



# Associação da concentração plasmática de cobre com metaloproteínas cobre-dependentes em atletas de elite

Josely Correa Koury<sup>1,2</sup>, Cyntia Ferreira de Oliveira<sup>1</sup> e Carmen Marino Donangelo<sup>1</sup>

## RESUMO

O cobre é um elemento-traço essencial para a manutenção de vários processos biológicos, tais como metabolismo energético, homeostase de ferro e mecanismos de proteção antioxidante através da atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (Cu-Zn SOD), da ceruloplasmina e da metalotioneína. No entanto, o cobre também participa de reações oxidativas que promovem a liberação de radicais livres, podendo prejudicar a integridade e a funcionalidade celular. A atividade física afeta a homeostase do cobre e promove maior utilização de oxigênio, favorecendo a instalação do estresse oxidativo quando mecanismos naturais de proteção antioxidante, incluindo os dependentes de cobre, não atuam adequadamente. Não há relatos na literatura sobre a associação de diferentes níveis de concentração plasmática de cobre com indicadores antioxidantes cobre-dependentes em atletas de elite. O presente estudo objetivou verificar a associação entre diferentes níveis plasmáticos de cobre e metaloproteínas cobre-dependentes, com atividade antioxidante, em atletas de elite. Os indicadores bioquímicos (metalotioneína e Cu-Zn SOD eritrocitárias, ceruloplasmina e cobre plasmáticos) foram avaliados em 50 atletas, homens e adultos, utilizando metodologias já consolidadas. Os resultados mostraram que 32% dos atletas apresentaram níveis de cobre plasmático inferiores a 11 µmol/L, 38% entre 11-13 µmol/L e 30% > 13 µmol/L. As associações encontradas entre cobre plasmático e ceruloplasmina ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,04$ ) e Cu-Zn SOD ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,02$ ); metalotioneína eritrocitária e ceruloplasmina ( $r = 0,40$ ,  $p = 0,006$ ) e Cu-Zn SOD ( $r = 0,73$ ,  $p = 0,001$ ) e entre Cu-Zn SOD e ceruloplasmina ( $r = 0,37$ ,  $p < 0,001$ ) demonstraram que a atividade da Cu-Zn SOD e a concentração de metalotioneína eritrocitárias são sensíveis a menor concentração, enquanto que a ceruloplasmina é sensível a elevadas concentrações plasmáticas de cobre, sugerindo que há um equilíbrio homeostático entre antioxidantes, cobre-dependentes, intra e extracelulares em atletas de elite.

## ABSTRACT

### **Association between copper plasma concentration and copper-dependent metalloproteins in elite athletes**

*Copper is a trace element essential in several biological processes, some of them important for physical activity, such as energy metabolism, iron homeostasis and antioxidant protection through the plasma ceruloplasmin, erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) and metallothionein. However, copper also parti-*

**Palavras-chave:** Cuproenzimas. Metalotioneína. Superóxido dismutase. Ceruloplasmina.

**Keywords:** Metalloproteins. Metallothionein. Ceruloplasmin. Cu-Zn superoxide dismutase.

*cipates in oxidative reactions releasing free radicals, which may adversely affect cell integrity and function. Physical activity is known to affect copper homeostasis and may interfere in the copper antioxidant capacity. Intense physical activity results in higher oxygen consumption, which favors the release of free radicals and may cause irreversible damage to the body when the natural mechanisms of protection, including those copper-dependent, are not properly stimulated. Few studies related exercise with plasma copper level and copper-dependent metalloproteins in elite athletes. The present study aimed at evaluating the association between different levels of plasma copper and copper-dependent metalloproteins in male elite athletes (n = 50). The biochemical indices studied were plasma copper and ceruloplasmin, and erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase and metallothionein by validated methods. The results showed that 32% of the athletes had plasma copper levels lower than 11 µmol/L, 38% between 11-13 µmol/L and 30% higher than 13 µmol/L. Plasma copper was associated with plasma ceruloplasmin level ( $r = 0.31$ ,  $p = 0.004$ ), and with Cu-Zn SOD ( $r = -0.32$ ,  $p = 0.02$ ); metallothionein erythrocyte were associated with Cu-Zn SOD ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.001$ ) and with ceruloplasmin ( $r = 0.40$ ,  $p = 0.006$ ). These results suggest that both plasma and erythrocyte antioxidant capacity favor homeostatic adjustments in agreement with plasma copper levels in elite athletes.*

