

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO DA CARNOSINA E DA β -ALANINA NO DANO
PRODUZIDO PELO EXERCÍCIO INTENSO NO
MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Guilherme Pedrini Bortolatto
Educador Físico

ARAÇATUBA – SP
2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DA CARNOSINA E DA β -ALANINA NO DANO
PRODUZIDO PELO EXERCÍCIO INTENSO NO
MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Guilherme Pedrini Bortolatto
Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Lousada
Co-orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

B739e

Bortolatto, Guilherme Pedrini.

Efeito da carnosina e da β -alanina no dano produzido pelo exercício intenso no músculo sóleo de ratos / Guilherme Pedrini Bortolatto. -- Araçatuba: [s.n.], 2015.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária. Araçatuba, SP, 2015.

Orientador: Mário Jefferson Quirino Lousada
Co-orientador: Fábio Erminio Mingatto
Inclui bibliografia.

1. Antioxidantes. 2. Enzimas. 3. Estresse oxidativo. 4. Peptídeo. 5. Radicais livres. 6. Teste de esforço. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



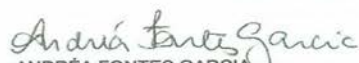
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito da carnosina e da β -alanina no dano produzido pelo exercício intenso no músculo sóleo de ratos

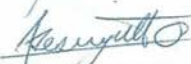
AUTOR: GUILHERME PEDRINI BORTOLATTO

COORIENTADOR: Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA


Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO


Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 3 de dezembro de 2015.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO
- Coorientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guilherme Pedrini Bortolatto - nascido em Dracena (SP) no dia 4 de dezembro de 1983, ingressou no curso de licenciatura plena em Educação Física pela Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp - Câmpus de Presidente Prudente em fevereiro de 2002, obtendo o grau de educador físico em dezembro de 2005. Ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp - Câmpus de Araçatuba, em agosto de 2013 na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, responsável pelas disciplinas de Bioquímica e Bioquímica Animal dos cursos de graduação em Engenharia Agrônômica e Zootecnia, respectivamente, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena. A partir de março de 2015, passou a ser orientado pelo Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Lousada, responsável pelas disciplinas de Ciências Humanas e Sociais Aplicadas e Metabolismo dos Sistemas II do curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp - Câmpus de Araçatuba e co-orientado pelo Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto. Ao longo do mestrado também foi bolsista CAPES, concluindo o curso em dezembro de 2015.

“Quando penso que cheguei ao meu limite descubro que tenho forças para ir além.”

Ayrton Senna

Aos meus pais e minha esposa.
Por sempre acreditarem na minha capacidade e sucesso.

AGRADECIMENTOS

Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus.

Ao meu orientador Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto. Serei eternamente grato pela oportunidade que me proporcionou. Agradeço por tudo e principalmente pela paciência e dedicação.

Ao Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Lousada que durante o programa de mestrado foi essencial para minha caminhada.

À Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba (FMVA) - UNESP e ao curso de pós-graduação em Ciência Animal.

Agradeço à Fundação Capes (Ministério da Educação) pela bolsa concedida.

À equipe do LaBMeT, muito obrigado pelo empenho e dedicação de cada um de vocês.

Aos meus pais Nelson e Neide, irmãos Thiago e Vinícius, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado. Amo vocês.

A minha esposa Priscila, por permanecer ao meu lado, sempre me apoiando e incentivando. Amo-te.

Ao meu filho Lorenzo, que muitas vezes deixei de estar ao seu lado, para poder me aprofundar cada vez mais nos estudos. Amor incondicional.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio	12
1.2 Sistema antioxidante celular e estresse oxidativo	13
1.3 Exercício físico e estresse oxidativo	14
1.4 Creatina quinase	15
1.5 Aspartato aminotransferase	16
1.6 Glutathionas e sistema antioxidante	16
1.7 Malondialdeído	17
1.8 Carnosina	18
1.9 β -alanina	19
2 OBJETIVO	20
3 REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2 - EFEITO DA CARNOSINA E DA β -ALANINA NO DANO PRODUZIDO PELO EXERCÍCIO INTENSO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS.....	30
RESUMO	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL e MÉTODOS	32
2.1 Avaliação ética	32
2.2 Animais	33
2.3 Tratamento	33
2.4 Análise das enzimas indicadoras de lesões musculares	35
2.5 Preparação do homogenato de musculo sóleo	35
2.6 Atividade da enzima glutathiona peroxidase	35
2.7 Atividade da enzima glutathiona redutase	36
2.8 Determinação da concentração de GSH no homogenato	36
2.9 Avaliação da lipoperoxidação	37
2.10 Análise estatística	37
3 RESULTADOS	37
3.1 Análise da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST)	37
3.2 Análise da atividade das enzimas Glutathiona Peroxidase (GPx) e Glutathiona Redutase (GR) no homogenato de músculo sóleo	39
3.3 Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato de músculo sóleo	41
3.4 Oxidação dos lipídeos de membrana no homogenato de músculo sóleo....	41
4 DISCUSSÃO	42
5 CONCLUSÃO	45
6 REFERÊNCIAS	45

EFEITO DA CARNOSINA E DA β -ALANINA NO DANO PRODUZIDO PELO EXERCÍCIO INTENSO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS

RESUMO - O exercício físico intenso afeta o balanço entre ataque oxidativo e a defesa antioxidante no músculo. A carnosina é um dipeptídeo citoplasmático composto pelos aminoácidos β -alanina e histidina. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da carnosina e do seu precursor β -alanina sobre os danos oxidativos causados pelo exercício físico intenso no músculo sóleo de ratos. Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 240 g foram divididos em 4 grupos: controle (sedentários), exercício, exercício + β -alanina e exercício + carnosina. Os animais dos grupos submetidos ao exercício correram em esteira por 60 min a 25 m/min. Fatores relacionados ao dano muscular e estresse oxidativo foram avaliados no soro sanguíneo e no homogenato do músculo sóleo. O exercício promoveu lesão muscular, conforme observado pelo aumento da atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase e creatina quinase, e também induziu o estresse oxidativo, observado pelo aumento da atividade das enzimas glutathione peroxidase e redutase, diminuição da concentração de glutathione reduzida e lipoperoxidação, no músculo sóleo. Apenas a carnosina manteve os parâmetros próximos aos do grupo controle. Os resultados indicam que o tratamento prévio com carnosina protegeu o músculo sóleo de ratos contra os danos oxidativos e a consequente lesão provocada pelo exercício físico intenso.

Palavras-chave: antioxidantes, enzimas, estresse oxidativo, peptídeo, radicais livres, teste de esforço

EFFECT OF CARNOSINE AND β -ALANINE PRODUCED BY THE INTENSE EXERCISE MUSCLE INJURY IN RATS SOLEUS

ABSTRACT - Intense physical exercise affects the balance between oxidative damage and antioxidant defense in the muscle. Carnosine is a dipeptide composed of the cytoplasmic β -alanine and histidine amino acids. This study aimed to evaluate the effect of carnosine and its β -alanine precursor of oxidative damage caused by intense physical exercise in the soleus muscle of rats. Male Wistar rats weighing between 200 and 240 g were divided into 4 groups: control (sedentary), exercise, exercise + β -alanine and carnosine + exercise. The animal groups submitted to the exercise ran on a treadmill for 60 min to 25 m / min. Factors related to muscle damage and oxidative stress were assessed in blood serum and homogenate of the soleus muscle. The exercise promoted muscle damage, as observed by increased serum activity of enzymes aspartate aminotransferase and creatine kinase, and also induced oxidative stress could be seen by the increased activity of the enzymes glutathione peroxidase and reductase, decreased reduced glutathione concentration and lipid peroxidation in soleus muscle. Only carnosine kept the parameters close to those of the control group. The results indicate that pretreatment with the soleus muscle carnosine protected mice against oxidative damage and consequent damage caused by intense exercise.

Keywords: antioxidants, enzymes, oxidative stress, peptide, free radicals, stress test

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas, proporcionando melhor adaptação funcional com estímulos variados (MCKOY et al., 2005; CAPITANIO et al., 2006).

Cerca de 40% da massa corpórea é constituída de tecido muscular, o qual é classificado de acordo com suas características histológicas e fisiológicas. Tratando-se do músculo esquelético, apresenta-se ligado a ossos, ligamentos, fâscias ou pele (LAWRIE, 2005).

