% overload the weight attached to the tail of the animal was released. Supplemented group animals received 100mg/kg/day α -lipoic acid, while the Control group received placebo vehicle. Euthanasia was in 3 different times, Basal (animals that have not performed exhaustive exercise), 0 and 4h post-exhaustion.

The dosages of biomarkers of oxidative stress were performed, yielding a simultaneous decrease of the concentrations of reduced glutathione (GSH), vitamin E 4h after exhaustive exercise in the Supplemented group, suggesting the use of these for the reduction of lipid peroxidation, reducing perceived by the thiobarbituric acidreactive substances (TBARS) in the same group and in the experimental protocol period. In contrast, there was an increase of nitric oxide (NO) in the Supplemented group and the total antioxidant capacity remained unchanged. Thus, only the latter two parameters go against our hypothesis.

Thus, it is concluded that supplementation with α -lipoic acid resulted in the protection against oxidative stress induced by exhaustive exercise.

Keywords: exhaustive exercise, oxidative stress, α -lipoic acid, ROS, supplementation, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Delineamento experimental.....	24
2	Peso (gramas) semanal dos animais durante o período experimental.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1 Razão peso do músculo gastrocnêmio / peso do animal (mg/g).....	30
2 Valores de proteína carbonilada muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	31
3 Valores de SRATB muscular (nmol/g de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	31
4 Valores de óxido nítrico muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	32
5 Valores de GSH muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	33
6 Valores de tiol total muscular (mmol/g de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	33
7 Valores de capacidade antioxidante total muscular (mmol/g de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	34
8 Valores de vitamina E muscular ($\mu\text{g/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP- Adenosina difosfato

ALT- Ácido α -lipóico treinado

AKT- Proteína quinase B

AMP- Adenosina monofosfato

AMPK- Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

ATP- Adenosina trifosfato

Ca²⁺- Cálcio iônico

CAT - Catalase

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DTNB- 5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GPx- Glutathione peroxidase

GSH- Glutathione reduzida

GSSG- Glutathione dissulfeto

HCl- Ácido clorídrico

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

H₂O- Água

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

KCl- Cloreto de potássio

MDA- Malondialdeído

NAD⁺- Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NaOH- Hidróxido de sódio

NEED- *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride

NO₃ – Nitrato

NO₂ - Nitrito

O₂^{•-} - Ânion superóxido

O₂- Oxigênio molecular

OH[•]- Radical hidroxila

ON - Óxido nítrico

ONSe- Óxido nítrico sintase endotelial

ONSi- Óxido nítrico sintase induzida

ONSn- Óxido nítrico sintase neuronal

PT- Placebo treinado

PVC- Policloreto de vinila

RNA_m- Ácido ribonucleico mensageiro

SNC- Sistema nervoso central

SNP- Sistema nervoso periférico

SOD- Superóxido dismutase

SRATB- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SULF- Sulfanilamida

TCA- Ácido tricloroacético

VCl₃- Cloreto de vanádio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Radicais livres e o exercício físico.....	13
1.2 Exercício físico e sistema antioxidante.....	17
1.3 Objetivo.....	21
2 HIPÒTESE.....	22
3 JUSTIFICATIVA.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Aspécto ético.....	24
4.2 Grupos experimentais.....	24
4.3 Protocolo de suplementação.....	25
4.4 Protocolo de treinamento físico.....	25
4.5 Protocolo de exaustão.....	25
4.6 Eutanásia e coleta de amostras.....	26
4.7 Preparo do tecido muscular.....	26
4.8 Determinação de proteínas carboniladas.....	26
4.9 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB).....	27
4.10 Determinação de nitrato (NO ₃) e nitrito (NO ₂).....	27
4.11 Determinação de tióis não proteicos e totais.....	27
4.12 Determinação da capacidade antioxidante total.....	28
4.13 Determinação da concentração de vitamina E	28
4.14 Análises estatísticas.....	28
5 RESULTADOS	29

6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

A prática regular de atividade física associada a uma dieta balanceada é importante na promoção da saúde. Entretanto, a realização de exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos pode gerar danos como lesões, fadiga crônica e *overtrainig*, parcialmente em razão da elevada síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CRUZAT *et al.*, 2007).

É bem estabelecido que o exercício físico produz radicais livres e, na tentativa de aumentar a capacidade antioxidante dos indivíduos e reduzir lesões musculares, muitos estudos têm utilizado a suplementação com antioxidante como estratégia (CRUZAT *et al.*, 2007). Diferentes pesquisas mostram o efeito positivo da suplementação com antioxidantes sobre o estresse oxidativo e lesões celulares decorrentes de exercícios físicos exaustivos (RYAN, *et al.*, 2010; ASHA DEVI, PRATHIMA, SUBRAMANYAM, 2003). No entanto, outros estudos demonstraram efeito negativo da suplementação com antioxidantes na adaptação ao exercício crônico (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2008; RISTOW, *et al.* 2009). Portanto são necessários mais estudos para esclarecer os efeitos da suplementação com antioxidantes.

1.1 RADICAIS LIVRES E O EXERCÍCIO FÍSICO

Os átomos possuem elétrons que se movem geralmente aos pares em uma região chamada de eletrosfera, ao redor de um núcleo. Um radical livre é qualquer átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons não pareados. Esses elétrons não pareados alteram a reatividade química de um átomo ou molécula, fazendo-o mais reativo, ou seja, apresentando uma grande tendência a iniciar reações em cadeia pela retirada de um elétron da molécula vizinha para completar seu próprio orbital e obtendo assim estabilidade (HALLIWELL, 1994). Portanto, radical livre é qualquer espécie química com elétrons não pareados na última camada eletrônica, como por exemplo, ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e óxido nítrico (ON) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

As espécies reativas são compostos tão reativos quanto os radicais livres, mas não possuem elétrons desemparelhados na última camada. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são derivadas de oxigênio e não são necessariamente radicalares, como peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet* (DRODGE, 2002). Através de reações enzimáticas e não enzimáticas, todos os

organismos aeróbios formam o radical superóxido e outras EROs, assim seus níveis aumentam tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos, (BERGENDI *et al.*, 1999).

Os radicais livres são gerados por várias fontes, podendo ser endógenas, como por exemplo, a fosforilação oxidativa (subprodutos do metabolismo aeróbio) ou exógenas, como a radiação ionizante e a exposição à radiação eletromagnética, podendo atingir assim, os sistemas biológicos (SOUTHORN & POWIS, 1988; WULF, 2001). Dentre as fontes de geração endógena, encontram-se a formação de superóxido pela mitocôndria e a geração de superóxido pela xantina oxidase (SACHDEV & DAVIES, 2008).

Durante o exercício pode haver um “vazamento” na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, formando-se radicais livres. Mesmo durante o metabolismo basal (estado de repouso), reações laterais indesejadas que ocorrem na cadeia de transporte de elétrons podem levar à produção de radicais. Nestas reações, o oxigênio molecular reage com espécies geradas por transferência de elétrons individuais, tais como aquelas entre Fe-S e ubiquinona / ubisemiquinona (DAVIES & HOCHSTEIN, 1982; BOVERIS, CADENAS, STOPPANI, 1976). Em tais reações, o oxigênio molecular é reduzido de um elétron para formar $O_2^{\cdot-}$. A cadeia transportadora de elétrons faz transporte vetorial de prótons para fora da matriz mitocondrial e para dentro do espaço intermembranar. A dismutação de $O_2^{\cdot-}$ forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode ser clivado homoliticamente (reação de Fenton) por metais de transição, para formar o altamente reativo radical hidroxila (OH^{\cdot}), este é provavelmente o mais poderoso oxidante produzido por sistemas biológicos (SACHDEV & DAVIES, 2008).

A produção de radicais livres durante o exercício exaustivo também pode ser provocada pela enzima xantina oxidase. Períodos de exercício intenso podem causar isquemia sistêmica temporária ou hipóxia em certas regiões do corpo, fazendo com que o ATP seja convertido em ADP, AMP, inosina, e finalmente hipoxantina. Sob tais condições de isquemia, xantina desidrogenase intracelular pode ser convertida à xantina oxidase pela modificação de resíduo de cisteína e/ou proteólise parcial (NISHINO *et al.*, 2005). Em condições fisiológicas normais, a xantina desidrogenase é a forma dominante da enzima, e oxida tanto hipoxantina e xantina (em ácido úrico) em um processo que, concomitantemente reduz NAD^+ para NADH. A xantina oxidase, por outro lado, não pode continuar a utilizar o NAD^+ como receptor de elétron, e ao invés disso, preferencialmente reduz o oxigênio a superóxido e peróxido de hidrogênio. Durante a isquemia, as concentrações de oxigênio são baixas, e concentrações intracelulares de xantina oxidase e hipoxantina podem subir. Quando o oxigênio é finalmente reintroduzido (reperfusão), pode resultar em uma explosão de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (ENGERSON *et al.*, 1987). Deve ser notado que a

xantina oxidase gera ambos $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 diretamente. Esta redução do oxigênio molecular para $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 seria esperado como resultado de novas reações prejudiciais incluindo peroxidação lipídica e oxidação da glutatona (SACHDEV & DAVIES, 2008).

Pela característica de alta reatividade em busca de estabilidade, as EROs e os radicais livres atacam e promovem modificações em diversas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, os quais podem ser utilizados como biomarcadores deste processo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Para a manutenção da homeostasia celular os organismos aeróbios possuem uma maquinaria para o controle das ações dos radicais livres. Esta maquinaria é conhecida como sistema antioxidante. Antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Podem ser enzimas (ex: catalase, glutatona, glutatona peroxidase, glutatona redutase, superóxido dismutase) ou não-enzimas (ex: vitaminas, flavonoides, proteínas do plasma, selênio), endógenos ou exógenos (SIES, 1993).

Para a conservação da homeostase de nosso organismo, é necessária esta constante regeneração da capacidade antioxidante. Assim, em condições fisiológicas estáveis, o balanço entre agentes pró-oxidantes e mecanismos celulares antioxidantes se mantém equilibrados (GILLHAM et al., 1997). Quando há balanço favorável aos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo está sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos (SIES, 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) e este estresse oxidativo pode se instalar por aumento na produção de radicais livres e/ou por redução na capacidade antioxidante por doença ou má-alimentação (BELLÓ-KLEIN, 1993; TRAVACIO & LLESUY, 1996), que pode prejudicar todas as macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Em verdade, o estresse oxidativo crônico tem sido sugerido como sendo a causa ou consequência de muitas doenças humanas agudas e crônicas, como obesidade, doenças cardiovasculares, cancro, doenças de lesão pulmonar aguda e esclerose múltipla (GOMES, SILVA, OLIVEIRA, 2012).

