

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA-PPGBTOX**

**EFEITO DO EXERCÍCIO AGUDO DE CURTA
DURAÇÃO NA ATIVIDADE DA ENZIMA δ -
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM HUMANOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sally Danuta Schettert

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**EFEITO DO EXERCÍCIO AGUDO DE CURTA DURAÇÃO NA
ATIVIDADE DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE EM HUMANOS**

por

Sally Danuta Schettert

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mâmica da Cruz
Co-Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**EFEITO DO EXERCÍCIO AGUDO DE CURTA DURAÇÃO NA
ATIVIDADE DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM
HUMANOS**

elaborada por
Sally Danuta Schettert

como requisito parcial a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Betrice Mânica da Cruz, Dr^a (UFSM)
(presidente/Orientador)

Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 fevereiro e 2009.

*" Sou um só, mas ainda assim sou um.
Não posso fazer tudo, mas posso fazer
alguma coisa. Por não poder fazer
tudo, não me recusarei a fazer o
pouco que posso.
O que eu faço é uma gota no meio de
um oceano, mas sem ela o oceano
será menor."*

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos. Agradeço também:

À minha Mãe, meu Pai e minhas irmãs Teiva e Taine por existirem. Amo muito vocês!

Aos meus anjos Sofia e Branquinha pelo companheirismo e amor incondicional;

A todos os meus amigos que me ajudaram e estiveram do meu lado durante a realização desse trabalho;

À minha orientadora prof^a. Ivana pela dedicação, orientação, mas principalmente pela força e amizade;

Ao meu co-orientador prof^o. João pela oportunidade;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização desse curso;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO EXERCÍCIO AGUDO DE CURTA DURAÇÃO NA ATIVIDADE DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM HUMANOS

AUTORA: SALLY DANUTA SCHETTERT

ORIENTADORA: PROF^a.DR^a. IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

O exercício aeróbico realizado em determinada intensidade e duração pode resultar no aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) sendo que o exercício de extrema resistência pode causar estresse oxidativo com a concomitante diminuição na atividade do sistema de defesa antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito na atividade da enzima δ -ALA-D e de outros biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em corredores de longa distância submetidos a exercício agudo de curta duração. O protocolo de exercício (realizado em uma esteira ergométrica) foi dividido em repouso, submáximo, máximo e recuperação. Foram avaliados, em sangue humano, os biomarcadores de estresse oxidativo (produção de TBARS e atividade da δ -ALAD) sistema de defesa antioxidante (atividade da catalase, -SH e ácido ascórbico). Como resultados, o exercício máximo induziu o aumento na produção de TBARS e níveis de -SH durante o exercício submáximo, máximo e recuperação quando comparados ao repouso. A atividade da δ -ALA-D aumentou no exercício máximo e recuperação quando comparada ao período de repouso. Quando comparado ao período de repouso a atividade da catalase aumentou no exercício submáximo e na recuperação. Os resultados deste estudo sugerem que a enzima δ -ALAD foi modulada em uma via similar as observadas para outros biomarcadores de estresse oxidativo. Investigações complementares analisando a papel funcional da atividade da δ -ALAD necessitam ser realizadas. Ainda, os resultados deste estudo sugerem que durante o protocolo de exercício a estimulação do sistema de defesa antioxidante (observada pelo aumento nos níveis de grupos tióis) não foi suficiente para prevenir a peroxidação lipídica mesmo nos indivíduos treinados.

Palavras-chave: estresse oxidativo; exercício físico; δ -aminolevulinato desidratase

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF THE ACUTE EXERCISE OF SHORT DURATION IN THE ENZYME δ -AMINOLEVULINATO DEHYDRATASE ACTIVITY IN HUMAN

AUTHOR: Sally Danuta Schettert

ADVISOR: Ivana Beatrice Manica da Cruz

Date and Place of Defense: Santa Maria, february of 2009

Aerobic exercise of sufficient intensity and duration can result in increased generation of reactive oxygen species and exercise of extreme endurance may cause oxidative stress with a concomitant decreased activity of antioxidant defense systems. The aim of this study was to investigate the possible effect of a peak of oxidative stress exposition on the activity of blood δ -ALA-D, an enzyme sensitive to pro-oxidant situations. The protocol of exercise (treadmill) was divided in rest, submaximal exercise, maximal exercise, and recovery. Oxidative stress biomarkers (TBARS production and δ -ALA-D activity), antioxidant defenses systems (catalase activity, -SH and ascorbic acid) were measured in human blood. The maximal exercise induced an increase in TBARS production and -SH levels during submaximal exercise, maximal exercise and recovery when compared with resting. δ -ALA-D activity increased at maximal exercise and recovery when compared with resting. Catalase activity increased during submaximal exercise and recovery when compared to the rest period. The results described here suggest that δ -ALA-D was modulated in a way similar to that observed for other biomarkers of oxidative stress. Complementary investigations analyzing the functional role of δ -ALA-D activity need to be performed. Additionally, the results suggest that during the test stages the stimulation of antioxidant defense systems (observed by the increase in thiol group levels) were not sufficient to prevent lipid peroxidation even in trained individuals.

Key words- oxidative stress; physical exercise; delta-aminolevulinate dehydratase

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1- Formação de EROs e sistema de defesa antioxidante..... 18

FIGURA 2- Geração de Superóxido via xantina oxidase..... 23

FIGURA 3- Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-aminolevulínico catalisada pela enzima δ -ALA-D..... 24

Manuscrito

FIGURA 1- Oxidative stress (TBARS production) and antioxidant defense systems (-SH levels, catalase activity and ascorbic acid levels) biomarkers at rest, submaximal and maximal stages and recovery during the physical effort test..... 50

FIGURA 2- Delta-ALA-D activity with DTT (A) and without DTT (B) at rest, submaximal, maximal and recovery stages during the physical effort test..... 51

FIGURA 3- Positive correlation during recovery in the δ -ALA-D activity with ascorbic acid and δ -ALA-D activity with -SH levels. After maximal exercise, positive correlation between δ -ALA-D activity and -SH and negative correlation's between heart rate and ascorbic acid levels..... 52

FIGURA 4- Relative changes (as percent of the rest period) in the level of biomarkers of oxidative stress in healthy volunteers..... 53

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

TABELA 1- Physical characteristics of the study participants..... 50

TABELA 2- Exercise performance measures..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
ATP: Adenosina Trifosfato
O₂^{•-}: Ânion Superóxido
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HO[•]: Radical Hidroxil
SOD: Superóxido Dismutase
CAT: Catalase
GPx: Glutathione Peroxidase
GSH: Glutathione Redutase
δ-ALA-D: Delta-aminolevulinato Desidratase
Zn²⁺: Íon Zinco
ALA: Ácido 5-aminolevulínico
DNA: Ácidos Desoxirribonucléicos
H⁺: Íon Hidrogênio
GSSG: Glutathione Oxidada
•OOL: Radical Peroxil
VO₂máx: Consumo Máximo de Oxigênio
XO: Xantina Oxidase
AMP: Monofosfato de Adenosina
Ca⁺²: Íon Cálcio
NOS: Óxido Nítrico Sintase
PBG: Porfobilinogênio
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
DTT: Ditioneitol
-SH: Grupos Tióis
LDH: Lactato Desidrogenase
TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobabúrico
VO₂: Consumo de Oxigênio
MDA: Malondialdeído

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Metabolismo Aeróbico e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	15
2.2 Defesas Antioxidantes.....	16
2.2.1 Sistema de Defesa Enzimático.....	17
2.2.2 Sistema de Defesa Não-Enzimático.....	18
2.3 Estresse Oxidativo.....	18
2.3.1 Exercício Físico e Estresse Oxidativo.....	19
2.4 Mecanismos de Formação das EROs no Exercício.....	20
2.5 A Enzima δ-Aminolevulinato Desidratase (E.C.4.2.1.24).....	23
2.5.1 Histórico e Função da Enzima δ -aminolevulinato Desidratase	23
2.5.2 Características Estruturais.....	25
2.5.3 Ação Catalítica.....	27
2.5.4 Atividade da δ -ALA-D e Estresse Oxidativo.....	27
2.5.6 Atividade da δ -ALA-D e Exercício Físico.....	28
3 OBJETIVO.....	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
4.1 Effect of Exhaustive Exercise on d-Aminolevulinatase (δ-ALA-D) Activity in Runners.....	31
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	59
7 REFERÊNCIAS.....	60

APRESENTAÇÃO

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito submetido à revista Biochemical and Biophysical Research Communications o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre a investigação desenvolvida.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** desta dissertação uma vez que o manuscrito contem as suas próprias referências.

1 INTRODUÇÃO

A prática de exercício físico regular é determinante para aquisição de um estilo de vida saudável. No entanto, o exercício físico agudo sem preparo físico anterior ou que exceda a capacidade fisiológica do indivíduo pode causar alterações orgânicas indesejáveis, como o estresse oxidativo. Assim, o exercício aeróbico resulta, potencialmente, no aumento da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) quando praticado em determinada duração e intensidade (JI et al., 1992; TSAI et al., 2001; VIDER et al., 2001; MASTALLOUDIS et al., 2001; ILHAN et al., 2004; BLOOMER et al., 2005; MICHALIDIS et al., 2007). Além do aumento das EROs diversos estudos realizados ao longo destes últimos trinta anos sugerem que o exercício físico exaustivo também é acompanhado da diminuição dos sistemas de defesas antioxidantes (KEUL & DOLL, 1972; PAPAS, 1999; ALESSIO et al., 2000; AGUILÓ et al., 2003).

A possível explicação para a associação entre exercício físico extenuante e estresse oxidativo está relacionada com o metabolismo aeróbico. Isto porque durante o metabolismo basal das células aeróbicas, existe uma produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de moléculas antioxidantes, que tem como objetivo manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (DAVIES, 1991).

A formação de EROs ocorre porque a maioria do oxigênio consumido é reduzido à água no metabolismo de substratos para a formação de adenosina trifosfato (ATP). Porém, uma pequena quantidade desta molécula pode sofrer redução univalente seqüencial e formar ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil (HO^{\bullet}) (FRIDOVICH, 1979; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). O principal sítio de formação endógena do ânion superóxido pode estar localizado na cadeia respiratória mitocondrial, correspondendo à cerca de 2% do oxigênio consumido. Portanto, a produção de ânion superóxido é diretamente proporcional ao volume de oxigênio consumido a nível mitocondrial (BOVERIS & CHANCE, 1973; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

O aumento do estresse oxidativo causado pelo exercício físico exaustivo está associado com processos inflamatórios e com a etiologia de doenças crônicas não-transmissíveis (SIES, 1991) apresentando também relação com a fadiga (BARCLAY

& HANSEL, 1991) e com o dano muscular (PYNE, 1994). Ou seja, a exposição ao estresse oxidativo aumenta o risco de disfunções e morbidades que podem levar ao prejuízo na saúde do indivíduo e a um envelhecimento biológico acelerado ao longo de sua vida.

As EROs podem afetar diferentes órgãos e organelas celulares onde são geradas, podendo acarretar conseqüências patológicas inespecíficas (SASSA et al., 1989; PEREIRA et al., 1992; JAFFE et al., 1995; PACKER, 1997; ROCHA et al., 2003). No estado de repouso o corpo humano produz EROs que podem ser neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Em comparação, durante o exercício exaustivo o consumo de oxigênio pode aumentar de 10 a 20 vezes no corpo como um todo (ASTRAND & RODAHL, 1986; JI et al., 1993) e de 100 a 200 vezes no músculo esquelético (KEUL & DOLL, 1972). É esta elevação no consumo de oxigênio que resulta na produção de EROs em taxas que podem exceder a capacidade do sistema de defesa antioxidante (SJODIN et al., 1990) ocasionando estresse oxidativo.

Estudos também têm sugerido que outras enzimas, além daquelas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, podem estar relacionadas com o estresse oxidativo. A δ -aminolevulinato desidratase (E.C. 4.2.1.24) é uma enzima que participa na catálise e síntese de compostos tetrapirrólicos como bilinas e o heme. A enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) participa da síntese do grupamento heme, que é um dos principais componentes da hemoglobina e dos citocromos (SASSA et al., 1989). δ -ALA-D é um composto sulfidrílico dependente de íons Zn^{2+} para sua atividade e estudos sugerem ter sensibilidade a situações associadas com o estresse oxidativo (FOLMER et al., 2003; 2004). Evidências demonstram que o acúmulo do ácido 5-aminolevulínico (ALA) pode ter um efeito pró-oxidante (BECHARA et al., 1993). Portanto, a inibição da δ -aminolevulinato desidratase poderia ter efeitos nocivos para as células tanto por haver prejuízo na síntese do grupo heme quanto pelo possível comprometimento do metabolismo aeróbico.

Com base nestes resultados estudos realizados por grupos de pesquisa associados a esta investigação têm demonstrado que a inibição da δ -ALA-D pode estar associada com o estresse oxidativo agudo e crônico. Algumas evidências apontam uma possível associação indireta entre a δ -ALA-D e o estresse oxidativo em condições patológicas (intoxicação por metais, hemodiálise, câncer, diabetes, hipotireoidismo) (DJORDJEVIC et al., 1991; FONTANELLAS et al., 1996;

GONÇALVES et al., 2005; SOUZA et al., 2007; VALENTINI et al. 2007). Porém, estes resultados podem ter variáveis intervenientes relacionadas aos efeitos metabólicos severos causados por tais patologias, o que poderia levar a um possível erro de interpretação.

