

Concentração de hidroxiprolina como marcador bioquímico do dano músculo esquelético após treinamento de resistência de força.

Hydroxyproline of concentration as biomarker of muscle skeletal damage after endurance training

NOGUEIRA, A.C.; SIMÃO R.; CARVALHO M.C.G.A.; VALE, R.G.S.; DANTAS P.M.S.
Concentração de hidroxiprolina como marcador bioquímico do dano músculo esquelético após treinamento de resistência de força. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(2): 33-38.

RESUMO: A geração de força elevada nas ações musculares excêntricas pode afetar as estruturas musculares e tendíneas do tecido conjuntivo. Por isso, o objetivo deste estudo foi comparar a concentração de hidroxiprolina antes e depois de um treino de resistência de força em 30RM, já que a hidroxiprolina pode ser utilizada como marcador do dano músculo esquelético. Foi necessário então, comparar o efeito agudo do treino de resistência de força na concentração de hidroxiprolina em oito homens com idades variando entre 17 e 25 anos. Uma coleta de urina basal e três testes de 30RM foram realizados, e após recuperação, executaram três séries de 30RM com outra coleta de urina feita duas horas depois. O tratamento estatístico dado para as médias da concentração de hidroxiprolina de pré e pós-treino, através do teste t-Student pareado, mostrou não haver diferença significativa ($p>0,05$). Assim, não foi possível inferir que houve algum dano por este método de análise.

Palavras-chave: tendão, excêntrico, colágeno, hidroxiprolina, resistência de força.

NOGUEIRA, A.C.; SIMÃO R.; CARVALHO M.C.G.A.; VALE, R.G.S.; DANTAS P.M.S.
Hydroxyproline of concentration as biomarker of muscle skeletal damage after endurance training. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(2): 33-38.

ABSTRACT: The increased force due to the concentric and eccentric muscle actions may affect the connective tissue structures in muscle and tendon. So, this paper goal was to compare the hydroxyproline concentration before and after 30RM muscle endurance training, since hydroxyproline can be used as a biomarker of connective tissue damage. For such it was necessary to compare the muscle endurance training acute effect on the hydroxyproline concentration of 8 trained men whose ages varied between 17 and 25 years. A basal urine collection and a three 30RM test were performed. After the recovery, they performed three sets of 30RM and another urine collection two hours later was taken. The statistical treatment used to compare the averages of the hydroxyproline concentration before and after training across paired Student t-test showed no significant difference ($p>0.05$). So, it is not possible to infer that there was no damage through this method of analysis.

Keywords: tendon, eccentric, collagen, hydroxyproline, muscle endurance.

Antonio de Carvalho Nogueira¹,
Roberto Simão²,
Mauro César Gurgel de Alencar
Carvalho¹,
Rodrigo Gomes de Souza Vale¹,
Paulo Moreira Silva Dantas¹,
Estélio Henrique Martin Dantas¹,

¹ Mestrado em Ciência da Motricidade Humana (Rio de Janeiro – UCB) – LABIMH/ PROCIMH.

² Escola de Educação Física e Desportos – Universidade Federal do Rio de Janeiro (EEFD/UFRJ).

Recebimento: 14/09/2006
Aceite: 21/12/2006

Correspondência: Estrada do Lameirão, 661, casa três. Santíssimo – RJ. – E-mail: atpase@ig.com.br

Introdução

O treinamento de força é hoje o método mais utilizado para aumentar a sobrecarga com intuito de provocar adaptações na musculatura esquelética. Tal sobrecarga pode estar relacionada a um determinado percentual da maior carga possível de ser levantada em um único movimento máximo (1RM), ou relacionada com uma quantidade estipulada de repetições máximas (8, 10, 12.... RM)¹⁰. O músculo-esquelético é um tecido extremamente plástico que se adapta rapidamente as demandas impostas. O estímulo mecânico, como aumento da sobrecarga, provoca adaptações e alterações nas características contráteis das fibras musculares¹. Com o intuito de maximizar os ganhos de força, ações musculares concêntricas ou excêntricas ou ainda, a combinação das duas, podem ser empregadas para provocar alterações no músculo-esquelético, principalmente com objetivo de promover a hipertrofia muscular. No entanto, durante as ações excêntricas, o músculo se alonga sob tensão, distendendo assim os elementos do tecido conjuntivo associados tanto aos tendões quanto às células musculares. Em contraste, durante as ações concêntricas, apenas os tecidos conjuntivos associados aos tendões são distendidos⁹.