A unidade estrutural essencial de todos os músculos é a fibra. As fibras musculares são células longas, estreitas, multinucleadas que podem se estender de uma extremidade do músculo a outra. Em animais saudáveis, o diâmetro da fibra muscular difere de um músculo para o outro e entre as espécies, raças e sexo (LAWRIE, 2005).

Os músculos esqueléticos são compostos de vários tipos de fibras, sendo caracterizados por diferenças quanto ao tipo de contração e classificados em dois grandes grupos, de contração lenta (tipo I) e de contração rápida (tipo II) (LEFEUVRE et al., 1996). Músculos posturais como, por exemplo, o sóleo, possuem maior proporção de fibras tipo I oxidativas e resistentes à fadiga, enquanto os músculos envolvidos em atividades rápidas e que exigem força, como por exemplo, o bíceps braquial possuem maior quantidade de fibras tipo II, altamente fadigáveis (GOLDSPINK, 2005).

1.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não pareado ocupando um orbital externo. Entre os principais radicais livres produzidos nos sistemas biológicos estão o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), que são classificados como espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não enzimáticos e, continuamente, causam danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos

nucléicos celulares (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). Os radicais livres são capazes de oxidar biomoléculas como enzimas, DNA e lipídios de membrana, causando sérios danos estruturais na célula, ocasionando seu mau funcionamento e até a morte celular (DROGE, 2002).

Existem, entretanto, compostos tão reativos quanto os radicais livres que não possuem elétron não pareado na sua última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Entre estes se encontra outra espécie reativa de oxigênio que é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DROGE, 2002)

Existem dois tipos de radicais livres: os endógenos, que são produzidos pelo próprio organismo como produto de uma determinada reação metabólica, incluindo a mitocôndria e a atividade de algumas enzimas como xantina oxidase, e os exógenos, que são provenientes do meio externo ao sistema biológico, incluindo tabaco, poluição do ar, dieta e radiação (DROGE, 2002).

1.2 Sistema antioxidante celular e estresse oxidativo

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidantes para limitar os níveis intracelulares dessas substâncias e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995).

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Antioxidantes não enzimáticos são provenientes da alimentação e não produzidos pelo organismo como a vitamina E, vitamina C, flavonoides, β -caroteno, proteínas do plasma, selênio, glutathiona, clorofilina, L-cisteína e curcumina. Antioxidantes enzimáticos são produzidos pelo próprio organismo como a catalase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (SIES, 1993).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo e designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (SIES, 1986).

1.3 Exercício físico e estresse oxidativo

Hábitos de vida inapropriados, tais como, a ingestão de álcool, fumo e dieta inadequada; condições ambientais impróprias, poluição (ELSAYED, 2001), o envelhecimento (DROGE, 2002) e o exercício físico realizado de forma extrema também estão associados ao estresse oxidativo (ELSAYED, 2001).

O exercício físico está associado ao aumento da geração de radicais livres principalmente devido ao aumento do consumo de VO_2 pelos tecidos ativos (CAZZOLA, et al. 2003). A maior parte do oxigênio consumido é utilizado na mitocôndria para a fosforilação oxidativa, onde é reduzido a água. Entretanto, uma fração pequena, porém significativa do O_2 consumido pode sofrer “escape” (ação de escapar) da cadeia transportadora de elétrons e produzir ERO (DI MEO; VENDITTI, 2001). Estima-se que entre 2% a 5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria são convertidos em radicais livres (URSO; CLARKSON, 2003).

O aumento do consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de ERO pelas mitocôndrias, especialmente no músculo esquelético (DAVIES, et al., 1982; ROWLANDS; DOWNEY, 2000). Estas moléculas estão aumentadas nos exercícios de alta intensidade (LOVLIM, 1987; EBELLING; CLARKSON, 1989) e extenuantes (JENKINS, 1988) e foram relacionadas a um grande número de doenças. Por outro lado, sabe-se que a atividade física é uma conhecida forma de estresse e a exposição crônica a ela, chamada

treinamento físico, é capaz de disparar adaptações em resposta a uma maior produção destes radicais livres.

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o estresse oxidativo, uma vez que, durante o exercício físico, ocorrem várias reações químicas que implicam na formação de ERO (SEN; ROY; PACKER, 2001).

O estresse oxidativo induzido pelo exercício físico causa diferentes tipos de resposta que parecem ter relação com o tipo de tecido estudado e com os níveis de antioxidantes endógenos (LIU, et al. 2002).

Os danos associados ao estresse oxidativo induzidos pelo exercício intenso estão relacionados com a diminuição do desempenho físico, fadiga muscular, danos musculares e até a síndrome do sobretreinamento (KONIG, et al. 2001) promovendo alteração do sistema imune (VIDER, et al. 2001) e do estado de treinamento dos indivíduos (ALESSIO, et al. 2000).

1.4 Creatina quinase

A creatina quinase (CK) foi descoberta em 1934 por Lohmann (LOPEZ, 1969), é uma enzima citoplasmática e mitocondrial que catalisa reações com transferência de energia: a formação da adenosina trifosfato (ATP) e do difosfato de adenosina (ADP) com fosforilação reversível da creatina (LOPEZ, 1969).

É encontrada principalmente na musculatura esquelética (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011), mas também no músculo cardíaco e no tecido cerebral e, em menor escala, nos pulmões, rins entre outros.

A creatina quinase sérica é um marcador bioquímico que caracteriza a ruptura da membrana celular e é utilizada frequentemente como marcador de dano muscular (WILMORE; COSTILL, 2001; FOSCHINI; PRESTES; CHARRO, 2007; MOUGIOS, 2007), determinando o estado funcional do tecido muscular (BRANCACCIO et al., 2008).

González e Silva (2006) relatam que a principal atividade da CK está no tecido muscular (esquelético e cardíaco), cuja principal função é fosforilar de forma reversível a creatina à custa do ATP com a formação de creatina fosfato

A enzima CK pode chegar a altos índices quando ocorrem distrofias musculares. No entanto, mesmo com um mínimo de lesão celular já se percebem alterações nos seus índices, o que a torna um indicativo importante de adaptação ao exercício. Isso porque a CK é uma enzima citoplasmática, sujeita a uma rápida liberação na circulação como resultado de uma pequena lesão (SOARES, 2004).

1.5 Aspartato aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST), é uma enzima que atua na transferência de grupos amina entre alfa-aminoácidos e alfa-cetoácidos sendo por esta razão uma aminotransferase. A AST é vastamente distribuída nos diversos tecidos humanos, com atividades mais elevadas no músculo esquelético, no fígado e no miocárdio. Esta enzima também é utilizada como marcador de dano muscular induzido pelo exercício (LAZARIM et al., 2009; HAMMOUDA et al., 2012).

1.6 Glutationas e o sistema antioxidante

A glutathiona é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) presente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER; ANDERSON, 1983). A glutathiona reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (Figura 1), protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes oxidantes (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

Quanto à enzima glutathiona peroxidase (GPx), esta foi descoberta por Mills em 1959, em tecidos de mamíferos. A GPx encontra alta atividade no fígado, moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Na maioria dos animais, a enzima dependente de selênio é responsável pela maior parte da atividade da

GPx, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre as diferentes espécies, bem como de tecido para tecido em uma mesma espécie. Em ratos, a distribuição da GPx tem sido extensamente estudada e, em hepatócitos a GPx selênio dependente está localizada principalmente no citosol e na matriz mitocondrial (MANNERVIK, 1985).

Outra enzima que age conjuntamente com a glutathiona peroxidase é a enzima glutathiona redutase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém, é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (MEISTER; ANDERSON, 1983).

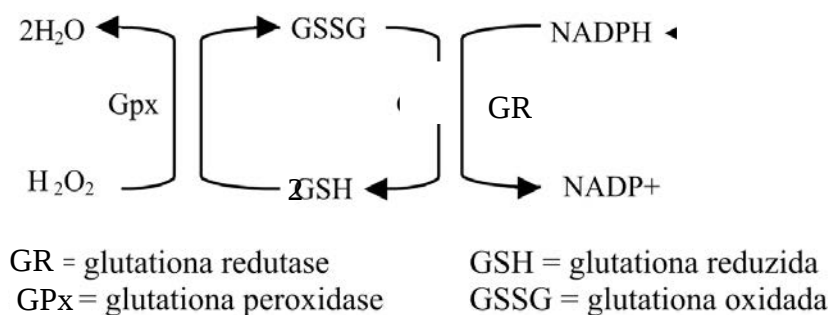


Figura 1. Sistema antioxidante (RIBEIRO, 2005).

