

MÔNICA CRUVINEL DE LIMA

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO SOBRE OS NÍVEIS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS**

CAMPO GRANDE
2012

MÔNICA CRUVINEL DE LIMA

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO SOBRE OS NÍVEIS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guido Marks.

CAMPO GRANDE
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

MONICA CRUVINEL DE LIMA

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor. Guido Marks

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Doutor. Baldomero Antonio Kato da Silva

Instituição: Universidade Federal do Piauí

Profª. Doutora. Iandara Schettert Silva

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Aos meus queridos pais, **Oswaldo e Iolanda** pelo exemplo, amor, sacrifícios e renúncias.

Ao meu companheiro, **Gabriel**, pelo amor e pelo apoio que me incentivam e me guiam em todos os desafios.

AGRADECIMENTOS

- A **Deus** pela saúde e capacidade para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao **Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste**, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a concretização deste projeto.
- Ao meu orientador Prof. Dr. **Guido Marks** por ter contribuído com minha formação científica e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.
- À Prof^ª. Dr^ª. **Iandara Schettert** pela participação na revisão do trabalho e execução da experimentação cirúrgica
- Ao Prof. Dr. **Baldomero Antônio Kato**, pela participação na revisão do trabalho e análise estatística.
- À Prof^ª. Dr^ª. **Lourdes Zanoni**, pela execução e participação nas análises de peroxidação lipídica.
- Ao Técnico **Anderson**, pela participação nas análises.
- À Técnica **Camila** pela participação no armazenamento amostral.
- Ao Técnico **Osmar** pela participação e auxílio no espectrofotômetro.
- À acadêmica **Daiani Miotti** pela participação na execução do experimento.

*“A vida é como andar de bicicleta:
para manter o equilíbrio, deve-se
ficar em movimento.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

LIMA MC. Efeito do exercício físico aeróbico sobre os níveis de estresse oxidativo em camundongos. Campo Grande; 2012. [Dissertação- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Avaliar a influência do exercício físico aeróbico sobre o estresse oxidativo em camundongos. **Método:** Utilizou-se no estudo 20 camundongos (*Swiss*), distribuídos em dois grupos: controle-sedentário (GA, n=10) e exercício (GB, n=10). Todos os animais permaneceram em período de adaptação de sete dias. A seguir o grupo GB foi submetido a exercício físico em roda giratória angulada montada sobre eixo articulado por 5 minutos durante 3 dias consecutivos. Decorridos quatro dias de experimento, os animais do (GB) foram submetidos à única sessão de exercício por 45 minutos. Após foram realizados eutanásia e coleta das amostras. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada por meio da mensuração dos níveis de malondialdeído pelo método do TBA. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 535nm. **Resultados:** A análise de MDA intergrupos evidenciou aumento não significativo na comparação entre os tecidos avaliados. Diferença significativa foi observada na comparação intragrupo para o GA ($p = 0,0201$). Evidenciaram-se valores significativamente inferiores no músculo cardíaco em relação ao plasma. A análise de variância do GB apontou diferença significativa entre os tecidos ($p = 0,0009$), com valores menores no músculo cardíaco em relação ao plasma ($p < 0,001$), e maiores no músculo estriado em relação ao músculo cardíaco ($p < 0,05$). **Conclusão:** O exercício físico aeróbico promoveu aumento não significativo sobre os níveis de estresse oxidativo em camundongos. **Descritores:** estresse oxidativo, exercício aeróbico, peroxidação de lipídeos.

ABSTRACT

LIMA MC. MC. Effect of aerobic exercise on levels of oxidative stress in mice. Campo Grande; 2012. [Dissertation- Federal University of Mato Grosso do Sul].

Purpose: To evaluate the influence of aerobic exercise on oxidative stress in mice. **Methods:** The study included twenty female mice *Mus musculus*-Swiss divided into two groups: sedentary control (GA) and exercise (GB), each containing ten animals. All animals underwent an adaptation period of seven days isolated in individual boxes. After this period, the animals in the exercise group (GB) were trained in angled running wheel with circumference of 25 cm assembled on an articulated axle during 5 minutes for 3 consecutive days. On the fourth day, they underwent an exercise program of one session lasting 45 minutes. The evaluation of oxidative stress was performed by determining the levels of malondialdehyde by the TBA method. The samples were read in a spectrophotometer at 535 nm. **Results:** The MDA intergroup analysis did not reveal significant increase when comparing the evaluated tissues. A significant difference was observed in the control group ($p = 0.0201$) during the intragroup comparison. Significant lower values were noticed in the smooth tissue than in plasma. The GB analysis indicated significant difference among the tissues ($p = 0.0009$), with lower values in the smooth muscle in relation to plasma ($p < 0.001$) and higher in striated muscle in relation to smooth muscle ($p < 0.05$), was observed. **Conclusion:** Physical exercise did not result in significant increase on the levels of oxidative stress in mice.