Por esta razão, investigações utilizando estresse oxidativo causado em condições fisiológicas como o exercício físico exaustivo, e não em situações patológicas poderia ser um modelo satisfatório para averiguar a ação da δ -ALA-D na modulação oxidativa. Um estudo que investigou o efeito do exercício exaustivo em biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de enzimas contendo grupos sulfidrílicos (δ -ALA-D, succinato desidrogenase e lactato desidrogenase-LDH) em camundongos observou que tanto a dieta com deficiência em selênio quanto o exercício exaustivo causavam inibição das enzimas δ -ALA-D e succinato desidrogenase (SOARES et al., 2003).

Apesar destes resultados apontarem para uma possível modulação da enzima δ -ALA-D no metabolismo oxidativo investigações em seres humanos sobre este aspecto ainda são muito incipientes.

Dentro deste contexto, o presente estudo buscou investigar as alterações que o exercício físico agudo poderia ocasionar na atividade da δ -ALA-D em seres humanos e ainda, que correlações podem ser encontradas entre a atividade desta enzima com outros biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes nestas condições.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo Aeróbico e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O oxigênio molecular é indispensável à vida da maioria dos organismos. Entretanto, considerando as características químicas e as vias metabólicas de sua utilização, podem ocorrer algumas reações que resultam em efeitos deletérios à própria vida. Este aspecto deletério não é devido ao oxigênio molecular “per se”, pois este tem baixa reatividade e não é causador de lesões oxidativas. Entretanto, os produtos intermediários de seu metabolismo, conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), estão envolvidos em diversos tipos de eventos oxidativos ocasionando a oxidação de estruturas celulares como membranas, proteínas e ácidos desoxirribonucléicos (DNA), podendo causar disfunção celular (JI et al., 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

As EROs são compostos altamente reativos, a maioria apresentando um tempo de vida incrivelmente fugaz. Apesar da breve existência, possuem um instante de vida livre, no qual reagem com a matéria circundante e assim adquirem estabilidade (BOVERIS et al., 1976; DAVIES & HOCHSTEIN, 1982; SACHDEV & DAVIES, 2008). Nas células, o oxigênio molecular não reage diretamente com os substratos, mas é transportado até a mitocôndria onde tem o papel fundamental de receber os íons de hidrogênio (H^+) e os elétrons extraídos dos substratos por meio de diferentes reações enzimáticas. Estas reações de oxidação e redução ocorrem simultaneamente nas células possibilitando a transferência eficiente e controlada de parte da energia armazenada nas ligações químicas dos substratos para o trifosfato de adenosina (ATP), que quando hidrolisado transfere energia para que ocorram as diversas funções celulares (NEWSHOLME & LEECH, 1994).

As quatro etapas de redução ocorrem no interior do complexo IV mitocondrial. Estima-se que em torno de 98% do oxigênio molecular consumido em organismos aeróbios seja reduzido de forma tetravalente até H_2O (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006), através da ação da citocromo c oxidase mitocondrial, sem a concomitante geração de EROs. Porém, uma pequena parte do oxigênio consumido pode sofrer redução univalente seqüencial e formar ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil (HO^{\bullet}) (BOVERIS & CHANCE, 1973;

FRIDOVICH, 1979). O principal sítio de formação endógena do ânion superóxido pode estar localizado na cadeia respiratória mitocondrial, correspondendo à cerca de 2% do oxigênio consumido. A produção de ânion superóxido é diretamente proporcional ao volume de oxigênio consumido a nível mitocondrial (BOVERIS et al., 1976; DAVIES & HOCHSTEIN, 1982; HALLIWELL & GUTTRIDGE, 2006; SACHDEV & DAVIES, 2008).

É importante salientar que nem todas as ERO são moléculas de radicais livres, mas nem por isso deixam de ser muito reativas ou precursoras de outra espécie radical. Este é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado essencialmente em mitocôndria e peroxissomos, e é uma molécula que, a rigor, não pode ser considerada um radical livre, já que não possui elétrons não-pareados, mas possui atividade oxidante e elevada capacidade de difusão (HALLIWELL & GUTTRIDGE, 2006). O peróxido de hidrogênio pode ser precursor do radical hidroxil, que é considerada a ERO mais reativa, pois, na busca imediata de sua estabilidade, este radical transforma as moléculas circundantes em radicais, que, por sua vez, também precisam estabilizar-se. Esta seqüência de eventos é que dá origem às reações em cadeia com os constituintes celulares, podendo ocasionar peroxidação lipídica de membranas, inativação de sistemas enzimáticos e quebra de ligações protéicas e de DNA (BOVERIS & CHANCE, 1973; FRIDOVICH, 1979; NEWSHOLME & LEECH, 1994).

2.2 Defesas Antioxidantes

A atividade biológica das EROs é limitada por uma série de antioxidantes endógenos e proteínas relacionadas ao estresse (Figura 1). As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular, pois eliminam $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e hidroperóxidos que poderiam oxidar os substratos celulares, prevenindo as reações em cadeia dos radicais livres, através da diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo (YU, 1994; POWERS et al., 1999; POWERS & JACKSON, 2008).

Halliwell & Gutteridge (2006) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato.

Esta definição compreende compostos enzimáticos como SOD (superóxido dismutase), a CAT (catalase), a GPx (glutathione peroxidase) e não-enzimáticos como a GSH (glutathione reduzida) e vitaminas A, C e E. Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a SOD, a CAT e a GPx, que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs (figura 1). Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do radical hidroxila (BOVERIS & CADENAS, 1997; POWERS & JACKSON, 2008).

A participação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos no mecanismo de defesa injúria celular, pode diminuir o risco de dano mediado por EROs (POWERS et al., 1994; 1999; POWERS & JACKSON, 2008). Sendo assim, durante o metabolismo aeróbio, a possibilidade de ocorrer lesão oxidativa nos tecidos vai depender de um equilíbrio preciso entre a geração de EROs e a eficácia dos mecanismos antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

2.2.1 Sistema de Defesa Enzimático

A SOD, encontrada em elevadas quantidades em células de mamíferos catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 [$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$]. O H_2O_2 por sua vez é degradado pela ação da CAT resultando em água e O_2 [$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$]. A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra estresse oxidativo, convertendo a glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água (YU, 1994; POWERS et al., 1999; POWERS & JACKSON, 2008).

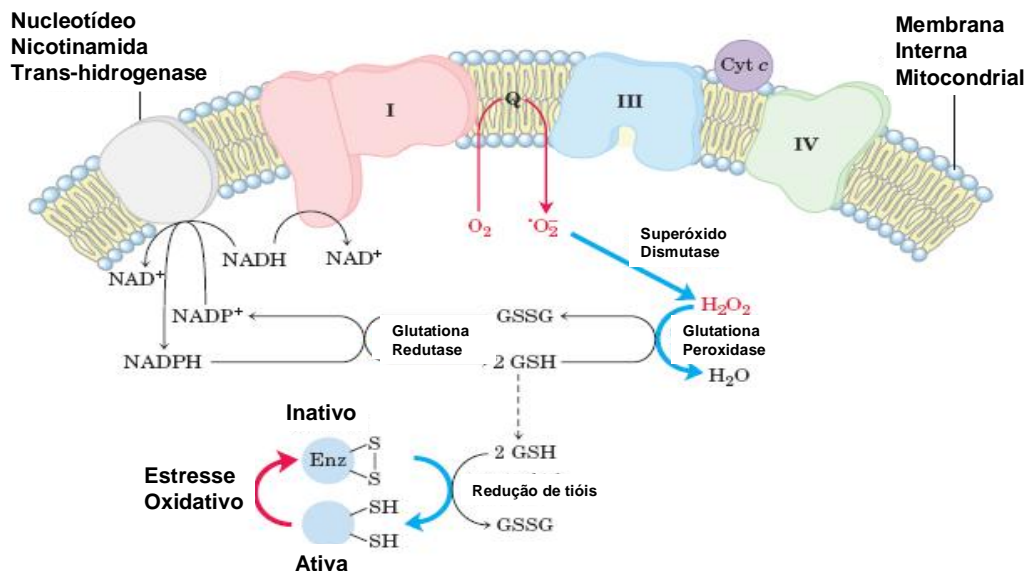


Figura 1- Formação de EROs e sistema de defesa antioxidante. (Fonte: Modificado a partir de NELSON & COX, 2004)

2.2.2 Sistema de Defesa Não-Enzimático

Entre os antioxidantes não enzimáticos destaca-se a vitamina C (ácido ascórbico), que é uma eficiente molécula antioxidante (*scavenger*) de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ e do radical peróxil ($\cdot OOL$). O ascorbato age protegendo biomembranas contra a peroxidação lipídica, perpetuando, desta forma, a atividade do α -tocoferol, um antioxidante não-enzimático lipossolúvel (ROSE, 1987). Também entre os antioxidantes não enzimáticos estão β -caroteno (precursor da vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides) ingeridos através da dieta (POWERS & JACKSON, 2008).

2.3 Estresse Oxidativo

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe uma produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas, qualidade ou natureza dos mesmos a que as células estão expostas, bem como das defesas antioxidantes (DAVIES, 1991).

Um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, de maneira que os primeiros sejam predominantes ou, na situação mais crítica, onde o aumento do sistema pró-oxidante vem acompanhado de uma redução paralela do sistema antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Estudos demonstraram que o aumento na atividade metabólica favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas (KEUL et al., 1972; PAPAS, 1999; ALESSIO et al., 2000; AGUILÓ et al., 2003). Como o treinamento esportivo e a competição elevam acentuadamente a atividade metabólica celular, estas lesões podem assumir dimensões ainda maiores (JI et al., 1992; TSAI et al., 2001; VIDER et al., 2001; MASTALOUDIS et al., 2001; ILHAN et al., 2004; BLOOMER et al., 2005; MICHAILIDIS et al., 2007). O aumento do estresse oxidativo causado pelo exercício físico exaustivo está associado com processos inflamatórios e com a etiologia de doenças crônicas não-transmissíveis (SIES, 1991) apresentando também relação com a fadiga (BARCLAY & HANSEL, 1991) e com o dano muscular (PYNE, 1994). Ou seja, a exposição ao estresse oxidativo aumenta o risco de disfunções e morbidades que podem levar ao prejuízo na saúde do indivíduo ao longo de sua vida.

2.3.1 Exercício Físico e Estresse Oxidativo

O mecanismo molecular envolvido no estresse oxidativo e no dano muscular induzido por um protocolo de exercício agudo tem sido objeto de intensa investigação nos últimos anos (DAVIES et al., 1982; MAUGHAN et al., 1989; SAHLIN et al., 1991; SAXTON et al., 1994; ORTENBLAD et al., 1997; REID, 2001, ANTUNES NETO et al., 2006). O estresse oxidativo tem sido associado à diminuição da performance, fadiga, dano muscular e excesso de treinamento. Por essa razão, alguns pesquisadores (POWERS et al., 1999; RADÁK et al., 1999; CARMELI et al., 2000; POLIDORI et al., 2000) sugerem que reduzir o estresse oxidativo pode melhorar a tolerância ao exercício bem como a performance física.

O aumento no consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de EROs estando estas aumentadas nos exercícios de alta intensidade e extenuantes e que

tem sido relacionadas a um grande número de doenças como o enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer e envelhecimento (SIES, 1991; JI, 1993;). Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar em 35 vezes a demanda de repouso. Dessa forma durante sua realização ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio, na sua maior parte em decorrência do aumento do trabalho muscular (ASTRAND et al., 2003). O exercício físico induz aumento de até 20 vezes no volume de oxigênio total consumido (ASTRAND & RODAHL, 1986; SJÖDIN et al., 1990) permitindo que o O_2^{\bullet} possa ser formado de várias maneiras (DAVIES et al., 1982; SJÖDIN et al., 1990; JENKINS & GOLDFARB, 1993; REID, 1996; TIIDUS, 1998).

Entretanto, a intensidade do estresse oxidativo é dependente do tipo de exercício. Atividades intensas e de longa duração promovem um maior estresse oxidativo do que atividades de curta e média duração realizadas em alta intensidade. Estes resultados demonstraram que o exercício estimula o estresse oxidativo de forma diferente (JI et al., 1992; TSAI et al., 2001; VIDER et al., 2001; MASTALOUDIS et al., 2001; ILHAN et al., 2004; BLOOMER et al., 2005; MICHAILIDIS et al., 2007), dependendo da sua intensidade e duração (DAVIES et al., 1982; POWERS et al., 1994; 1999).

2.4 Mecanismos de Formação das EROs no Exercício

Embora os benefícios do aumento no $VO_{2m\acute{a}x}$ sejam bem estabelecidos, um paradoxo bioquímico é verificado. O aumento no $VO_{2m\acute{a}x}$ é essencial para a aptidão cardiovascular e performance, porém o aumento no consumo durante o exercício pode ser prejudicial. Dependendo do tipo e da intensidade do exercício, têm sido propostos vários mecanismos na geração de EROs (SJÖDIN et al., 1990; PARKER, 1999; KÖNIG & BERG, 2002):

- 1) Aumento na produção de O_2^{\bullet} na cadeia respiratória (Figura 1).
- 2) Ativação da xantina oxidase (XO): a XO catalisa a degradação do monofosfato de adenosina (AMP) durante o trabalho muscular isquêmico, levando ao aumento na produção de O_2^{\bullet} . Durante a isquemia, o AMP, formado do ATP (trifosfato de adenosina) pela reação de adenilato quinase, é degradado para hipoxantina. A XO é convertida e, dessa forma, reduzida para xantina desidrogenase

durante a isquemia por proteases intramusculares, as quais necessitam de Ca^{+2} . A XO converte a hipoxantina para xantina e ácido úrico usando o oxigênio molecular como receptor de elétrons, formando assim o O_2^{\bullet} . Em condições aeróbicas, o oxigênio suficiente assegura que o ATP seja repostado via fosforilação oxidativa mitocondrial e que a hipoxantina e a xantina sejam, primeiramente, convertidas para ácido úrico por meio da xantina desidrogenase (Figura 2).