1.7 Malondialdeído

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (ÖZGÜNER et al., 1999; DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (STEGHENS et al., 2001; ANDRADE JR et al., 2005; BAGIS et al., 2005).

1.8 Carnosina

A carnosina (Figura 2) é um dipeptídeo citoplasmático encontrado em altas concentrações no tecido muscular esquelético de mamíferos (SMITH et al., 2009; BAGUET et al., 2010). Sua síntese ocorre pela ação da enzima carnosina sintase a partir dos aminoácidos L-histidina e β -alanina, dos quais o último parece ser o precursor limitante, e é degradada pela enzima carnosinase (HARRIS et al., 2006; DERAIVE et al., 2010).

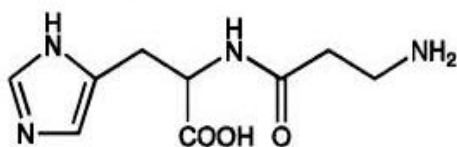


Figura 2. Estrutura química da carnosina (Fonte: domínio público).

A carnosina tem sido apontada como um dipeptídeo pluripotente e multifuncional, sendo uma substância não enzimática removedora de radicais livres e um antioxidante natural (BOLDYREV; ABE, 1999). As propriedades biológicas da carnosina não são mais bem conhecidas do que as da enzima superóxido dismutase (SOD) e vitaminas C e E, mas os estudiosos em todo o mundo tornaram-se muito interessados em suas propriedades como um antioxidante, imunomodulador e neuroprotetor contra os radicais livres (HIPKISS; WORTHINGTON; HIMSORTH, 1998).

O alto grau de conservação ao longo do processo evolutivo, a elevada concentração em alguns tecidos, a presença em diversos órgãos e o alto grau de organização de componentes de seu metabolismo entre os vertebrados sugerem que a carnosina (e moléculas análogas) desempenha funções primordiais na homeostase de diferentes tipos celulares (ABE, 2000).

Dentre os papéis fisiológicos da carnosina, destacam-se: tamponamento de íons hidrogênio (H^+) (ABE, 2000), regulação da sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio (DUTKA, et al., 2012), potencialização da liberação do cálcio

dos retículos sarcoplasmáticos durante a contração muscular (BATRUKOVA; RUBTSOV, 1997; DUTKA et al., 2012), quelatação de íons metálicos (VELEZ, NAIR, REDDY, 2008), ação antioxidante e inibição da formação de produtos avançados da glicoxidação e lipoxidação (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Juntas, essas funções conferem à carnosina um enorme potencial de aplicação no contexto esportivo, bem como no contexto clínico (SALE et al., 2013; HIPKISS et al., 2013).

O músculo esquelético é incapaz de produzir histidina, tampouco β -alanina. Portanto, a síntese de carnosina pelo músculo esquelético depende unicamente da captação desses aminoácidos (ARTIOLI et al., 2010).

Nos humanos, podem ser verificados maiores concentrações de carnosina intramuscular em atletas envolvidos em esportes anaeróbicos, como velocistas e fisiculturistas (TALLON et al., 2005; DERAIVE et al., 2007).

1.9 β -alanina

A β -alanina (Figura 3) é um aminoácido beta, que juntamente com a histidina, é responsável pela síntese da carnosina. Alguns relatos têm indicado que a suplementação com este precursor teria vantagens em relação à ingestão da carnosina, alegando que a última é degradada no trato digestivo (estômago e intestino) em seus dois constituintes que, apesar de seguirem sendo novamente utilizados na formação da própria carnosina, sofrem uma perda em seu aproveitamento em todo esse processo, sendo mais proveitoso do ponto de vista fisiológico e econômico a suplementação com β -alanina do que com a carnosina (ABE, 2000).

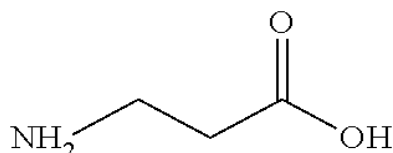


Figura 3. Estrutura química da β -alanina (Fonte: domínio público).

A β -alanina é um aminoácido não-proteinogênico, sintetizado no fígado como metabolito final da degradação do uracil e da tiamina (JORDAN et al., 2010).

Quando da sua produção endógena, a fonte primária de β -alanina em humanos vem da dieta, sendo a carne a principal fonte, com concentrações mais elevadas encontradas na carne de frango e de peru (ABE, 2000).

A suplementação com β -alanina é capaz de promover um aumento real na concentração intramuscular de carnosina (HILL et al., 2007).

Um levantamento recentemente realizado entre atletas australianos profissionais mostrou que mais de 60% deles faz uso de suplementos contendo β -alanina (KELLY et al., 2013).

2 Objetivo

Avaliar o efeito da carnosina e do seu precursor β -alanina sobre os danos oxidativos produzidos pelo exercício físico intenso no músculo sóleo em ratos.

3 Referências Bibliográficas

ABE, H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 7, p. 757-765, 2000.

ALESSIO, H. M.; HAGERMAN, A. E.; FULKERSON, B. K.; AMBROSE, J.; RICE, R. E.; WILEY, R. L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 32, n. 9, p. 1576-1581, 2000.

ANDRADE J. R., D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ARTIOLI, G. G.; GUALANO, B.; SMITH, A.; STOUT, J.; LANCHI, A. H. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 6, p. 1162-1173, 2010.

BAGIS, S.; TAMER, L.; BILGIN, G. S. R.; GULER, H.; ERDOGAN, B. E. C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? **International Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 3, p. 188-190, 2005.

BAGUET, A.; BOURGOIS, J.; VANHEE, L.; ACHTEN, E.; DERAIVE, W. Important role of muscle carnosine in rowing performance. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, p. 1096-1101, 2010.

BATRUKOVA, M. A.; RUBTSOV, A. M. Histidinecontaining dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1324. n. 1, p. 142-150, 1997.

BOLDYREV, A. A.; ABE, H. Metabolic transformation of neuropeptide carnosine modifies its biological activity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 19, p. 163-175, 1999.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1803-1845, 2013.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; BUONAURO, R.; LIMONGELLI, F. M. Serum enzyme monitoring in sports medicine. **Clinics in Sports Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-18, Jan 2008.

CAPITANIO, M.; CANEPARI, M.; CACCIAFESTA, P.; LOMBARDI, V.; CICCHI, R.; MAFFEI, M. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 1, p. 87-92, 2006.

CAZZOLA, R.; RUSSO-VOLPE, S.; CERVATO, G.; CESTARO, B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 10, p. 924-930. 2003.

DAVIES, K. J.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.107, p. 1198-1205, 1982.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.

Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, v. 15, p. 316-328, 2005.

DERAVE, W. OZDEMIR, M. S.; HARRIS, R. C.; POTTIER, A.; REYNGOUDT, H.; KOPPO, K.; WISE, J. A.; ACHTEN, E. β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1736-1743, 2007.

DERAVE, W.; EVERAERT, I.; BEECKMAN, S.; BAQUET, A. Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247-263, 2010.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Biological Signals and Receptors**, v.10, n. 1-2, p.125-140, 2001.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUTKA, T. L.; LAMBOLEY, C. R.; MCKENNA, M. J.; MURPHY, R. M.; LAMB, G. D. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, v. 112. n. 5, p. 728-736, 2012.

EBELLING, C. B.; CLARKSON, P. M. Exercise-induced muscle damage and adaptation. **Sports Medicine**, v. 7, p. 207-234, 1989.

ELSAYED, N. M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 828-834, 2001.

FERNANDES, T. L.; PEDRINELLI, A.; HERNANDEZ, A. J. Lesão muscular – fisiopatologia, diagnóstico, Tratamento e apresentação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 3, p. 247-255, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M. A. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2007.

GOLDSPINK G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 232-238, 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Perfil Bioquímico no Exercício. In: introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, p. 543, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University, 1999. p. 936.

HAMMOUDA, O.; CHAHED, H.; CHTOUROU, H.; FERCHICHI, S.; MILED, A.; SOUISSI, N. Morning-to-evening difference of biomarkers of muscle injury and antioxidant status in young trained soccer players. **Biological Rhythm Research**, v. 43, n. 4, p. 431-438, 2012.

HARRIS, R. C.; TALLON, M. J.; DUNNETT, M.; BOOBIS, L.; COAKLEY, J.; KIM, H. J.; FALLOWFIELD, J. L.; HILL, C. A.; SALE, C.; WISE, J. A. The

absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. **Amino Acids**, v. 30, n. 3, p. 279-289, 2006.

