

Biomarcadores de Estresse Oxidativo: Novas Possibilidades de Monitoramento em Treinamento Físico*

Oxidative Stress Biomarkers: New Possibilities of Monitoring in Physical Training

ANTUNES-NETO, J.M.F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D.V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. **R. bras. Ci e Mov.** 2005; 13(2):7-15.

RESUMO – O exercício físico pode ser entendido como um agente estressor ao organismo. Fatores endógenos (idade, sexo, potencial genético) e exógenos (intensidade, duração, frequência e tipo de exercício) determinam a severidade do estresse e as respostas adaptativas dos sistemas biológicos. Sabe-se, também, que o exercício físico aumenta drasticamente o consumo de oxigênio. Este aumento resulta na produção de radicais e espécies reativas de oxigênio no músculo. Tais oxidantes podem modificar macromoléculas celulares, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Uma situação de estresse oxidativo pode ocorrer quando as defesas antioxidantes locais são depletadas ou então quando a taxa de produção dos oxidantes é maior do que os níveis antioxidantes. Duas grandes classes endógenas de proteção atuam no combate dos efeitos oxidativos na célula: defesas enzimáticas (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase) e antioxidantes não-enzimáticos (vitaminas E e C, glutathione e grupos tiol de proteínas). Uma quantia significativa de trabalhos mostra que, para a resposta ao estresse, a expressão de proteínas de estresse - "heat shock proteins" (HSP) - torna-se essencial para a sobrevivência da célula, atuando estas também como integrantes de um sistema secundário de defesa antioxidante. Assim, análises de marcadores de estresse oxidativo em conjunto com a detecção de HSPs poderiam ser uma potente ferramenta para controlar a sobrecarga dos exercícios de treinamento, prevenindo a instalação de situações de indução de sobre-treinamento (*overtraining*).

PALAVRAS-CHAVE - estresse oxidativo, exercício físico, proteínas de estresse.

ANTUNES-NETO, J.M.F.; SILVA, L.P.; MACEDO, D.V. Oxidative stress biomarkers: new Possibilities of monitoring in physical training. **R. bras. Ci e Mov.** 2005; 13(2):7-15.

ABSTRACT – The physical exercise is a kind of stressor agent to the organism. Endogenous (age, gender, trainability, genetic potential) and exogenous (intensity, duration, frequency and type of exercise, environments conditions) factors indicate the stress severity and the adaptative responses of the biological systems. It is well know that the physical exercise markedly increases oxygen uptake. Increased oxygen consumption results in the production of radicals and other reactive oxygen species within skeletal muscle and others cells, such as superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide and hydroxyl radicals. Unscavenged oxidants can modify macromolecules in the cell including nucleic acids, proteins, and lipids. An oxidative stress situation occur under conditions when the local antioxidant defenses are depleted because of oxidants or when the rate constants of the radical reactions are greater than the rate constants of the antioxidant defense mechanisms. Two major classes of endogenous protective mechanisms work together to reduce the harmful effects of oxidants in the cell: enzymatic defenses (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and superoxide dismutase) and nonenzymatic antioxidants (vitamins E and C, glutathione, and protein-thiols). A significant amount of work has clearly shown that the stress response, and in particular the stress protein - heat shock protein (HSP) -expression, are essential for the survival of the cell confronted with a particular environmental insult. Oxidative stress markers analyses and HSP70 detection could be a useful tool to control the overload of training exercises preventing the installation of overtraining situation.

KEYWORDS - oxidative stress, physical exercise, heat shock proteins.

Joaquim M. F. Antunes-Neto¹

Lúcia Pereira da Silva²

Denise Vaz de Macedo²

¹ Curso de Educação Física e Esporte – METROCAMP, Av. Júlio de Mesquita, 840, CEP: 13025-061, Campinas-SP.

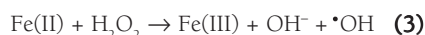
² Instituto de Biologia - Departamento de Bioquímica – Laboratório de Bioquímica do Exercício – LABEX, UNICAMP, CEP: 13083-970, Campinas-SP.