## INTRODUÇÃO

O cobre é componente de grande número de proteínas e enzimas que desempenham funções biológicas fundamentais às células e que contribuem para a manutenção de sua homeostase<sup>(1)</sup>. O cobre é um metal essencial aos seres vivos, mas também potencialmente tóxico às células pela facilidade de sofrer mudanças do estado de oxidação na forma de íon livre. Portanto, para que as metaloproteínas cobre-dependentes desempenhem suas funções essenciais de forma satisfatória, tais como as antioxidantes, o íon cobre precisa estar adequadamente compartimentalizado e presente em concentrações intra e extracelulares adequadas. Tanto a deficiência quanto o excesso desse mineral podem trazer prejuízos à integridade e funcionalidade celular<sup>(1-3)</sup>.

A ingestão adequada de cobre é importante para assegurar o bom desempenho de atletas. Em geral, a ingestão de cobre por atletas de diferentes modalidades supera as recomendações dietéticas<sup>(4-6)</sup>. No entanto, outros nutrientes, tais como ferro e zinco, quando consumidos em excesso, podem causar efeitos adversos sobre a homeostase de cobre e possivelmente prejudicar a manutenção de sua função antioxidante<sup>(1)</sup>. O uso de suplementos nutricionais que não contemplam adequadamente o fornecimento de cobre é bastante comum entre atletas, o que poderia prejudicar a função essencial do cobre durante a atividade física.

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química – Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Rio de Janeiro.

2. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição – Centro de Orientação Nutricional para Atletas, Rio de Janeiro.

Aceito em 31/1/07.

**Endereço para correspondência:** Profa. Dra. Josely Correa Koury, Centro de Orientação Nutricional para Atletas, Rua São Francisco Xavier, 524, 12º andar, sala 12.032-D, Maracanã – 20559-900 – Rio de Janeiro, RJ. E-mail: jckoury@gmail.com

O exercício físico intenso promove a liberação de espécies reativas de oxigênio<sup>(7)</sup> e pode influenciar a homeostase do cobre<sup>(8)</sup>. As metaloproteínas, ceruloplasmina plasmática, Cu-Zn SOD e metalotioneína eritrocitárias são metaloproteínas cobre-dependentes e mantêm a proteção antioxidante intra e extracelular, respectivamente<sup>(1,9-10)</sup>. Vários são os fatores que influenciam os teores das metaloproteínas, entre eles o cobre plasmático, a atividade física<sup>(1,8)</sup>, uso de suplementos de zinco e ácido ascórbico, contraceptivos, antibióticos, gestação e presença de processos inflamatórios<sup>(11-13)</sup>.

Considerando que, na literatura, os estudos sobre a influência da concentração plasmática de cobre sobre as metaloproteínas cobre-dependentes foram realizados em mulheres atletas<sup>(4)</sup>, atletas femininas colegiais<sup>(6)</sup> e em meninos adolescentes<sup>(14)</sup>, justificase ter por objetivo avaliar a associação de diferentes níveis plasmáticos de cobre com metaloproteínas antioxidantes cobre-dependentes em atletas de elite adultos do gênero masculino.