Os efeitos de EROs variam de acordo com suas concentrações. Quando em baixas concentrações, agem como segundos mensageiros em cascatas de transdução de sinal celular, ou seja, induzem vários processos biológicos como expressão gênica de componentes estimulantes de transdução de sinal estimulante, tais como sinalização de Ca^{2+} e fosforilação de proteínas. Quando as concentrações de EROs são excessivamente elevadas, sobrecarregam o sistema de

defesa do corpo e induzem danos oxidativos em diversos compartimentos das células (CHAE, SHIN, KIM, 2008).

Os danos oxidativos podem ser mais graves em músculos esqueléticos por terem níveis mais baixos de antioxidantes do que outros tecidos e pela superprodução de EROs nesses músculos serem desencadeadas possivelmente por um aumento da procura de energia em condições de exercício físico exaustivo. O aumento da demanda de energia ativa e respiração mitocondrial conseqüentemente, aumentam o consumo de oxigênio nos músculos. Durante o exercício extenuante, a taxa metabólica nos músculos esqueléticos é aumentada até 100 vezes acima dos níveis de repouso, o que é refletido através do aumento acentuado do consumo de oxigênio (CHAE, SHIN, KIM, 2008; KHANNA *et al.*, 1999). Há algumas conclusões diferentes sobre as taxas de estresse oxidativo como resultado de desempenho do exercício. Isto é compreensível porque uma variedade de fatores podem influenciar a taxa de oxidação, tais como os grupos musculares recrutados, os modos de contração, a intensidade, duração e população do exercício (GOMES, SILVA, OLIVEIRA, 2012).

As causas do aumento da produção dos radicais livres e EROs durante o exercício não foram totalmente esclarecidas. Embora vários mecanismos tenham sido identificados, existe ainda falta de compreensão de como cada um deles contribui para a quantidade total de estresse oxidativo produzido. Além disso, estes mecanismos podem atuar sinergicamente, e diferentes tipos de exercício provavelmente levam a diferentes vias de produção de radicais livres. Por exemplo, embora o consenso geral seja que, durante o exercício a produção de espécies reativas ocorre principalmente por músculos em contração (esquelético e coração), outros mecanismos como processos inflamatórios e aumento da liberação de catecolaminas, que podem ocorrer com o exercício, também desempenham um papel importante na geração de espécies reativas (GOMES, SILVA, OLIVEIRA, 2012).

Durante o exercício extenuante há um aumento de até cem vezes na taxa metabólica no músculo esquelético em relação aos níveis de repouso. O consumo de oxigênio pode levar a uma elevação da produção de ânion superóxido na mitocôndria, formando assim, outras espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e, os extremamente reativos, radicais hidroxila (NURAY *et al.*, 2004). Se o exercício for exaustivo (KHANNA *et al.*, 1999) ou moderado (ALESSIO, 1993; GUL *et al.*, 2001) pode elevar a produção de EROs, excedendo a capacidade de defesas antioxidantes. A atividade muscular contrátil intensa pode resultar em estresse oxidativo, e tem como indicadores os níveis de glutathiona muscular alterados e um aumento na oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. Quando proteínas e lipídeos se

tornam oxidados por EROs, a produção de força muscular é diminuída (COOMBES *et al.*, 2000).

Como EROs se acumulam nos músculos que se contraem, a oxidação de proteínas e lipídios pode causar, entre outras coisas, a inibição da produção de força, contribuindo para o desenvolvimento da fadiga aguda (POWERS & JACKSON, 2008). Além disso, este aumento exagerado nos níveis de EROs em resposta ao exercício extenuante pode também levar à modificação oxidativa do DNA, inibem atividade locomotora e bactericida dos neutrófilos, diminuem proliferação de linfócitos T e B, inibem células natural killer, danos nas membranas celulares e outros compostos celulares (NIESS & SIMON, 2007).

Segundo Liu *et al.* (2000), estudos em ratos mostram que o exercício físico aumenta biomarcadores de danos oxidativos como proteínas carboniladas e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, tem efeitos sobre a função mitocondrial, e diminui os níveis de antioxidantes e enzimas antioxidantes no coração, sangue, pulmão, fígado, cérebro e músculos. Esses autores encontraram que as respostas do cérebro ao estresse oxidativo por exercício agudo ou crônico são bastante diferentes das encontradas no fígado, coração, músculos rápido e lento, portanto, o estresse oxidativo causado pelo exercício agudo ou crônico provoca diferentes respostas, dependendo do tipo de tecido, do órgão e seus níveis de antioxidantes endógenos.

Concomitantemente, há relatos mostrando que o exercício não resulta em um nível funcional significativo de danos oxidativos no coração, como também não evidências do mesmo em agravos teciduais devido à complexidade dos modelos de exercício, e tão pouco um quadro que tenha abrangência sobre o estresse oxidativo e exercício físico no cérebro, fígado, coração e músculos, pois a relação entre as mudanças em antioxidantes endógenos e estresse oxidativo permanece por esclarecer, embora sua correlação tenha sido frequentemente hipotetizada (LIU *et al.*, 2000).

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

Segundo Gomes, Silva e Oliveira (2012), os antioxidantes podem ser tanto sintetizados *in vivo*, quanto absorvidos pela dieta. Eles podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Os principais antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), cada uma é responsável pela redução de uma ERO diferente e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares.

Existem três isoformas de SOD, duas se encontram no interior das células e a outra no espaço extracelular. Especificamente em células do músculo esquelético, a porcentagem mais alta de SOD (65-85%) encontra-se no citosol e o restante (15-35%) encontra-se nas mitocôndrias dos músculos. SOD catalisa a reação de radicais superóxido em oxigênio e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2). GPx está localizada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias das células, e é responsável pela remoção de uma grande variedade de hidroperóxidos por complexos de hidroperóxidos orgânicos de H_2O_2 , assim pode proteger os lipídios das membranas, proteínas e ácidos nucleicos da oxidação. GPx também está presente em células dos músculos, mas sua atividade varia dependendo do tipo de fibra, com maior atividade em fibras de contração lenta (tipo I) com maior capacidade oxidativa. CAT é amplamente distribuída no interior das células e sua principal função é degradar H_2O_2 em H_2O e O_2 . No entanto, tem uma menor afinidade para H_2O_2 em comparação com GPx. CAT também pode ser encontrada em maior concentração em fibras do tipo I (GOMES, SILVA, OLIVEIRA, 2012).

Um trabalho recente mostrou que o aumento de espécies reativas durante o exercício leva a adaptações favoráveis, como o aumento na atividade de enzimas antioxidantes em vários tecidos. Trata-se de um processo de adaptação que acontece porque os radicais livres produzidos durante a contração muscular agem como moléculas de sinalização (GOMEZ-CABRERA, DOMENECH, VIÑA, 2008). Isto estimula a expressão de genes alvo e, por conseguinte, aumenta a produção de enzimas antioxidantes e modula outras vias de proteção ao estresse oxidativo, tais como o aumento da atividade de enzimas de reparação do DNA em músculos esqueléticos. Este estímulo associado com a proteção antioxidante ocorre não apenas nos músculos, mas também sistematicamente para os órgãos vitais, como fígado e cérebro, que também passam por este ajuste benéfico (RADAK, CHUNG, GOTO, 2008). Esse processo de adaptação significa que os produtos químicos e substâncias tóxicas podem fornecer respostas positivas quando presentes em pequenas quantidades. O tipo e a duração de treinamento são fundamentais para uma regulação mais eficiente de antioxidantes endógenos com treinamento de resistência de longa duração e alta intensidade (POWERS, JI, LEEUWENBURGH, 1999).

Treinamentos de resistência melhoram tanto a defesa antioxidante quanto a capacidade oxidante do músculo esquelético. Foram mostrados aumentos nas atividades de SOD, CAT e GPx após treino aeróbico em ratos jovens (HOLLANDER *et al.*, 2000; LEEUWENBURGH *et al.*, 1997). Assim como demonstrado por Leeuwenburgh *et al.* (1994), em que camundongos treinados tiveram as atividades de SOD e GPx aumentadas no músculo esquelético, o que foi associado com marcadores de estresse oxidativo reduzidos no tecido. Portanto foi proposto que a

upregulação induzida pelo exercício nas atividades das enzimas antioxidantes, como SOD e GPx, é responsável pela proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício (LEEUNBURGH *et al.*, 1994, 1997).

No entanto, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes não é necessariamente paralelo ao aumento na capacidade oxidativa do músculo esquelético, principalmente durante o exercício extenuante, quando há um aumento notável no consumo de oxigênio, com concomitante produção de EROs (BARRETO *et al.*, 2012). A variação nos níveis das enzimas antioxidantes é dependente não só do tipo de tecido medido, mas também do modo e intensidade do exercício (LEE, MAR, NG, 2009).

Como esperado, Veskokis *et al.* (2008) encontraram aumento da peroxidação lipídica no plasma, eritrócitos e músculo gastrocnêmio com o exercício exaustivo, descoberta também relatada por outros pesquisadores (AJMANI *et al.*, 2003; ALESSIO *et al.*, 2000). Tem sido proposto que o exercício aumenta significativamente o grau de insaturação e concentração de ácidos graxos não esterificados no sangue (NIKOLAIDIS & MOUGIOS, 2004).

Agentes redutores, tais como antioxidantes podem proteger as células contra estresse oxidativo induzido por EROs (COOMBES *et al.*, 2000; CHAE, SHIN, KIM, 2008). O aumento dos níveis de antioxidantes intracelulares de uma célula muscular deve proporcionar maior proteção contra esses agentes oxidantes e reduzir a fadiga (KHANNA *et al.*, 1999). Ainda segundo Coombes *et al.* (2000) níveis mais baixos de EROs são necessários para a função muscular contrátil ótima. Reid e Moody (1994) demonstram que a adição de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) resultou em diminuição *in vitro* do desempenho muscular contrátil no músculo não fatigado.