* HSP, Estresse Oxidativo e Exercício Físico

Recebimento: 09/11/2004
Aceite: 18/03/2005

Introdução

A *teoria do radical livre* postula que moléculas reativas contendo um certo número de elétrons desemparelhados são produzidas no curso normal do metabolismo energético. De acordo com esta teoria, efeitos tóxicos destes radicais são introduzidos no interior celular, desencadeando reações deletérias denominadas de *estresse oxidativo*¹. A formação de *espécies reativas de oxigênio* relaciona-se diretamente com os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo¹⁴. O potencial destrutivo do oxigênio é atribuído a sua possibilidade de desviar-se do estado estável diradical (O_2) para um estado de forma ativa, tal como o *oxigênio singlete* (1O_2), e no estado de radical livre ($O_2^{\bullet-}$), este conhecido como *radical ânion superóxido*. A reação de Haber-Weiss demonstra a continuidade do processo de formação de espécies radicalares de oxigênio através do radical ânion superóxido²²:



O oxigênio, que é caracterizado como uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de spins iguais, recebe seus elétrons um a um, na cadeia de transporte de elétrons, através da *citocromo oxidase*, tendo-se H_2O como produto final da reação. Contudo, há vazamentos de elétrons durante o seu transporte na cadeia de transporte de elétrons, o que pode gerar radicais livres de oxigênio. Quando apenas um elétron se adiciona à molécula de oxigênio, observa-se a produção de $O_2^{\bullet-}$ (*reação 1*). A *superóxido dismutase* (SOD), uma enzima do sistema de defesa antioxidante, possibilita que duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ se dismutem para a formação de *peróxido de hidrogênio* (H_2O_2), considerado um agente oxidante fraco (*reação 2*); contudo, H_2O_2 tem a propriedade de atravessar facilmente membranas celulares e poder-se unir com um elétron proveniente de metais de transição, Fe^{2+} ou Cu^+ , fator que pode dar origem ao *radical hidroxila* ($\bullet OH$), que é uma das espécies radicalares mais reativas existente (*reação 3*)¹².

Embora a maior parte do oxigênio combine-se com hidrogênio formando água,

cerca de 4% a 5% de oxigênio formarão espécies radicalares de oxigênio com os elétrons que escapam da cadeia de transporte de elétrons¹². Esta situação de vazamento de elétrons tem maior ocorrência quando há um aumento desproporcional no consumo mitocondrial de oxigênio. Em situação de exercício físico, a demanda energética e o consumo de oxigênio estão aumentados, podendo este consumo elevar-se até vinte vezes mais em relação à condição de repouso²³.

Estresse oxidativo e mecanismos enzimáticos antioxidantes

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser formado nos músculos esqueléticos de várias maneiras^{12,21,23,27}:

- na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, devido ao vazamento de elétrons, principalmente pelo Complexo I e Coenzima Q;
- por enzimas como xantina oxidase, que estão ativas quando predomina uma baixa razão ATP/ADP tecidual e uma alta concentração de Ca^{2+} intracelular.
- pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase;
- através da ativação de neutrófilos e macrófagos, que promovem a inflamação pós-exercício, importante para a remoção de tecidos danificados no processo de reparo.
- pela presença de ferro (na forma livre ou ligado ao heme), que pode converter o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , pela reação de Fenton, em $\bullet OH$.
- o músculo esquelético também produz óxido nítrico (NO), a partir do aminoácido arginina, pela reação da enzima óxido nítrico sintase. O NO pode reagir com $O_2^{\bullet-}$, formando peroxinitrito, um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao $\bullet OH$.

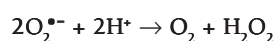
Pelo fato dos radicais livres serem espécies de alta instabilidade, uma forma deles buscarem estabilidade é por via de ataque a regiões celulares específicas, principalmente fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, proteínas e DNA nuclear e mitocondrial⁹.

O processo de peroxidação lipídica pode iniciar-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna da mitocôndria, quando o radical hidroxila busca abstrair o hidrogênio das ligações C—H da cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados. Esta condição trará consequências homeostáticas severas para a membrana, refletindo, principalmente, na sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez⁹. No caso de proteínas, os aminoácidos constituem-se no alvo às espécies reativas de oxigênio, tendo suas estruturas secundárias e terciárias rompidas, com subsequente aumento de hidrofobicidade. Os produtos formados das oxidações dos lipídeos (malondialdeídos) e proteínas (grupamentos carbonila) podem ser quantificados em espectrofotômetro por técnicas específicas laboratoriais, através de dosagens realizadas tanto em amostras de sangue quanto em músculo². Na referida tese de doutorado, pudemos certificar que há uma grande correlação entre aumento exacerbado da sobrecarga de treinamento e diminuição do tempo de recuperação de animais submetidos tanto a protocolos de exercícios de corrida contínua e intermitente, no que diz respeito aos efeitos induzidos pelos radicais livres nas estruturas de lipídeos e proteínas.