## MÉTODOS

### Amostragem

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (Rio de Janeiro, Brasil). Atletas de elite (n = 50), do gênero masculino e adultos, participaram do estudo depois de receber explicações sobre os objetivos e fornecer o consentimento. Os atletas foram selecionados aleatoriamente, por representantes de cada federação, entre aqueles que mais despontavam. Todos os atletas participavam de competições nacionais e internacionais. Nenhum atleta consumia suplemento vitamínico ou mineral durante o desenvolvimento do estudo.

### Coleta de amostras

As amostras de sangue foram coletadas no dia posterior ao da competição específica de cada modalidade esportiva (triatlo, n = 10; corrida, n = 15; judô, n = 10; e natação, n = 15). Os atletas mantiveram a prática alimentar até às 22 horas do dia da competição, que era realizada sempre pela manhã. Após esse horário, iniciava-se o jejum para coleta de sangue, que ocorreu no Centro de Orientação Nutricional para Atletas (Instituto de Nutrição – UERJ) às 8:00 horas por punção venosa em tubos de ensaio contendo heparina como anticoagulante (30U/tubo). Foram tomadas todas as precauções para não haver contaminação por minerais durante a coleta e processamento do sangue. O sangue foi alíquotado para a realização do hemograma. O restante foi centrifugado a 1,800g por 10 minutos para separação do plasma. O *buffy coat* foi removido e os eritrócitos remanescentes foram lavados três vezes com NaCl a 0,9% gelado. As células lavadas foram lisadas e completadas ao volume inicial com água deionizada gelada. As alíquotas de plasma e eritrócitos lisados foram estocados a -20°C até o momento das análises.

### Análises laboratoriais

Hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos foram determinados por analisador hematológico automático (*Cell-Dyn/Co-bas Vega*, Florida, EUA). Zinco e cobre plasmáticos foram medidos por espectrometria de absorção atômica (*Perkin Elmer Plasma modelo AA1475*, Massachusetts, EUA). A heparina utilizada possuía baixo teor de zinco (0,005µg Zn/1.000U), não afetando a quantidade final de zinco plasmático. A ceruloplasmina foi determinada no plasma através do método baseado em sua atividade de oxidase sobre a *p*-fenilenodiamina<sup>(15)</sup>. A atividade da superóxido dismutase nos eritrócitos foi determinada usando o método do pirogalol<sup>(16)</sup> e os resultados foram expressos por grama de hemoglobina. A metalotioneína nos eritrócitos foi medida usando a adaptação do método de afinidade do <sup>109</sup>Cd à hemoglobina<sup>(17)</sup>, tal como descrito por Zapata *et al.*<sup>(18)</sup>, e também foi expresso por grama de he-

moglobina. O coeficiente de variação intra-ensaio para todas as medidas foi menor do que 5%. Todas as análises foram feitas em duplicata ou triplicata.

### Determinação do ponto de corte para o cobre plasmático

Para avaliar a influência da concentração plasmática de cobre sobre os indicadores cobre-dependentes, os resultados obtidos foram subdivididos de acordo com a concentração plasmática de cobre (< 11µmol/L; 11-13µmol/L e > 13µmol/L), segundo a DRI/02<sup>(19)</sup>, a qual preconiza que valores plasmáticos inferiores a 11µmol/L devem ser considerados como indicativo de deficiência em cobre.

### Análises estatísticas

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados encontravam-se dentro de distribuição normal. A comparação estatística entre os índices bioquímicos foi realizada utilizando ANOVA *one-way on ranks*, seguido pelo teste de Dunn. A associação entre os indicadores foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de *p* considerado como significativo foi de < 0,05. Para realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o *software* estatístico *SCG Plus Version 7.0* (Statistical Graphycs Corporation Plusware, EUA).

## RESULTADOS

Os atletas apresentavam idade média de 27 ± 6 anos, os valores médios de hemoglobina (155 ± 15g/L) e hematócrito (45 ± 3%) estavam adequados e similares, não demonstrando influenciar outros indicadores por hemodiluição ou hemoconcentração. Todos os atletas apresentaram valor médio de zinco plasmático acima de 10µmol/L, não demonstrando sinais de deficiência desse mineral. A contagem de leucócitos (5,5 ± 2,0x10<sup>3</sup> células/µL) não demonstrou presença de processos infecciosos.