HILL, C. A.; HARRIS, R. C.; KIM, H. J.; HARRIS, B. D.; SALE, C.; BOOBIS, L. H.; KIM, C. K.; WISE, J. A. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. **Amino Acids**, v. 32, p. 225-233, 2007.

HIPKISS, A. R.; CARTWRIGHT, S. P.; BROMLEY, C.; GROSS, S. R.; BILL, R. M. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 38, 2013.

HIPKISS, A. R.; WORTHINGTON, V. C.; HIMSDORTH, D. T. J.; HERWIG, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1380, p. 46-54, 1998.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, p. 156-170, 1988.

JORDAN, T.; LUKASZUK, J.; MISIC, M.; UMOREN, J. Effect of beta-alanine supplementation on the onset of blood lactate accumulation (OBLA) during treadmill running: Pre/post 2 treatment experimental design. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 20-27, 2010.

JORDÃO JUNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

KELLY, V. G.; JENKINS, D. G.; LEVERITT, M. D.; BRENNAN, C. T.; SLATER, G. J. Evaluation of the prevalence, knowledge and attitudes relating to β -

alanine use among athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 4, p. 47, 2013.

KÖNIG, D.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. **Exercise Immunology Review**, v.7, p. 108-133, 2001.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 383.

LAZARIM, F. L.; ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, F. O. C.; NUNES, L. A. S.; BASSINI-CAMERON, A.; CAMERON, L. C.; ALVES, A. A.; BRENZIKOFER, R.; MACEDO, D. V. The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. **Journal Science Medicine Sports**, v. 12, n. 1, p. 85-90, 2009.

LEFEUVRE, B.; CROSSIN, F.; FONTAINE-PERUS, J.; BANDMAN, E.; GARDHAUT, M., Innervation regulates myosin heavy chain isoform expression in developing skeletal muscle fibers. **Mechanisms of Development**, v. 58, n. 1-2, p. 115-127, 1996.

LIU, J.; YEO, H. C.; OVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONINGER, S. J.; CHYU, D. W.; BROOKS, G. A.; AMES, B. N.; CHU, D. W. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 21-28, 2002.

LÓPEZ, J. C. Enzimología: Química de las enzimas. Métodos de preparación y valoración. Nomenclatura, clasificación y descripción. Aplicación en medicina. **Barcelona: Científico-Médica**, 1969.

LOVLIM, R.; COTTLE, W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, A. N. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 56, p. 312-316, 1987.

MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 490-495, 1985.

MCKOY, G.; HOU, Y.; YANG, S. Y.; VEGA AVELAIRA, D.; DEGENS, H.; GOLDSPINK, G. Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 6, p. 2337-2343, 2005.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 10, p. 674-678, 2007.

ÖZGÜNER, M. F.; DELÝBAÞ N.; TAHAN V.; KOYU A.; KÖYLÜ H. Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde. **Eastern Journal of Medicine**, v. 4, n. 1, p. 13-15, 1999.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA; S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROWLANDS, D. S.; DOWNEY B. Physiology of triathlon. In: Garrett W. E. Jr.; Kirkendall D. T. **Exercise and sport science**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 921-922.

SALE, C.; ARTIOLI, G. G., GUALANO, B.; SAUNDERS, B.; HOBSON, R. M.; HARRIS, R. C. Carnosine: from exercise performance to health. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1477-1491, 2013.

SEN, C. K.; ROY, S.; PACKER, L. Exercise: induced oxidative stress and antioxidant nutrients. In: KOMI, P. V. **Nutrition in sports**. Oxford: Blackwell, 2001. p. 22.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SMITH, A. E.; WALTER, A. A.; GRAEF, J. L.; KENDALL, K. L.; MOON, J. R.; LOCKWOOD, C. M.; FUKUDA, D. H.; BECK, T. W.; CRAMER, J. T.; STOUT, J. R. Effects of β -alanine supplementation and high-intensity interval training on endurance performance and body composition in men; a double-blind trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2009.

SOARES, E. C. **Indicadores hematológicos e bioquímicos na avaliação da performance de equinos atletas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

STEGHENS, J. P.; KAPPEL, A. L. V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

TALLON, M. J.; HARRIS, R. C; BOOBIS, L. H.; FALLOWFIELD, J. L.; WISE, J. A. The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained

bodybuilders. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 19, n 4, p. 725-729, 2005.

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

VELEZ, S.; NAIR, N. G.; REDDY, P. Transition metal ion binding studies of carnosine and histidine: Biologically relevant antioxidants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66. n. 2, p. 291-294, 2008.

VIDER, J.; LEHTMAA, J.; KULLISAAR, T.; VIHALEMM, T.; ZILMER, K.; KAIRANE, C.; LANDÖR, A.; KARU, T.; ZILMER, M. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. **Pathophysiology**, v. 7, n. 4, p. 263-270, 2001.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. São Paulo: Manole, 2001.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DA CARNOSINA E DA β -ALANINA NO DANO PRODUZIDO PELO EXERCÍCIO INTENSO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS

RESUMO - O exercício físico intenso afeta o balanço entre ataque oxidativo e defesa antioxidante no músculo. A carnosina é um dipeptídeo citoplasmático composto pelos aminoácidos β -alanina e histidina. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da carnosina e do seu precursor β -alanina sobre os danos oxidativos causados pelo exercício físico intenso no músculo sóleo de ratos. Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 240 g foram divididos em 4 grupos: controle (sedentários), exercício, exercício + β -alanina e exercício + carnosina. Os animais dos grupos submetidos ao exercício correram em esteira por 60 min a 25 m/min. Fatores relacionados ao dano muscular e estresse oxidativo foram avaliados no soro sanguíneo e no homogenato do músculo sóleo. O exercício promoveu lesão muscular, conforme observado pelo aumento da atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase e creatina quinase, e também induziu o estresse oxidativo, observado pelo aumento da atividade das enzimas glutathione peroxidase e redutase, diminuição da concentração de glutathione reduzida e lipoperoxidação, no músculo sóleo. Apenas a carnosina manteve os parâmetros próximos aos do grupo controle. Os resultados indicam que o tratamento prévio com carnosina protegeu o músculo sóleo de ratos contra os danos oxidativos e a consequente lesão provocada pelo exercício físico intenso.

Palavras-chave: antioxidantes, enzimas, estresse oxidativo, peptídeo, radicais livres, teste de esforço

1. INTRODUÇÃO

Como consequência da vida aeróbia, o organismo humano produz continuamente radicais livres conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO) (SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004). Define-se como estresse oxidativo a alteração no estado de equilíbrio entre produção de ERO e sua remoção pelos sistemas antioxidantes celulares (FINDEL, 2003). A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. O aumento no consumo de oxigênio, por meio da ativação das diferentes vias metabólicas, durante ou após exercícios físicos, resulta no aumento de ERO podendo provocar danos ao músculo esquelético (SEN et al., 2001; EL'CHANINOVA, et al. 2003; SOUZA; DE OLIVEIRA; PEREIRA, 2005).

A análise de concentrações de enzimas plasmáticas, como a creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST), são métodos indiretos de análise de dano estrutural causado ao músculo esquelético (VAN DE VYVER; MYBURGH, 2012). A concentração sérica dessas enzimas determina o estado funcional do tecido muscular e varia tanto em condições patológicas quanto fisiológicas (HAMMOUDA et al., 2012).

A glutathione é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) presente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, o metabolismo e a proteção celular (MEISTER; ANDERSON 1983). A glutathione reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes oxidantes (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima do sistema antioxidante celular que elimina o peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE,

1989). Outra enzima que age conjuntamente com a GPx é a glutathione redutase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radiculares, porém é responsável pela regeneração da GSSG a GSH na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo (ÖZGÜNER et al., 1999; DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (STEGHENS et al., 2001; ANDRADE JR et al., 2005; BAGIS et al., 2005).

A carnosina (N-β-alanil-L-histidina) é um dipeptídeo pluripotente e multifuncional encontrada em diversos tecidos e em uma concentração particularmente elevada nos músculos e no cérebro (MARCHIS et al., 1997). Vários estudos têm abordado suas propriedades como antioxidante, imunomodulador e neuroprotetor (HIPKISS et al., 2013; BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

A β-alanina é um aminoácido beta que, juntamente com a histidina compõe a carnosina. Alguns relatos têm indicado que a suplementação com este precursor teria vantagens em relação à ingestão da carnosina, alegando que a última é degradada no trato digestivo (estômago e intestino) em seus dois constituintes que, apesar de seguirem sendo novamente utilizados na formação da própria carnosina, sofrem uma perda em seu aproveitamento em todo esse processo, sendo mais proveitoso do ponto de vista fisiológico e econômico a suplementação com β-alanina do que com a carnosina (HILL et al., 2007). No presente trabalho foi analisado o efeito da suplementação com carnosina e β-alanina sobre os danos oxidativos produzidos pelo exercício físico intenso no músculo sóleo de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação ética

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Campus da Unesp de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº 19/2014).