O ácido α -lipóico, um composto dissulfeto com oito átomos de carbono, funciona como um cofator natural nos complexos piruvato e α -ceto desidrogenase. O ácido α -lipóico e sua forma reduzida, ácido dihidrolipóico, agem como potentes antioxidantes e eliminam radicais livres (MURUGAVEL & PARI, 2004). Comumente usado como suplemento dietético nos Estados Unidos e Alemanha, é exogenamente fornecido e prontamente captado por uma variedade de células e tecidos em que é reduzido rapidamente por enzimas NADH ou NADPH-dependentes para ácido dihidrolipóico (DHHLA). DHHLA é um redutor forte, com um potencial padrão de redução e é conhecido para regenerar os principais antioxidantes fisiológicos de lipídios e fases aquosas, tais como vitamina E, ácido ascórbico, e glutathiona (GSH), que são oxidados por EROs (CHAE, SHIN, KIM, 2008; KHANNA *et al.*, 1999).

O ácido dihidrolipóico também pode eliminar radicais hidroxila, ácido hipocloroso, oxigênio, metais quelatos de transição como ferro e cobre (CHAE, SHIN, KIM, 2008). A combinação de vitamina E e ácido α -lipóico tem sido mostrada para proteger as células contra danos oxidativos como danos por isquemia-reperfusão, neurodegeneração, e formação de catarata (CHAE, SHIN, KIM, 2008; COOMBES *et al.*, 2000).

Nos seres humanos, o ácido α -lipóico é sintetizado no fígado e em outros tecidos e também é obtido de fontes animais e vegetais na dieta, porém, em baixas concentrações nas dietas dos mamíferos (MCNEILLY *et al.*, 2011; SINGH & JIALAL, 2008). No tecido animal, maiores concentrações de ácido α -lipóico são encontradas no coração, fígado e rins, enquanto espinafre, brócolis, tomate, ervilha, couve de bruxelas, e farelo de arroz estão entre as fontes vegetais. Naturalmente, o ácido α -lipóico em alimentos está covalentemente ligado à lisina em proteínas (lipoilisina), enquanto em suplementos ele é livre (SINGH & JIALAL, 2008). Uma dose oral de ácido α -lipóico é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, aumentando sensivelmente seus níveis plasmáticos. Tipicamente, 20-40% dos ácidos α -lipóicos racêmicos administrados por via oral são absorvidos com as concentrações plasmáticas de pico mais elevados no isômero R em relação ao isômero S (GLEITER *et al.*, 1996; HERMANN *et al.*, 1996), sugerindo uma melhor absorção do isômero R. A quantidade de uma dose administrada e a presença ou ausência de alimentos pode explicar a variabilidade de absorção. Absorção gastrointestinal rápida é seguida por um ritmo de “*clearance*” igualmente rápido, refletindo tanto o transporte para os tecidos, bem como de filtração glomerular e esforço renal (GOLBIDI, BADRAN & LAHER, 2011).

O papel antioxidante do ácido α -lipóico também tem sido implicado na hepatite, aterosclerose, urolitíase, infecção pelo HIV e também no tratamento de intoxicação hepática aguda, intoxicação por metais pesados e outras patologias hepáticas. Tratamento com ácido α -lipóico oferece proteção através da atenuação da peroxidação lipídica e diminuição da produção de derivados de radicais livres (MURUGAVEL & PARI, 2004).

Além disso, Chae, Shin e Kim (2008) relatam que o exercício extenuante provoca estresse oxidativo, enquanto que exercícios aeróbicos regulares podem reduzir o estresse oxidativo induzido por EROs, estimulando a atividade das enzimas antioxidantes. Eles encontraram que a suplementação de ácido α -lipóico combinado com exercício aeróbico inibe a peroxidação lipídica nos músculos esqueléticos, aumentando os níveis de atividade de vitamina E, superóxido dismutase e glutationala peroxidase em ratos.

Diante do exposto, temos que o exercício extenuante provoca estresse oxidativo, porém, o treinamento físico exerce capacidade protetora à essa resposta através da produção adaptativa endógena de antioxidantes. Assim, procuramos saber qual o efeito da suplementação com ácido α -lipóico sobre a modulação do sistema antioxidante de camundongos treinados.

1.3 OBJETIVO

Avaliar o efeito da suplementação de ácido α -lipóico sobre biomarcadores de estresse oxidativo de camundongos treinados no pós-exercício exaustivo.

2 HIPÓTESE:

A hipótese do presente estudo é que a suplementação com ácido α -lipóico aumenta o estresse oxidativo em camundongos treinados submetidos à exaustão física.

3 JUSTIFICATIVA

A literatura relata que o exercício físico extenuante produz EROs, tais como superóxido e radicais hidroxila. A atividade muscular contrátil intensa pode resultar neste estresse oxidativo, e tem como indicadores os níveis de glutatona muscular alterados e um aumento na oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (COOMBES et al., 2000). Ao mesmo tempo, já é conhecido o efeito protetor adaptativo do treinamento físico em relação à produção endógena de antioxidantes. O ácido α -lipóico, comumente usado como suplemento dietético nos Estados Unidos e Alemanha, juntamente com sua forma reduzida, ácido dihidrolipóico, agem como potentes antioxidantes e eliminam radicais livres (MURUGAVEL, & PARI, 2004).

Tendo em vista o papel antioxidante do ácido α -lipóico contra os danos oxidativos, desejamos elucidar se sua suplementação, em curto período anterior à uma atividade física extenuante, reduz a capacidade antioxidante endógena promovendo estresse oxidativo no período de recuperação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspecto ético:

O presente trabalho foi enviado à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM e aprovado sob o protocolo nº 219/12 (Anexo).

4.2 Grupos experimentais

Para realização do estudo proposto, foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* machos, com peso em torno de 25g e idade entre 50 e 60 dias, procedentes da empresa ANILAB- Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA (Paulínia-SP) e mantidos no Biotério da disciplina de Nutrição Experimental da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) de polipropileno autoclavável 170mm x 290mm x 135mm com tampa (grade) em aço galvanizado com separadores em aço inox em temperatura ambiente de 22-23° C, e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e tiveram livre acesso à água e alimento (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais de acordo com o tratamento a receber: 1) animais que receberam veículo placebo e foram submetidos ao treinamento (placebo treinado PT, n=30) e 2) animais que receberam ácido α -lipóico e foram submetidos ao treinamento (α -lipóico treinado ALT, n=30) conforme figura 1.

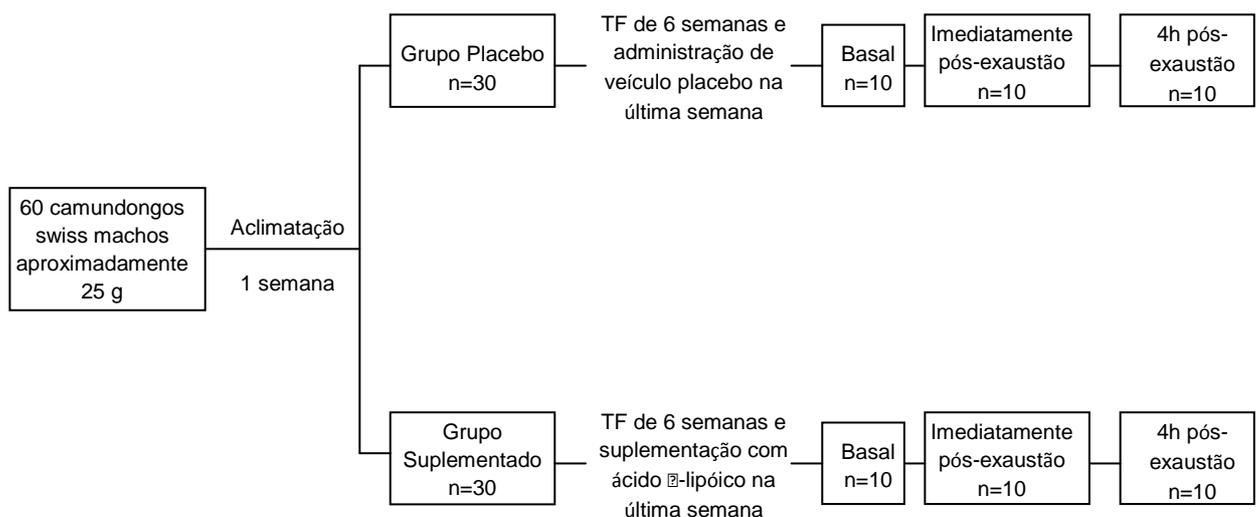


Figura 1 – Delineamento experimental.

4.3 Protocolo de suplementação

Uma solução de ácido α -lipóico (Zhejiang Chemicals, China) foi preparada em óleo de soja com a adição de algumas gotas de DMSO para melhor diluição, em uma dosagem de (100 mg/kg peso corpóreo/ dia). Doses semelhantes de óleo de soja (veículo placebo) foram administradas nos grupos controles durante a última semana do protocolo de treinamento (oitava semana). As administrações foram por gavagem, em que o animal foi elevado da bancada após o pinçamento na base do pescoço com a mão esquerda, deixando-se o peso do corpo alinhar o tronco com a força da gravidade, naturalmente o animal abriu a boca e a cânula foi introduzida, ao ser conduzida a partir do lado da boca do animal. Para este procedimento foi utilizado uma cânula externa de cateter intravenoso em teflon, com paredes finas, flexível e siliconizada, conectada em uma seringa de insulina. O tempo de administração da suplementação foi de 7 dias, equivalente à última semana de treinamento físico.

4.4 Protocolo de treinamento físico

Inicialmente, os animais passaram por uma semana de aclimatação ao exercício, com 5 minutos no primeiro dia, 15 minutos no segundo, 30 no terceiro, 45 no quarto e 60 no quinto.

Após o período de aclimatação, os animais foram submetidos a sessões de treinamento físico por natação em uma frequência de cinco vezes por semana durante seis semanas consecutivas com um tempo de treinamento de 60 minutos. Este treinamento foi realizado em grupos de 5 animais devido à promoção de exercício mais vigoroso quando comparado com o nado individual, em um cilindro de PVC, (DONATTO *et al.*, 2010) de 22 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade preenchido com água de torneira até a altura de 30 cm para os animais não poderem se agarrar às bordas, mantida a 31°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

4.5 Protocolo de exaustão

No último dia do protocolo, os animais foram submetidos a um treinamento de exaustão que consistiu em sua última sessão de natação com sobrecarga de 10% do peso corpóreo preso à cauda do animal. A exaustão foi determinada pela incapacidade de o animal manter-se na superfície da água por aproximadamente 8 a 10 segundos (DONATTO *et al.*, 2010).