Além disso, o músculo esquelético tem baixa atividade da XO. Todavia, a XO pode ser um importante caminho quando o músculo apresentar um déficit de adenina dinucleotídeo. Essa situação, teoricamente, pode acontecer em situação isquêmica, exercício isométrico, déficit de O_2 e exercícios com limitação vascular de fluxo sanguíneo (JI, 1999).

3) Ativação de neutrófilos após danos musculares induzidos por exercício: o exercício leva à mobilização de várias células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, que são capazes de produzir EROs. Entre essas células, os neutrófilos são a maior fonte de produção de O_2^{\bullet} pela reação NADPH-oxidase. Na presença de H_2O_2 e íon cloreto, os neutrófilos geram ácido hipocloroso, pela atividade da mieloperoxidase.

As EROs produzidas por neutrófilos são geradas para destruir bactérias invasoras e remover tecidos danificados. A neutrofilia induzida pelo exercício ocorre como resultado da migração de neutrófilos vindos dos tecidos endoteliais (mediada por catecolaminas) e da medula óssea (mediada pelo cortisol) (TREVOR & SANDY, 2001). Isso faz com que removam proteínas e células danificadas e também células mortas.

Embora isso seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido a um grande aumento na produção de mediadores pro-inflamatórios (interleucinas 1, 8, TNF-alfa) e prostaglandinas, levando à indução e à intensificação de processo inflamatório adicional, aumentando a produção de EROs, que são ativadores de fator transcrição NF-kB (MASTALOUDIS et al., 2004).

4) Quebra da homeostase do cálcio em músculos estressados: o exercício leva a uma isquemia muscular e à diminuição da homeostase do Ca^{+2} , o que favorece a produção de EROs por reações catalisadas pela XO (CHEVION et al., 2003). O aumento das concentrações de Ca^{+2} pode ativar a enzima fosfolipase A2, a

qual libera o ácido araquidônico a partir dos fosfolípidos. A ciclooxigenase reage com o ácido araquidônico para gerar o radical hidroxil;

5) Períodos de exercício intenso podem aumentar o estresse oxidativo devido à hipóxia e reoxigenação temporárias, que ocorrem no músculo exercitado em função das contrações e relaxamentos estabelecidos ciclicamente. Durante a contração, a compressão vascular estabelece um quadro de isquemia e, portanto, de hipóxia. No relaxamento, ocorre a reperfusão e, conseqüentemente, a reoxigenação. Sob condições de hipóxia, os equivalentes reduzidos podem se acumular dentro da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, resultando em um fenômeno conhecido como estresse redutivo. Na reoxigenação, uma explosão (burst) de reduções monoelétrônicas pode converter o oxigênio molecular em radicais superóxido;

Condições hipóxicas também têm sido mostradas no aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), levando à formação de radicais do óxido nítrico. Estes radicais podem exercer um efeito pró-oxidante fraco por eles próprios ou se combinar com o superóxido para formar um oxidante mais potente, o peroxinitrito.

Entretanto, mesmo que o exercício intenso induza a uma alteração significativa na produção de EROs, estudos recentes mostram que o exercício físico regular intenso pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhorar a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas EROs e os sistemas de reparos antioxidantes (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; POWERS et al., 1999; RADÁK et al., 1999; CARMELI et al., 2000).

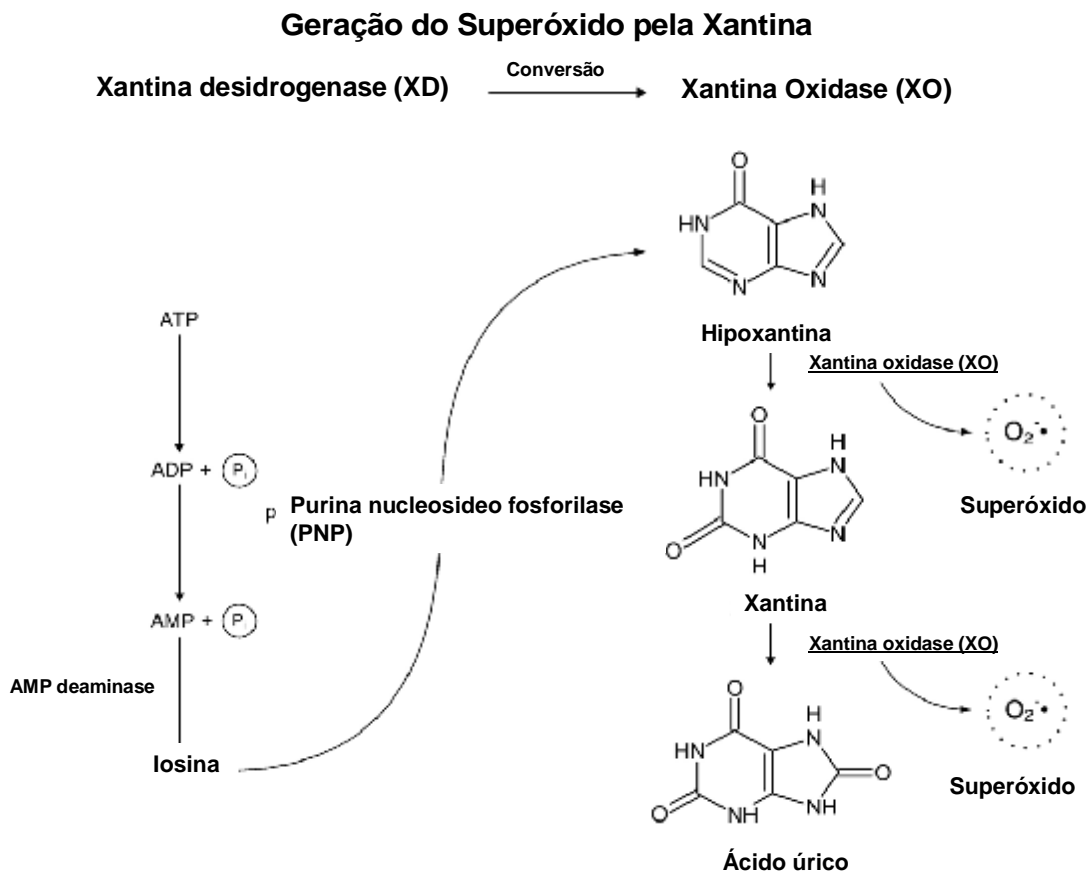


Figura 2- Geração de Superóxido via xantina oxidase (Fonte: modificado de SACHDEV & DAVIES , 2008)

2.5 A Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase (E.C.4.2.1.24)

2.5.1 Histórico e Função da enzima δ -aminolevulinato desidratase

A metaloenzima citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), também conhecida por porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (DRESEL & FLAK, 1953; GIBSSON et al., 1955). Essa enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (ALA) para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (JAFFE, 1995).

No mecanismo proposto para a síntese do porfobilinogênio, um resíduo lisil do sítio ativo da enzima forma uma base de Schiff com a primeira molécula de substrato (ALA). A base de Schiff é, por enquanto, o único intermediário caracterizado da reação, a qual origina a cadeia lateral P (cadeia propiônica). A

Segunda molécula do substrato envolvida na síntese do PBG dá origem à cadeia lateral A (acética) (figura 3) (CASTELFRANCO & BEABLE, 1983).

A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferriprotoporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), biotransformação de xenobióticos (citocromo P₄₅₀) e dos sistemas de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (JEFFE et al., 1995).

A via para a biossíntese de porfirinas é semelhante em bactérias, vegetais e animais (BELLINASSO, 1985; AMAZARRAY, 1986; RODRIGUES et al., 1989). Em mamíferos os tecidos que apresentam maior atividade são o hepático, o renal e os tecidos hematopoiéticos (GIBSON et al., 1955). Guo et al. (1994), demonstraram que a enzima δ -ALA-D é idêntica ao inibidor de proteossoma de 249-KDa (CF-2). Estes achados conferem a δ -ALA-D uma importância adicional, uma vez que os proteossomas atuam na degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, oncoproteínas, bem como no processamento de antígenos (WLODAWER, 1995).

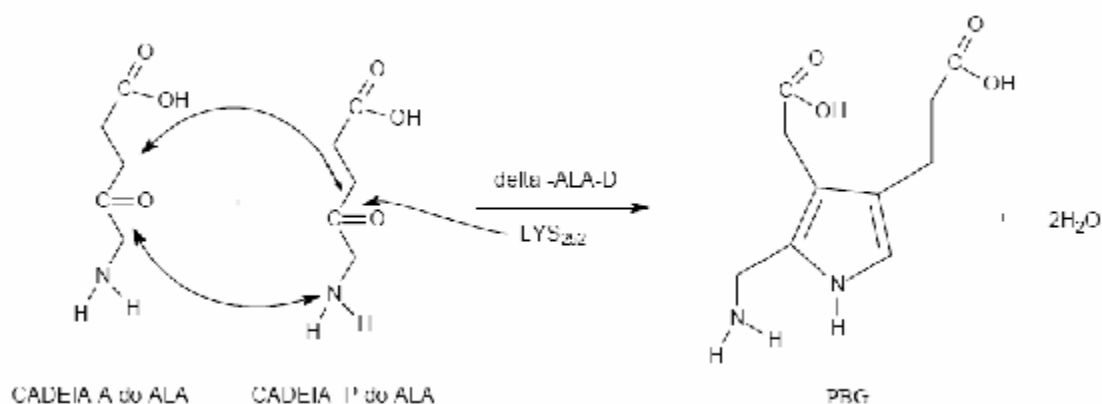


Figura 3- Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-aminolevulínico catalisada pela enzima δ -ALA-D (Fonte: GABRIEL, 2004)

Cadeia Lateral P do ALA, originária da primeira molécula de substratos, a qual forma a porção propionil do PBG. O nitrogênio do grupo amino dessa porção é incorporado no anel pirrólico do produto. Esta cadeia liga-se primeiro e forma uma base de Schiff com o resíduo lisil (lisina-252 na δ -ALA-D de mamíferos e lisina-246 na δ -ALA-D de *E. coli*).

Cadeia Lateral A do ALA, originária da segunda molécula de substrato, a qual forma a porção acetil do PBG. O nitrogênio do grupo amino dessa porção permanece livre.

2.5.2 Características Estruturais

Existe uma grande similaridade entre as seqüências do gene da δ -ALA-D isolado de diversas fontes (humano, WETMUR et al., 1986; *Escherichia coli*, ECHELARD et al., 1988; camundongos, BISHOP et al., 1989; ervilha, BOESE et al., 1991), sugerindo que a enzima apresenta estrutura e mecanismo básico de ação similar em diferentes organismos.

A δ -ALA-D de fígado bovino possui peso molecular de 280-KDa (TIGIER et al., 1970; WU et al., 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981), arranjadas em uma estrutura cúbica octomérica, com simetria diédrica (WU et al., 1974).

Todas as enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico bivalente para estarem ativas, sendo em sua maioria inibidas por EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Apesar da similaridade entre os genes da δ -ALA-D provenientes de diversos organismos, a enzima requer metais diferentes para sua ativação, de acordo com a sua fonte. A δ -ALA-D proveniente de animais, leveduras e de algumas bactérias é uma enzima dependente de zinco (CHEH & NEILANDS, 1973; FINELLI et al., 1974), tendo sido demonstrado o envolvimento de resíduos de cisteína na união deste metal (DENT et al., 1990; MITCHELL & JAFFE, 1993; SPENCER & JORDAN, 1994). A enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma similaridade de 35-50% com a δ -ALA-D de outras fontes, requer magnésio ao invés de zinco (SHIBATA & OCHIAI, 1977; TOMAI et al., 1979). A região em cisteína presentes na enzima de origem animal, e que corresponde a região que supostamente liga zinco, é substituída na enzima de vegetais por uma

região rica em aspartato, que caracterizaria o sítio para a união do magnésio (BOESE et al., 1991; SCHAUMBURG et al., 1991).

A δ -ALA-D, independente de sua fonte, é uma enzima de natureza sulfidrídica (SHEMIN, 1976; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos tiólicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (BATTLE et al., 1978), paracloromecuriobenzoato, monoiodiacetamida e DTNB (TIGIER et al., 1970; BARNARD et al., 1977; BATTLE et al., 1978; RODRIGUES et al., 1989) e por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrídicos, tais como chumbo, cobre e mercúrio (GIBSON et al., 1955; ROCHA et al., 1993; EMANUELLI et al., 1996). Alguns compostos orgânicos e inorgânicos de selênio e de telúrio podem inibir a enzima δ -ALA-D pela oxidação de seus grupamentos sulfidrídicos (BARBOSA et al., 1998).

Para obtenção da atividade catalítica máxima é necessária, geralmente, a adição de ativadores tiólicos como ditiltreitól (DTT), cisteína, glutatona e β -mercaptoetanol. Entretanto, quando a enzima é isolada na presença de zinco (TSUKAMOTO et al., 1979) ou de um agente redutor (GIBSON et al., 1955; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980), ela apresenta atividade máxima mesmo sem a adição de um ativador tiólico no meio de incubação (TSUKAMOTO et al., 1979).

A curva de velocidade da reação em função da concentração de substrato, para a δ -ALA-D de origem animal, apresenta um perfil sigmóide, indicando caráter alostérico da enzima (VERGNANO et al., 1968; CHINARRO et al., 1983).