2.2 Animais

Foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar machos pesando entre 200 e 240 g. Foram colocados quatro animais por caixa e as mesmas foram armazenadas sob temperatura controlada de aproximadamente 22°C e receberam alimento e água *ad libitum*, com uma dieta padronizada para animais de laboratório (Nuvilab®, Colombo, PR, Brasil).

2.3 Tratamento

Os animais foram divididos em quatro grupos contendo oito animais cada, sendo: grupo 1 (Controle) - animais sedentários; grupo 2 (exercício físico), animais que realizaram um protocolo de exercício físico por 3 semanas e foram submetidos ao exercício na esteira motorizada e projetada para ratos (Figura 1) (Single Rodent Motorized Treadmill, AVS Projetos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) correndo por 60 min a 25 m/min; grupo 3 (exercício + β -Alanina) – os animais foram submetidos ao protocolo de exercício físico por 3 semanas e receberam β -alanina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (1 mg/kg de peso vivo) dissolvida em água (via oral por meio de gavagem) pelos últimos 15 dias do protocolo e então foram submetidos ao exercício na esteira correndo por 60 min a 25 m/min e grupo 4 (exercício + carnosina) – foram submetidos ao protocolo de exercício físico por 3 semanas e receberam carnosina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (1 mg/kg de peso vivo) dissolvida em água (via oral por meio de gavagem) pelos últimos 15 dias do protocolo e então foram submetidos ao exercício na esteira correndo por 60 min a 25 m/min.

Os animais dos grupos 2, 3 e 4 foram acostumados a correr em uma esteira motorizada projetada para ratos com início a 8 m/min durante 10 min em 3 dias por semana. Ao longo de um período de 3 semanas, a intensidade de exercício foi gradualmente aumentada para 25 m/min, enquanto a duração

de 10 min foi mantida. No dia do experimento, os animais executaram o exercício na esteira correndo por 60 min a 25 m/min.

Passadas 24 h após o exercício físico, os ratos foram eutanasiados por decapitação para coleta do sangue e do músculo sóleo (Figura 2) (AOI et al., 2004).

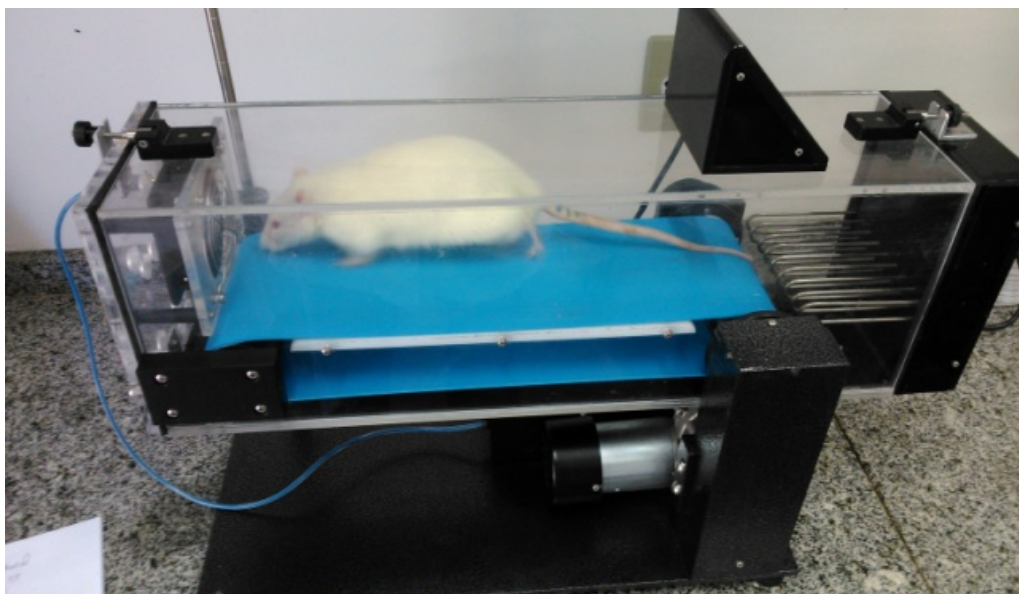


Figura 1. Rato durante o exercício físico na esteira (Fonte: próprio autor).

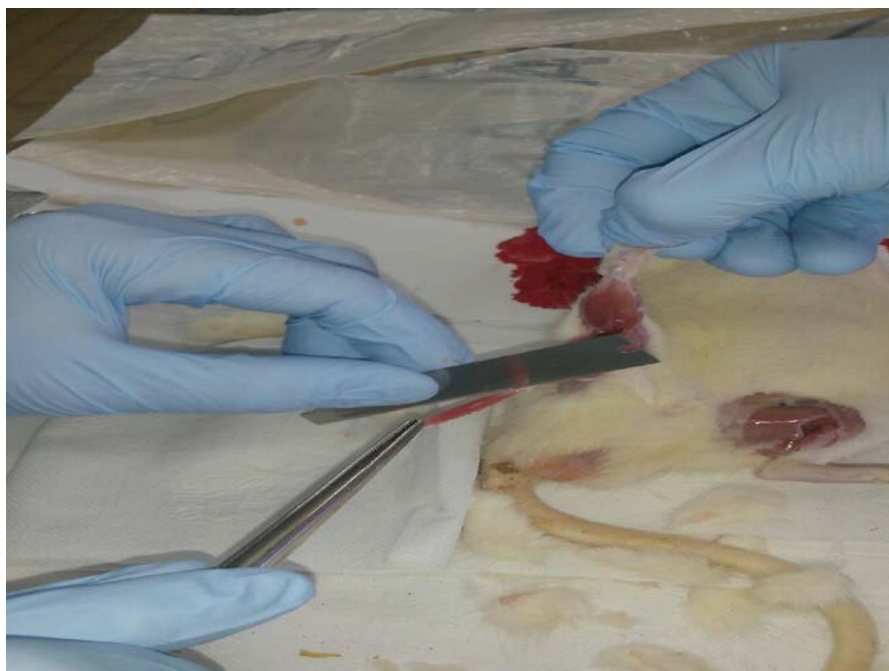


Figura 2. Retirada do músculo sóleo (Fonte: próprio autor).

2.4 Análise das enzimas indicadoras de lesões musculares

O sangue dos animais tratados e controle foram coletados individualmente em tubos tipo “Falcon” de 15 mL, e mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos para coagulação. O soro foi separado por centrifugação (Centrífuga Eppendorf, modelo 5804-R, Hamburgo, Alemanha), com velocidade de 3000 rpm por 15 min. As atividades das enzimas indicadoras de lesões musculares (AST e CK) foram dosadas em espectrofotômetro (modelo DU800, Beckman Coulter, USA) por meio de kits comerciais de dosagem enzimática (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

2.5 Preparação do homogenato de músculo sóleo

Ratos foram eutanasiados por decapitação e o músculo sóleo foi retirado e colocado em aproximadamente 50 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM e HEPES 10 mM com pH 7,2 a 4°C, onde foi picotado e levado para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen e homogeneizado 3 vezes por 15 s com intervalos de 1 min. O homogenato foi centrifugado a 750 g por 3 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf, modelo 5804-R, Hamburgo, Alemanha) para separar as membranas celulares e o sobrenadante foi usado nas análises.

A determinação de proteína foi realizada através da reação do biureto, de acordo com Cain; Skilleter (1987) usando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.6 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi determinada por um método indireto baseado na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG), catalisada pela GPx e a consequente oxidação do NADPH pela GSSG a 30°C em espectrofotômetro (modelo DU800, Beckman Coulter, USA). O sistema de reação foi composto de 1,5 mL contendo: GSH 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio

0,10 M (pH 7,6), triton X-100 0,1% e homogenato de músculo (1 mg de proteína/mL). A oxidação de 1 μ mol of NADPH/min avaliada em 340 nm foi usada como uma unidade de glutathiona peroxidase. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína.