Na tabela 1, encontram-se os resultados dos indicadores cobre-dependentes agrupados de acordo com a concentração plasmática de cobre. Cerca de 32% (n = 16) dos atletas encontravam-se com concentração plasmática de cobre inferior a 11µmol/L classificado como deficiente pela DRI 2002<sup>(19)</sup>; 38% (n = 19), com concentração entre 11-13µmol/L; e 30% (n = 15), com concentração > 13µmol/L. Os valores plasmáticos apresentaram diferença significativa (*p* < 0,05) entre todos os grupos, resultado que garantiu verificar a associação de diferentes concentrações de cobre plasmático com metaloproteínas cobre-dependentes em atletas de elite.

**TABELA 1**  
Distribuição dos indicadores bioquímicos cobre-dependentes nos atletas avaliados de acordo com a concentração plasmática de cobre

Variáveis	Níveis de cobre plasmático, µmol/L			
	n	< 11	11-13	> 13
		16	19	15
Cobre plasmático (µmol/L)		9,8 ± 1,0	11,9 ± 0,5	14,1 ± 0,8*
Metalotioneína (nmol/g hemoglobina)		3,1 ± 1,0	3,1 ± 0,9	2,8 ± 0,6
Ceruloplasmina plasmática (mg/L)		248 ± 49	295 ± 93	306 ± 71**
Cu-Zn superóxido dismutase (U/g hemoglobina)		900 ± 200	873 ± 209	764 ± 142***

Resultados descritos como média ± desvio-padrão. Comparação por ANOVA *one-way on ranks*, seguido pelo teste de Dunn.

\* Diferença significativa entre todos os grupos (*p* < 0,005).

\*\* Diferença significativa (*p* < 0,05) entre o grupo > 13µmol/L vs o grupo < 11µmol/L.

\*\*\* Diferença significativa (*p* < 0,05) entre o grupo > 13µmol/L vs os grupos 11-13µmol/L e < 11µmol/L.

Considerando os diferentes níveis de cobre plasmático empregados neste estudo, a concentração de ceruloplasmina plasmática, a atividade da Cu-Zn SOD e da metalotioneína eritrocitárias apresentaram comportamento inverso. Enquanto a Cu-Zn SOD (*p*

= 0,05) e a metalotioneína ( $p = 0,06$ ) reduziram sua atividade, a concentração plasmática de ceruloplasmina aumentou ( $p = 0,03$ ) frente aos elevados valores de cobre plasmático ( $> 13\mu\text{mol/L}$ ).

As associações observadas entre os indicadores, quando considerado o conjunto de atletas, são demonstradas na tabela 2.

**TABELA 2**  
**Associações entre os indicadores bioquímicos**  
**cobre-dependentes nos atletas avaliados (n = 50)**

Indicadores	Grau de associação	
	r	p
Cobre plasmático x Cu-Zn SOD	-0,32	0,02
Cobre plasmático x Ceruloplasmina	0,31	0,04
Metalotioneína x Cu-Zn SOD	0,73	0,00
Metalotioneína x Ceruloplasmina	-0,40	0,006
Cu-Zn SOD x Ceruloplasmina	0,37	< 0,0001

Grau de associação determinado pelo coeficiente de correlação de Spearman.

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a ter como objetivo determinar a associação entre diferentes concentrações de cobre plasmático e concentração de metaloproteínas cobre-dependentes com ação antioxidante. A limitação deste estudo foi não determinar a ingestão de cobre diária pelos atletas, porém esta limitação não prejudicou a interpretação dos resultados.