Até o momento foram identificadas três isoenzimas diferentes em humanos, designadas δ -ALA-D 1-1, δ -ALA-D 1-2 e δ -ALA-D 2-2 (BATTISTIZZI et al., 1981; PETRUCCI et al., 1982), resultantes da expressão de 2 alelos comuns ALA-D¹ e ALA-D². Indivíduos portadores de alelo ALA-D² apresentam um maior conteúdo de chumbo no organismo e maior risco de intoxicação por chumbo, possivelmente devido à maior afinidade da enzima pelo chumbo, determinada por este alelo (WETMUR, 1994).

A atividade da δ -ALA-D de mamíferos é inibida por moléculas quelantes como EDTA e a 1,10-fenantrolina (CHEH & NEILANDS, 1976; SOMMER & BEYERSMANN, 1984). Esta inibição pode ser revertida pela adição de zinco (BEVAN et al., 1980), demonstrando que o zinco faz parte da estrutura da enzima. A δ -ALA-D de mamíferos requer zinco para estar ativa.

2.5.3 Ação Catalítica

O sítio ativo da enzima parece ser composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (TSUKAMOTO et al., 1979; CHINARRO et al., 1983; JAFFE et al., 1994). Atualmente sabe-se que 3 tipos diferentes de aminoácidos são essenciais para a atividade da δ -ALA-D:

a- um resíduo de lisina ao qual se liga a primeira molécula de substrato, através de uma base de Schiff (NANDI, 1978; GIBBS & JORDAN, 1986);

b- um resíduo de histidina, o qual pode sofrer fotooxidação, reduzindo tanto a atividade enzimática quanto a ligação ao zinco (TSUKAMOTO et al., 1979). Este resíduo poderia participar no mecanismo de transferência de prótons do meio aquoso ao sítio ativo hidrofóbico (BATLLE & STELLA, 1978);

c- dois resíduos de cisteína, os quais devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (CHEH & NEILANDS, 1976). Estes resíduos são altamente reativos (GIBBS et al., 1985), podendo formar uma ponte dissulfeto em presença de ar, formar mercaptídeos por reação com metais pesados ou ser modificados por agentes químicos. A intoxicação desses resíduos leva à inativação com concomitante perda de zinco (TSUKAMOTO et al., 1979).

2.5.4 Atividade da δ -ALAD e Estresse Oxidativo

A enzima δ -ALA-D é um composto sulfidrílico dependente de íons Zn^{2+} para sua atividade e estudos sugerem ter sensibilidade a situações associadas com o estresse oxidativo (FOLMER et al., 2003; FOLMER et al., 2004). Evidências demonstram que o acúmulo do ácido 5-aminolevulínico (ALA) pode ter um efeito pró-oxidante (BECHARA et al., 1993).

Devido a sua natureza sulfidrólica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados e não metais que possuam a propriedade química de

oxidar grupamentos –SH. Sabe-se que o prognóstico de pacientes que sofreram intoxicação por chumbo pode ser avaliado de acordo com a inibição da δ -ALA-D de eritrócitos e seu índice de reativação por DTT (BONSIGNORE, 1966).

A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, podendo resultar em conseqüências patológicas (SASSA et al., 1989; GOERING, 1993). Além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA está relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (MONTEIRO et al., 1989; PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993). Assim, o aumento na concentração de ALA, devido à inibição da enzima δ -ALA-D, pode acarretar em conseqüências patológicas inespecíficas, uma vez que a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio pode atuar nos mais diferentes órgãos e compartimentos celulares dos organismos nos quais são gerados (SASSA et al., 1989).

δ -ALA-D é uma das enzimas mais sensíveis da rota biossintética do heme e, portanto, tem sido investigada em várias patologias. Estudos prévios têm demonstrado que a inibição da δ -ALAD pode estar associada com o estresse oxidativo agudo e crônico. Algumas evidências sugerem uma possível associação indireta entre a δ -ALA-D e o estresse oxidativo em condições patológicas (intoxicação por metais, hemodiálise, câncer, diabetes, hipotireoidismo) (DJORDJEVIC et al., 1991; FONTANELLAS et al., 1996; GONÇALVES et al., 2005; SOUZA et al., 2007; VALENTINI et al. 2007). Porém estes resultados podem ter variáveis intervenientes relacionadas aos efeitos metabólicos severos causados por tais patologias, o que poderia levar a um possível erro de interpretação.

2.5.6 Atividade da δ -ALA-D e Exercício Físico

Como já foi mencionado anteriormente, a δ -ALA-D é uma enzima essencial para todos os organismos aeróbicos, uma vez que ela participa da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, os quais formam grupos prostéticos de proteínas fisiologicamente importantes como a hemoglobina e os citocromos, as quais possuem papel central em muitos processos metabólicos na célula (JAFFE et al., 1995; SASSA, 1998).

Um estudo investigou o efeito do exercício exaustivo em biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de enzimas contendo grupos sulfidrílicos (δ -ALA-D, succinato desidrogenase e lactato desidrogenase-LDH) em camundongos. Os resultados sugeriram que tanto a dieta com deficiência em selênio quanto o exercício exaustivo causavam inibição das enzimas δ -ALA-D e succinato desidrogenase (SOARES et al., 2003).

Ainda não foram publicados estudos investigando a atividade da δ -ALA-D relacionada ao exercício físico em humanos, o que não torna os resultados sobre a atividade desta enzima durante o exercício conclusivos. Por este motivo estudos complementares em seres humanos da relação estresse oxidativo, modulação da atividade da enzima δ -ALA-D em resposta ao estresse e em relação aos biomarcadores pró- e anti-oxidativos clássicos podem ser considerados relevantes.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Analisar modificações na atividade da enzima δ -ALA-D e de outros biomarcadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante no sangue de corredores de longa distância submetidos a exercício agudo de curta duração.

3.2 Específicos

No sangue de atletas corredores adultos jovens do gênero masculino submetidos a exercício físico extenuante avaliar:

- a atividade da enzima delta-minolevulinato desidratase;
- o nível de peroxidação lipídica através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobabúrico (TBARS);
- o sistema de defesa antioxidante não enzimático através da determinação dos níveis de grupos tióis não protéicos e vitamina C;
- o sistema de defesa enzimático através da determinação da atividade da catalase;
- a ocorrência de respostas modulatórias similares entre a δ -ALA-D e os demais marcadores do estresse oxidativo e sistemas antioxidantes.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito o qual está organizado nesse item. Os subitens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontra-se no próprio manuscrito. O manuscrito está disposto da mesma forma que foi submetido à revista Biochemical and Biophysical Research Communications.

4.1 - Effect of Exhaustive Exercise on d-Aminolevulinate Dehydratase (d-Ala D)

Activity in Runners

Sally D. Schettert, Andreza F. De Bem, Elisângela Colpo, Daniela L. dos Santos,
Ivana B. M. da Cruz, João B. T. Rocha

Artigo submetido para publicação na revista Biochemical and Biophysical Research
Communications

**EFFECT OF EXHAUSTIVE EXERCISE ON d-AMINOLEVULINATE
DEHYDRATASE (d-ALA D) ACTIVITY IN RUNNERS**

**Sally D. Schettert^{1,3}, Andreza F. De Bem², Elisângela Colpo¹, Daniela L. dos
Santos³, João B. T. Rocha¹, Ivana B. M. da Cruz^{3,4}**

*¹Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica Toxicológica, ²Departamento
de Análises Clínicas e Toxicológicas, ³Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Bioquímica Toxicológica, UFSM); ⁴Centro de Ciências da Saúde,
Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS,
Brazil.*

Corresponding author:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Universidade Federal de Santa Maria - Departamento de Química, Prédio 18

Av. Roraima 1000, Camobi-Santa Maria-RS, Brazil.

ZIP CODE 97.105-000

Telephone (Fax): 55-55-32208978

E-mail: imbacruz@hotmail.com.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the possible effect of exhaustive exercise on the activity of blood δ -ALAD, an enzyme sensitive to pro-oxidant situations. The protocol of exercise (treadmill) was divided in rest, sub maximal exercise, maximal exercise, and recovery. Additionally, other oxidative stress (TBARS production and δ -ALA-D activity) and antioxidant biomarkers (catalase activity, -SH and ascorbic acid) were evaluated in human blood. δ -ALA-D activity was increased at maximal exercise when compared with resting. The maximal exercise induced an increase in TBARS production and -SH levels during submaximal exercise, maximal exercise and when compared with resting. Catalase activity also increased during sub maximal exercise and recovery when compared to the rest period. This study suggests that the enzyme δ -ALA-D can be modulate by short-duration exhaustive exercise as observed in some oxidative and antioxidant biomarkers.

Key words- δ -aminolevulinate dehydratase, reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidant defenses systems, exercise.

1 INTRODUCTION

Aerobic exercise of sufficient intensity and duration can result in increased generation of reactive oxygen species and exercise of extreme endurance may cause oxidative stress with a concomitant decreased activity of antioxidant defense systems [1,2]. In contrast, literature data have also indicated that exhaustive aerobic exercise can be associated with increased activity of antioxidant defense systems [3,4].

δ -Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D), an enzyme of the heme biosynthesis pathway, has been suggested as a possible marker for oxidative stress because it is highly sensitive to -SH oxidation by pro-oxidant elements [5,6,7]. This enzyme catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of 5-aminolevulinic acid (δ -ALA) to form monopyrrole porphobilinogen (PBG) [9,8]. In subsequent steps, PBG is assembled into tetrapyrrole molecules, which constitute the prosthetic groups of physiologically relevant proteins such as hemoglobin, cytochromes and catalase. Furthermore, enzyme inhibition can lead to ALA accumulation in the blood, which in turn can intensify oxidative stress by generating carbon-centered reactive species or by releasing iron from proteins such as ferritin [10]. In line with this, the enzyme activity is decreased in several diseases associated with oxidative stress, including cancer [7] and chronic renal failure and hemodialysis (CRF) [11,12,13].

Data in the literature indicate that δ -ALAD inhibition can impair heme biosynthesis, and the accumulation of its substrate, aminolevulinic acid (ALA), can produce pro-oxidant effects [14] under physiologically relevant conditions [15]. Based on these results, we postulated that δ -ALAD inhibition could be associated with chronic and acute oxidative stress. However, evidence of a possible correlation between δ -ALA-D and oxidative stress under pathological conditions (for example,

metal intoxication, hemodialysis, cancer, diabetes and hypothyroidism) [16] is indirect because there are several systemic metabolic effects associated with these diseases that could confound data interpretation.

Previously we have investigated the effect of chronic exhaustive exercise on oxidative stress parameters and on the activity of sulfhydryl-containing enzymes (δ -ALA-D, succinate dehydrogenase and lactate dehydrogenase -LDH) in mice. The results indicated that an association between exhaustive exercise and dietary selenium deficiency causes inhibition of δ -ALA-D and succinate dehydrogenase [17], indicating that chronic oxidative stress could oxidize δ -ALA-D and other redox sensitive enzymes.

The main question in the present study is related to oxidative stress exposure: could acute exhaustive exercise change δ -ALA-D activity, as observed earlier in mice submitted to chronic exhaustive exercise? In order to elucidate this question, we studied here the possible modulation of δ -ALA-D in human runners submitted to short-duration acute exercise as well as TBARS, enzymatic defense system (catalase activity) and non-enzymatic defense systems (-SH and ascorbic acid).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Subjects

Ten well-trained, male, long distance runners aged 31.5 ± 9.1 yr (mean \pm SD) were recruited for the study. Physical training and maximal performance characteristics of the group are shown in Table 1 and 2. The protocol for this study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (n^o: 0023.0.243.000-04) situated in Santa Maria City, Rio Grande do Sul, Brazil. All subjects signed written informed consent forms before participating in the study.

2.2 Exercise test

The test was performed using a professional treadmill (Inbramed[®]) with a 1% inclination. The test consisted of 5-min stages, with a beginning speed of 5.4 km/h and subsequent increments of 1.8 km/h at each stage until exhaustion. Exhaustion was considered reached for all runners when heart rate was maximal during the test and based on the rating of perceived exertion as described by Larsen et al., 2002 [18]. Heart rate (HR) was measured using a Polar S810 heart rate monitor (Polar) and was monitored continuously during the test. When the test was completed, the subjects assessed their effort level using Borg's Rating of Perceived Exertion (RPE) scale of 6-20 [19].

2.3 Study design

The runner subjects were free from illness symptoms and went to the laboratory in the morning of the scheduled testing day after a light breakfast and having refrained from exercise for the previous 12 h. Diet and fluid consumption were not monitored during this period of absence from the laboratory. The consumption of water *ad libitum* was allowed just after test was finished. The tests were: 1) at rest, 2) at sub maximal exercise (13-point Borg scale), 3) immediately after exhaustive exercise, and 4) after 10 min of recovery. Subjects were allowed a maximum of 5 min to warm up on the treadmill at a self-selected speed slower than that set for completion of the exercise protocol.

Before the exercise test, a catheter was inserted into a superficial vein in the forearm of the subject to collect blood samples using standard venipuncture techniques. At sub maximal exercise and immediately after exhaustive exercise,

blood was drawn from the catheter without the subject stopping completely his run on the treadmill. Time of blood collection was less than one minute and the runner could then return to the treadmill. In the sub maximal phase the treadmill was kept at the same speed stage before the procedure. After exhaustive exercise treadmill, the speed was decreased as previously described. Four 7-ml blood samples were collected: venous blood was collected into a Vacutainer tube containing anticoagulant (heparin). Blood was centrifuged at 3000 rpm, and serum was separated from red blood cells and stored frozen at -70°C until biochemical analysis.

