



Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral

Ricardo A. Pinho^{1,2}, Paulo C.L. Silveira², Mariana Piazza², Talita Tuon², Gabriela A. Slva², Felipe Dal-Pizzol^{1,3} e José C.F. Moreira¹

RESUMO

Estudos têm apontado o exercício físico regular de baixa a moderada intensidade como um importante agente no combate ao estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do exercício físico regular na resposta oxidativa pulmonar após a inalação de pó de carvão mineral. Vinte e quatro ratos Wistar machos (200-250g) foram divididos aleatoriamente em dois grupos com respectivos controles (treinado, n = 6 e não-treinado, n = 6). Os animais receberam, por instilação traqueal, pó de carvão mineral (3mg/0,5ml salina, três dias/semana, durante três semanas) ou 0,5ml de solução salina 0,9%. Quarenta e oito horas após a última instilação, o grupo treinado foi submetido a um programa de exercício progressivo em esteira durante 12 semanas (até 17m.min⁻¹, 50min.dia⁻¹, 10% de inclinação). Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, todos os animais foram mortos por decapitação e os pulmões e sóleo foram cirurgicamente removidos para posterior análise bioquímica. A atividade da citrato-sintase foi determinada no músculo sóleo e os danos em lipídios e proteínas foram avaliados nos pulmões pela concentração de TBARS e pela determinação de grupos carbonil, respectivamente. Os resultados mostram que a prática regular de exercício físico reduz significativamente os níveis presentes de TBARS em ratos treinados e diminui os níveis de oxidação em proteínas em ambos os grupos quando comparados com os respectivos controles. Os resultados nos levam a sugerir que o exercício físico regular em esteira é um agente capaz de amenizar os danos oxidativos pulmonares induzidos pela inalação de partículas de carvão mineral.

ABSTRACT

Regular physical exercises decrease the oxidant pulmonary stress in rats after acute exposure to mineral coal

Several studies have pointed the regular low to moderate intensity physical exercise an important agent to combat the oxidant stress. The purpose of this study was to investigate the effect of the physical exercise in the pulmonary oxidant response after inhaling mineral coal dust. Twenty-four male Wistar rats (200-250 g) were randomly divided in two groups with their respective controls (trained, n = 6; non-trained, n = 6). All animals received mineral coal dust via tracheal instillation (saline 3 mg/0.5 ml, 3 days/week for 3 weeks), or 0.5 ml of 0.9% saline solution. Forty-eight hours after the last instillation, the trained group was submitted to

Palavras-chave: Treinamento físico. Dano oxidativo. Pulmão. Radicais livres.

Keywords: Physical training. Oxidative damage. Lung. Free radicals.

Palabras-clave: Educación física. Daño oxidativo. Radicales pulmonares. Libres.

a progressive exercise program on treadmill for twelve weeks (up to 17 m.min⁻¹, 50 min/day⁻¹, 10% inclination). Forty-eight hours after the last training session, every animal was killed by decapitation, and their lungs and soleus were surgically removed for later biochemical analysis. The citrate synthase activity was determined in the soleus muscle, and the damages on the lipids and proteins were assessed into the lungs by means of the TBARS concentration and by determining the carbonyl groups, respectively. The results show that the regular practice of physical exercises reduces significantly the present TBARS levels in trained rats, decreasing the oxidation levels in proteins of both groups compared to their respective controls. The results lead us to suggest that the regular physical exercise on treadmill is an agent capable to soften the pulmonary oxidant damages caused by inhaling mineral coal particles.