4.6 Eutanásia e coleta de amostras

Os 30 animais de cada grupo (PT e ALT) foram eutanasiados por decapitação por tesoura trinchante com anestesia prévia por quetamina (80mg/kg) e xilasina (5mg/kg) por via intraperitoneal em prol de um relaxamento do animal antes da decapitação, que ocorreu na seguinte sequência: pré-exaustão (n=10), imediatamente pós-exaustão (n=10), e 4 horas pós-exaustão (n=10). O músculo gastrocnêmio foi coletado, rapidamente dissecado, livre de tecido adiposo e de tecido conjuntivo; lavado em solução salina gelada, submerso em nitrogênio líquido e armazenado a -20°C até as análises.

4.7 Preparo do tecido muscular

O músculo gastrocnêmio tem um predomínio de fibras do tipo 2, com padrão de distribuição não homogêneo, com predomínio de fibras brancas (porção interna) e fibras vermelhas (porção superficial). Ele foi homogeneizado em um homogeneizador de tecidos do tipo Potter com adição de tampão de ensaio para capacidade antioxidante total (Sigma Co., USA) na proporção de 1,0 mL para 100 mg de tecido. Após homogeneização, a solução foi centrifugada a 10.000 g para remoção de debris celulares e o sobrenadante foi retirado, aliquotado, armazenado a -20°C e utilizado para análises posteriores.

4.8 Determinação de proteínas carboniladas

A formação de proteínas carboniladas consequente da deaminação oxidativa catalisada por metais foi determinada pelo método proposto por Odetti e colaboradores (1996). Foram adicionados 100 µL de homogenato de músculo em 100 µL de TCA 20%. Após agitação seguida de centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm foi descartado o sobrenadante e 500 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10mM em HCl 2M foram adicionados ao precipitado. Foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, com agitação a cada 15 min. Em seguida, foi adicionado 1mL de etanol-acetato de etila (1:1, v/v) e após agitação foi efetuada nova centrifugação por 10 min a 3500 rpm a 4°C. O procedimento de lavagem com etanol-acetato de etila foi repetido por 3 vezes. Ao final, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado e o *pellet* foi ressuspensionado em 2mL de guanidina 6 M, foi mantido em banho-maria a 34°C por 15 min. e foi procedida à leitura a 370 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 22.000 M⁻¹cm⁻¹ para o cálculo.

4.9 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)

A peroxidação lipídica no homogenato de músculo foi quantificada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinadas por método colorimétrico que consiste na reação dos aldeídos formados cujo principal representante é o malondialdeído (MDA), com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre aquecimento a 100°C por 30 minutos. Esta reação produz um composto de coloração rosa que é lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm (BUEGE & AUST, 1978). Para quantificar o malondialdeído ligado a macromoléculas as amostras de homogenato foram submetidas à hidrólise alcalina seguindo protocolo proposto por Cighetti *et al.* (1999) com as seguintes modificações: em tubo de ensaio 200 µL de homogenato de músculo foram homogeneizados com 0,1 mL de KCl 1,15%. Em seguida foram adicionados 0,3 mL de água Milli-Q e 0,05 mL de NaOH 2 M. Após agitação os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos e, então neutralizados com HCl 2 M para seguirem à reação com o ácido tiobarbitúrico.

4.10 Nitrato (NO₃) e Nitrito (NO₂)

A quantificação de nitrato e nitrito no homogenato de músculo gastrocnêmio foi tratada neste estudo como óxido nítrico (ON) e se deu através do método descrito por Miranda, Espey, Wink (2001), que consiste das seguintes etapas: 400 µL de homogenato foram desproteinizados com igual volume de etanol gelado, agitados em vortex e centrifugados a 14000g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram retirados 300 µL do sobrenadante e transferidos para um tubo de ensaio, adicionados 300 µL de solução saturada de VCl₃, 150 µL de *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEED) e 150 µL de sulfanilamida (SULF) em sequência e sem demora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 540 nm, após 15 minutos de reação utilizando-se como branco, 300 µL de VCl₃, 150 µL de NEED, 150 µL de SULF e 300 µL de água destilada. Uma curva de calibração de nitrato (NO₃) foi realizada na faixa de 10 a 1000 µM por diluições sucessivas e utilizou-se protocolo de ensaio para dosagem de NO₃+NO₂.

4.11 Tióis não-protéicos e totais

A quantificação de tióis não protéicos, cujo maior representante nos sistemas biológicos é a glutatona reduzida (GSH), foi realizada em homogenato de músculo desproteinado com ácido tricloroacético (TCA) e posterior reação com colorimétrica com 5,5'-ditiobis(2-ácido

nitrobenzóico) (DTNB) e leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 412 nm. Os tióis totais, representados pela soma dos tióis não-protéicos mais tióis protéicos, foram quantificados pelo método colorimétrico descrito acima sem a etapa de adição de ácido tricloroacético (TCA).

A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

4.12 Determinação da capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi determinada nos homogenatos de músculo por kit comercial da Sigma Co. (USA). A metodologia de tal kit consiste em produzir uma espécie radicalar que é um cromógeno verde com absorção no comprimento de onda de 405 nm. A adição da amostra e possível diminuição na produção deste cromógeno é proporcional a capacidade antioxidante.

4.13 Determinação da concentração de vitamina E

A análise de vitamina E foi realizada em HPLC equipado com uma coluna tipo C-18 (Luna 4,6 x 15 cm) em fluxo de 2,0 mL/min e detector UV/Visível com leitura no comprimento de onda 292 nm após extração recomendada por Arnaud et al. (1991) nos homogenatos de tecido muscular. A concentração foi calculada por meio de um padrão externo de α -tocoferol (ARNAUD *et al.*, 1991).

4.14 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov e Smirnov para verificação de normalidade dos dados. Quando normais, foi utilizado ANOVA para verificar diferenças de resultados em um mesmo grupo em diferentes momentos, enquanto que diferenças entre dois grupos em um mesmo momento foram verificadas com teste t de Student. Quando não verificada normalidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para verificação de diferença de resultados em um mesmo grupo em diferentes momentos e teste de Mann-Whitney para verificação de diferenças entre dois grupos em um mesmo momento. Foram considerados significantes os resultados com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Pra esse projeto, foi utilizado um modelo experimental representado por camundongos Swiss machos treinados durante 6 semanas consecutivas em natação e, que receberam, ou não, suplementação com ácido α -lipóico (100mg/ kg de peso corporal/ dia) na última semana de treinamento.

As variações do peso dos animais (Figura 2), foram observadas ao longo do período de 7 semanas. Ao analisarmos, percebemos que houve uma variação ao longo do período experimental, observando-se um ganho ponderal no grupo Controle. O peso inicial foi de $25,5 \pm 3,2$ g e na 5ª semana de $31,0 \pm 7,5$ g (n=30, p<0,05), diferença também percebida entre a 1ª semana ($26,4 \pm 4,2$ g) e a 6ª semana ($29,4 \pm 7,1$ g) (n=30, p<0,05) no mesmo grupo. O grupo Suplementado com ácido α -lipóico também apresentou ganho significativo de peso corporal ($25,2 \pm 3,2$ g aclimatação e $29,1 \pm 4,7$ g; $30,1 \pm 5,4$ g; $31,1 \pm 6,0$ g; $30,7 \pm 5,8$ g nas 3ª, 4ª, 5ª e 6ª semanas, respectivamente) (n=30, p<0,05), aumento também observado entre a 2ª semana ($26,7 \pm 3,9$ g) e a 5ª e 6ª semanas ($31,1 \pm 6,0$ g e $30,7 \pm 5,8$ g) respectivamente (n=30, p<0,05). No entanto, não foi verificada diferença de peso entre grupos em nenhum período experimental.

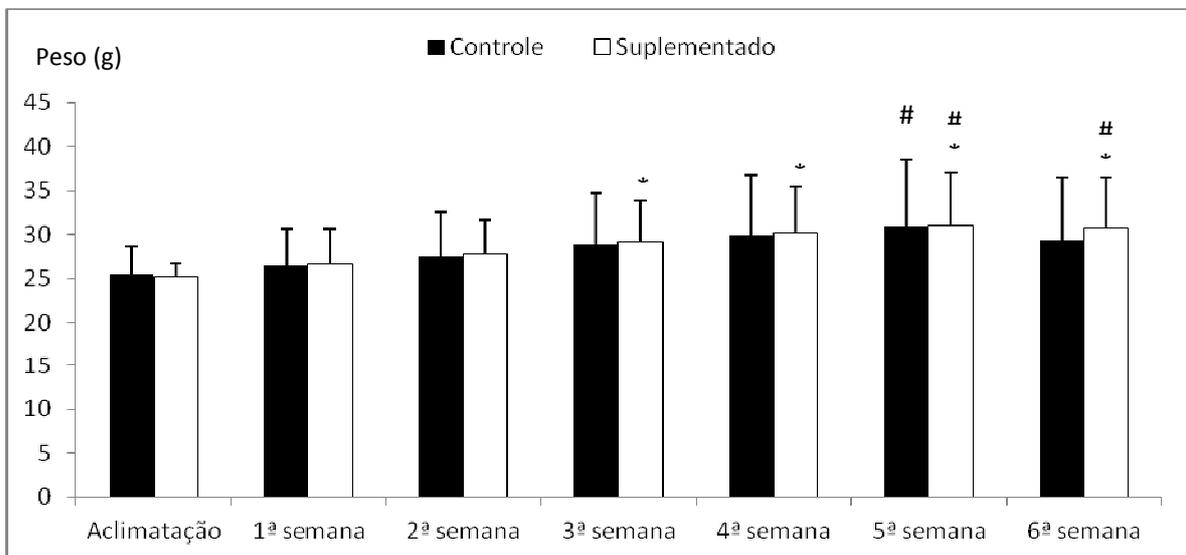


Fig. 2. Peso (gramas) semanal dos animais durante o período experimental. (*) p<0,05 em relação à aclimatação do mesmo grupo. (#) p<0,05 em relação à primeira semana.