2.4 Determination of blood oxidative and antioxidant biomarkers

Blood δ -ALA-D activity was assayed according to the method of Berlin and Schaller, 1974 [20]. The enzyme activity was measured by determining the amount of porphobilinogen formed at 37°C . The reaction was started by adding substrate (δ -ALA) and followed by incubation for 90 min at 37°C . The reaction product (porphobilinogen) was determined using modified Ehrlich's reagent with absorbance read at 555 nm. Four additional oxidative and antioxidant biomarkers were determined by biochemical methods. Catalase (CAT) activity was measured by the method of Aebi, 1984 [21]. Packed erythrocytes were lysed by adding one hundred volume of distilled water, and 20 μl of this hemolysate was then added to a cuvette where the reaction was started by the addition of 100 μl of freshly prepared 300 mM H_2O_2 in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0; total volume of incubation: 1 ml). The rate of H_2O_2 decomposition was measured spectrophotometrically at 240 nm for 120 s. Catalase activity was expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{ml erythrocytes}/\text{min}$. Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al., 2001 [22]. Plasma samples were precipitated with 1 volume of a cold 10% trichloroacetic acid

solution followed by centrifugation. An aliquot of 300 μ l of the supernatants was mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg/ml), CuSO_4 (0.075 mg/ml) and 13.3% trichloroacetic acid (final volume: 1 ml) and the mixture incubated for 3 h at 37° C. Next, 1 ml of 65 % (v/v) H_2SO_4 was added to the half. Plasma ascorbic acid content was calculated using a standard curve (1.5 – 4.5 μ mol/l ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid) and expressed as μ mol/ml. TBARS levels were determined in erythrocytes by the method of Ohkawa et al., 1979 [23], in which malondialdehyde (MDA), an end-product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. In brief, samples were incubated at 100 °C for 60 min in acid medium containing 1% phosphoric acid buffer. The reaction product was determined at 532 nm using 1,1,3,3- tetramethoxypropane as standard, and plasma MDA results were expressed as nmol/ml. Thiol groups (-SH) were determined as described by Ellman, 1959 [24]. Plasma was obtained after centrifugation of heparinized whole blood. The colorimetric assay (using DTNB) was carried out in 0.3M phosphate buffer, pH 7.0. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the level of thiol groups in the samples.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc; Tulsa, OK) program. Significance was set at $p < 0.05$. Descriptive statistics (mean \pm SD) were used to summarize the baseline group characteristics. Concentrations of the biochemical variables were normally distributed. Therefore, to compare the stages of the tests, an analysis of variance with repeated measures (ANOVA/MANOVA) was performed. Additional statistical tests correlated the

biochemical values in the same stage (resting, sub maximal and maximal exercise, and recovery) using the parametric Pearson correlation test.

3 RESULTS

Participants' physical characteristics and performance measures are displayed in Tables 1 and 2, respectively. As it can be seen the values observed were the expected ones in trained subjects.

Oxidant and anti-oxidant biomarkers also showed differential modulation during the exercise period (Figure 1). Erythrocytes TBARS levels increased significantly during exercise, when compared to rest. In fact, at submaximal exercise ($p=0.02$), maximal exercise ($p=0.03$) and recovery ($p=0.04$) the levels of TBARS were higher than at rest (Figure 1A). Similarly, a significant increase in the thiol groups level occurred in submaximal exercise ($p=0.04$), maximal exercise ($p=0.02$) and recovery ($p=0.01$) when compared with rest (Figure 1B). Catalase levels increased significantly in the submaximal and recovery period when compared with rest (Figure 1C). Ascorbic acid levels did not change during (submaximal and maximal exercise) or after exercise, when compared with rest values (Figure 1D).

No significant changes in δ -ALA-D activity determined without DTT were detected. However, in the presence of DTT, a significant increase in enzyme activity was observed during maximal exercise and during the recovery period when compared with rest (Figure 2 A).

A positive correlation occurred between δ -ALA-D activity (measured in the presence of DTT) with -SH levels during maximal exercise and in recovery period (Figure 3). Negative correlations between heart rate and ascorbic acid occurred after maximal exercise (Figure 3).

To analyze the of oxidant and antioxidant changes during the physical effort test all values in the submaximal and maximal stages and during recovery were compared from percentage changes in relation of rest values. As it can be seen in Figure 4 the δ -ALA-D activity/-SH levels with DTT present significant changes during physical effort as well as occurred with TBARS, thiol and catalase biomarkers.

4 DISCUSSION

We described here the occurrence of oxidative biomarkers modification in runners submitted to maximal aerobic exercise as well as on δ -ALA-D levels (when determined in the presence of DTT) in acute extenuate exercise. From these results we can discuss two mainly questions: The first question it is associate to response of oxidative metabolism and the second one involve the response of the δ -ALAD enzyme in acute extenuate exercise.

Many studies have reported that acute aerobic exercise contributes to oxidative stress [3,1,4,25,26,27] as observed here. Therefore in our study we found that catalase activity changed in accordance with data previously published in the literature [28,29] and involved a significant increase in the submaximal and recovery stages, when compared with resting. Similarly, thiol group levels increased in the submaximal and maximal stages, as well as during recovery, when compared with resting. Thiols are strong reducing agents and have negative standard reduction potentials, and therefore, they act as electron donors [30]. The most abundant non-protein thiol in mammalian cells is glutathione,[31,30].

Studies showed a differential effect of moderate and vigorous activity in the GSH levels and suggest a mechanism through which physical activity may influence lung cancer risk [32]. These results are similar to those reporting increased GSH

blood concentrations after a marathon run [33,2] and in highly trained cyclists after 2 h of cycling at 70% VO_2 max [34] and demonstrated in humans during and after submaximal exercise [35]. Such a change is often described during oxidative stress and may reflect the production and release of GSH by organs such as the liver [36]. An inter-organ transport could then be established to help muscles to react against reactive oxygen species [37].

Increased pro-oxidant activity via VO_2 elevation (observed in this study indirectly by heart rate) is considered a mechanism linking acute aerobic exercise and oxidative stress. Malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation by-product, has been the most common parameter studied with respect to exercise. In this study, TBARS levels increased in submaximal exercise, maximal exercise and recovery when compared with resting. Increases in MDA have been demonstrated after exhaustive aerobic exercise and after 30 min of recovery [28]. In a study conducted with trained subjects (cyclists), TBARS level increased after a submaximal exercise test (70% of VO_2 max) [29]. Increases in lipid peroxidation have been observed after exercise of extreme endurance [38] and after aerobic exercise [25,26,29,39].

These previous studies corroborating that the oxidative biomarker modifications observed here are physiological in acute aerobic exercise, and the physic activity protocol used in this investigations can to induce these changes. For this reason the chances described in on δ -ALA-D levels it is interesting and need to be more understood.

In this study, δ -aminolevulinate dehydratase activity displayed a significant increase during maximal exercise when compared to resting. The acute exercise increase the oxygen absorption to supply the energy to muscle tissues. The δ -ALA-D enzyme is a molecule that participate directly to catalyze and synthesis of compound

hemoglobin-associated (heme) (Sassa et al. 1989). Therefore, the stimulation to δ -ALA-D enzyme levels has a biological plausibility.

However is surprisingly to observe that the stimulation to increase the δ -ALA-D levels is intense and acute as the other oxidative biomarkers molecules. Additional studies need to be performed to investigate the δ -ALA-D levels behavior in immune response associated to aerobic acute exercise, in anaerobic exercises and in no-training persons. Association between δ -ALA-D levels and body dysfunction such as chronic renal failure (CRF) has been previously performed. An investigation that analyzed the effect of prolonged hemodialysis (HD) treatment under parameters of the oxidative stress was performed by Valentini et al., (2007) [40]. Malondialdehyde (MDA) levels had positive correlation with time of HD treatment. As blood δ -ALA-D and MDA reactivation index showed increase in HD patients, and it had correlation with the time of treatment the authors suggested that these parameters may be the better biomarkers to evaluate chronic oxidative stress in comparison with other markers analyzed in the study. These studies can us to understand how the possible adaptive role of the δ -ALA-D in metabolism including possible differential response to oxidative stress.

Finally, it is important to ponder some considerations associated with our methodological design. Since the results described here suggest that aerobic acute response induce differential δ -ALA-D response the protocol present some limitations such as: (1) the investigation was performed just in training subjects and this conditions did not permit to amplify the interpretation to other groups such as sedentary or no-training subjects and (2) the study was performed just in males, therefore, we need to realize additional investigation to verify if in female runners

present similar response. In this case, we need to consider a female hormonal cycle and the period blood lost as intervenient variables.

In conclusion, the results described here suggest that δ -ALAD was modulated in a way similar to that observed for other biomarkers of oxidative stress. Complementary investigations analyzing the functional role of δ -ALAD activity need to be performed. Additionally, the results suggest that during the test stages the stimulation of antioxidant defense systems (observed by the increase in thiol group levels) were not sufficient to prevent lipid peroxidation even in trained individuals.

Declaration of interest:

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

5 REFERENCES

- [1] A. Mastaloudis, S.W. Leonard, M.G. Traber, Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise, *Free Radic Biol Med.* 31 (2001) 911-22.
- [2] G. Machefer, C. Groussard, F. Rannou-Bekono, et al., Extreme running competition decreased blood antioxidant defenses capacity, *J Am Col Nutr.* 23 (2004) 358-4.
- [3] H.M. Alessio, A.E. Hagerman, B.K. Fulkerson, et al., Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise, *Med Sci Sports Exerc.* 32 (2000) 1576-1.
- [4] A. Aguiló, P. Tauler, M.P. Guix, G. Villa, et al., Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists, *J Nutr Biochem.* 14 (2003) 319-5.

- [5] V. Folmer, J.C.M. Soares, D. Gabriel, J.B.T Rocha, A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*), *J Nutr.* 135 (2003) 2165-70.
- [6] V. Folmer, F.W. Santos, L. Savegnago, V.B. Brito, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on delta-aminolevulinic acid dehydratase in mice, *Toxicol Lett.* 153 (2004) 333-41.
- [7] T.L. Gonçalves, F. Erthal, C.L.D. Corte, L.G. Müller, C.M. Piovezan, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem.* 38 (2005) 1071-75.
- [8] S. Sassa, H. Fujita, A. Kappas, Genetic and chemical influences on heme biosynthesis, In: *Highlights of modern biochemistry 1* (1989) 329-338.
- [9] E.K. Jaffe, S. Ali, L.W. Mitchell, K.M. Taylor, M. Volin, G.D. Markham, Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase, *Biochemistry* 34 (1995) 244-1.
- [10] M.E.M. Rocha, F. Dutra, B. Bandy, R.L. Baldini, S.L. Gomes, A. Faljoni-Alario, et al., Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid, *Arch Biochem Biophys.* 409 (2003) 349-65.
- [11] V.B. Djordjevic, S. Strahinjic, D. Karacevic, P. Mijkovic, D. Pavlovic, V. Stefanovic, Erythrocytes Delta-aminolevulinic acid dehydratase measurements in Balkan endemic nephropathy, *Kidney Int Suppl.* 34 (1991) 93-6.
- [12] A. Fontanellas, J.A. Herrero, F. Coronel, J.L. Santos, M.J. Moran, A. Barrientos, et al., Effects of recombinant human erythropoietin on porphyrin metabolism in uremic patients on hemodialysis, *J Am Soc Nephrol.* 07 (1996) 774-9.

- [13] C.A. Costa, G.C. Trivelato, A.M.P. Pinto, E.J.H. Bechara, Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers, *Clin Chem.* 43 (1997) 1196–02.
- [14] J. Valentini, G.C. Schmitt, D. Grotto, L.D. Santa Maria, S.P. Boeira, S.J. Piva, et al., Human erythrocytes δ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients, *Clin Biochem.* 40 (2007) 591-4.
- [15] B. Pereira, R. Curi, E. Kokubun, E.J. Bechara, 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats, *J Appl. Physiol.* 72 (1992) 226-230.
- [16] J.B. Souza, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, V.C. Borges, R.R. Kaizer, V.M. Morsch, V.L. Dressler, A.F. Martins, E.M.M. Flores, M.R.C. Schetinger, Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism, *Clin Biochem.* 40 (2007) 321-325.
- [17] J.C.M. Soares, V. Folmer, J.B.T. Rocha, Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice, *Nutrition.* 19 (2003) 627-632.
- [18] G.E. Larsen, J.D. George, J.L. Alexander, G.W. Fellingham, S.G. Aldana, A.C. Parcell. Prediction of maximum oxygen consumption from walking, jogging, or running. *Res Q Exerc Sport.* 73 (2002) 66-72.
- [19] G. Borg, Perceived exertion as an indicator of somatic stress. *Scand J Rehabil. Med.* 2 (1970) 92-8.
- [20] A. Berlin, K.H. Schaller, European Standardized Method for the determination of d-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood, *Z Klin Chem Klin Biochem.* (1974) 389-390.
- [21] H. Aebi, Catalase in vitro, *Meth Enzym.* 105 (1984) 121-6.