2.7 Atividade da enzima glutathiona redutase (GR)

A taxa de oxidação de NADPH pela GSSG a 30°C em espectrofotômetro (modelo DU800, Beckman Coulter, USA) foi utilizada como medida direta para a atividade da enzima glutathiona redutase. O sistema de reação foi composto de 1,5 mL contendo: GSSG 1,0 mM, NADPH 0,1 mM, EDTA 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,10 M (pH 7,6), triton X-100 0,1% e homogenato de músculo (1 mg de proteína/mL). A oxidação de 1 μ mol de NADPH/min avaliada em 340 nm foi usada como uma unidade de glutathiona redutase. A atividade específica foi expressa como unidade por mg de proteína.

2.8 Determinação da concentração de GSH no homogenato

A determinação da concentração de GSH no homogenato do músculo dos animais foi realizada utilizando-se tubos do tipo “eppendorf” de 2 mL. Colocado o homogenato (1 mg de proteína), foi adicionado meio contendo sacarose 125 mM, KCl, 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 para completar 1 mL e, após uma leve homogeneização, foram adicionados 500 μ L de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 min. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 μ L de tampão contendo NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 μ L do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 μ L de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg/mL. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro (modelo RFPC 5301, Shimadzu, Japão) com comprimento de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente, com abertura de fenda 5 em ambos os casos. A concentração de GSH foi determinada por meio de uma curva padrão com diferentes concentrações.

2.9 Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) por meio da dosagem da concentração de malondialdeído (MDA). O homogenato (5 mg de proteína / mL) foi colocado em tubo de ensaio e foram adicionados 0,2 mL de SDS (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%), 1,5 mL de TBA (solução aquosa a 0,67%), o volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura foi colocada em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o período de incubação, os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e adicionados de 1 mL de água milli-Q e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5 mL de n-butanol. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 min, a parte orgânica foi coletada e a absorvância foi medida a 535 nm em espectrofotômetro (modelo DU800, Beckman Coulter, USA). A concentração de malondialdeído foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

2.10 Análises estatísticas

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA) e a comparação múltipla entre as médias foi feita pelo teste de Tukey, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $P < 0,05$, por meio do programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

3. RESULTADOS

3.1 Análises da atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST)

O exercício físico (G2) promoveu um aumento significativo na atividade sérica das enzimas AST e CK (Figuras 3A e 3B, respectivamente) em relação ao controle (G1), as quais foram utilizadas como parâmetro de lesão muscular.

Os resultados obtidos para os grupos 3 e 4 mostram que apenas o tratamento com a carnosina foi capaz de proteger o músculo sóleo contra os danos provocados pelo exercício físico, conforme observado pela diminuição significativa da liberação da enzima CK (Fig. 3B).

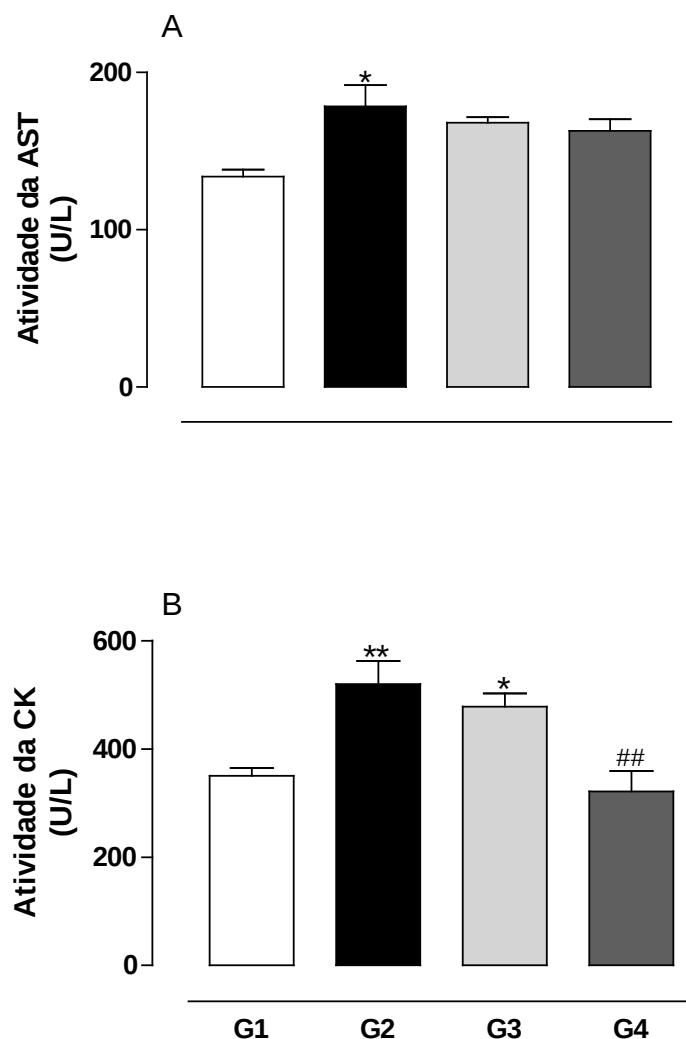


Figura 3. Atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e creatina quinase (CK) (B) no soro sanguíneo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais por grupo. G1 = controle; G2 = exercício físico; G3 = β -alanina + exercício físico; G4 = carnosina + exercício físico. * Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). ** Significativamente diferente do grupo exercício físico (G2) ($P < 0,01$)

3.2 Análise da atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) no homogenato de músculo sóleo

A análise da atividade das enzimas GR e GPx no homogenato de músculo sóleo (Figuras 4A e 4B, respectivamente) demonstrou que houve um

aumento significativo na atividade muscular dessas enzimas provocado pelo exercício físico (G2) em relação ao grupo controle (G1). Apenas o tratamento dos animais com a carnosina (G4) promoveu uma redução significativa na atividade das enzimas em relação ao grupo exercício físico (G2).

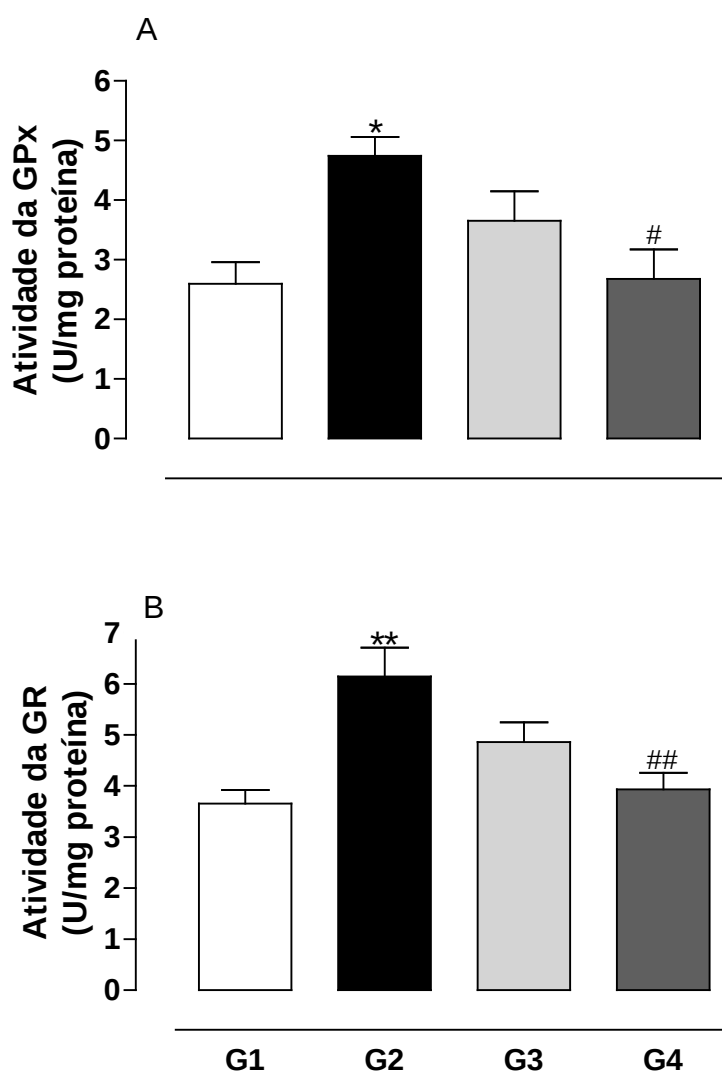


Figura 4. Atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) (A) e glutathiona redutase (GR) (B) no homogenato de músculo sóleo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais por grupo. G1 = controle; G2 = exercício físico; G3 = β -alanina + exercício físico; G4 = carnosina + exercício físico. *, ** Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). #, ## Significativamente diferente do grupo exercício físico (G2) ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

3.3 Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato de músculo sóleo

O exercício físico (G2) promoveu uma redução significativa na concentração de GSH no músculo sóleo em relação ao grupo controle (G1) conforme observado na Figura 5. O tratamento dos animais com a carnosina (G4) possibilitou a manutenção da concentração de GSH próxima à do grupo controle (G1).