A concentração de cobre plasmático em atletas pode apresentar-se elevada<sup>(8)</sup> ou inalterada<sup>(14)</sup>. Alguns autores acreditam que a magnitude da perda de cobre através do suor seja uma justificativa para tais alterações, embora não conduza a deficiência de cobre<sup>(14,20-21)</sup>. As diversas concentrações plasmáticas encontradas por diferentes estudos<sup>(8,14)</sup> podem ser também parcialmente explicadas pelo treinamento físico crônico que, aparentemente, estimula mecanismos de defesa antioxidante, mobilizando o cobre plasmático para síntese de ceruloplasmina e Cu-Zn SOD<sup>(22)</sup>.

No presente estudo, a distribuição dos atletas de acordo com a concentração plasmática de cobre possibilitou observar que 32% deles apresentavam níveis inferiores ao limite mínimo de adequação previsto pela DRI/02 ( $< 11\mu\text{mol/L}$ )<sup>(19)</sup>. Apesar da reduzida concentração plasmática de cobre, nenhum atleta apresentou valores de ceruloplasmina abaixo do considerado adequado ( $180\text{mg/dL}$ )<sup>(19)</sup>. No entanto, não podemos classificá-los nutricionalmente como deficientes em cobre, nem como adequados, uma vez que o cobre plasmático e a ceruloplasmina podem ser afetados pela atividade física intensa.

A ceruloplasmina é uma glicoproteína presente no plasma, sintetizada pelo fígado e dependente de cobre<sup>(9)</sup>. Suzuki *et al.*<sup>(23)</sup> encontraram, em ratos deficientes em cobre, baixos teores de ceruloplasmina devido à preferência de mobilização do cobre hepático disponível para os *chaperones* (CCS) responsáveis pela síntese de Cu-Zn superóxido dismutase e não para os *chaperones* (ATOX 1) envolvidos com a síntese de ceruloplasmina, evitando assim o efluxo do cobre para a corrente sanguínea na forma de ceruloplasmina.

A função antioxidante da ceruloplasmina consiste não apenas em sua capacidade de manter os íons cobre e ferro ligados à suas proteínas específicas, evitando que os mesmos participem da reação de Fenton, mas também no seu efeito varredor sobre os ânions superóxido e outras espécies reativas de oxigênio<sup>(24)</sup>.

Durante o exercício físico intenso, há liberação de espécies reativas de oxigênio<sup>(7)</sup> e estímulo ao processo inflamatório através da liberação de citocinas<sup>(25)</sup>, podendo resultar em elevação da concentração de ceruloplasmina<sup>(26)</sup>, já que tanto a síntese quanto a liberação de ceruloplasmina no plasma são estimuladas pelas interleucinas 1 e 6<sup>(27)</sup>. No entanto, é possível que o aumento de ceruloplasmina em resposta às interleucinas no exercício físico esteja também associado ao seu papel como antioxidante<sup>(22,26)</sup>.

A concentração de ceruloplasmina, no presente estudo, foi sensível à concentração de cobre plasmático. Os atletas não apresentavam contagem de leucócitos pertinente à presença de processos inflamatórios. Logo, podemos sugerir que, neste caso, a ceruloplasmina desempenhava papel de antioxidante plasmático, protegendo o organismo dos maiores teores disponíveis de cobre. As metaloproteínas intracelulares desempenham papel semelhante ao da ceruloplasmina, sendo importante na proteção antioxidante e na manutenção da homeostase de cobre<sup>(28-29)</sup>.

Os eritrócitos, por estar constantemente expostos ao oxigênio, requerem mecanismos de defesa antioxidante muito ativos para prevenir ou reduzir lesões oxidativas. A Cu-Zn superóxido dismutase eritrocitária protege essas células da ação dos íons superóxido, que são radicais lesivos<sup>(30)</sup>. Como o exercício físico intenso é promotor de radicais livres, alguns autores encontraram maiores teores de metaloproteínas após a atividade física<sup>(14,22,31)</sup>, embora outros não tenham observado resultados semelhantes<sup>(30)</sup>. A discrepância relatada pode ser justificada pelos diferentes ensaios empregados para determinar a atividade da superóxido dismutase. Além disso, outros fatores influenciam a atividade dessa enzima, como o momento de coleta<sup>(7)</sup>.