As ações musculares quando impostas aos músculos esqueléticos com sobrecarga promovem danos aos tecidos conjuntivos, e o aumento na excreção urinária de hidroxirolina indica os referidos danos teciduais. O colágeno tem como parte fundamental a hidroxirolina que é formada preferencialmente através da oxidação da prolina e entra no metabolismo durante a degradação do próprio colágeno. Nesta degradação se formam peptídeos contendo hidroxirolina que em parte não sofrem hidrólise posterior e são eliminados pela urina²⁰.

Regimes de treinamento intenso aumentam a força de tensão no osso e no tendão e isso pode acarretar mudanças na taxa da síntese e degradação do colágeno. A geração de força elevada durante as ações musculares excêntricas, pode afetar o metabolismo do colágeno e até as estruturas musculares e tendíneas do tecido conjuntivo². Portanto, os níveis de

hidroxirolina, quando comparados antes e depois do treinamento, podem identificar o grau de dano sobre o tecido conjuntivo. O maior risco de dano muscular ocorre durante a ação muscular excêntrica intensa, pois neste tipo de ação realiza-se trabalho de força e de alongamento simultaneamente, aumentando assim o estresse sobre os tecidos^{6,19}. No entanto, prévias ações musculares concêntricas de alta intensidade podem aumentar a susceptibilidade do músculo ao dano, quando acompanhada por ações musculares excêntricas^{8,18}.

A maioria da literatura abordada, não faz referência ao risco de dano sob o treinamento de resistência de força com implementos de pesos livres e sim com equipamentos isocinéticos^{2,5}. Além disso, os estudos encontrados analisaram as ações musculares concêntricas e excêntricas de forma isolada⁴. Com isso, têm-se como objetivo verificar os níveis de hidroxirolina antes e depois de um treinamento de resistência de força, com velocidade controlada nas ações excêntricas e concêntricas associadas.

Materiais e Métodos

Amostra

Participaram da amostra oito homens voluntários (22,7 ± 4 anos; 177 ± 4 cm; 72,6 ± 4,8 kg). Todos referiram serem saudáveis e fisicamente ativos, realizando atividades de força, pelo menos três vezes por semana e familiarizados com exercícios e equipamentos utilizados neste estudo. Para seleção da amostra respeitaram-se os seguintes critérios de inclusão: a) prática regular de atividades de força há pelo menos seis meses; b) IMC ≤ 25 Kg.m⁻² evitando-se níveis de sobrepeso que comprometessem a qualidade de execução dos movimentos; c) questionário PAR-Q negativo.

Adotaram-se como critérios de exclusão: a) uso de medicamentos que tivessem influência sobre o comportamento das respostas funcionais; b) problemas osteomioarticulares que poderiam limitar a realização dos exercícios propostos; c) falta de familiarização com os exercícios propostos. Também foi sugerido que o padrão nas horas de sono e o tipo de alimentação não fossem modificadas do habitual. Este estudo foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Castelo Branco (UCB-RJ) e todos os voluntários

assinaram um termo de consentimento, de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

Testes de 30RM

Os dados foram coletados em três dias distintos. Na primeira visita, os indivíduos, após realizarem as medidas antropométricas, executaram o teste de 30RM no aparelho de *leg-press* 45° (LP) e supino horizontal (SH) com a barra longa (*Fitness equipment; Franklin Park, IL*). A inclusão dos indivíduos, nas seqüências dos exercícios testados foi determinada na forma de delineamento alternado. Após a obtenção das cargas máximas no teste de 30RM, os indivíduos descansaram por 24 horas e foram reavaliados para obtenção da reprodutibilidade das cargas no teste de 30RM em mais dois dias, com intervalo de 24 horas entre os mesmos. Para tanto, considerou-se como 30RM a maior carga estabelecida nos três dias, com diferença menor que 5%. Nos intervalos entre as sessões de testes não foi permitida a realização de exercícios, a fim de evitar qualquer interferência nos resultados obtidos.

Visando reduzir a margem de erro nos testes de 30RM, foram adotadas as seguintes estratégias¹⁴: a) instruções padronizadas foram fornecidas antes do teste, de modo que o avaliado estivesse ciente de toda a rotina que envolvia a coleta de dados; b) o avaliado foi instruído sobre a técnica de execução do exercício; c) o avaliador estava atento quanto à posição adotada pelo praticante no momento da medida, pois pequenas variações no posicionamento das articulações envolvidas no movimento poderiam acionar outros músculos, levando a interpretações errôneas dos escores obtidos; d) estímulos verbais foram realizados a fim de manter alto o nível de estimulação; e) os pesos adicionais utilizados no estudo foram previamente aferidos em balança de precisão. Os intervalos entre as tentativas em cada exercício durante o teste de 30RM foram fixados entre dois a três minutos.