RESUMEN

El ejercicio físico regular reduce la respuesta oxidativa pulmonar en los ratones después de la exhibición aguda al carbón mineral

Los estudios han estado apuntando el ejercicio físico regular de intensidad baja a moderada como un agente importante en el combate a la tensión oxidativa. El objetivo de ese estudio era investigar el efecto del ejercicio físico para regular la respuesta oxidativa pulmonar después de la inhalación de polvo de carbón mineral. Veinticuatro ratones varones Wistar (200-250g) fueron aleatoriamente divididos en 2 grupos con los mandos respectivos (, n = 6 y Ningún -, n = 6). Los animales recibieron, por instilación traqueal polvo de carbón mineral (3mg/0,5ml salina, 3 días/semana, durante 3 semanas) o 0,5ml de solución salina 0,9%. Cuarenta y ocho horas después de la última instilación, el grupo especializado fue sometido a un programa de ejercicio progresivo en la cinta durante 12 semanas (a 17m.min⁻¹, 50min.dia⁻¹, 10% de inclinación). Cuarenta y ocho horas después de la última sesión de entrenamiento, todos los animales fueron sacrificados por decapitación y los pulmones y el músculo sóleo fueron extirpados por cirugía para el análisis bioquímico subsecuente. La actividad de la citrato-sintetasa fue determinada en los músculos así como los daños y perjuicios en los lipídios y las proteínas se estimaron en los pulmones para la concentración de TBARS y para la determinación de carbonilo de estos grupos, respectivamente. Los resultados mostraron que el ejercicio físico regular reduce los niveles presentes de TBARS significativamente en los ratones especializados y reduce los niveles de la oxidación en las proteínas en ambos grupos cuando se compararon los grupos respectivos. Los resultados permitirían sugerir que el ejercicio físico regular en la cinta es un agente capaz de minimizarlos daños y perjuicios oxidativos pulmonares inducidos por la inhalación de partículas de carbón mineral.

1. Centro de Estudos em Estresse Oxidativo/Departamento de Bioquímica/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/Universidade do Extremo Sul Catarinense.

3. Laboratório de Fisiopatologia Experimental/Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Recebido em 11/2/05. Versão final recebida em 29/8/05. Aceito em 4/11/05.

Endereço para correspondência: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC, Av. Universitária, 1.105 – Bairro Universitário – 88806-000 – Criciúma, SC, Brasil. E-mail: pinho.ra@terra.com.br

INTRODUÇÃO

A inalação de poluentes ocupacionais e atmosféricos, como o carvão mineral, tem contribuído significativamente para o surgimento e progressão de inúmeras desordens respiratórias, como infecções, inflamações, pneumoconiose, bronquite crônica, entre outras.

Estudos recentes⁽¹⁻⁴⁾ têm mostrado que a alteração pulmonar, após a inalação de partículas industriais, é mediada, principalmente, pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa resposta bioquímica, segundo Tao *et al.*⁽⁵⁾, leva à ativação de macrófagos e recrutamento de células polimorfonucleares, as quais induzem ao aumento de mediadores inflamatórios.

As ERO são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, principalmente em nível mitocondrial, sendo fundamentais para diversos processos celulares, como defesa e sinalização celular. Entretanto, sua produção em excesso pode acarretar danos nos constituintes celulares, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos^(6,7). Essas substâncias podem elevar os efeitos deletérios da doença. Mas, é bem possível que o exercício físico, em longo prazo, possa aumentar o sistema de defesa contra a ação das ERO^(8,9).

As intervenções terapêuticas de rotina, especialmente as ações farmacológicas, têm contribuído significativamente para a diminuição da gravidade do problema, mas apresentam limitações. Acredita-se que o exercício físico regular exerça um efeito positivo sobre a capacidade cardiorrespiratória e sobre a resposta bioquímica pulmonar.

Diversos estudos têm descrito as vias metabólicas da produção das ERO durante o exercício⁽⁹⁻¹²⁾, porém pouco se conhece sobre a influência do exercício físico regular sobre a liberação de ERO após inalação de partículas minerais. As informações na literatura são apenas pressupostos que necessitam de investigação científica mais apurada.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do exercício físico regular na resposta oxidativa pulmonar, após a inalação de pó de carvão mineral. Acredita-se que desvendar esse aspecto é de extrema relevância para uma melhor compreensão do fenômeno bioquímico dos danos oxidativos pulmonares e de sua relação com o exercício físico.

MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com "Guiding Principles in the Care and Uses of Animals"⁽¹³⁾ e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Preparação do carvão – 1kg de carvão mineral bruto foi coletado na Carbonifera Cooperminas, localizada no município de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Trezentos gramas da amostra foram triturados em um moinho de esfera por três horas, numa frequência de 25Hz. O carvão foi analisado no Laboratório de Análises de Solo e Fertilizantes da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil, apresentando as seguintes características mineralógicas: cobre (0,003%), ferro (2,5%), zinco (0,003%) e sílica (27,3%). As partículas de carvão utilizadas nesse experimento apresentaram um diâmetro até 15µm.

Instilação do carvão – Vinte e quatro ratos Wistar machos (200-250g) foram usados no protocolo experimental. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada em 22°C, ciclo claro-escuro 12:12h e com livre acesso à água e à comida. Para a instilação de carvão, os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg de massa corporal, i.p) e xilasina (20mg/kg de massa corporal, i.p) e receberam a administração direta por instilação traqueal de 3mg/0,5ml de salina ou 0,5ml de solução salina 0,9%, uma vez a cada três dias durante nove dias, procedimento adaptado do modelo descrito por Pinho *et al.*⁽⁴⁾. Os

animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com respectivos controles: treinado (TR, n = 6) e não-treinado (NTR, n = 6).

Protocolo de treinamento – Quarenta e oito horas após a última instilação de carvão, todos os animais foram ambientados em esteira ergométrica adaptada (10m.min⁻¹ sem inclinação, 10min.dia⁻¹). Os grupos treinados (carvão e salina) foram submetidos a um programa de treinamento progressivo durante 12 semanas com velocidade até 17m.min⁻¹, tempo até 50min.dia⁻¹ e inclinação até 10%, aumentados gradualmente. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, todos os animais foram mortos por decapitação e o pulmão e sóleo foram cirurgicamente removidos e imediatamente estocados em -80°C, para posterior análise.

Citrato-sintase (CS) – A atividade da CS foi determinada a partir do grupamento SH usando 5. 5'ditiobis – (ácido 2-nitrobenzóico – DTNB)⁽¹⁴⁾. 100mg de músculo (sóleo) foram homogeneizados em PBS e centrifugados durante 10min, 1000Xg, 4°C. Para a reação foram utilizados 100µl de 1mM-DTNB, dissolvidos em 10ml de 1M-Tris/HCl (pH 8,1), 30µl de 10mM-acetil-CoA, dissolvidos em água de Milli Q, 20µl da amostra, 800µl da solução (1mM-EDTA/Triton X100 0.05%, pH 7,4, 25°C). A atividade enzimática foi medida numa absorbância de 412nm por 3min com incubação por 7min. O processo é repetido e a reação da atividade da CS iniciou quando foram adicionados 50µl de oxaloacetato, dissolvidos em 0,1M-Tris/HCl. Foi utilizado um coeficiente de absorção de 13.600M.

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – Como índice de peroxidação de lipídios, foi verificada a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico medido espectrofotometricamente (532nm) e expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA) (nmol/mg proteína)⁽¹⁵⁾.

Carbonilação de proteínas – Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupamento carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina⁽¹⁶⁾. O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente 22.000M.

Determinação de proteínas – A quantidade de total de proteína foi determinada a partir da técnica de Lowry⁽¹⁷⁾.

Análise estatística – Os dados foram expressos em média e erro padrão médio, analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student para a análise da atividade da citrato-sintase (CS) e pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey para os ensaios de danos oxidativos. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 10.0 como pacote estatístico.

Reagentes – Ácido tiobarbitúrico, DTNB, acetil-CoA, oxaloactato, dinitrofenilhidrazina, adrenalina e peróxido de hidrogênio foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO).

RESULTADOS

Citrato-sintase (CS) – A atividade da CS foi usada como indicador do efeito do exercício físico. Os resultados (tabela 1) indicam que o programa de treinamento realizado em esteira foi suficiente para aumentar a capacidade oxidativa do músculo esquelético (TR = 0,58 ± 0,01U/mg proteína, NTR = 0,32 ± 0,04U/mg proteína, $p < 0,05$).