Na Tabela 1 encontramos a razão do peso do músculo gastrocnêmio pelo peso dos animais, em mg/g. Houve uma redução na razão de pesos dos animais eutanasiados 4 horas após a sessão de exercício exaustivo em relação aos animais eutanasiados logo após a exaustão (0h) e aos que não sofreram exaustão (Basal) no grupo Controle. No entanto, não foi verificada diferença sobre a razão de pesos entre os animais eutanasiados em diferentes momentos no grupo Suplementado, enquanto que uma diferença significativamente menor foi verificada entre grupos no momento Basal, ou seja, sem a exaustão.

TABELA 1: Razão peso do músculo gastrocnêmio / peso do animal (mg/g)

Períodos experimentais	Grupos		
	Basal	0h após	4h após
Controle	5,3±0,5	5,2±0,5	4,4±0,2 ^{*,**}
Suplementado	4,6±0,4 [*]	5,0±0,4	4,5±0,4

* P < 0,05 em relação ao Basal do grupo Controle

** P < 0,05 em relação ao 0h do grupo Controle

Com os animais submetidos a uma sessão exaustiva de treinamento de natação (10% do peso corporal preso à calda) antes da eutanásia, obtivemos a média do tempo de exaustão, que no grupo Controle foi de 87,0±41,2s, enquanto no grupo Suplementado foi de 147,0±79,0s (p<0,05).

A Tabela 2 mostra a concentração de proteína carbonilada presente no mesmo tecido muscular analisado (gastrocnêmio). Não houveram diferenças significativas entre os grupos e/ou tempos de recuperação pós-exaustão.

A Tabela 3 apresenta os resultados das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), cujo principal representante é o malondialdeído (MDA), produzido no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos Controle e Suplementado nos diferentes períodos do

protocolo experimental. Nota-se que tanto os animais que não foram submetidos à exaustão (Basal), quanto os que foram eutanasiados 4h após a exaustão do grupo Suplementado, apresentaram menores concentrações de SRATB em relação aos animais do grupo Controle no mesmo tempo de recuperação. No entanto, em ambos os grupos, os animais eutanasiados 0 e 4h pós-exaustão tiveram menores concentrações de SRATB em relação aos animais do mesmo grupo que não passaram pelo exercício exaustivo. Apenas no grupo Controle, os animais eutanasiados 4h pós-exaustão apresentaram concentrações significativamente maiores de SRATB em relação aos 0h.

TABELA 2: Valores de proteína carbonilada muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais

Grupos	Períodos experimentais		
	Basal	0h após	4h após
Controle	1,8 \pm 2,0	1,7 \pm 2,0	1,3 \pm 0,6
Suplementado	2,2 \pm 0,8	2,9 \pm 1,3	2,5 \pm 1,7

TABELA 3: Valores de SRATB muscular (nmol/g de tecido), nos diferentes períodos experimentais

Grupos	Períodos experimentais		
	Basal	0h após	4h após
Controle	9,9 \pm 1,9	4,7 \pm 1,2**	7,1 \pm 0,5**, #
Suplementado	7,3 \pm 1,4*	4,1 \pm 1,2**	4,4 \pm 0,9*, **

* P < 0,05 em relação ao grupo Controle do mesmo tempo

** P < 0,05 em relação ao Basal do mesmo grupo

P < 0,05 em relação ao 0h do mesmo grupo

As concentrações de óxido nítrico muscular, representadas pelas quantidades de nitrato e nitrito presentes na amostra, são apresentadas na Tabela 4. Observa-se que os animais do grupo Basal Suplementado apresentaram menores concentrações de óxido nítrico em relação aos animais do grupo Basal Controle, enquanto o inverso aconteceu com os animais eutanasiados 4h-pós exaustão do grupo Suplementado em relação aos animais do grupo Controle. A análise dos diferentes períodos de um mesmo grupo mostra que no grupo Suplementado, tanto os animais eutanasiados 0 e 4h pós-exaustão tiveram maiores concentrações de óxido nítrico em relação aos basais, enquanto que no grupo Controle, os animais eutanasiados 4h pós-exaustão apresentaram concentrações significativamente menores em relação aos demais períodos (Basal e 0h).

TABELA 4: Valores de óxido nítrico muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) nos diferentes períodos experimentais.

Períodos experimentais	Grupos		
	Basal	0h após	4h após
Controle	1,5 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4	0,8 \pm 0,2 ^{*,#}
Suplementado	0,6 \pm 0,3 [*]	1,4 \pm 0,4 ^{**}	1,3 \pm 0,1 ^{*,**}

* P < 0,05 em relação ao grupo Controle do mesmo tempo

** P < 0,05 em relação ao Basal do mesmo grupo

P < 0,05 em relação ao 0h do mesmo grupo

A concentração da glutathiona reduzida no músculo gastrocnêmio, representada neste estudo como tióis não-protéicos, está mostrada na Tabela 5. Os animais que foram eutanasiados 4h após a exaustão do grupo Suplementado, apresentaram menores concentrações de GSH em relação aos animais do grupo Controle no mesmo tempo de recuperação. Também observamos que tanto os animais eutanasiados 4h pós-exaustão do grupo Controle, quanto os eutanasiados 0h pós-exaustão no grupo Suplementado apresentaram concentrações significativamente maiores do que os animais que não sofreram exaustão no mesmo grupo que pertencem.

TABELA 5- Valores de GSH muscular ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais

Períodos experimentais Grupos	Basal	0h após	4h após
	Controle	283,2 \pm 51,7	343,5 \pm 49,2
Suplementado	316,0 \pm 71,7	399,7 \pm 68,2**	342,9 \pm 43,2*

* P < 0,05 em relação ao grupo Controle do mesmo tempo

** P < 0,05 em relação ao Basal do mesmo grupo

Já a concentração de tióis totais presente no músculo gastrocnêmio encontra-se na Tabela 6. Não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos e/ou períodos do protocolo experimental.

TABELA 6: Valores de tiol total muscular (mmol/g de tecido), nos diferentes períodos experimentais

Períodos experimentais Grupos	Basal	0h após	4h após
	Controle	15,9 \pm 3,1	19,1 \pm 2,7
Suplementado	18,0 \pm 5,5	17,4 \pm 3,9	21,1 \pm 1,8

Quanto à capacidade antioxidante total presente no músculo gastrocnêmio (Tabela 7), observamos que os animais eutanasiados 0h pós-exaustão no grupo Controle apresentaram concentrações significativamente maiores do que os animais que não sofreram exaustão no mesmo grupo que pertencem. No mesmo grupo, também podemos notar maiores concentrações nos animais eutanasiados 4h pós-exaustão do que nos que sofreram eutanásia imediatamente após o exercício exaustivo (0h).

TABELA 7: Valores da capacidade antioxidante total muscular (mmol/g de tecido), nos diferentes períodos experimentais

Períodos experimentais	Grupos		
	Basal	0h após	4h após
Controle	518,2±206,8	812,6±120,5**	596,9±114,1 [#]
Suplementado	667,3±190,6	852,1±151,6	668,8±202,2

** P < 0,05 em relação ao Basal do mesmo grupo

[#] P < 0,05 em relação ao 0h do mesmo grupo

A concentração de vitamina E presente no músculo gastrocnêmio encontra-se na Tabela 8, em que os animais que foram eutanasiados 0h após exaustão do grupo Suplementado, apresentaram maiores concentrações de vitamina E em relação aos animais do grupo Controle no mesmo tempo de recuperação, enquanto o contrário foi observado nos animais eutanasiados 4h após exaustão no grupo Suplementado em comparação aos animais do grupo Controle no mesmo tempo de recuperação. Também notamos que os animais eutanasiados 4h pós-exaustão do grupo Controle apresentaram concentrações significativamente maiores tanto em comparação aos animais que não sofreram exaustão quanto aos que foram eutanasiados 0h após exaustão no mesmo grupo a que pertencem. Quanto aos animais do grupo Suplementado, apenas os animais eutanasiados imediatamente após a exaustão apresentaram aumento significativo nas

concentrações de vitamina E em relação aos animais do mesmo grupo que não sofreram exaustão.

TABELA 8: Valores de vitamina E muscular ($\mu\text{g/g}$ de tecido), nos diferentes períodos experimentais

Períodos experimentais	Grupos		
	Basal	0h após	4h após
Controle	2,9 \pm 1,4	2,6 \pm 1,8	6,9 \pm 2,1 ^{**, #}
Suplementado	3,2 \pm 1,4	7,4 \pm 3,4 ^{*, **}	4,9 \pm 1,7 [*]

* P < 0,05 em relação ao grupo Controle do mesmo tempo

** P < 0,05 em relação ao Basal do mesmo grupo

P < 0,05 em relação ao 0h do mesmo grupo

6 DISCUSSÃO

O principal propósito do presente estudo foi o de avaliar o efeito da suplementação de ácido α -lipóico sobre biomarcadores de estresse oxidativo de camundongos treinados após uma sessão de exercício exaustivo. Embora amplamente estudados, principalmente em seres humanos quanto aos vários aspectos relacionados ao papel antioxidante, os efeitos do ácido α -lipóico têm sido muito pouco investigados sobre as mudanças induzidas pelo exercício no músculo imediatamente após exaustão e durante o período de recuperação.

O estudo sobre o treinamento físico tem revelado um enorme potencial sobre a capacidade protetora ao estresse oxidativo provocado, por exemplo, pelo exercício extenuante, através da produção adaptativa endógena de antioxidantes. Assim sendo, o esclarecimento sobre o efeito da suplementação com ácido α -lipóico sobre a modulação do sistema antioxidante de camundongos treinados, seria de grande valor na elucidação de se o uso desse antioxidante momentos antes de uma competição exaustiva, prejudica a recuperação do sistema antioxidante endógeno.

Quanto ao peso dos animais, o trabalho de Lee, Mar, Ng (2009) constata que não houve alteração de peso entre os grupos controle e suplementado, o que condiz com o dado de nosso estudo, mostrando que o aumento no tempo de exaustão do grupo Suplementado não foi associado com as condições ponderais dos animais.

No presente estudo houve uma redução da razão peso do músculo gastrocnêmio / peso do animal nos animais submetidos à exaustão no grupo Controle, o que pode indicar um efeito da suplementação de ácido α -lipóico na manutenção do peso do músculo gastrocnêmio pós-exercício exaustivo. Entretanto, esta explicação é especulativa pois não foram realizadas análises de composição de macroelementos musculares e de marcadores inflamatórios assim como, não foram encontrados dados acerca desse parâmetro na literatura científica.