A metalotioneína é uma proteína rica em resíduos de cisteína capaz de ligar zinco, cádmio e cobre, sendo importante na manutenção intracelular de níveis adequados desses metais<sup>(11,13)</sup>. Apresenta propriedades antioxidantes importantes, inibindo reações de propagação de radicais livres através da ligação seletiva de íons de metais pró-oxidantes, tais como ferro e cobre, e dos potencialmente tóxicos, como cádmio e mercúrio. Além disso, é um potente varredor de espécies reativas de oxigênio<sup>(10)</sup>. Somente dois estudos determinaram a concentração de metalotioneína eritrocitária em atletas. Estes concluíram que a metalotioneína é sensível ao exercício físico intenso e de alto impacto<sup>(22)</sup>, mas não ao tempo de repouso pós-exercício<sup>(32)</sup>.

No presente estudo, a Cu-Zn SOD e a metalotioneína eritrocitárias apresentaram menores valores quando o cobre plasmático encontrava-se em maior concentração, possivelmente, devido à maior mobilização do cobre pelo fígado para a síntese da ceruloplasmina e manutenção do sistema antioxidante plasmático<sup>(10)</sup>. Essa afirmativa pode ser observada pelas associações do cobre plasmático com a Cu-Zn SOD (negativa) e com a ceruloplasmina (positiva), quando considerados todos os atletas. As associações positivas observadas entre a metalotioneína eritrocitária e a Cu-Zn SOD e destas com a ceruloplasmina demonstraram o sensível equilíbrio entre os sistemas antioxidantes intra e extracelulares em atletas de elite.

Em conclusão, as metaloproteínas cobre-dependentes estudadas demonstraram que mantêm associação com diferentes concentrações plasmáticas de cobre, sendo as intracelulares (Cu-Zn SOD e metalotioneína) sensíveis à baixa concentração e a extracelular (ceruloplasmina), sensível a maior concentração. Isso, possivelmente, em virtude da mobilização do cobre para os sistemas antioxidantes, sugerindo que há um equilíbrio homeostático entre os antioxidantes intra e extracelulares em função da proteção aos diferentes níveis de cobre.

A suplementação nutricional com micronutrientes é crescente no meio esportivo, sendo sua real necessidade questionada<sup>(33)</sup>. Apesar de o presente estudo não ter avaliado o hábito dietético dos atletas, alertamos para o fato de que manipulações dietéticas (uso indiscriminado de suplementos contendo zinco ou ferro) podem afetar os níveis das metaloproteínas estudadas, prejudicando a homeostase do cobre e o cumprimento de sua função antioxidante, afetando diretamente a funcionalidade e a integridade celular.