TABELA 1
Atividade da citrato-sintase em músculo esquelético (sóleo) de ratos treinados e não-treinados

Grupo	Média	EPM
Treinado (TR)	0,589U/mg proteína*	0,010
Não-treinado (NTR)	0,327U/mg proteína	0,042

* $p < 0,05$

Lipoperoxidação – Como índice de dano oxidativo em lipídios de membrana, avaliamos a formação de TBARS, após exposição ao carvão mineral. Conforme figura 1, os resultados indicam aumento significativo na lipoperoxidação em ratos expostos ao carvão (carvão = $0,123 \pm 0,025$ nmol/mg proteína; controle = $0,082 \pm 0,014$ nmol/mg proteínas, $p < 0,05$). Os resultados ainda mostram que a prática regular de exercício físico reduz significativamente a formação de TBARS em ratos treinados, comparados com não treinados (TR = $0,053 \pm 0,009$ nmol/mg proteína e NTR = $0,123 \pm 0,025$ nmol/mg proteína, $p < 0,05$).

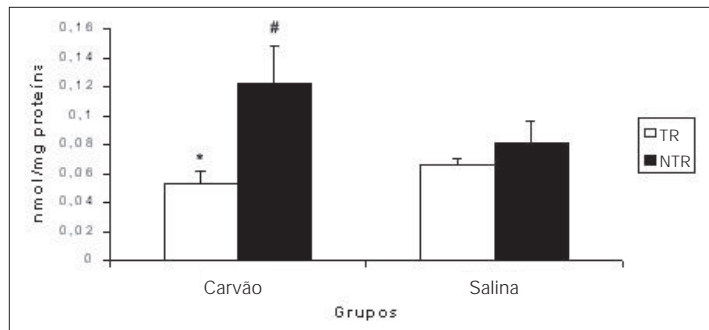


Figura 1 – Lipoperoxidação em pulmões de ratos treinados (TR) e não-treinados (NTR) após exposição ao carvão mineral. Os valores são apresentados em média \pm EPM e os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteínas. A diferença significativa entre os grupos controle* e grupo não-treinado# foi de $p < 0,05$.

Carbonilação de proteínas – Para verificar os danos oxidativos em proteínas, avaliamos os grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina. Conforme figura 2, os resultados não mostram uma diferença significativa no dano em proteína, em ratos, após exposição ao carvão mineral, quando comparado com o grupo controle (carvão = $0,407 \pm 0,075$ nmol/mg proteína e controle = $0,249 \pm 0,027$ nmol/mg proteína). Verificou-se ainda que o exercício físico regular diminui a resposta oxidativa provocada pela exposição ao carvão mineral (TR = $0,136 \pm 0,010$ nmol/mg proteína e NTR = $0,407 \pm 0,075$ nmol/mg proteína, $p < 0,05$).

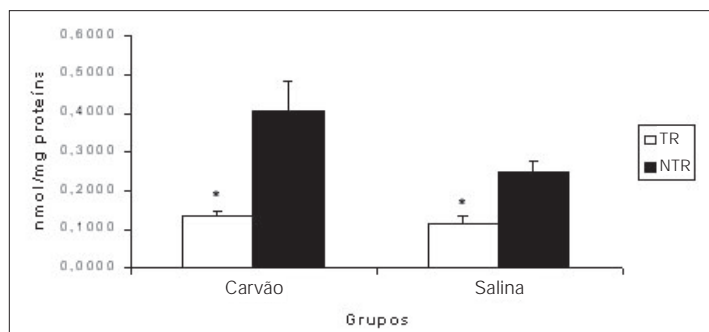


Figura 2 – Carbonilação de proteínas em pulmões de ratos treinados (TR) e não-treinados (NTR) após exposição ao carvão mineral. Os valores são apresentados em média \pm EPM e os resultados foram expressos em nmol de carbonis/mg de proteínas. A diferença significativa entre os grupos controle* e grupo não-treinado# foi de $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A citrato-sintase é uma enzima regulatória na produção de energia aeróbia que catalisa a condensação do oxaloacetato e acetil CoA para citrato no ciclo do ácido tricarbóxico⁽¹⁸⁾. Vários estudos têm utilizado a atividade de enzimas mitocondriais para confirmar ou não a influência do exercício físico na adaptação oxidativa do músculo esquelético de ratos^(10,19,18). Porém, poucos estudos têm demonstrado a resposta da CS após treinamento de *endurance* em esteira.