- [22] M.C. Jaques- Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, E.M.M. Flores, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice, *Pharmacol Toxicol.* 44 (2001) 119-25.
- [23] H. Ohkawa, H. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analyt Biochem.* 95 (1979) 351-8.
- [24] G.L. Ellman, Tissue sulphhydryl groups. *Archiv Biochem Bioph.* (1959) 82-70.
- [25] N. Ilhan, A. Kamanli, R. Ozmerdivenli, N. Ilhan, Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration, *Arch Med Res.* 35 (2004) 294-0.
- [26] P. Tauler, A. Aguiló, I. Gimeno, P. Guix, A.J. Tur, A. Pons, Different effects of exercise tests on the antioxidant enzyme activities in lymphocytes and neutrophils, *J Nutr Biochem.* 15 (2004) 479-4.
- [27] Y. Michailidis, A.Z. Jamurtas, M.G. Nikolaidis, I.G. Fatouros, Y. Koutedakis, I. Papassotiriou and Kouretas, Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress, *Med Sci Sports Exerc.* 39 (2007) 1107-13.
- [28] J. Vider, J. Lehtmaa, T. Kullisaar, T. Vihalemm, K. Zilmer, C. Kairane, A. Landõr, T. Karu, M. Zilmer, Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress, *Pathophysiology* 7 (2001) 263-70.
- [29] J.M. Morillas-Ruiz, J.A.V. García, F.J. López, M.L. Vidal-Guevara, P. Zafrilla, Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress, *Clin Nutr.* 25 (2006) 444-53.
- [30] C.K. Sen, L. Packer, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr.* 72 (2000) 653S-669S.
- [31] J. Vina, J. Sastre, M. Asensi, et al., Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise, *Meth Enz.* 251 (1995) 237-3.

- [32] A.G. Rundle, M. Orjuela, L. Mooney, D. Tang, M. Kim, A. Calcagnotto, J.P. Richie Jr, F. Perera, Preliminary studies on the effect of moderate physical activity on blood levels of glutathione. *Biomarkers* 10 (2005) 390-400.
- [33] E. Hessel, A. Haberland, M. Muller, D. Lerche, I. Schimke, Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running, *Clin Chim Acta* 298 (2000) 145-6.
- [34] L.L. Ji, A. Katz, R. Fu, M. Griffiths, M. Spencer, Blood glutathione status during exercise: effect of carbohydrate supplementation, *J Appl Physiol.* 74 (1993) 788-2.
- [35] K. Gohill, C. Viguie, W.C. Stanley, et al., Blood glutathione oxidation during human exercise, *J Appl Physiol.* 64 (1988) 115-9.
- [36] S.M. Deneke, B. Fanburg, Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol.* 257 (1989) L163-L173.
- [37] L.L. Ji, R. Fu, E.W. Mitchell, Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity, *J Appl Physiol.* 73 (1992) 1854-9.
- [38] K. Tsai, T.G. Hsu, K.M. Hsu, H. Cheng, T.Y. Liu, C.F. Hsu, C.W. Kong, Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise, *Free Radic Biol Med.* 31 (2001)1465-2.
- [39] K.J.A Davies, A.T. Quintanilha, G.A. Brooks, L. Packer, Free radicals and tissue damage produced by exercise, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 (1982) 1198–1205.
- [40] J. Valentini, G.C. Schmitt, D. Grotto, L.D. Santa Maria, S.P. Boeira, S.J. Piva, et al. Human erithrocytes δ -aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 40 (2007) 591-4.

Table 1- Physical characteristics of the study participants

Characteristics	Means \pm SEM
Height (cm)	174.9 \pm 8.0
Weight (kg)	70.4 \pm 10.1
Percentage body fat (%)	8.4 \pm 1.2

Table 2- Exercise performance measures (n=10)

	<i>Velocity (Km/h)</i>	<i>**HR (bpm)</i>	<i>*RPE</i>
Rest	-	64.50 ± 7.96	-
Submaximal	12.10 ± 0.1	168.30 ± 6.36	13.1 ± 0.3
Maximal	16.10 ± 0.5	191.80 ± 8.89	18.8 ± 1.3
Recovery	-	104.90 ± 12.5	-