Postula-se que a produção de radicais livres torna-se muito maior durante o exercício físico e no processo de envelhecimento. Porém, o organismo humano possui um sistema defensivo antioxidante celular para inibir a peroxidação lipídica de membranas, evitando, assim também, que demais propriedades biológicas sofram lesões e mudanças homeostáticas drásticas^{3,8}. Yu²⁸ descreve que o sistema de defesa antioxidante pode ser classificado em *primário* e *secundário*, de acordo com a ação do reagente com o radical livre: as defesas primárias interagem com as espécies radicalares geradas diretamente do oxigênio, tal como o $O_2^{\bullet-}$, sendo que as defesas secundárias combatem os radicais livres originados da dismutação do $O_2^{\bullet-}$. O sistema de defesa primário é compreendido por *vitaminas antioxidantes* (vitaminas A, C e E), *ácido úrico* e *enzimas antioxidantes* (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase); o sistema de defesa secundário envolve, basicamente, as *enzimas lipolíticas* (fosfolipases) e *enzimas proteolíticas* (proteases e peptidases).

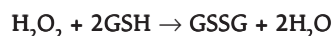
Os sistemas de enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular que compete com a produção de radicais livres. Eliminam o $O_2^{\bullet-}$ e os hidroperóxidos que podem oxidar os substratos celulares e previnem as reações em cadeia dos radicais livres, diminuindo, assim, a concentração disponível destes para iniciar o processo degradativo.

A primeira defesa contra o radical $O_2^{\bullet-}$ é a enzima **superóxido dismutase** (SOD). A SOD, como já apresentado, dismuta o radical $O_2^{\bullet-}$ para formação de H_2O_2 e O_2 :

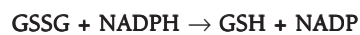


A literatura sugere que a atividade da SOD é mais pronunciada em músculos de elevada capacidade oxidativa (maior porcentagem de fibras do tipo I e IIa) em comparação com músculos de baixa capacidade oxidativa (com grande percentual em fibras do tipo IIb)^{4,19}.

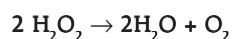
A enzima **glutatona peroxidase** (GPX) cataliza a redução de H_2O_2 em H_2O , utilizando glutatona, na sua forma reduzida (GSH), como substrato:



A glutatona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Quando GSH é oxidada na reação, haverá a interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, formando GSSG. Queda nos níveis endógenos de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão elevada de GSH/GSSG para garantir a disponibilidade de GSH. Para tanto, é necessária a constante regeneração do GSH, que se dará por meio da ação da enzima glutatona redutase (GR)²⁰.



A **catalase** (CAT) tem como função principal a decomposição do H_2O_2 :



A distribuição da CAT ocorre em grande concentração nos peroxissomas e em baixa concentração nas mitocôndrias⁹. Similar a SOD e GPX, a CAT possui maior atividade nos músculos de capacidade oxidativa mais elevada¹⁹.

A formação de radicais livres ocorre tanto em uma situação metabólica basal quanto

quando há aumento da taxa respiratória mitocondrial. A sobrevivência celular frente ao ataque dos radicais livres dependerá de um equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação das espécies reativas. Na circunstância de um desequilíbrio destes dois processos, haverá a instalação de uma condição de estresse oxidativo, onde prevalecerá a formação das espécies radiculares¹. Neste caso, o acúmulo de reações oxidativas induzirá lesões severas em várias estruturas celulares. Contudo, também é bem estabelecido que os sistemas de defesa antioxidantes são capazes de adaptar-se em resposta a exposição crônica de oxidantes, tal como visto no treinamento físico²⁰. A modulação das enzimas antioxidantes parece depender da concentração e do tempo de exposição celular frente às espécies reativas de oxigênio^{13,19}. De acordo com Navarro-Arévalo & Sánchez-del-Pino¹⁷, fatores como o tipo, intensidade e duração do exercício físico são fundamentais na modificação da atividade das enzimas antioxidantes. Portanto, o treinamento eficaz será aquele que estimular a geração de espécies radiculares com concomitante aumento da atividade enzimática antioxidante, evitando a instalação de um quadro de estresse oxidativo².