Na tabela 1, observamos um aumento significativo na atividade da CS no músculo sóleo de ratos, após o programa de treinamento. Da mesma forma, Alessio e Goldfarb⁽²⁰⁾ mostram que o treinamento em esteira em ratos jovens aumenta a atividade da CS no gastrocnêmio duas vezes a mais do que o grupo controle. Em outro estudo, Rádak *et al.*⁽¹²⁾ mostraram um importante aumento na atividade da CS em diferentes músculos esqueléticos de ratos jovens e de meia-idade, após nove semanas de treinamento em água. Embora nosso estudo corrobore com esses resultados, outros estudos citados por Pereira *et al.*⁽²¹⁾ apresentam respostas contrárias. Provavelmente, as diferenças entre os estudos estão relacionadas com os diferentes tipos de fibras musculares utilizadas, ou diferentes protocolos de treinamento, ou diferentes métodos para determinação da atividade enzimática, ou ainda, com as adaptações moleculares diferenciadas (modificações translacional e/ou pós-translacional) na adaptação da CS durante e após o treinamento físico⁽²²⁾.

Recentes estudos^(4,5,23,24) mostram que a resposta pulmonar por poluentes ocupacionais e atmosféricos, como carvão, provoca uma resposta inflamatória em cadeia mediada por ativação de macrófagos e recrutamento de células polimorfonucleares, citocinas, quimocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO). Após a inalação desses poluentes, a produção de ERO pode ser aumentada significativamente, ocasionando danos nos constituintes celulares⁽²⁾.

A resposta oxidativa ao exercício físico é determinada pelo tipo, frequência, duração e intensidade, que, por um lado, podem gerar a formação de ERO capazes de causar danos celulares e inflamação⁽²⁵⁾ e, por outro lado, o exercício físico regular de *endurance* pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas ERO e os sistemas de reparos antioxidantes⁽²⁶⁾. Portanto, em função desses dois extremos observados na resposta oxidativa ao exercício físico, os resultados obtidos com o treinamento físico ainda não são conclusivos.

Em nosso estudo, hipotetizamos que a prática regular e contínua de exercícios físicos aeróbios possa ser um agente capaz de amenizar os danos em proteínas e lipídios de membrana causados pela exposição ao carvão mineral.

Os danos em lipídios, a partir de sua oxidação, resultam da reação de radicais livres com ácidos graxos polinsaturados presentes em lipoproteínas de membranas. Mudanças nos marcadores de lipoperoxidação são evidências mais frequentes observadas no tecido pulmonar, após exposição a poluentes atmosféricos⁽⁴⁾ e na resposta ao exercício físico⁽²⁶⁾.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostram que o exercício físico regular diminui significativamente os níveis de lipoperoxidação pulmonar em ratos expostos ao carvão mineral após o treinamento físico (figura 1). É possível que esses resultados sejam decorrentes do aumento nos níveis de enzimas antioxidantes; entretanto, embora esses resultados sejam importantes, Ohlshi *et al.*⁽¹¹⁾ sugerem que o efeito do treinamento físico sobre a redução nos níveis de lipoperoxidação não é tão significativo quanto a melhora na capacidade do tecido em resistir aos efeitos da lipoperoxidação induzida pelo próprio exercício físico.

As AERO podem modificar aminoácidos por reações em cadeias através de agregados de proteínas suscetíveis a degradações proteolíticas. Durante esse processo, alguns aminoácidos são convertidos em derivados de carbonil⁽⁷⁾. A exposição ao carvão mineral também estimula a produção de grupos carbonil⁽⁴⁾, o que pode, nesse caso específico, ser amenizado pela prática regular de exercício físico, conforme os resultados mostrados nesse estudo.