* Rating of perceived exertion

** Heart rate

Figura 1

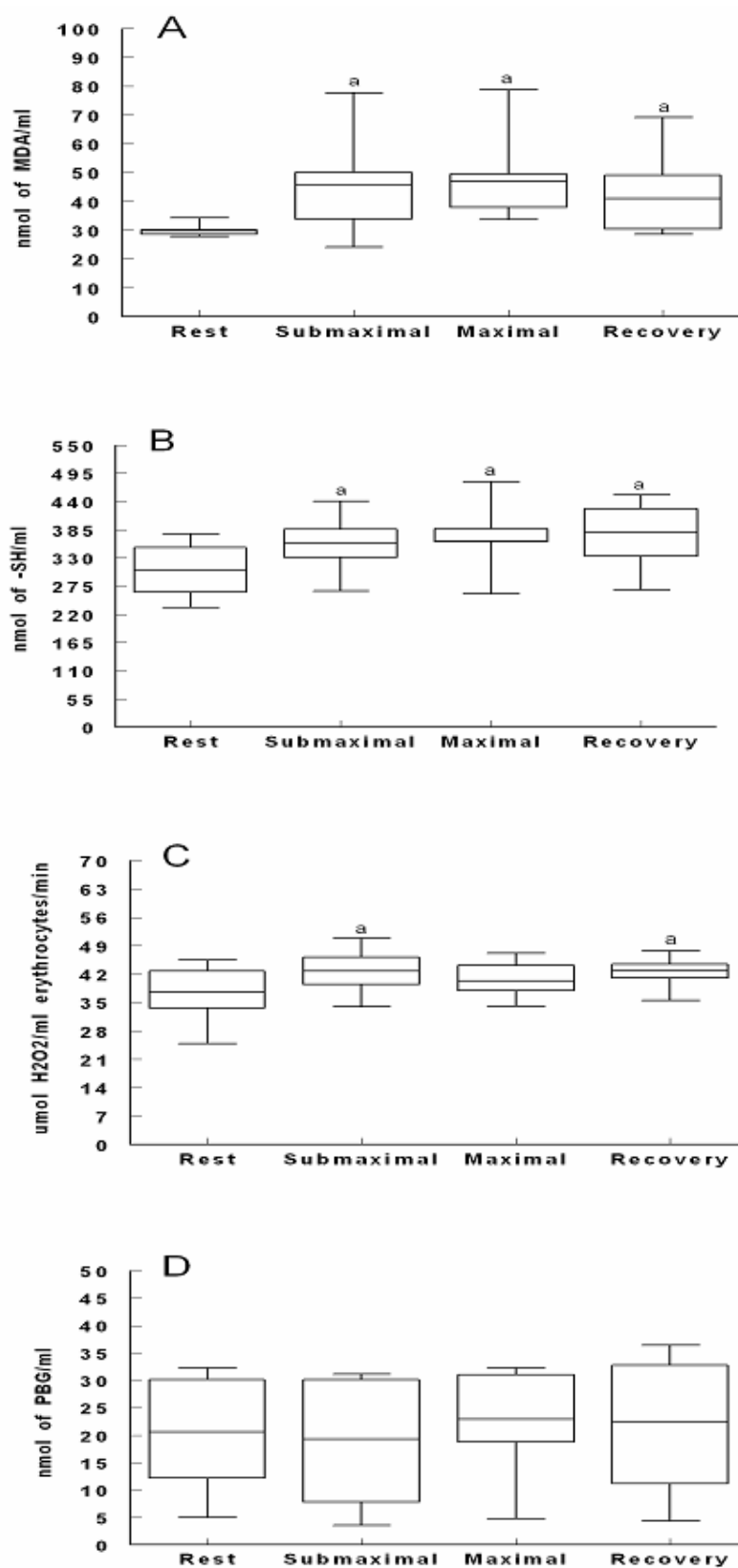


Figura 2

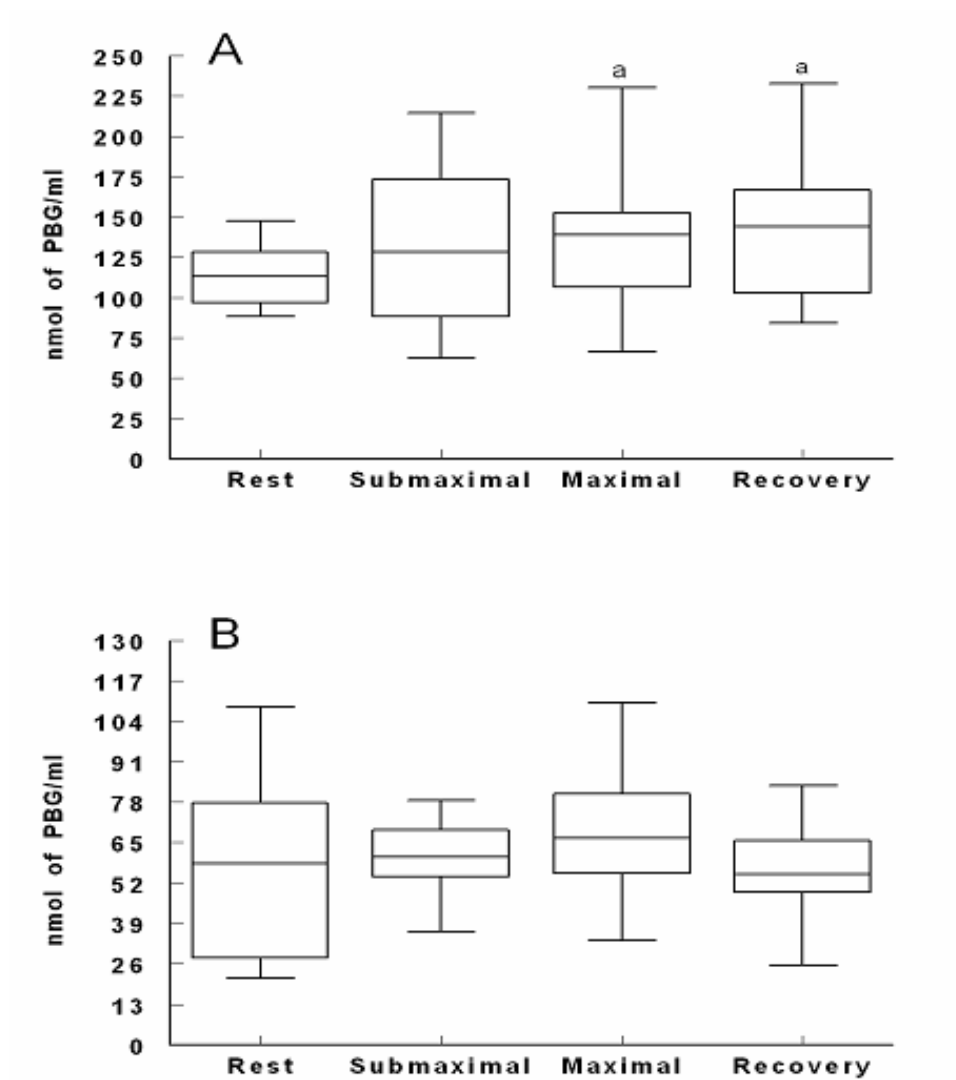


Figura 3

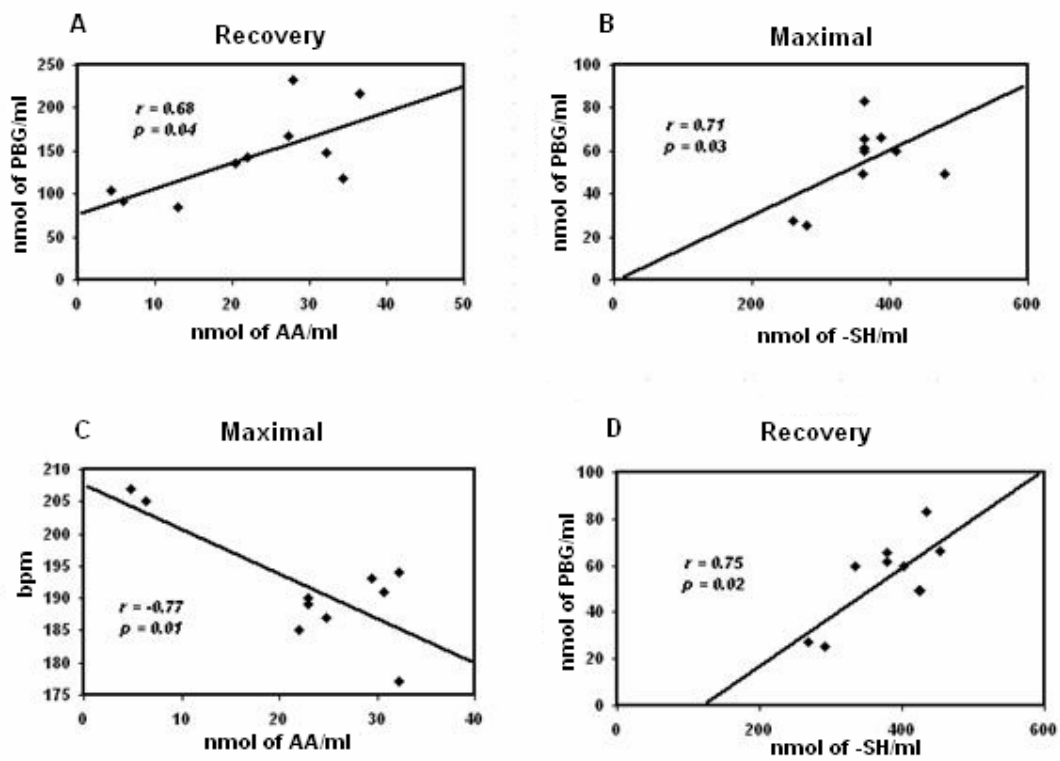


Figura 4

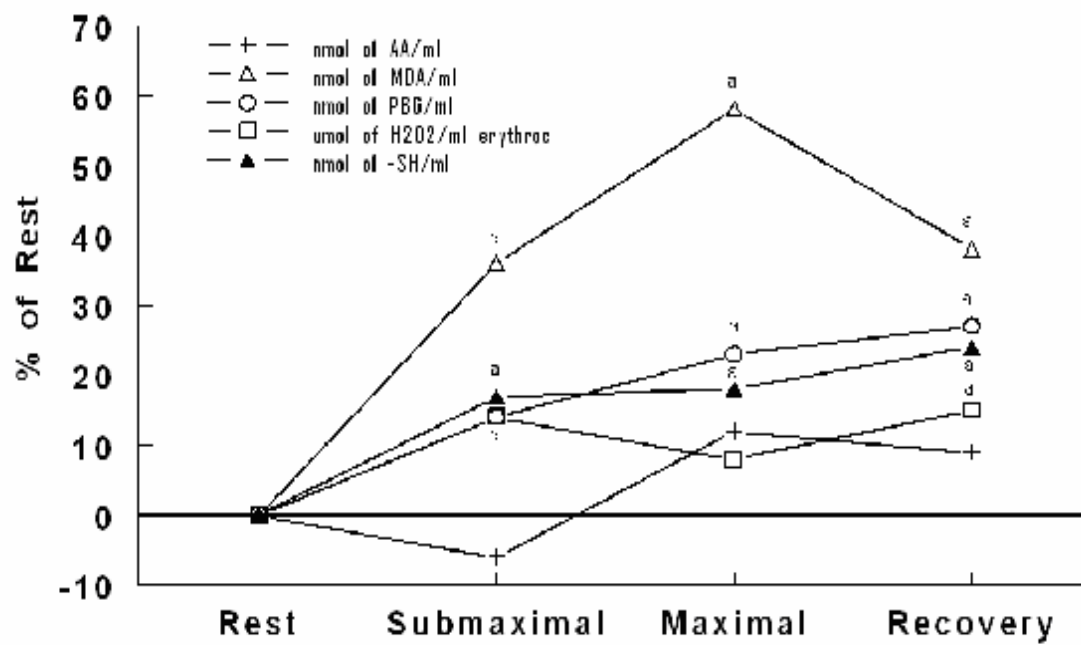


FIGURE LEGENDS

Figure 1- Oxidative stress (TBARS production [A]) and antioxidant defense systems (-SH levels [B], catalase activity [C] and ascorbic acid [D] levels) biomarkers at rest, submaximal and maximal stages and recovery during the physical effort test. The values are shown individually. ^a Significantly different from rest $p < 0.05$.

Figure 2- Delta-ALA-D activity with DTT (A) and without DTT (B) at rest, submaximal, maximal and recovery stages during the physical effort test. ^a Significantly different from rest $p < 0.05$ (A).

Figure 3- Positive correlation during recovery in the δ -ALA-D activity with ascorbic acid (A) and δ -ALA-D activity with -SH levels (D). After maximal exercise, positive correlation between δ -ALA-D activity and -SH (B) and negative correlation's between heart rate and ascorbic acid levels (C).

Figure 4- Relative changes (as percent of the rest period) in the level of biomarkers of oxidative stress in healthy volunteers (AA, +; MDA, Δ ; ALA-D, \circ ; Catalase, \square ; and -SH, \blacktriangle). ^a Significantly different from rest $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

Nesta investigação a modificação de biomarcadores do estresse oxidativo presentes no sangue de corredores de longa distância submetidos a exercício agudo de curta duração mostrou que além de mudanças nos níveis de TBARS, grupos tióis e catalase ocorreram também modificações nos níveis da enzima δ -ALA-D (quando determinada na presença de DTT).

A partir dos resultados obtidos duas principais questões serão aqui discutidas. A primeira diz respeito a resposta do metabolismo oxidativo (pró e antioxidante) em relação ao exercício agudo de curta duração. A segunda diz respeito a modulação da enzima δ -ALAD na resposta a tal exercício.

Os resultados aqui descritos em relação a resposta oxidativa durante exercício agudo de curta duração corroboram resultados em investigações prévias que também estudaram o efeito da atividade física no metabolismo pró e antioxidante. Muitos estudos têm demonstrado que o exercício aeróbico agudo contribui para o estresse oxidativo (ALESSIO et al., 2000; MASTALLOUDIS et al., 2001; AGUILÓ et al., 2003; ILHAN et al., 2004; TAULER et al., 2004; MICHAILIDIS et al., 2007). Estudos prévios demonstraram resultados similares na atividade da catalase (VIDER et al., 2001; MORILLAS-RUIZ et al., 2006) onde foram observados aumentos significativos no exercício submáximo e na recuperação, quando comparados ao repouso. Comparado ao repouso também, foram observados aumento significativo nos grupos tióis nos períodos de exercício submáximo e máximo. Os tióis são fortes agentes redutores e tem potencial de redução negativo, atuando assim como doadores de elétrons (SEN et al., 2000).

A glutathiona é o tiol não protéico mais abundante em mamíferos (VINA et al., 1995; SEN et al., 2000). Deste modo, uma resposta ao estresse causado pelo exercício intenso pode ser via modificação nos níveis de tióis. Estes resultados, demonstrando o aumento da concentração sanguínea de GSH aqui descritos são, portanto, similares aos encontrados em atletas após a realização de maratona (HESSEL et al., 2000; MACHEFER et al., 2004), em ciclistas altamente treinados após 2 horas pedalando a 70% do VO_2 max (JI et al., 1993) e em indivíduos após a realização de exercício submáximo (GOHILL et al., 1988).

Acredita-se que tal mudança ocorra em situações de estresse oxidativo podendo ser reflexo da produção e liberação de GSH por órgãos como o fígado (DENEKE et al., 1989). Um transporte destas moléculas entre órgãos poderia ser desencadeado pelo exercício agudo como uma forma de aumentar a proteção do tecido muscular ao aumento das espécies reativas de oxigênio (JI et al., 1992) causado pelo aumento do gasto energético que induz uma maior necessidade de oxigênio.

Apesar da ocorrência de aumento nos níveis de tióis, os níveis da vitamina C que é uma molécula antioxidante não enzimática obtida a partir da dieta não variaram durante o protocolo de exercício realizado nesse estudo. Tais resultados também corroboram resultados obtidos em outros estudos em humanos (CHEVION et al., 2003; BLOOMER et al., 2005). Entretanto, foi observada correlação negativa entre esta molécula antioxidante e a frequência cardíaca logo após o exercício máximo. A causa desta associação não está bem esclarecida e precisaria ser investigada a partir de estudos complementares a este trabalho.

O aumento no consumo de oxigênio VO_2 (observado indiretamente em nosso estudo pelos valores de frequência cardíaca) está associado ao aumento na atividade pró-oxidante e é considerado um mecanismo no qual o exercício aeróbico pode causar estresse oxidativo. O malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica tem sido utilizado como principal parâmetro nos estudos relacionados ao exercício. Neste estudo, os níveis de TBARS aumentaram no exercício submáximo, máximo e na recuperação quando comparados aos níveis observados no repouso. Este tipo de resultado também já foi previamente descrito na literatura a partir de outros protocolos de exercícios. Assim, o aumento nos níveis de MDA foi observado após exercício exaustivo e depois de 30 min de recuperação (VIDER et al., 2001). Em um estudo realizado com ciclistas treinados, o nível de TBARS aumentou após exercício submáximo (70% of VO_2 max) (MORILLAS-RUIZ et al., 2006). Aumento na peroxidação lipídica também foi observado após exercício de extrema resistência (TSAI et al., 2001) e após outros protocolos de exercícios aeróbicos (ILHAN et al., 2004; TAULER et al., 2004; MORILLAS-RUIZ et al., 2006).

Considerando o conjunto dos resultados obtidos e anteriormente publicados pode-se inferir que a resposta do metabolismo oxidativo ao exercício agudo de curta duração também é aguda. Uma vez que o aumento dos níveis de moléculas pró-oxidantes e antioxidantes ocorre, nestas condições este protocolo pode ser

considerado satisfatório para o estudo de agentes que modulem o estresse oxidativo como suplementos alimentares antioxidantes. Além de modificações dietéticas o protocolo permite que variações individuais (genéticas) presentes nos atletas sejam também futuramente investigadas.

Neste estudo além da resposta de biomarcadores do estresse oxidativo ao exercício agudo de curta duração foi investigada se a atividade da enzima δ -ALA-D também poderia ser afetada. Os resultados mostraram que tal enzima apresentou um aumento significativo imediatamente após o exercício máximo quando comparada a sua atividade durante o repouso. Este aumento também foi observado nos níveis de grupos tióis durante o exercício, demonstrando um possível mecanismo compensatório contra o estresse oxidativo.

Como o exercício agudo demanda uma quantidade aumentada de oxigênio para suprir as necessidades energéticas dos tecidos musculares que estão sendo intensamente trabalhados e a enzima δ -ALA-D é uma molécula que participa diretamente da catálise e síntese de compostos associados a hemoglobina (heme) (SASSA et al. 1989) o estímulo a produção desta molécula é biologicamente plausível. O que surpreende é que tal estímulo ocorra de modo intenso e agudo, o que precisa ser mais bem investigado em estudos complementares.

Tal resultado aponta para a necessidade de estudos complementares que busquem elucidar questões cujas respostas ainda estão em aberto. Entre estas questões inclui-se: (1) como se comporta a modulação da enzima δ -ALA-D até 24 ou 48 horas após o exercício, considerando que neste período para além do estresse oxidativo causado pelo aumento no consumo de oxigênio existem outras respostas fisiológicas que agem no organismo como é o caso de processos inflamatórios musculares? (2) uma vez que o estudo foi realizado em atletas e que estes já possuem uma adaptação fisiológica a exercício a modificação nos níveis de modulação da enzima δ -ALA-D também acontece em indivíduos não treinados? Qual é a importância fisio-metabólica desta condição? (3) a resposta dos níveis da enzima δ -ALA-D ao exercício agudo de curta duração seria modificada ao longo de um programa de treinamento aeróbio? (4) e por fim, seria esta enzima um novo marcador do estresse oxidativo? Apesar de serem questões em aberto é importante salientar que já existem estudos que sugerem que tal enzima possui sensibilidade a situações associadas com o estresse oxidativo (FOLMER et al., 2003; 2004). Recentemente, foram obtidas evidências de que o acúmulo do ácido 5-

aminolevulínico (ALA) pode ter um efeito pró-oxidante (BECHARA et al. 1993). Portanto, a inibição da δ -aminolevulinato desidratase poderia ter efeitos nocivos para as células tanto por haver prejuízo na síntese do grupo heme quanto pelo possível comprometimento do metabolismo aeróbico. E o contrário seria verdadeiro? O estímulo na produção desta enzima seria potencialmente um mecanismo antioxidante em resposta ao estresse causado pelo exercício agudo de curta duração? Acredita-se que estas são questões que merecem atenção e que devem ser consideradas e investigadas em trabalhos futuros.

Apesar dos resultados aqui descritos sugerirem que a resposta ao exercício agudo de curta duração afete o metabolismo pró e antioxidante do organismo incluindo os níveis da enzima δ -ALA-D, é importante que sejam comentadas as suas limitações. As limitações metodológicas deste estudo incluem: (1) estudo realizado apenas em indivíduos previamente treinados, o que não permite ampliar a sugestão de que os níveis de enzima δ -ALA-D em resposta ao exercício agudo de curta duração ocorra em outras circunstâncias (por exemplo em indivíduos sedentários); (2) o estudo também é limitado apenas ao gênero masculino. Considerando o ciclo hormonal das mulheres e o seu metabolismo mensal que inclui perda e estímulo na síntese de hemoglobina provocada pelo sangramento menstrual a resposta desta enzima seria similar a dos homens? Por ora não é possível afirmar; (3) os níveis observados da enzima seriam um artefato metabólico produzido pelas condições de coleta de sangue ao longo do exercício que tende a provocar hemólise. Apesar desta condição não poder ser totalmente descartada os resultados obtidos na análise das outras moléculas pró e antioxidantes que estavam dentro de parâmetros e variações normais tornam esta hipótese muito pouco provável. Entretanto, partindo do pressuposto que resultados científicos precisam ser reproduzíveis, apenas após a ocorrência de investigações similares que considerem a variação da enzima δ -ALA-D poderá ser realmente descartada a questão se a resposta diferencial desta enzima é causal ou não causal em relação ao estresse oxidativo provocado pelo exercício agudo de curta duração.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo que investigou a resposta do metabolismo oxidativo em atletas submetidos a exercício agudo de curta duração sugerem que a enzima δ -ALA-D é modulada de forma similar ao que ocorre a outros biomarcadores de estresse oxidativo como o TBARS, catalase e tióis. Investigações complementares analisando a papel funcional da atividade da δ -ALA-D necessitam ser realizadas.

Ainda, os resultados deste estudo sugerem que durante o protocolo de exercício a estimulação do sistema de defesa antioxidante (observada pelo aumento nos níveis de grupos tióis) não foi suficiente para prevenir a peroxidação lipídica mesmo nos indivíduos treinados.

7 REFERÊNCIAS

AGUILÓ, A.; TAULER, P.; GUIX, M. P.; VILLA, G.; et al: Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J. Nutr. Biochem.* 14:319-325, 2003.

ALESSIO, H. M; GOLDFARB, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J. Appl. Physiol* 64:1333-1336, 1988.

ALESSIO, H. M.; HAGERMAN, A. E.; FULKERSON, B. K.; et al: Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32:1576-1581, 2000.

AMAZARRY, M. T. R. Efeito de metais pesados em plantas: delta-aminolevulinato desidratase em *Ricinus communis*. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Ecologia, UFRGS, 1986. Dissertação de Mestrado.