Proteínas de estresse (HSPs) e exercício físico

Como vimos, pelo fato dos radicais livres serem espécies de alta instabilidade, uma forma deles buscarem estabilidade é por via de ataque a membranas celulares e de organelas⁹. Pesquisas recentes mostram que, em conjunto com a ação das enzimas antioxidantes, há um sistema de defesa secundário que auxilia a atenuação dos eventos oxidativos induzidos pelos radicais livres: é o sistema das **proteínas de estresse (heat shock proteins – HSP)**^{2,25}. Essig & Nosek⁶ relatam que a *síntese de HSPs* poderia complementar a capacidade de defesa enzimática antioxidante pré-existente do organismo quando proteínas intracelulares são danificadas pelos radicais livres. As HSPs teriam, nestas condições, a função de ligar-se a estruturas peptídicas que estivessem sofrendo ataque mediado pelos radicais livres e, assim, evitariam que a proteína sofresse total degeneração. Funcionariam, portanto, como estruturas estabilizadoras de proteínas. A Figura 1 mostra como as HSPs são transcritas pelas células.

Aparentemente, em condições homeostáticas normais, as células apresentam, no citoplasma, uma quantidade de HSPs

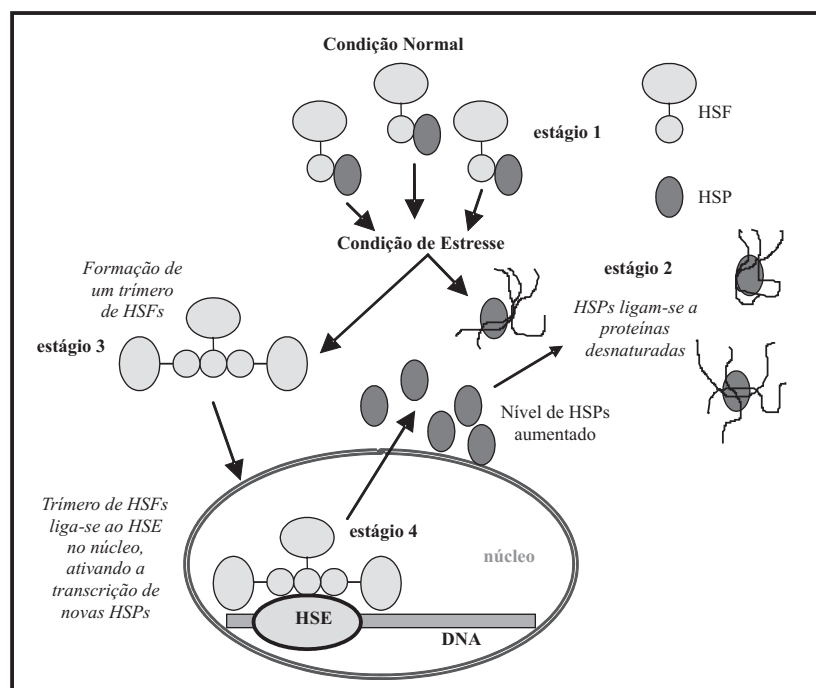


Figura 1. Modelo especulativo para a ativação do fator heat shock em condição de estresse.

conservadas, que funcionam como “satélites” de localização de proteínas danificadas. Nestas HSPs conservadas, existem fatores de ativação nuclear de novas HSPs (os chamados *fatores heat shock* – HSF) (estágio 1). Os HSFs, em resposta a uma condição de estresse, tal como o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, desacoplam-se das HSPs (estágio 2) e, ao formarem um trímero (tal como uma chave de acesso ao DNA nuclear) (estágio 3), adentram-se no núcleo da célula e ativam o *elemento heat-shock* (HSE), responsável pelo desencadeamento transcricional de novas HSPs (estágio 4). A resposta transcricional de HSPs parece ser proporcional à duração e severidade do estresse^{7,16,26}.