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

## REFERÊNCIAS

1. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2003;189:147-63.
2. Gutteridge JMC. Inhibition of the Fenton reaction by the protein ceruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact*. 1985;56:113-20.
3. Fabisiak JP, Tyurin VA, Tyurina YT, Borisink GG, Korotalva A, et al. Redox regulation of copper metallothionein. *Arch Biochem Biophys*. 1999;1:171-81.
4. Nuviala RJ, Lapieza MG, Bernal E. Magnesium, zinc, and copper status in women involved in different sports. *Int J Sports Nutr*. 1999;9:295-309.
5. Fogelholm M, Ranikem T, Isokaanta M, Kujala U, Uusitupa M. Growth, dietary intake and trace element status in pubescent athletes and schoolchildren. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32:738-46.
6. Gropper SS, Sorrells LM, Blessing D. Copper status of collegiate female athletes involved in different sports. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2003;13(3):343-57.
7. Rádko Z. In Free radicals in exercise and aging. Zsolt Rádko, editor. Champaign, IL: Human Kinetics; 2000. p. 264-350.
8. Tuya IR, Gil PE, Mariño MM, Carra RM, Misiego AS. Evaluation of the influence of physical activity on the plasma concentrations of several trace elements. *Eur J Appl Physiol*. 1996;73:299-303.
9. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Ann Rev Nutr*. 2002;22:439-58.
10. Suzuki KT, Someya A, Komada Y, Ogra Y. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *J Inorg Biochem*. 2002;88:173-82.
11. Uauy R, Olivares M, Gonzales M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:952-9S.
12. Failla ML, Johnson MA, Prochaska JR. Copper. In: Bowman BA, Russel RM, editors. *Present knowledge in nutrition*; 373-81, Washington DC, IL: ILSI; 2001. p. 373-81.
13. Shreedhar B, Krishnapillai NM. Modulation of aconitase, metallothionein, and oxidative stress in zinc-deficient rat intestine during zinc and iron repletion. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:999-1008.
14. Lukaski HC, Hoverson BS, Gallagher SK, Bolonchuk WW. Physical training and copper, iron, and zinc status of swimmers. *Am J Clin Nutr*. 1990;51:1093-9.
15. Sunderman FW, Nomoto S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin Chem*. 1970;16:209-20.
16. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide dismutase anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47:469-71.
17. Eaton DL, Toal BF. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1982;66:134-42.
18. Zapata CLV, Simões TMR, Donangelo CM. Erythrocyte metallothionein in relation to other biochemical zinc indices in pregnant and non-pregnant women. *Biol Trace Elem Res*. 1997;57:15-23.
19. Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes for vitamin A; vitamin K; arsenic; boron; chromium; copper; iodine; iron; manganese; molybdenum; nickel; silicon; vanadium and zinc*. Washington, DC: National Academic Press; 2002.
20. Aruoma OI, Reill T, Macharen D, Halliwell B. Iron, copper and zinc concentration in human sweat and plasma, the effect of exercise. *Clin Chim Acta*. 1988;177:81-8.
21. Fogelholm M. Micronutrients: interaction between physical activity, intakes and requirements. *Public Health Nutr*. 1999;2:349-56.
22. Koury JC, Oliveira Junior AV, Portella ES, Oliveira CF, Lopes GC, Donangelo CM. Zinc and copper biochemical indices of antioxidant status in elite athletes of different modalities. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2004;14:364-78.
23. Suzuki KT, Someya A, Komada Y, Ogra Y. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to copper-deficient diets in mice. *J Inorg Biochem*. 2002;88(2):173-82.
24. Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I. *J Biol Chem*. 1971;246(9):3018-23.
25. Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E. Structure, oxidant activity and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci*. 1995;56(21):1749-58.
26. Meyer T, Gabriel HHW, Ratz M, Muller HJ, Kindermann W. Anaerobic exercise induces moderate acute response. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:549-55.
27. Anuradha CV, Balakrishnam SD. Increased lipoprotein susceptibility to oxidation following long distance running in trained subjects. *Clin Chim Acta*. 1998;271:97-103.
28. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr*. 2000;130:1455S-8S.
29. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*. 1995;64:97-112.
30. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 1997;37:235-9.
31. Tauler P, Gimeno I, Aguiló A, Guix MP, Pons A. Regulation of erythrocyte antioxidant enzymes activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflügers Arch*. 1999;438(6):782-7.
32. Koury JC, Oliveira CF, Portella ES, Oliveira Junior AV, Donangelo CM. Effect of the period of resting in elite judo athletes. Hematological indices and copper/zinc-dependent antioxidant capacity. *Biol Trace Elem Res*. 2005;107:201-11.
33. Lukaski HC. Micronutrients (Mg, Zn, Cu): are mineral supplements needed for athletes? *Int J Sports Nutr*. 1995;5:574-83.