Procedimento para coleta de dados

No quarto dia, 48 horas após a realização do último teste de 30RM, os indivíduos foram submetidos à sessão de treinamento para coleta de dados. Anteriormente a condução do protocolo, os voluntários realizaram

aquecimento específico, executado no SH e LP respectivamente, composto por uma série de 30 repetições com 40% da carga obtida em 30RM. Posteriormente, realizaram-se três séries com carga para 30RM nos respectivos exercícios sempre na mesma ordem (SH e LP). Os intervalos foram fixados em dois minutos e 30 segundos entre as séries e exercícios. A velocidade de execução foi controlada por meio de um metrônomo (*Casio HS-30W®*), estabelecendo-se três segundos para cada movimento completo, totalizando 90 segundos nas 30RM. Um profissional experiente em treinamento de força acompanhou os voluntários, de modo que os avaliados conseguissem executar todas as repetições dentro do tempo previsto, em cada movimento, e no tempo total de cada série. Dessa forma, os voluntários foram levados à exaustão, sem risco de redução no volume total do treinamento.

Análise da Hidroxiprolina

A coleta da urina para verificação da variação da concentração de hidroxiprolina foi feita antes do protocolo da sessão de treinamento. Os indivíduos realizaram um jejum de 12 horas (período da noite) e logo após eliminarem a primeira urina, fizeram uma hidratação com água e a partir daí, um período de duas horas foi dado para que iniciassem a coleta nos frascos previamente distribuídos. A mesma foi imediatamente acondicionada no gelo e levada para o laboratório para análise.

Após a sessão de treinamento, os indivíduos aguardaram duas horas e imediatamente após esse tempo, realizaram a coleta da urina, que a partir daí, seguiu os mesmos procedimentos anteriormente citados. Vale ressaltar que neste caso a hidratação foi feita durante os intervalos de recuperação entre as séries.

Tratamento Estatístico

Para o tratamento dos dados, utilizou-se um teste-t student para amostras pareadas. Em adição, aplicou-se a ANOVA de uma entrada para medidas repetidas, com intuito de verificar as cargas nos testes de 30RM nos exercícios avaliados. Os dados foram tratados no *software Statistica® 5.5 (Statsoft®, USA)*. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Inicialmente são ilustrados os resultados referentes às cargas obtidas nos testes de 30RM. Não foram verificadas diferenças significativas entre as cargas obtidas para 30RM nos exercícios LP ($p=0,256$) e SH ($p=0,351$).

Na tabela 1, verifica-se que no pós-treino as medidas da média e da mediana se aproximaram. O coeficiente de variação obteve redução em virtude de uma diminuição dos valores do desvio padrão e da média. Isso mostra uma tendência à convergência dos dados da amostra. A média de hidroxirolina excretada no pós-treino foi menor que a

excretada no pré-treino (13,3 mg/d < 21,1mg/d). O desvio padrão mostra que a variabilidade na concentração de hidroxirolina foi muito maior no pré-treino (26,88 mg/d), do que no pós-treino (5,53 mg/d). O erro padrão apresentado explica que há uma possibilidade de erro de (9,50 mg/d e 1,95 mg/d) para o pré e o pós-treino respectivamente. Portanto, uma menor possibilidade de erro na concentração de hidroxirolina excretados no pós-treino. Como a amostra ficou próxima da distribuição normal foi possível usar testes paramétricos para comparar as médias.

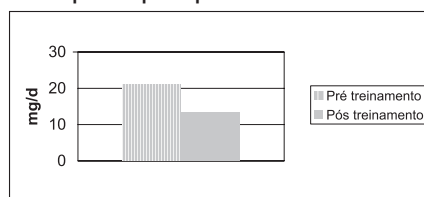
Tabela 1 - Análise descritiva dos níveis de hidroxirolina em mg/d.

HP	Min	Máx	Média	Md	DP	EPE	Ass	Curt	CV %
Pré	4,0	86,9	21,1	13,5	26,88	9,50	2,69	7,44	127,10
Pós	5,4	22,7	13,3	14,3	5,53	1,95	0,13	-0,02	41,56

HP = Hidroxirolina; Min = Mínimo; Máx = Máximo; Md = Mediana; DP= desvio padrão; EPE = Erro Padrão; Ass = Assimetria; Curt = Curtose; CV = Coeficiente de Variação.