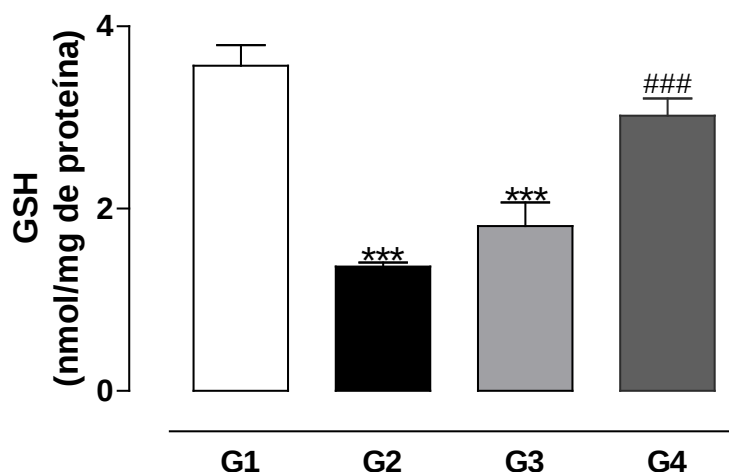


Figura 5. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato de músculo sóleo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais por grupo. G1 = controle; G2 = exercício físico; G3 = β -alanina + exercício físico; G4 = carnosina + exercício físico. *** Significativamente diferente do controle (G1) ($P < 0,001$). #### Significativamente diferente do grupo exercício físico (G2) ($P < 0,001$).

3.4 Oxidação dos lipídeos de membrana no homogenato de músculo sóleo

A Figura 6 demonstra que o exercício físico (G2) estimulou significativamente o aumento na produção de MDA em relação ao grupo

controle (G1), indicando que houve oxidação dos lipídeos de membrana. O tratamento com a carnosina (G4) protegeu o músculo contra os danos oxidativos provocados pelo exercício físico.

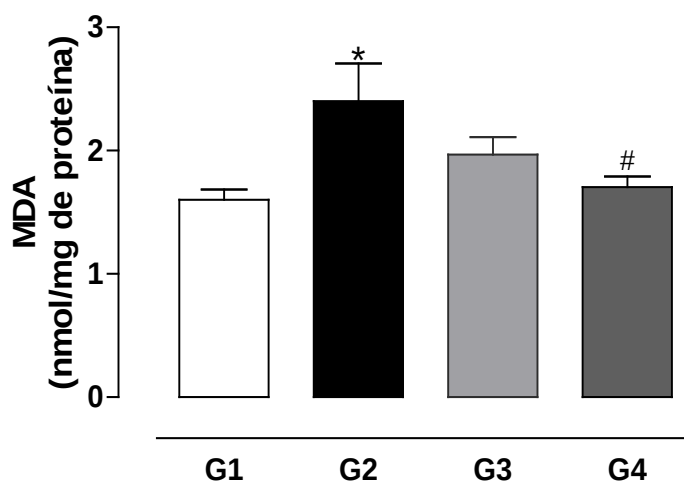


Figura 6. Concentração de malondialdeído (MDA) no homogenato de músculo sóleo de ratos. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais por grupo. G1 = controle; G2 = exercício físico; G3 = β -alanina + exercício físico; G4 = carnosina + exercício físico. *Significantemente diferente do controle (G1) ($P < 0,05$). #Significantemente diferente do grupo exercício físico (G2) ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o exercício físico intenso aplicado aos animais promoveu um aumento significativo na atividade sérica das enzimas AST e CK em relação ao controle, indicando a ocorrência de lesão muscular. O tratamento dos animais com a carnosina protegeu o músculo sóleo contra os danos provocados pelo exercício físico, conforme observado pela diminuição significativa da liberação da enzima CK. Um dado bastante interessante obtido no estudo realizado por Prada et al. (2004) foi à redução da atividade CK no sangue dos ratos treinados em comparação com os controles, sugerindo redução das lesões musculares nos primeiros.

A questão do treinamento físico aumentar ou não a atividade das enzimas do sistema antioxidante permanece controversa. Enquanto alguns autores demonstraram aumento da atividade enzimática antioxidante (CAT, SOD e GPx) em músculo esquelético induzida pelo treinamento físico (PEREIRA, et al., 1996; SMOLKA, et al., 2000) outros não constataram nenhuma alteração na atividade das mesmas enzimas (ALESSIO; GOLDFARB, 1988). A resposta das enzimas antioxidantes musculares parece ser dependente do ergômetro utilizado: natação (PEREIRA, et al., 2000), corrida em esteira (ALESSIO; GOLDFARB, 1988; SMOLKA, et al., 2000) ou ocorrida em roda de atividade espontânea (SELMAN et al., 2002); do protocolo de exercício, contínuo (ALESSIO; GOLDFARB, 1988) ou intermitente (ATALAY, et al., 1996; SMOLKA, et al., 2000) assim como do tipo de fibra muscular (POWERS, 1994; ATALAY, et al., 1996) e da espécie estudada: rato (ALESSIO; GOLDFARB, 1988; PEREIRA, et al., 1996; SMOLKA, et al., 2000), camundongo (AVULA; FERNANDES, 1999) ou outros mamíferos (SELMAN, et al., 2002).

Em relação à análise da atividade das enzimas GPx e GR no homogenato de músculo sóleo dos ratos submetidos ao exercício no presente estudo, observou-se um aumento significativo na atividade muscular dessas enzimas quando comparadas com o grupo controle. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por estudos anteriores que demonstraram que, para proteger os tecidos contra possíveis danos causados pelas ERO, as enzimas antioxidantes como SOD, catalase (CAT), GPx e GR, parecem responder de maneira adaptativa elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados (JENKINS, 1987; PEREIRA et al., 1996; AVULA, FERNANDES, 1999). O tratamento prévio dos animais com a carnosina apresentou uma redução significativa na atividade dessas enzimas no homogenato de músculo, indicando uma ação antioxidante. Vieira Junior et al. (2013), encontraram diferenças significantes da atividade da enzima GPx entre os dois grupos avaliados, sendo os valores médios maiores no grupo que treinou natação em relação ao grupo sedentário. Em outro trabalho, os autores somente identificaram diferença significativa de atividade da glutathione peroxidase em determinadas intensidades de treinamento (SCHNEIDER, et al. 2005).

Os efeitos do exercício aeróbio não se resumem somente à atividade de antioxidantes enzimáticos, pois também podem ser observados efeitos sobre os antioxidantes não enzimáticos. Neste sentido, o exercício físico promoveu uma redução significativa na concentração de GSH no músculo sóleo dos ratos em relação ao grupo controle, enquanto que a carnosina utilizada no tratamento dos animais possibilitou a manutenção da concentração de GSH. Alguns estudos mostraram que a glutathione (GSH), principal antioxidante celular não enzimático, ou a relação entre GSH e sua forma oxidada (GSSG) podem ser reduzidas durante o exercício físico (JI; FU, 1992; TESSIER, et al. 1995).

O exercício físico estimulou significativamente o aumento na produção de MDA em relação ao grupo controle indicando que houve peroxidação dos lipídeos de membrana. Mais uma vez a carnosina protegeu o músculo contra o dano oxidativo provocado pelo exercício intenso. De acordo com Alessio e Goldfarb (1988), houve pequeno aumento na peroxidação lipídica tanto no fígado quanto no músculo esquelético de ratos após exercício submáximo de corrida em esteira. Boldyrev et al. (1988) demonstraram que, na presença de carnosina, ocorreu uma diminuição das concentrações de produtos estritamente relacionados com a peroxidação lipídica no músculo esquelético.

Os efeitos antioxidantes da carnosina encontrados neste estudo estão de acordo com os relatos da literatura que demonstram uma atividade “scavenger” (capacidade de interagir e sequestrar os radicais livres formando compostos menos reativos) dos radicais superóxido e hidroxil pela carnosina, ou ainda, por sua ação quelante de metais (KOHEN et al., 1988; PAVLOV et al., 1993; GARIBALLA; SINCLAIR, 2000). Estudo recente, no qual atletas caiaquistas e canoístas receberam suplementação com 4 g/dia de carnosina por 14 dias, demonstrou uma significativa redução na produção de marcadores de estresse oxidativo no sangue (SLOWINSKA-LISOWSKA et al., 2014).