Proteína carbonilada e SRATB, produtos oxidativos de proteínas e lipídios, respectivamente, são bem conhecidos como marcadores de estresse oxidativo *in vivo* (SEN *et al.* 1997; BEJMA & JI, 1999). Estudos têm mostrado que o exercício físico pode resultar em um aumento no estresse oxidativo *in vivo* (JI, 1999; ALESSIO, 2000), o qual é conhecido por exercer importante papel na fadiga muscular ou dano nas fibras musculares (ANDRADE *et al.* 1998). O dano oxidativo em proteínas é acompanhado de resíduos de carbonila após exercício de endurance no músculo esquelético de ratos (JI, 1999). No presente estudo não foi encontrada diferença entre o grupo Suplementado e o Controle. Entretanto, Khanna *et al.* (1999) relatam concentrações menores de proteína carbonilada no músculo do grupo suplementado em

comparação ao seu controle, ambos submetidos a sessão exaustiva de natação. No mesmo estudo, também encontraram diminuição na concentração de SRATB no sangue e fígado dos animais suplementados em relação ao controle, enquanto que no músculo, essa diferença não foi significativa. O mesmo resultado muscular também foi encontrado por Lee, Mar, Ng, (2009), que trataram os animais com um outro antioxidante (vitamina E) por 28 dias de gavagem. De maneira diferente, Chae, Shin, Kim, (2008) verificaram uma diminuição na produção de SRATB nos músculos dos animais suplementados em relação aos controles, embora o grupo controle utilizado na pesquisa referida, além de não receber suplementação, não era treinado. Os resultados de nosso presente estudo corroboram com os achados da última pesquisa mencionada, o que pode significar uma menor produção de radicais livres no grupo Suplementado, ou proteção por antioxidantes.

Quanto aos períodos do protocolo experimental, o presente estudo mostra uma redução de SRATB em ambos os grupos Suplementado e Controle após exercício exaustivo (imediatamente e 4h após) em relação aos animais que não sofreram exaustão, o que discorda com os dados da revisão de Finsterer (2012) que embora dosadas no plasma de homens, as concentrações de SRATB foram maiores imediatamente após exercício exaustivo e permaneceram elevadas algum tempo após.

Um benefício do exercício é a produção endógena de óxido nítrico, que tem papel fundamental na homeostase cardiovascular (ZHANG *et al.* 2009). O óxido nítrico é sintetizado pela óxido nítrico sintase (ONS), uma enzima que existe em três isoformas, a óxido nítrico sintase neuronal (ONSn), a óxido nítrico sintase induzida (ONSi) e a óxido nítrico sintase endotelial (ONSe). A ONSn é constitutiva, presente em neurônios, células epiteliais, Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético e outros, e tem como funções a regulação da transmissão sináptica do SNC, regulação central da pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso, vasodilatação via nervos periféricos, regulação do fluxo sanguíneo cerebral local (FORSTERMANN *et al.* 1994). A ONSi é uma ONS induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular, e tem como funções o efeito citostático por inibição de enzimas contendo ferro, fragmentação de DNA, atua em parasitas e células tumorais (FORSTERMANN *et al.* 1994). A ONSe também é constitutiva, presente no endotélio vascular, e tem como funções inibir adesão e agregação plaquetária no endotélio vascular, inibir a síntese de DNA, mitogênese e a proliferação de células da musculatura lisa vascular, regular a pressão sanguínea e contrair o músculo cardíaco (FORSTERMANN *et al.* 1994).

O exercício agudo aumenta a ativação de ONSe, mas ainda não foi estabelecido como o exercício medeia esta indução (ZHANG *et al.* 2009). Além disso, estudos têm demonstrado que H₂O₂ promove a fosforilação de ONSe nas células endoteliais (THOMAS, CHEN, KEANEY, 2002). Considerando o exercício como uma abordagem terapêutica, estes achados são importantes porque o exercício agudo também está associada com aumento do estresse oxidativo (FISHER-WELLMAN & BLOOMER, 2009). Sob condições patológicas, a produção excessiva de EROs tem consequências vasculares prejudiciais. A ONSe é ativada por H₂O₂ e é fosforilada por várias quinases, incluindo as proteínas quinases (AMPK) ativadas por PKB/Akt e AMP. O exercício agudo exaustivo aumenta os níveis de oxidantes e induz a ativação de ONSe, mas os mecanismos subjacentes deste processo permanecem obscuros (ZHANG *et al.*, 2009).

Harris *et al.* (2008), em um estudo realizado com ratos treinados por 8 semanas em esteira, encontraram um aumento na atividade da óxido nítrico sintase no músculo sóleo em relação aos animais sedentários, embora este estudo não realizou suplementação com antioxidante e exercício exaustivo. Já Belviranlı *et al.* (2012) que suplementaram ratos com extrato de semente de uva, um potente antioxidante, e realizaram treinamento crônico e exaustivo em esteira, não encontraram diferença nos níveis plasmáticos de ON após exercício exaustivo, em contrapartida, notaram um aumento nos animais que receberam suplementação em relação ao controle. Corroborando com este último achado, no presente estudo, também foi percebido um aumento na concentração de ON no grupo Suplementado após exercício exaustivo, e uma diminuição no grupo Controle após exaustão em relação aos animais que não realizaram o exercício exaustivo.

Como não é conhecida a origem enzimática responsável pela geração do ON encontrado em nosso estudo, inferimos as possibilidades de que a suplementação aumenta a produção de ON em resposta à maior ativação de ONSe ou ONSn, auxiliando por exemplo, na vasodilatação e contração cardíaca necessárias no exercício exaustivo ou então, que a suplementação aumenta a produção de ON através da ativação de ONSi, em resposta às citocinas inflamatórias produzidas no exercício exaustivo, embora Hussain *et al.* (1997) relataram que o RNAm de ONSi está pouco presente no músculo esquelético de ratos ou camundongos, prejudicando a recuperação antioxidante pós-exaustão. Apenas esta segunda possibilidade vai de acordo com a hipótese do presente estudo.

Os dados aqui apresentados sobre marcadores do processo oxidativo em macromoléculas sugerem um efeito protetor exercido pela suplementação com ácido α -lipóico.

GSH exerce várias funções essenciais no corpo, dentre elas encontra-se seu principal papel, um antioxidante. Ele é eficiente contra EROs e radicais livres, prevenindo um aumento do processo de estresse oxidativo. Nestas reações, o GSH é oxidado, por meio da enzima glutathione peroxidase, de modo a formar glutathione disulfeto (GSSG). Uma vez oxidada, GSSG pode ser reduzido de volta à sua forma original de GSH pela enzima GSSG redutase e adenina nicotinamida dinucleotídeo-fosfato (NADPH). No entanto, quando há um nível elevado de estresse oxidativo, a NADPH torna-se esgotada e existe um acúmulo intracelular de GSSG, que pode ser exportado para fora da célula ou pode formar dissulfetos (LU, 1999).

Khanna *et al.* (1999) encontraram maiores concentrações de GSH no grupo suplementado em relação ao controle, achado este, também encontrado por Chae, Shin, Kim, (2008), embora os animais deste último estudo não tenham passado por uma sessão final de exercício exaustivo. Em contrapartida, no presente estudo, as concentrações de GSH no músculo gastrocnêmio foram menores no grupo Suplementado do que no grupo Controle nos animais eutanasiados 4h pós-exaustão indicando uma possível indução na sua produção imediatamente após a sessão de exaustão no grupo Suplementado e mais tardio para o Controle.

Em relação aos períodos do protocolo experimental, Zembron-Lacny *et al.* (2009) encontraram um aumento na concentração de GSH em relação ao pré-exercício no grupo suplementado com ácido α -lipóico, embora as dosagens deste estudo foram realizadas no plasma de humanos treinados com exercício resistido. Em contrapartida, no presente estudo, foi observado um aumento na concentração de GSH 4h pós-exaustão no grupo Controle em relação aos animais que não realizaram exercício exaustivo e um aumento logo após exaustão no grupo Suplementado em relação aos que não realizaram exercício exaustivo. Isto indica que a recuperação da homeostase celular continua por várias horas após o exercício e que mudanças na proteção antioxidante e marcadores de estresse oxidativo são mais fidedignos quando analisados várias horas após exercício comparados com aqueles imediatamente após exercício (KAYATEKIN *et al.* 2002; LEE *et al.* 2002), sendo assim possível associar a queda das SRATB imediatamente após exaustão no grupo Suplementado com a diminuição da peroxidação lipídica que se deu através do aumento do GSH no mesmo grupo e mesmo momento.

Tióis totais têm sido uma parte integral e importante do mecanismo antioxidante que regula a produção de EROs. Os níveis de tióis dependem dos compostos contendo enxofre como as glutathionas, ácido α -lipóico, cisteinilglicina, homocisteína e cisteína secretados pelo fígado e músculo (ZEMBRON-LACNY *et al.* 2009). No presente estudo não foram encontradas diferenças nas concentrações de tiol total entre os grupos ou períodos do protocolo experimental,

o que condiz com o encontrado no estudo de Kinnunen *et al.* (2005), embora este tenha sido realizado com cavalos. O mesmo resultado também foi encontrado por Kaikkonen *et al.* (2002) em uma pesquisa com corredores humanos maratonistas.

A vitamina E tem sido relatada como protetora das membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Por isso, é lógico supor que esta vitamina pode proteger as células do músculo contra danos induzidos pelo exercício. Este raciocínio é baseado no conhecimento de que esta vitamina pode estabilizar as membranas musculares, interagindo com seus fosfolipídios que, deste modo, pode proporcionar proteção contra o aumento do estresse oxidativo ou danos musculares observados após certos tipos de exercício (URSO & CLARKSON, 2003).