No gráfico 1, pode-se observar a diminuição da concentração de hidroxirolina no pós-treino. Contudo, a estatística adequada (Teste t-Student pareado) mostrou não haver diferença significativa entre as comparações do pré e pós-teste ($p = 0,368$).

GRÁFICO 1 – concentração média de hidroxirolina pré e pós-treino.



Discussão

Diversos estudos indicam que a ação muscular excêntrica é mais comumente associada ao dano no tecido músculo-esquelético^{1,4,16}. Portanto, era de se esperar que um determinado grau de dano pudesse ser observado ao final das ações musculares excêntricas associadas às ações concêntricas em 30RM com velocidade controlada. No entanto, não verificamos na literatura estudos que suportassem a evidência de dano no tecido conjuntivo após uma sessão de resistência de força em dois exercícios distintos. O principal resultado encontrado nesse experimento foi a diminuição do nível da variável hidroxirolina no pós-treino,

mas sem ocorrer diferença significativa entre as comparações do pré e pós-teste.

Com o intuito de sustentar esses resultados, buscamos na literatura estudos com análises similares de hidroxirolina. Nessa busca, encontramos dois estudos aproximados no tempo de análise de urina pós-treino. Os mesmos analisaram a concentração de hidroxirolina nos tempos de 5 min. e 1h pós-treino, e como no presente estudo, também não encontraram diferenças significativas^{11,21}. Esses autores justificam seus achados hipotetizando que o tempo de coleta pós-treino pode ter sido insuficiente para que se detectasse uma concentração mais elevada de hidroxirolina. Portanto, o tempo de duas horas dado para a coleta de urina e posterior análise de hidroxirolina neste experimento, pode também ter sido insuficiente para que se conseguisse uma concentração mais elevada desta variável e o respectivo dano no tecido conjuntivo. As referências supra citadas^{11,21}, além de serem justificativas para os achados deste estudo, também corroboram com outros achados. Por exemplo: outros autores mostraram concentração mais elevada de hidroxirolina com coletas após 24 horas do término do treinamento^{7,15}. Tais achados sugerem que imediatamente após a degradação do colágeno existe a necessidade de regeneração imediata ou do rearranjo das células do colágeno e somente após várias horas, a

prolina é então hidrolisada e liberada na urina como hidroxiprolina. Entende-se com isso, que a concentração de hidroxiprolina logo após, e até 2 horas depois do treino, deve ser inferior a concentração pré-treino, exatamente como mostrou este estudo, apesar do tratamento estatístico não ter apresentado diferença significativa.

Essa hipótese pode ser fundamentada pelas declarações de um importante estudo¹³. O mesmo relata que ocorre na literatura um consenso no que se refere à identificação da concentração de colágeno relacionados aos componentes bioquímicos, que por sua vez, são determinantes na regeneração dos danos pelo aumento da bioatividade molecular¹³.

Diferentemente dos resultados encontrados pelos estudos citados anteriormente^{7,15}, Brown et al.³, reportam que não encontraram diferença significativa na quantidade de hidroxiprolina plasmática 24 e 216 horas (1 e 9 dias), pós-exercício. Porém, a concentração de colágeno foi aumentada em 46,6 e 44,3% respectivamente. Contudo, tal aumento da concentração de colágeno, sem identificação do aumento da hidroxiprolina plasmática e conseqüentemente de qualquer dano, justifica uma possível regeneração do dano pela alta concentração de colágeno encontrada. Já que como referenciado, ele é determinante na regeneração dos danos¹³.

Mackey et al.¹², reportam que o estiramento muscular pode ser um estímulo para a proliferação do colágeno. Assim, apesar deste estudo não ter mensurado a concentração do colágeno, pode ser que os 90 estiramentos utilizados (três séries de 30 RM), tenham provocado a captação de componentes bioquímicos, como a prolina e a própria hidroxiprolina, para aumentar a concentração do colágeno. Isso pode ter impedido a detecção de concentrações mais elevadas de hidroxiprolina no tempo de duas horas pós-treino. Sendo assim e de acordo com os resultados encontrados na presente investigação, pode-se concluir que

duas horas depois de três séries de 30RM, para essa amostra, não foi tempo suficiente para que se conseguisse observar, através da sobrecarga aplicada, um efeito agudo elevado na concentração de hidroxiprolina e conseqüentemente algum grau de dano no tecido conjuntivo. Talvez a necessidade imediata de formação de colágeno para regenerar o tecido conjuntivo, provavelmente via metaloproteínases, seja prioritária e absorva rapidamente a hidroxiprolina do meio para a referida regeneração. Além disso, a adaptação dos indivíduos às ações musculares utilizadas, pode também não ter permitido a detecção de uma concentração elevada de hidroxiprolina, e conseqüentemente, algum grau de dano no tecido conjuntivo, já que indivíduos treinados podem estar bem adaptados às ações musculares estudadas, obtendo com isso um efeito protetor e conseqüentemente menor mudança nos indicadores do dano muscular^{5,16}.