ASTRÄND, P. O; RODAHL, K. Textbook of work physiology: physiological basis of exercise. New York: McGraw-Hill, 1986.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M. C.; BRAGA, A. L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149:243-253, 1998.

BARCLAY, J. K. & HANSEL, M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69:279-284, 1991.

BARNARD, G. F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L. H.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. *J. Biol. Chem.* 252:8965-8974, 1977.

BATTISRUZZI, G.; PETRUCCI, R.; SILVAGNI, L.; URBANI, F. R.; CAIOLA, S. Delta-aminolevulinic dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet.* 46:223-229, 1981.

BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim. Nova.* 16:385-92, 1993.

BERLIN, A. & SCHALLER, K. H. European standardized method for the determination of d-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 389-390, 1974.

BETTLE, A. M. DEL, C.; & STELLA, A. M. Delta-aminolevulinate dehydratase: its mechanism of action. *Int. J. Biochem.* 9:861-864, 1978.

BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 255:2030-2035, 1980.

BISHOP, T. R.; HODES, Z. I.; FRELIN, L. P.; BOYER, S. H. Cloning and sequence of mouse erythroid delta-aminolevulinate dehydratase cDNA. *Nuc. Acid. Res.* 17:1775, 1989.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H.; MCKENZIE, M. J. Oxidative stress response to aerobic exercise: Comparison of antioxidant supplements. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1098-1105, 2005.

BOESE, Q. F.; SPANO, A. J.; LI, J.; TIMKO, M. P. δ -aminolevulinate acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. *J. Biol. Chem.* 266:17060-17066, 1991.

BONSIGNORE, D. L. 'attività ALA-deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. *Med. Lav.* 57:647-654, 1966.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. Oxygen, gene expression and cellular function. Marcel Decker: New York, 105:01-25, 1997

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A. O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156:435-444, 1976.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 34:707-717, 1973.

CARMELI, E.; LAVIAM, G.; REZNICK, A. Z. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z, editor. Free radicals in exercise and aging. Champaign:Human Kinetics, 73-115, 2000.

CASTELFRANCO, P. A. & BATLE, A. M. Aminolevulinate dehidratasa: propiedades y mecanismo de acción. N. Arch. Fac. Med. 45:61-70, 1983.

CHEH, A. & NEILANDS, J. B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinate dehidratasa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55:1060-1063, 1973.

CHEH, A. & NEILANDS, J. L. The delta-aminolevulinate dehidratasa: molecular and environmental properties. Struct. Bonding. 29:123-169, 1976.

CHEVION, S.; MORAN, D. S.; HELED, Y.; SHANI, Y.; REGEV, G.; ABBOU, B.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E. R.; EPSTEIN, Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100:5119-5123, 2003.

CHINARRO, S.; STELLA, A. M.; BERGES, L.; SALAMANCA, R. E.; BATTLE, A. M.; DEL, C. Aminolevulinato dehidratasa propiedades y mecanismo de acción. N. Arch. Fac. Med. 41:61-70, 1983.

DAVIES, K. J. A. Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects. Oxford: Pergamon. 910, 1991.

DAVIES, K. J. A.; HOCHSTEIN, P. Ubisemiquinone radicals in liver: implications for a mitochondrial Q cycle in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:1292-1299, 1982.

DAVIES, K. J. A.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:1198-1205, 1982

DENT, A. J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; HASNAIN, S. S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinate dehidratasa distinguished by extended X-ray absorption fine structure. Biochemistry. 29:7822-7828, 1990.

DJORDJEVIC, V. B.; STRAHINJIC, S.; KARACEVIC, D.; MIJKOVIC, P.; PAVLOVIC, D.; STEFANOVIC, V. Erythrocytes delta-aminolaevulinate dehydratase measurements in Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* 34:93-6, 1991.

DRESEL, E. I. B. & FALK, J. E. Conversion of delta aminolevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature*, v. 172, p. 1185, 1995.

ECHELARD, Y.; DYMETRYZYN, J.; DROLET, M.; SASARMAN, A. Nucleotide sequence of the hemB gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 214:503-508, 1988.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; PORCIUNCULA, L. O.; MORSCH, V. M.; MARTINS, A. F.; SOUZA, D. O. G. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79:136-143, 1996.

FINELLI, V. N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W. B.; PETERING, H. G. Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60:1418-1424, 1974.

FOLMER, V.; SANTOS, F. W.; SAVEGNAGO, L.; BRITO, V. B.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. High sucrose consumption potentates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on delta-aminolevulinate dehydratase in mice. *Toxicol. Lett.* 153:333-41, 2004.

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; GABRIEL, D.; ROCHA, J. B. T. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J. Nutr.* 135(7):2165-70, 2003

FONTANELLAS, A.; HERRERO, J. A.; CORONEL, F.; SANTOS, J. L.; MORAN, M. J.; BARRIENTOS, A.; et al. Effects of recombinant human erythropoietin on porphyrin metabolism in uremic patients on hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 07:774-9, 1996.

FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxigem toxicity. In: FANH, S. et al., *Advances in neurology*, New York: Raven. 225-226, 1979.

FUJITA, H.; ORII, Y., SAND, S. Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead poisoned rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 678:39-50, 1981.

GABRIEL, D. A inibição da enzima delta-aminolevulinato desidratase por monossacarídeos redutores não é medida pela oxidação de grupos –SH. Santa Maria, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, UFSM, 2004. Dissertação de Mestrado.

GIBBS, P. N. B. & JORDAN, P. M. Identification of lysine at the active site of human delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 236:447-451, 1986.

GIBBS, P. N. B.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 225:573-580, 1985.

GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 61:618-629, 1955.

GOERING, P. L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology.* 14:45-60, 1993.

GONÇALVES, T. L.; ERTHAL, F.; CORTE, C. L. D.; MÜLLER, L. G.; PIOVEZAN, C. M.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin. Biochem.* 38(12):1071-1075, 2005.

GUO, G. G.; GU, M.; ETLINGER, J. D. 24-kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. *J. Biol. Chem.* 269:12399-12402, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, UK: Clarendon Press; 2006.

ILHAN, N.; KAMANLI, A.; OZMERDIVENLI, R.; ILHAN, N. Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch. Med. Res.* 35:294-300, 2004.

JAFFE, E. K.; ALI, S.; MITCHELL, L. W.; TAYLOR, K. M.; VOLIN, M.; MARKHAM, G. D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochem.* 34:244-51, 1995.

JAFFE, E. K.; VOLIN, M.; NYERS, C. B. 5-Chloro[1,4-¹³C]levulinic acid modification of mammalian and bacterial porphobilinogen synthase suggests an active site tow Zn (II). *Biochen.* 33:11554-11562, 1994.

JAQUES- SILVA, M. C.; NOGUEIRA, C. W.; BROCH, L. C.; FLORES, E. M. M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 44:119-125, 2001.

JENKINS, R. R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25(2):210-212, 1993.

JI, L. L.; FU, R.; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 73:1854-1859, 1992

JI, L. L.; KATZ, A.; FU, R.; GRIFFITHS, M.; SPENCER, M. Blood glutathione status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. *J. Appl. Physiol.* 74:788-792, 1993.

JI, LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 87:465-470, 1999.

KEUL, J.; DOLL, E. Oxidative energy supply. In: Jokl, E., ed. *Energy metabolism of human muscle*. Basel: Karger. 52-71, 1972.

KÖNIG, D.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. *Österreichisches Journal für Sportmedizin* 3. 2002.

MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 31:911-922, 2001.

MASTALOUDIS, A.; MORROW, J. D.; HOPKINS, D. W.; DEVARAJ, S.; TRABER, M. G. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1329-1341, 2004.

MICHAILIDIS, Y.; JAMURTAS, A. Z.; NIKOLAIDIS, M. G.; FATOUROS, I. G.; KOUTEDAKIS, Y.; PAPASSOTIRIOU, I. and KOURETAS. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39:1107-1113, 2007.

MITCHELL, L. W. & JAFFE, E. K. Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II). Arch. Biochem. Biophys. 300:169-177. 1993.

MONTERO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; AUGUSTO, O.; BECHARA, E. J. H. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. Arch. Biochem. Biophys. 271:206-216, 1989.

NANDI, D. L. δ -aminolevulinic acid synthase of *Thiodopseudomonas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to enzyme. Z. Naturforsch. 33C:799-800, 1978.

NELSON, D. L., COX. M. M. Lehninger, Principles of Biochemistry, Fourth Edition, 2004.

NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. Biochemistry for the medical science. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.

PACKER, L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. J. Sports Sci. 15:353-363, 1997.

PAPAS, A. M. Other antioxidants, in Papas AM (ed): Antioxidant status, diet, nutrition and health. Boca Raton, FL, CRC Press, 1999.

PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E.; BECHARA, E. J. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats J. Appl. Physiol. 72:226-230, 1992.

PETRUCCI, R.; LEONARDI, A.; BATTISTUZZI, G. The genetic polymorphism of human delta-aminolevulinic acid dehydratase in Italy. Hum. Genet. 60:289-290, 1982.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol Rev 88:1243–1276, 2008.

POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. Med. Sci. Sports Exerc. 31:987–997, 1999.

PYNE, D. B. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Aust. J. Sci. Med. Sport.* 26:49-58, 1994.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcome. *Free Radic. Biol. Med.* 27:69–74, 1999.

REID, M. B. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol. Sci.* 11:114-119, 1996.

ROCHA, J. B. T.; FREITAS, A. J.; MARQUES, M. B.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26:1077-1083, 1993.

ROCHA, M. E. M.; DUTRA, F.; BANDY, B.; BALDINI, R. L.; GOMES, S. L.; FALJONI-ALARIO, A.; et al. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 409(2):349–65, 2003.

RODRIGUES, A. L. S.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 94B:65-69, 1989.

SACHDEV, S.; DAVIES, K.J.A. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise / *Free Radic. Biol. Med.* 44:215–223, 2008.

SASSA, M. E.; VERONE, C. L.; MONTERO, L.; CÁSEPA, E. T. Insulin inhibits delta-aminolevulinic acid synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells. *Exp. Cell. Res.* 244:460-469, 1998.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: *Highlights of modern biochemistry.* 1:329-338, 1989.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; Paces and V. Kostka (Eds.), *Highlights of Modern Biochemistry*, VSP, Utrecht. 1:329-338, 1989.

SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A. A. W.; ECKERSKORN, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from

spinach (*Spinacia oleracea* L) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. Z. Naturforsch. 47C:77-84, 1991.

SHEMIN, D. 5-aminolevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. Phil. Trns. R. Soc. Lond. 273B:109-105, 1976.

SHIBATA, H, & OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. Plant & Cell Physiol. 18:421-429, 1977.

SIES, H. Oxidative stress: Introduction, in Sies H (ed): Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants. San Diego, CA, Academic Press, 1991.

SJÖDIN, B.; WESLING, H.; APPLE, S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med. 10:236-254, 1990.

SOARES, J. C. M.; FOLMER, V.; ROCHA, J. B. T. Influence of Dietary Selenium Supplementation and Exercise on Thiol-Containing Enzymes in Mice. Nutr. 19:627-632, 2003.

SOMMER, R. & BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium. Kinetic, and ¹¹³Cd-nmr-studies. J. Inorg. Biochem. 20:131-145, 1984.

SOUZA, J. B.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W.; BORGES, V. C.; KAIZER, R. R.; MORSCH, V. M.; DRESSLER, V. L.; MARTINS, A. F.; FLORES, É. M. M; SCHETINGER, M. R.C. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. Clin. Biochem. 40:321-325, 2007.

SPENCER, P. & JORDAN. P. M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 300:373-381, 1994.

TAULER, P.; SUREDA, A.; CASES, N.; AGUILÓ, A.; et al: Increased lymphocytes antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. J. Nutr. Biochem. 17:665-671, 2006.

TIGIER, H. A.; BATLLE, A. M. DEL, C.; LOCASCIO, G. A. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties delta-aminolevulinic acid dehydratase. Enzymol. 38:43-56, 1970.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. *Canad. J. Phys. Pharm.* 76:533-538, 1998.

TOMAI, H.; SHIOI, Y.; SASA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. *Plant & Cell Physiol.* 20:435-444, 1979.

TREVOR, C. C.; SANDY, S. H. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33:1732-1738, 2001.

TSAI, K.; HSU, T. G.; HSU, K. M.; CHENG, H.; LIU, T. Y.; HSU, C. F.; KONG, C. W. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 31(11):1465-1472, 2001.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 570:167-178, 1979.

VALENTINI, J.; SCHMITT, G. C.; GROTTA, D.; SANTA MARIA, L. D.; BOEIRA, S. P.; PIVA, S. J.; et al. Human erythrocytes δ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clin. Biochem.* 40:591-4, 2007.

VERGANANO, C.; CARTASEGNA, C.; BONSIGNORE, D. Regolazione allosterica della attivita 'delta-amino-levulinico-deidratasica eritrocitaria. *Nota I. Bioll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 64:692-695, 1968.

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. *Pathophys.* 7:263-270, 2001.

WETMUR, J. G. Influence of the common human delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. *Environ. H. Perspec.* 120:215-219, 1994.

WETMUR, J. G.; BISHOP, D. F.; CANTELMO, C.; DESNICK, R. J. Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7703-7707, 1986.

WLODAWER, A. Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. *Structure.* 3:417, 1995.

WU, W.; SHEMIN, D.; RICHARDS, K. E.; WILLIAMS, R. C. The quaternary structure of delta-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:1767-1770, 1974.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Reviews. 74(1):139-162, 1994.