Em um estudo de Liu *et al.* (2000) foi encontrada uma diminuição na concentração de vitamina E no músculo rápido de ratos submetidos a exercício crônico em esteira. Em contrapartida, não notaram diferença quando analisaram ratos submetidos a exercício agudo (exaustão). Resultado semelhante foi encontrado em um estudo de Kinnunen *et al.* (2005), em que as concentrações de vitamina E, embora dosadas no plasma de cavalos treinados, não apresentaram alterações entre o pré, pós, 4 e 24h pós exercício exaustivo. No presente estudo, as concentrações de vitamina E no grupo Suplementado aumentaram nos animais eutanasiados imediatamente após exaustão seguindo com uma diminuição nos animais eutanasiados 4h pós-exaustão em relação aos animais do grupo Controle no mesmo período referido. Quanto aos períodos do protocolo experimental, o grupo Controle apresentou aumento nos animais eutanasiados 4h pós-exaustão em relação aos animais dos outros períodos, enquanto o grupo Suplementado aumentou imediatamente após exaustão em relação aos animais que não sofreram exaustão no mesmo grupo. Estes achados, juntamente com o resultado de GSH, podem indicar que a vitamina E presente no grupo Suplementado está sendo mais consumida em prol da diminuição da peroxidação lipídica, como percebido na diminuição de SRATB no grupo Suplementado e que a recuperação da homeostase celular continua por várias horas após o exercício, como percebido pelo aumento tanto de vitamina E quanto GSH 4h pós-exaustão no grupo Controle.

A capacidade antioxidante total indica o efeito cumulativo de todos os antioxidantes presentes e é usado para avaliar um número de condições fisiológicas em humanos e animais (GHISELLI *et al.* 2000). Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos Controle e Suplementado, mas no grupo Controle percebemos um aumento na concentração da capacidade antioxidante total nos animais que foram eutanasiados logo após a exaustão em relação aos que não fizeram esse exercício e em seguida, uma diminuição nos animais que foram

eutanasiados após 4h da exaustão em relação aos que foram eutanasiados 0h pós-exaustão. Este achado concorda com um estudo por Michailidis *et al.* (2007), que embora dosada no soro de humanos não treinados, encontraram um aumento imediato da capacidade antioxidante total após corrida exaustiva em esteira e um declínio após 3h do exercício. Este aumento da capacidade antioxidante total após o exercício sugere que o exercício agudo ativa as defesas antioxidantes do corpo. Existem estudos que mostram que distúrbios de alguns índices de estresse oxidativo no sangue podem persistir ou aparecer após vários dias do exercício que prejudicou o músculo (GOLDFARB, 2005), o que está em contraste com o retorno para os valores de repouso encontrados em nosso estudo e no de Michailidis *et al.* (2007).

Já McNeilly *et al.* (2011) encontraram um aumento da capacidade antioxidante total após suplementação com ácido α -lipóico em humanos treinados e não treinados, mostrando o potencial antioxidante do ácido α -lipóico e sua capacidade de reciclar os antioxidantes endógenos, reduzindo-se para seu metabólito oxidado ácido dihidrolipóico.

O resultado da capacidade antioxidante total no presente estudo pode referir que no grupo Controle houve um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, já que neste grupo não foi percebido aumento de GSH ou vitamina E, enquanto que o aumento de antioxidantes ocasionado pela suplementação com ácido α -lipóico não permitiu essa adaptação enzimática derivada do treinamento físico.

Dos resultados aqui relatados, somente dois parâmetros, óxido nítrico e capacidade antioxidante total, vão de encontro com nossa hipótese, o que nos remete a rejeitá-la. Dessa forma, com o protocolo utilizado e os parâmetros analisados, a suplementação com ácido α -lipóico resultou em uma proteção contra o estresse oxidativo provocado pelo exercício exaustivo.

O presente estudo possui algumas importantes limitações. O período de uma semana de suplementação com ácido α -lipóico pode ter sido insuficiente para aumentar o estresse oxidativo devido ao bloqueio da adaptação antioxidante endógena gerada pelo treinamento crônico. A ausência de dosagens de antioxidantes enzimáticos também dificultou a definição de nossos resultados. Além disso, o tempo muito curto do protocolo de exaustão, possivelmente devido ao grande percentual de sobrecarga utilizado, pode ter utilizado predominantemente a via anaeróbica como fonte energética, diferente do protocolo de treinamento que, provavelmente fez uso predominante da via aeróbia.

7 CONCLUSÃO

Conforme proposto neste estudo e discutido acima, podemos concluir que:

- 1) A suplementação com ácido α -lipóico induziu um efeito protetor sobre o estresse oxidativo no pós exercício exaustivo de camundongos treinados, percebido através do aumento simultâneo de GSH e vitamina E em prol da diminuição da peroxidação lipídica, como percebido na diminuição de SRATB no grupo Suplementado no mesmo momento.
- 2) A recuperação da homeostase celular continua por várias horas após o exercício, como percebido pelo aumento tanto de vitamina E quanto GSH 4h pós-exaustão no grupo Controle.
- 3) Apenas a capacidade antioxidante total que permaneceu inalterada no grupo suplementado, e o ON que aumentou com a suplementação, foram de encontro com a hipótese do presente estudo, o que nos leva a rejeitá-la.

Portanto, a suplementação com ácido α -lipóico resultou em uma proteção contra o estresse oxidativo provocado pelo exercício exaustivo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJMANI, R. S. *et al.* Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 28, p. 29-40, 2003.
- ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, v. 25, p. 218–224, 1993.
- ALESSIO, H. M. *et al.* Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 32, p. 1576–1581, 2000.
- ANDRADE, F. H. *et al.* Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol (Lond)*, v. 509, p. 565–575, 1998.
- ARNAUD, J. *et al.* Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β etacarotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 572, p. 103-116, 1991.
- ASHA DEVI, S.; PRATHIMA, S.; SUBRAMANYAM, M. V. Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats, *Experimental Gerontology*, v. 38, n. 3, p. 285–290, 2003.
- BARRETO, T. O. *et al.* Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. *Eur J Appl Physiol*, v. 112, p. 2523–2530, 2012.
- BEJMA, J.; JI, L. L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v. 87, p. 465–470, 1999.
- BELLÓ-KLEIN, A. Ação da vitamina A e do Trolox sobre o stress oxidativo produzido pelo peróxido de oxigênio no miocárdio isolado de rato (tese de doutorado). Porto Alegre. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 1993.
- BELVIRANLI, M. *et al.* Effects of grape seed extract supplementation on exercise-induced oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*, v. 108, p. 249-256, 2012.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, v. 65, p. 1865-1874, 1999.
- BESSEY, O. A. Ascorbic acid microchemical methods. In: *Vitamin Methods*. New York: Academic Press, v. 1, p. 303, 1960.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A. O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* v. 156, p. 435–444; 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol*, v. 52, p. 302-310, 1978.

- CHAE, C. H.; SHIN, C. H.; KIM, H. T. The combination of α -lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles. *Nutrition Research*, v. 28, p. 399–405, 2008.
- CIGHETTI, G. *et al.* Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. *Anal Biochem*, v. 266, p. 222-229, 1999.
- COOMBES, J. S. *et al.* Effects of vitamin E and α -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *Appl Physiol*, v. 90, p. 1424-1430, 2000.
- CRUZAT, V. F. *et al.* Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte*, v. 13, n. 5, 2007.
- DAVIES, K. J. A.; HOCHSTEIN, P. Ubisemiquinone radicals in liver: implications for a mitochondrial Q cycle in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 107, p. 1292–1299; 1982.
- DONATTO, F. F. *et al.* Effect of oat bran on time to exhaustion, glycogen content and serum cytokine profile following exhaustive exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr*, v. 7, p. 32, 2010.
- DRODGE, W. Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, v. 82, p. 47-95, 2002.
- ENGERSON, T. D. *et al.* Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J. Clin. Invest*, v. 79, p. 1564–1570; 1987.
- FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *Musculoskeletal Disorders*, v. 13, p. 218, 2012.
- FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*, v. 8, n.1, 2009.
- FORSTERMANN, U. *et al.* Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, v. 23, n. 2, p. 1121-1131, 1994.
- GHISELLI, A. *et al.* Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med*, v. 29, p. 1106–1114, 2000.
- GILLHAM, R. W. *et al.* Enhanced degradation of VOCs: laboratory and pilot-scale field demonstration. In: *Proc. International Containment Technology Conference* (ed. by S. Chamberlain, C. Chien & N. Lailas) (February, St Petersburg, Florida), p. 858-864, 1997.
- GLEITER, C. H. *et al.* Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, v. 50, p. 513–514, 1996.
- GOLBIDI, S.; BADRAN, M.; LAHER, I. Diabetes and Alpha Lipoic Acid. *Front Pharmacol*, v. 2, p. 69, 2011.

- GOLDFARB, A. H.; BLOOMER, R. J.; MCKENZIE, M. J. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc*, v. 37, p. 234–239, 2005.
- GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2012, Article ID 756132, 12 pages, 2012.
- GOMEZ-CABRERA, *et al.* Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance, *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, n. 1, p. 142–149, 2008.
- GOMEZ-CABRERA, M. C.; DOMENECH, E.; VIÑA, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, n. 2, p. 126–131, 2008.
- GUL, M. *et al.* Short-term swimming exercise as an oxidative stress model in rat [in Turkish]. Hacettepe. *J Sport Sci*, v. 12, p. 26–32, 2001.
- HALLIWELL, B. Free Radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, v. 344, p. 721–724, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. *Oxford University Press*, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzimol*, v. 186, p. 1–63, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, v. 1, p. 1396–1397, 1984.
- HERMANN, R. *et al.* Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic alpha lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur. J. Pharm. Sci*, v. 4, p. 167–174, 1996.
- HOLLANDER, J.; BEJMA, J.; OOKAWARA, T.; OHNO, H. JL LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech Ageing Dev*, v. 116, p. 33–45, 2000.
- HUSSAIN, S. N. *et al.* Expression of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in the ventilatory and limb muscles during endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 17, p. 173–180, 1997.
- JI, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 222, p. 283–292, 1999.
- KAIKKONEN, J. *et al.* Exhaustive exercise increases plasma/serum total oxidation resistance in moderately trained men and wo-men, whereas their VLDL + LDL lipoprotein fraction is more susceptible to oxidation. *Scand J Clin Lab Invest*, 62:599–607, 2002.