Contudo, o presente estudo apontou algumas limitações que podem ter interferido nos resultados. Dentre elas destacam-se o número de participantes, o nível de estresse, o estado psicológico dos indivíduos e o jejum de 12 horas que foi controlado pelos próprios indivíduos. Entretanto esta pesquisa levantou desdobramentos para futuras investigações e interessantes questionamentos relacionados à dinâmica do processo de *turnover* do colágeno e da liberação da hidroxiprolina no sangue e posterior excreção pela urina. São eles:

- 1) Como ocorre esse processo de *turnover* e a liberação da hidroxiprolina em função do tempo?
- 2) É necessário mais tempo para filtração nos rins de modo que haja maior quantidade de hidroxiprolina na urina?

Recomendam-se ainda outros estudos sobre este assunto, levando-se em consideração outras formas de treinamento e tempos de coleta de hidroxiprolina diferentes do realizado aqui.

Referências Bibliográficas

1. Barroso R, Tricoli V, Ugrinowshch C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. 2005;13:111-122.
2. Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Índices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contraction. **European Journal Apply physiology**. 1997;75:369-374.
3. Brown SJ, Day SH, Donnelly AE. Indirect evidence of human skeletal muscle damage and collagen breakdown after eccentric muscle actions. **Journal Sports Science**. 1999;17:397-402.

4. Butterfield TA, Herzog GW. Effect of altering starting length and activation timing of muscle on fiber strain and muscle damage. **Journal Apply Physiology**. 2006;5:1489-1498.
5. Chen TC, Hsieh SS. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. **Medicine Science Sports Exercise**. 2001;33:1732-1738.
6. Clebis NK, Natali MRM. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. 2001;9:47-53.
7. Fox E, Bowers R, Foss M. **Bases Fisiológicas da Educação Física e dos Desportos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
8. Gleeson N, Eston R, Marginson V, Mc Hughm. Effects of prior concentric training on eccentric exercise induced muscle damage. **British Journal Sports Medicine**. 2003; 37: 119-125.
9. Komi PV. **Strength and Power in Sport**. Oxford: Blackwell Science, 2003.
10. Kraemer WJ, Adans K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. American College of Sports Medicine. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine Science Sports Exercise**. 2002;34:364-380.
11. Kristofferson A, Hultdin J, Holmlund I, Thorsen K, Lorentzon R. Effects of short-term maximal work on plasma calcium, Parathyroid hormone, osteocalcin and biochemical markers of collagen metabolism. **International Journal Sports Medicine**. 1995;16:145-149.
12. Mackey AL, Donnelly AE, Hujanen TT, Roper HP. Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. **Journal Apply Physiology**. 2004;97:197-203.
13. Martin R. The Epithelial Mitogen Keratinocyte Growth Factor Binds to Colagens Via the Consensus Sequence Glycine-Proline-Hydroxyproline. **On line**. Disponível em <http://www.jbc.org>. Acesso em: 24/07/2005.
14. Monteiro WD, Simão R, Farinatti P. Manipulação na ordem dos exercícios e sua influência sobre número de repetições e percepção subjetiva de esforço em mulheres treinadas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 2005; 11: 146-150.
15. Nascimento V. **Níveis de hidroxiprolina em adultos submetidos ao Flexionamento dinâmico nos Meios Líquido e Terrestre**. Rio de Janeiro, 2004. (Dissertação de Mestrado em Ciência da Motricidade Humana da Universidade Castelo Branco).
16. Nosaka K, Newton M. Concentric or eccentric training effect on eccentric exercise-induced muscle damage. **Medicine Science Sports Exercise**. 2002;34:63-69.
17. Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exercise Immunology Review**. 2005;11: 64-85.
18. Proske U, Morgan DL. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. **Journal of Physiology**. 2001;537:333-345.
19. Stupka N, Tarnopolsky MA, Yardley NJ, Phillips SM. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of Apply Physiology**. 2001;91:1669-1678.
20. Verlag GT. **Patobioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
21. Virtanen P, Vitasalo J, Vuori J, Vaananen K, Takala T. Effect of concentric exercise on serum muscle and collagen markers. **Journal Apply Physiology**. 1993; 75:1272-1277.