Conforme figura 2, observamos uma redução significativa na carbonilação de proteínas, após o programa de exercício. Embora sem utilizar poluentes atmosféricos para induzir danos pulmonares, Rádak *et al.*⁽¹²⁾ mostraram resultados contrários. O treinamento de *endurance* induz a um significante aumento na oxidação de proteínas em pulmão de ratos. É possível que essas diferenças

em estudos possam estar relacionadas a quatro aspectos: primeiro, o uso ou não de agentes estimuladores de danos pode apresentar repostas diferenciadas induzidas pelo exercício físico; segundo, a metodologia utilizada para determinar os níveis de oxidação protéica; terceiro, o tipo, duração, frequência e intensidade do exercício utilizado; quarto, é possível que essas diferenças estejam relacionadas à redução na taxa do *turnover* de proteínas. Está bem estabelecido na literatura que as proteínas modificadas ou oxidadas são menos degradadas por proteossomas. Essa hipótese é reforçada pelo aumento na atividade de proteossomas como um processo adaptativo secundário à oxidação de proteínas após

o exercício⁽²⁷⁾. Embora ainda seja uma hipótese, pode ser a principal justificativa para as diferenças encontradas em diversos estudos.

Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo mostram evidências de que o exercício físico regular em esteira possa ser um agente capaz de amenizar os danos oxidativos pulmonares induzidos pela inalação de partículas de carvão mineral.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Dörger M, Allmeling AM, Kiefmann R, Münzing S, Mesmer K, Krombach F. Early inflammatory response to asbestos exposure in rat and hamster lung: role of inducible nitric oxide synthase. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;181:93-105.
2. Castranova V, Porter D, Millicchia L, Ma JY, Hubbs AF, Teass A. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: time course of pulmonary reactions. *Mol Cell Biochem* 2002;234:177-84.
3. Mossman BT. Introduction to serial reviews on the role of reactive oxygen species (ROS/RNS) in lung injury and diseases. *Free Radic Biol Med* 2003;34:115-6.
4. Pinho RA, Bonatto F, Andrades M, Frota ML Jr, Ritter C, Klamt FF, et al. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ Res* 2004;96:290-7.
5. Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med* 2003;35:327-40.
6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915-22.
7. Repine JE, Bast B, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:341-57.
8. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Deitrick R. The exercise-induced oxidative stress paradox: the effects of physical exercise training. *Am J Med Sci* 1999;317:295-300.
9. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987-97.
10. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1988;263:173-9.
11. Oh-Ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, et al. Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1579-85.
12. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999;27:69-74.
13. Olert ED, Cross BM, McWilliams AA. Guide to care and use of experimental animals. 2nd ed. Ottawa: Canadian Council on Animal, 1993.
14. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976;154:689-700.
15. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
16. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
17. Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
18. Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2003;94:555-60.
19. Lawler JM, Powers SK, Van Dijk H, Visser T, Kordus MJ, Ji LL. Metabolic and antioxidant enzyme activities in the diaphragm: effect of acute exercise. *Respir Physiol* 1994;96:139-49.
20. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 1988;64:1333-6.
21. Pereira B, Costa Rosa LFB, Safi DA, Medeiros MHG, Curi R, Bechara EJJ. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiol Behav* 1994;56:1095-9.
22. Leek BT, Mudaliar SR, Henry R, Mathieu-Costello O, Richardson RS. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R441-7.
23. Vallyathan V, Goins M, Lapp LN, Pack D, Leonard S, Shi X, et al. Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miners. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:958-65.
24. Zhang Q, Huang X. Induction of ferritin and lipid peroxidation by coal samples with different prevalence of coal workers' pneumoconiosis: role of iron in the coals. *Am J Ind Med* 2002;42:171-9.
25. Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 2000;89:21-8.
26. Carmeli E, Laviam G, Reznick AZ. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z, editor. *Free radicals in exercise and aging*. Champaign: Human Kinetics, 2000:73-115.
27. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997;11:526-34.