No presente estudo a suplementação com β -alanina não foi tão eficaz quanto a utilização da carnosina. Embora estudos demonstrassem que a ingestão de β -alanina aumenta a concentração de carnosina no músculo (DERAVE et al., 2007; HILL et al., 2007; ARTIOLI et al., 2010), diversos trabalhos mostraram que a ingestão apenas de β -alanina não apresentou efeito

antioxidante como observado para o dipeptídeo (ARUOMA et al., 1989; KLEBANOV et al., 1998; BOLDYREV; ABE, 1999; SMITH et al., 2012).

5. CONCLUSÃO

A carnosina foi capaz de impedir os danos oxidativos produzidos pelo exercício físico intenso no músculo sóleo de ratos. Dessa forma, sugere-se o uso da carnosina para a suplementação de atletas sujeitos a lesões musculares provocadas pelo exercício.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **Journal of Applied Physiology**, v. 64, p.1333-1336, 1988.

ANDRADE, J. R. D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

AOI, W.; NAITO, Y.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; SAKUMA, K.; ICHIKAWA, H.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 4, p. 480-487, 2004.

ARTIOLI, G. G.; GUALANO, B.; SMITH, A.; STOUT, J.; LANCHA, A. H. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 6, p. 1162-1173, 2010.

ARUOMA, O. I.; LAUGHTON, M. J.; HALLIWELL, B. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? **Biochemical Journal**, v. 264, p. 863-869, 1989.

ATALAY, M. I.; SEENE, T.; ANIÑEN, O.; SEN, C. K. Skeletal muscle and heart antioxidant differences in response to sprint training. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 158, p. 129-134, 1996.

AVULA, R. C. P.; FERNANDES, G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. **Aging**, v. 11, n. 4, p. 246-252, 1999.

BAGIS, S.; TAMER, L.; BILGIN, G. S. R.; GULER, H.; ERDOGAN, B. E. C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? **Rheumatology International**, v. 25, n. 3, p. 188-190, 2005.

BOLDYREV, A. A.; DUPIN, A. M.; PINDEL, E. V.; SEVERIN, S. E. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 89, n. 2, p. 245-250, 1988.

BOLDYREV, A. A.; ABE, H. Metabolic transformation of neuropeptide carnosine modifies its biological activity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 19, p. 163-175, 1999.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1803-1845, 2013.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, p. 316-328, 2005.

DERAIVE, W.; EVERAERT, I.; BEECKMAN, S.; BAQUET, A. Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247-263, 2007.

EL'CHANINOVA, S. A.; SMAGINA, I. V.; KORENYAK, N. A.; VARSHAVSKII, B. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in response to interval hypoxic training. **Human Physiology**, v. 29, n. 3, p. 324-327, 2003.

FINKEL T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p. 247-54, 2003.

GARIBALLA, S. E.; SINCLAIR A. J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age and Ageing**, v. 29, p. 207-210, 2000.

HALLIWELL, B.;GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1989. p. 543.

HAMMOUDA, O.; CHAHED, H.; CHTOUROU, H.; FERCHICHI, S.; MILED, A.; SOUISSI, N. Morning-to-evening difference of biomarkers of muscle injury and antioxidant status in young trained soccer players. **Biological Rhythm Research**, v. 43, n. 4, p. 431-438, 2012.

HILL, C. A.; HARRIS, R. C.; KIM, H. J.; HARRIS, B. D.; SALE, C.; BOOBIS, L. H.; KIM, C. K.; WISE, J. A. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. **Amino Acids**, v. 32, p. 225-233, 2007.

HIPKISS, A. R.; CARTWRIGHT, S. P.; BROMLEY, C.; GROSS, S. R.; BILL, R. M. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 38, 2013.

JENKINS, R. R. Free radical chemistry: Relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, p. 156-170, 1987.

JI, L. L.; FU, R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, p. 549-554, 1992.

JORDÃO JUNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

KLEBANOV, G.; TESELKIN, Y.; BABENKOVA, I.; LYUBITSKY, O.; REBROVA, O.; BOLDYREV, A.; VLADIMIROV, Y. Effect of carnosine and its components on free-radical reactions. **The Journal of Membrane Biology**, v. 12, p. 89-99, 1998.

KOHEN, R.; YAMAMOTO, Y.; CUNDY, K. C.; AMES, B. N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 175-179, 1988.

MARCHIS, S. D.; MELCANGI, R. C.; MODENA, C. Identification of the glial cell types containing carnosine-related peptides in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 23, p. 737-740, 1997.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

ÖZGÜNER, M. F.; DELİBAŞ, N.; TAHAN V.; KOYU A.; KÖYLÜ, H. Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde. **East African Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 13-15, 1999.

PAVLOV, A. R.; REVINA, A. A.; DUPIN, A. M.; BOLDYREV, A. A.; YAROLOV, A. I. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1157, p. 304-312, 1993.

PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L. F.; BECHARA, E. J.; CURI, R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 48, n. 43-46, 1996.

PEREIRA, B.; COSTA ROSA, L. F.; SAFI, D. A.; MEDEIROS, M. H.; CURI, R.; BECHARA, E. J. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. **Physiology and Behavior**, v. 56, n. 5, p. 1095-1099, 2000.

POWERS, S. K. I.; CRISWELL, D.; LAWER, J.; JI, L. L.; MARTIN, D.; HERB, R.A. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology Regulatory Integrate and Comparative Physiology**, v. 266, p. 375-380, 1994.

PRADA, F. J. A.; VOLTARELLI, F. A.; OLIVEIRA, C. A. M.; GOBATTO, C. A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista brasileira de Ciência e Movimento**, v. 12, n. 2, p. 29-34, 2004.

SCHNEIDER, C. D.; BARP, J.; RIBEIRO, J. L.; BELLÓKLEIN, A.; OLIVEIRA, A. R. Oxidative stress after three different intensities of running. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 30, p. 723-34, 2005.

SCHNEIDER, D. C.; DE OLIVEIRA, R. A. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n. 4, p. 308-12, 2004.

SELMAN, C.; MCLAREN, J. S.; COLLINS, A. L.; DUTHIE, G. G.; SPEAKMAN, J. R. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DNA oxidative damage: Effects of short-term voluntary where running. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 401, p. 255-261, 2002.

SEN, C. K.; ROY, S.; PACKER, L. Exercise: induced oxidative stress and antioxidant nutrients. In: KOMI, P. V. **Nutrition in sports**. Oxford: Blackwell, p. 22, 2001.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SLOWINSKA-LISOWSKA, M.; ZEMBRON-LACNY, A.; RYNKIEWICZ M.; RYNKIEWICZ, T.; KOPEC, W. Influence of l-carnosine on pro-antioxidant status in elite kayakers and canoeists. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 101, n. 4, p. 461-470, 2014.

SMITH , A. E.; STOUT, J. R.; KENDALL, K. L.; FUKUDA, D. H.; CRAMER, J. T. Exercise-induced oxidative stress: the effects of β -alanine supplementation in women. **Amino Acids**, v. 43, p. 77-90, 2012.

SMOLKA, M.; ZOPPI, C. C.; ALVES, A. A.; SILVEIRA, L. R.; MARANGONI, S.; PEREIRA DA SILVA L. HSP-72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. 1539-45, 2000.

SOUZA, J. R. P. T.; DE OLIVEIRA, R. P.; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo: Efeitos do exercício físico intenso sobre a Quimiluminescência rinária e malondialdeído plasmático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 1, p. 91-6, 2005.

STEGHENS, J. P.; KAPPEL, A. L. V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical. Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

TESSIER, F.; MARGARITIS, I.; RICHARD, M. J.; MOYNOT, C.; MARCONNET, P. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 27, p. 390-6, 1995.

VAN DE VYVER, M.; MYBURGH, K. H. Cytokine and satellite cell responses to muscle damage: interpretation and possible confounding factors in human studies. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 33, n. 3-4, p. 177-85, 2012.

VIEIRA JUNIOR, R. C.; SILVA, C. M. S. S.; ARAÚJO, M. B.; GARCIA, A.; VOLTARELLI, V. A.; FILHO, A. D. R.; VOLTARELLI, F. A. Treinamento aeróbio de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 3, p. 204-208, 2013.