Parece existir uma situação de dualidade quando se analisa a ação das espécies radicalares de oxigênio no organismo: ao mesmo tempo que os radicais livres de oxigênio iniciam o processo de peroxidação lipídica de membranas, eles também podem sinalizar a síntese de proteínas de estresse para proteção da célula aos danos celulares. Por exemplo, numa condição onde há uma grande demanda de hidrólise de ATP, como em contrações musculares repetitivas, ocorrerá um aumento da fosforilação oxidativa, resultando na produção de espécies radicalares de oxigênio e indução de estresse oxidativo; a ação dos radicais livres poderá causar fadiga muscular por meio de desnaturação de proteínas do mecanismo de liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático; simultaneamente, os radicais livres participarão em vias de sinalização para indução transcricional de HSPs, o que tenderá a induzir menores prejuízos por estresse oxidativo em proteínas do retículo sarcoplasmático em uma subsequente atividade contrátil similar⁶.

Assim, fica evidente que, para que haja uma adaptação positiva aos efeitos agudos do treinamento físico, há a necessidade da célula “vivenciar” uma situação de estresse acima de seu metabolismo basal. Mecanismos de microlesão e reparação celular são ativados pelos mesmos agentes estressores, de forma que o sucesso adaptativo dependerá de fatores como intensidade, duração e frequência do estímulo imposto, da progressividade de aplicação deste estímulo e do tempo de recuperação entre uma sessão de treino exaustiva e outra². Desta forma, fica em aberto mais uma função das HSPs: sinalizar o

desencadeamento de síntese de proteínas estruturais ao longo do processo adaptativo ao treinamento físico.

Vindo a contribuir com esta abordagem, Davies et al.⁵, através de um estudo clássico, apontaram também que, apesar do exercício exaustivo resultar em decréscimo no controle respiratório mitocondrial, perda de integridade do retículo sarcoplasmático e aumento em produtos de peroxidação lipídica, as microlesões induzidas por radicais livres, em situação de treinamento crônico, podem providenciar um estímulo para biogênese mitocondrial como resultado de um treinamento de *endurance*. Pesquisas futuras poderiam observar qual seria um “limiar de estresse” aceitável para a ocorrência de adaptações musculares positivas, em virtude do treinamento físico, sem que hajam danos celulares severos impostos pelo estresse oxidativo. Se considerarmos que o nível de HSPs é proporcional à severidade de estresse celular, métodos de quantificação simplificados das HSPs poderiam auxiliar, de imediato, na intervenção das respostas de estresse e dosagem das cargas de treinamento físico antes mesmo da ocorrência da sintomatologia lesiva.

Relacionando efeito específico de treinamento e tipo de fibra muscular, Smolka²⁴ observou decréscimos significativos de HSP72 no músculo sóleo (de fibras do tipo I) após treinamento contínuo e no músculo semitendinoso (de fibras do tipo II) após treinamento intermitente. Tais resultados são compatíveis com os princípios de adaptação bioquímica do treinamento físico, mostrando que fibras com características metabólicas específicas (fibras do tipo I hidrolisam ATP mais lentamente e por um período de tempo maior, enquanto que fibras do tipo II hidrolisam ATP rapidamente, porém por curto intervalo de tempo) adaptam-se de forma mais rentável quando submetidas a um estímulo de treinamento que requer do substrato metabólico mais disponível. No caso de organismos não treinados, Hernando & Manso¹⁰ relataram que ratos sedentários submetidos ao exercício intenso tiveram aumentos significativos de HSP72 no músculo sóleo. Locke e colaboradores¹⁵ também enfatizam que o estresse criado durante a prática de um exercício exaustivo em esteira é um estímulo suficiente para

induzir síntese de HSP72 e HSP90, tanto em células do músculo sóleo, células do baço e linfócitos. Tais respostas regulatórias em organismos sedentários atuam como estratégia para conter danos oxidativos celulares ocasionados pelo estresse oxidativo e pela incapacidade do sistema de defesa antioxidante em conter a ação das espécies radiculares de oxigênio.

Contudo, os processos de adaptação ao estresse imposto pelo exercício têm suas atividades de regulação ocorrendo, preponderantemente, no intervalo de recuperação entre as sessões de treinamento (imediatamente após o exercício até 24 horas do término da atividade contrátil), por intermédio de expressão específica de genes que induzem síntese de HSPs¹⁸. Tais resultados revelam que a ação das HSPs é seqüencial após uma atividade contrátil contínua, sendo como um mecanismo de compensação celular aos possíveis danos ocasionados pelo estresse oxidativo, de forma que o tempo de recuperação de uma sessão de treinamento para outra é de fundamental importância para a ocorrência dos processos anabólicos.