- KAYATEKIN, B. M. *et al.* Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol*, v. 87, p. 141–144, 2002.
- KHANNA, S. *et al.* α -Lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol*, v. 86, p. 1191–1196, 1999.
- KINNUNEN, S. *et al.* Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *Eur J Appl Physiol*, v. 95, p. 550–556, 2005.
- LEE, J. *et al.* Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc*, v. 34, p. 443–448, 2002.
- LEE, S. P.; MAR, G. Y.; NG, L. T. Effects of tocotrienol-rich fraction on exercise endurance capacity and oxidative stress in forced swimming rats. *Eur J Appl Physiol*, v. 107, p. 587–595, 2009.
- LEEUWENBURGH, C. *et al.* Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol*, v. 267, n. 2, p. 439–445, 1994.
- LEUWENBURGH, C. *et al.* Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol*, v. 272, p. 363–369, 1997.
- LIU, J. *et al.* Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*, v. 89, p. 21–28, 2000.
- LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies, *The FASEB Journal*, v. 13, n. 10, p. 1169–1183, 1999.
- MCNEILLY, A. M. *et al.* Effect of alpha-lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in obesity with impaired glucose tolerance. *Lipids in Health and Disease*, v. 10, p. 217, 2011.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001.
- MURUGAVEL, P.; PARI, L. Protective Effect of α -Lipoic Acid against Chloroquine-induced Hepatotoxicity in Rats. *J. Appl. Toxicol*, v. 24, p. 21–26, 2004.
- NISS, A. M.; SIMON, P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise—the role of reactive oxygen species. *Frontiers in Bioscience*, v. 12, p. 4826–4838, 2007.
- NIKOLAIDIS, M. G.; MOUGIOS, V. Effects of exercise on the fatty-acid composition of blood of tissue lipids. *Apply. Physiol. Nutr. Metab*, v. 33, p. 1140–1154, 2004.
- NISHINO, T. *et al.* Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J. Biol. Chem*, v. 280, p. 24888–24894; 2005.

- NURAY, O. *et al.* Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol*, v. 91, p. 622–627, 2004.
- ODETTI, P. *et al.* Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. *Metabolism*, v. 45, n.11, 1996.
- POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, v. 88, n. 4, p. 1243– 1276, 2008.
- POWERS, K.; JI, L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 31, n. 7, p. 987–997, 1999.
- RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, n. 2, p. 153–159, 2008.
- REID, M. B.; MOODY, M. R. Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility. *J Appl Physiol*, v. 76, p. 2186–2190, 1994.
- RISTOW, M. *et al.* Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 21, p. 8665–8670, 2009.
- RYAN, M. J. *et al.* Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats, *Experimental Gerontology*, v. 45, n. 11, p. 882–895, 2010.
- SACHDEV, S.; DAVIES, K. J. A. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 44, p. 215–223, 2008.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, v. 25, n. 1, p. 192-205.1968.
- SEN, C. K. *et al.* Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. *J Appl Physiol*, v. 83, p. 189–195, 1997.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med*, Berlin, v. 91, n. 3, p. 31- 38, 1991.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.
- SINGH, U.; JIALAL, I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr. Rev*, v. 66, p. 646–657, 2008.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc*, v. 63, p. 381-389, 1988.

THOMAS, S. R.; CHEN, K.; KEANEY, Jr. J. F. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*, v. 277, n. 8, p. 6017-6024, 2002.

TRAVACIO, M.; LLEUSUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Free Radical Research in Latin America*, v. 48, p. 9-13, 1996.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VESKOUKIS, A. S. *et al.* Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, v. 33, p. 1140-1154, 2008.

WULF, D. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, v. 82, p. 47-95, 2001.

ZEMBRON-LACNY, A. *et al.* Assessment of the antioxidant effectiveness of α -lipoic acid in healthy men exposed to muscle-damaging exercise. *J Physiol Pharmacol*. v. 60, n. 2, p. 139-143, 2009.

ZHANG, Q. J. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol*, v. 587, n. 15, p. 3911-3920, 2009.

ANEXO – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFTM.



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE A MODULAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM CAMUNDONGOS TREINADOS.
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: PROF. DR GUILHERME VANNUCCHI PORTARI
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM.
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 13/01/2012.
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 219

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

Objetivos gerais: avaliar o efeito da suplementação de ácido α -lipóico sobre parâmetros do sistema antioxidante de camundongos treinados no pós-exercício exaustivo.

Objetivos específicos: avaliar parâmetros endógenos e exógenos do sistema antioxidante imediatamente após exaustão e durante a recuperação; avaliar o efeito da suplementação de ácido α -lipóico nas mudanças induzidas pelo exercício no fígado e porção vermelha do músculo gastrocnêmio.

2. JUSTIFICATIVA

A literatura relata que o exercício físico extenuante produz Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) ao mesmo tempo em que o treinamento físico exerce efeito protetor adaptativo em relação à produção endógena de antioxidantes. Tendo em vista o papel antioxidante do ácido α -lipóico contra os danos oxidativos, desejamos elucidar se sua suplementação durante o período de treinamento irá inibir a produção endógena de enzimas antioxidantes e gerar balanço oxidativo desfavorável em camundongos treinados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Animais:

Serão utilizados 96 camundongos machos adultos da linhagem Balb/c, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP – Campus Ribeirão Preto). Para a aclimação ao ambiente, os animais serão alocados em grupos de 6 por caixa (tamanho 170 x 290 x 135 cm) e mantidos por uma semana no Laboratório de Nutrição Experimental sob temperatura ambiente controlada a 22 °C com ciclo de claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso a água filtrada e ração comercial (Nuvilab). Os animais serão mantidos nas mesmas condições durante o experimento.

3.2) Procedimentos com animais e demais procedimentos:

Os animais receberão treinamento físico (natação), durante 8 semanas. Inicialmente, os animais passarão por uma semana de adaptação ao exercício, com 5 minutos no primeiro dia, 15 minutos no segundo, 30 no terceiro, 45 no quarto e 60 no quinto, enquanto os grupos que não receberão o treinamento físico serão submetidos em contato com a água, apenas haverá equalização do estresse entre os grupos (DONATTO et al., 2010). Após o período de adaptação, serão formados 4 grupos experimentais, tratados da seguinte maneira:

- 1) Grupo Placebo Sedentário (n=24): camundongos que receberão 100mg/Kg de veículo placebo via gavagem durante 8 semanas, 1 vez ao dia. Ao final da pré-exaustão, imediatamente pós-exaustão, 4 e 24 horas pós-exaustão, 6 animais serão eutanasiados para coleta de sangue e órgãos (fígado, rim, coração e porção vermelha do músculo gastrocnêmio e diafragma).



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE A MODULAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM CAMUNDONGOS TREINADOS.
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: PROF. DR GUILHERME VANNUCCHI PORTARI
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM.
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 13/01/2012.
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 219

- 2) Grupo Placebo Treinado (n=24): camundongos que receberão 100mg/Kg de veículo placebo via gavagem durante 8 semanas, 1 vez ao dia. Ao final da pré-exaustão, imediatamente pós-exaustão, 4 e 24 horas pós-exaustão, 6 animais serão eutanasiados para coleta de sangue e órgãos (fígado, rim, coração e porção vermelha do músculo gastrocnêmio e diafragma).
- 3) Grupo Ácido α -lipóico Sedentário (n=24): camundongos que receberão 100mg/Kg de ácido α -lipóico via gavagem durante 8 semanas, 1 vez ao dia. Ao final da pré-exaustão, imediatamente pós-exaustão, 4 e 24 horas pós-exaustão, 6 animais serão eutanasiados para coleta de sangue e órgãos (fígado, rim, coração e porção vermelha do músculo gastrocnêmio e diafragma).
- 4) Grupo Ácido α -lipóico Treinado (n=24): camundongos que receberão 100mg/Kg de ácido α -lipóico via gavagem durante 8 semanas, 1 vez ao dia. Ao final da pré-exaustão, imediatamente pós-exaustão, 4 e 24 horas pós-exaustão, 6 animais serão eutanasiados para coleta de sangue e órgãos (fígado, rim, coração e porção vermelha do músculo gastrocnêmio e diafragma).

Para realização da gavagem, o animal será elevado da bancada após o pinçamento na base do pescoço com a mão esquerda, deixando-se o peso do corpo alinhar o tronco com a força da gravidade, naturalmente o animal abrirá a boca e a cânula poderá ser introduzida, sendo conduzida ao esôfago do animal. Para este procedimento será utilizada agulha de aço inox BD-10, cânula de diâmetro 1,0 mm com esfera de 1,7 mm, raio de 40 mm e comprimento de 31 mm. O protocolo de natação será realizado em grupos de 6 animais devido à promoção de exercício mais vigoroso quando comparado com o nado individual, em um cilindro de PVC, (DONATTO et al., 2010) de 22 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade preenchido com água de torneira até a altura de 30 cm para os animais não poderem se agarrar às bordas, mantida a 31°C. A exaustão será determinada pela incapacidade de o animal manter-se na superfície da água por aproximadamente 8 a 10 segundos (DONATTO et al., 2010).

Os animais serão eutanasiados por decapitação, havendo uma tranquilização prévia com Diazepam (5mg/kg) por via intraperitoneal visando o relaxamento do animal antes do procedimento. Após a coleta de sangue e órgãos, os mesmos terão dosados vitaminas C e E, glutatona reduzida (GSH), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), proteínas carboniladas, hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX), enzimas e compostos antioxidantes (superóxido dismutase- SOD e Catalase- CAT) por metodologias já padronizadas no Laboratório de Nutrologia.

4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE PARA O USO DE ANIMAIS

Neste projeto, visamos entender melhor a modulação do sistema antioxidante muscular. Devido a impossibilidade de biópsias musculares em humanos, faz-se necessário o uso de animais.



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

**Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE A MODULAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM CAMUNDONGOS TREINADOS.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: PROF. DR GUILHERME VANNUCCHI PORTARI

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM.

DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 13/01/2012.

PROTOCOLO CEUA/UFTM: 219

5. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO

A via de administração do ácido α -lipóico pode causar desconforto, mas a gavagem será realizada por pessoal treinado e utilizando-se agulha própria para evitar tal desconforto. O treino forçado é inerente à esta pesquisa. O risco de afogamento durante os treinos existe, mas será evitado pela observação contínua de todo o momento de exercício realizado pelos animais. A eutanásia por decapitação pode causar desconforto que será evitado sendo realizada por pessoal treinado e mantendo os outros animais em ambiente separado para que não tenham nenhum desconforto por verem o procedimento, sentirem odores ou ouvirem ruídos.

6. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA

Poderão ocorrer mordidas durante o manuseio e a inoculação do material nos animais. Como medidas preventivas serão adotadas o treinamento dos envolvidos para melhor contenção e administração da droga e utilização de EPI's.

7. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Este protocolo obedece aos princípios éticos para a experimentação animal.

PARECER DA CEUA: Aprovado em 20/04/2012


Prof. Ana Paula Sarreta Terra
Vice-Coordenadora da CEUA