Considerações finais

O desenvolvimento de metodologias específicas para detecção de diferentes condições de estresse torna-se fundamental, principalmente no esporte de competição de alto rendimento. O estudo do comportamento adaptativo das proteínas de estresse parece ser uma forma plausível de monitoramento do treinamento físico, uma vez que as HSPs são os marcadores de estresse de mais imediata expressão no organismo. O referencial científico para o estudo das HSPs, apesar de bem delineado e consolidado, não apresenta ainda informações consistentes sobre a relação desta classe de proteína com a condição do exercício físico. O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas eletroforéticas para detecção de HSPs pode vir a contribuir não apenas com as pesquisas em bioquímica do exercício, mas, sobretudo, na melhoria das condições de planejamento das sessões de treino de atletas que estão submetidos a grandes sobrecargas físicas.

Referências Bibliográficas

1. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 1993; 25: 218-224.
2. Antunes-Neto JMF. **Estudo da relação entre estresse oxidativo e síntese de proteínas de estresse "HSP70" no sangue de animais submetidos a diferentes níveis de exercício físico**. Campinas; 2003 [Tese de Doutorado – Instituto de Biologia da UNICAMP].
3. Buczynsky A, Blaszczyk J, Kedziora J. Blood platelet superoxide dismutase activity and malonyldialdehyde concentrations in healthy men following submaximal physical exercise. In: Nazar K et al. (org.). **International perspectives in exercise physiology**. Champaign: Human Kinetics, 1990. p. 346-354.
4. Criswell D, Powers S, Dodd, S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 1993; 25: 1135-1140.
5. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1982; 107:1198-1205.
6. Essig DA, Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? **Canadian Journal of Applied Physiology**. 1997; 22: 409-428.
7. Feige U, Polla BS. Heat shock proteins: the hsp70 family. **Experientia**. 1994; 50: 979-986.
8. Goldfarb AH. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 1993; 25: 232-236.
9. Halliwell B, Gutteridge JM. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.
10. Hernando R, Manso R. Muscle fiber stress in response to exercise. **European Journal of Biochemistry**. 1997; 243: 460-467.
11. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**. 1991; 66: 191-197.

12. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 1993; 25: 210-212.
13. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. **American Journal of Physiology**. 1990; 258: R918-R923.
14. Lawler JM, Cline CC, Hu Z. Effect of oxidant challenge on contractile function of the aging rat diaphragm. **American Journal of Physiology**. 1997; 272 (Cell Physiol.): E201-E207.
15. Locke M, Noble EG, Atkinson BG. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**. 1990; 258 (Cell Physiol.): C723-C729.
16. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**. 1993; 259:1409-1410.
17. Navarro-Arévalo A, Sanchez-Del-Pino MJ. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. **Mechanisms of Ageing and Development**. 1998; 104: 91-102.
18. Neuffer PD, Ordway GA, Williams RS. Transient regulation of c-fos, B-crystallin, and hsp70 in muscle during recovery from contractile activity. **American Journal of Physiology**. 1998; 274 (Cell. Physiol.): C341-346.
19. Powers SK et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**. 1994; 266 (Cell. Physiol.): R-375-R380.
20. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 1999; 31: 987-997.
21. Reid MB. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. **News of Physiology and Science**. 1996; 11: 114-119.
22. Ryan TP, Aust SD. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. **Critical Reviews in Toxicology**. 1992; 22: 119-141.
23. Sjödin B, Wesling H, Apple S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine**. 1990; 10: 236-254.
24. Smolka MB. **Exercício físico e expressão da protreína de estresse HSP72 em músculos de ratos submetidos a diferentes tipos de treinamento**. Campinas; 1999 [Tese de Mestrado – Instituto de Biologia da UNICAMP].
25. Smolka et al. HSP72 as a complementary protection against exercise-induced oxidative stress in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology**. 2000; 279: R1539-R1545.
26. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. **Cell**. 1991; 65: 363-366.
27. Tiidus PM. Radical species in inflammation and overtraining. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 1998; 76: 533-538.
28. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. 1994; 74: 139-162.