Key words: oxidative stress, aerobic exercise, lipid peroxidation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média \pm desvio padrão dos níveis de MDA (ng/mL) nos grupos analisados. Campo Grande, MS, 2011. (n = 20).....	37
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Esquema representativo da geração de radicais.....	16
FIGURA 2-	Delineamento. Distribuição dos grupos: número de animais, realização do exercício físico e período para a coleta da amostra.....	33
FIGURA 3-	Roda de Corrida	34
FIGURA 4-	Roda de corrida em estrutura cilíndrica	34
FIGURA 5-	Esquema representativo de exercício físico	34
FIGURA 6-	Comparação dos níveis de MDA (ng/mL) no Plasma, Músculo Liso, e Músculo Estriado entre os tecidos avaliados. (Teste <i>t</i> de <i>Student</i> ; $p = 0,0869$), (Teste <i>t</i> de <i>Student</i> ; $p = 0,2409$), (Teste <i>t</i> de <i>Student</i> ; $p = 0,2835$).....	37
FIGURA 7-	Comparação intragrupo nos níveis de MDA (ng/mL) entre os diversos tecidos analisados para o Grupo Controle (ANOVA; $p = 0,0201$).....	38
FIGURA 8-	Comparação intragrupo nos níveis de MDA (ng/mL) entre os diversos tecidos analisados para o Grupo Exercício (ANOVA; $p = 0,0009$).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DCV	Doença Aterosclerótica Cardiovascular
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSSG	Oxidada ou Dissulfeto
h	horas
HPLC	Cromatografia Gasosa
HSPs	Heat Shock Proteins
km/h	kilômetros por hora
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade baixa
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
PL	Peroxidação Lipídica
Ph	Potencial Hidrogênico
RLs	Radicais Livres
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
SRATB	Teste das Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
XD	Xantina Desidrogenase
XO	Xantina Oxidase
4-HNE	4-hidroxynonenal
8-OhdG	8-hidroxideoxiguanosina

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
Cu-Zn-SOD	Enzima SOD com cobre e zinco
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
SH	Sulfidrilas
-SS	Dissulfeto
H•	Hidrogênio
L•	Radical de Lipídeo
LOO•	Radical Peroxila
LOOH	Hidroperóxido de Lipídeo
Mn-SOD	enzima SOD com manganês
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
Lexc	Comprimento de onda de excitação
Lem	Comprimento de onda de emissão
nm	nanômetros
μl	microlitros
VO ₂ ^{max}	Volume Máximo de Oxigênio
Ca ⁺	Cálcio
KCL	cloreto de Potássio
ml	mililitro
min	minutos
mg	miligramas
nmol	nanomol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo	16
<u>2.1.1 Principais espécies reativas de oxigênio</u>	17
2.2 Sistema de Defesa Antioxidante	19
2.1 <u>Antioxidante Enzimático</u>	20
2.2.2 <u>Antioxidantes Biológicos Não-Enzimáticos</u>	22
2.3 Peroxidação Lipídica	23
2.3.1 <u>Malondialdeído como Marcador de Peroxidação Lipídica</u>	25
2.4 Exercício Físico	26
3 OBJETIVOS	31
3.1. Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Local e período	32
4.2 Animais de experimentação	32
4.3 Grupos experimentais	32
4.4 Exercício físico	33
4.5 Coleta da amostra e armazenamento	34
4.6 Eutanásia	35
4.7 Avaliação de Peroxidação Lipídica	35
4.8 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	53
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. O oxigênio consumido tem como principal via de metabolismo o sistema aeróbio, ou seja, a mitocôndria. Esse sistema é responsável pela utilização de 85 a 90% de todo o oxigênio consumido, os outros 10 a 15% sendo utilizados por enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta (SCHENEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas intra e extracelulares, criando então o chamado “paradoxo do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, ou ainda reações de auto oxidação, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidantes gerando um potencial dano oxidativo a estruturas celulares. Sendo assim o equilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes é essencial para manutenção da homeostasia celular (equilíbrio redox) (SIES, CADENAS, 1985).

Espécies reativas de oxigênio, em sub-doses letais, atuam como moléculas modificadores intra celulares de genes expressão, e podem mediar processos de proliferação e diferenciação celulares. Em níveis mais altos, essas substâncias podem iniciar ou executar a morte da célula por apoptose (BLOOMER, 2005).

Hábitos de vida inapropriados tais como ingestão de álcool, fumo e dieta inadequada, condições ambientais impróprias, tais como exposição à radiação não ionizante UV e ondas curtas, poluição, alta umidade relativa e temperatura elevada, estados psicológicos que provocam estresse emocional, o envelhecimento e o exercício físico realizado de forma extrema também estão associados ao estresse oxidativo (ELSAYED, 2001).

A quantidade de espécies produzidas durante o exercício está diretamente relacionada com a velocidade do metabolismo aeróbio. O exercício aumenta os processos oxidativos dos músculos, levando a um aumento da geração de EROs e de seus subprodutos no homem (WOLINSKY, HICKSON JR, 1996).

O exercício excessivo praticado por atletas treinados podem prover exposição de ERO que exceda o efeito protetor de qualquer resposta adaptável alcançada no treinamento. Outros fatores que podem se sobrepor ao exercício para indução do dano oxidativo, por exemplo é a deficiência nutricional antioxidante. Durante a execução de protocolos de exercício com baixa intensidade e duração, defesas antioxidantes parecem ser suficientes contra a produção de EROs, mas em níveis de intensidade e/ou duração aumentados de exercício, essas defesas não são mais suficientes, resultando em dano oxidativo circundante para os tecidos (LONGO *et al.*, 2008).

A natureza aleatória dos ataques realizados pelas EROs dificulta a caracterização de seus produtos de reação, mas todas as moléculas biológicas são suscetíveis às suas lesões oxidativas. A oxidação dos lipídios poliinsaturados nas células rompem a estrutura das membranas biológicas, e as lesões oxidativas no DNA podem produzir mutações. Quando os radicais livres escapam do sistema antioxidante e atacam os ácidos graxos insaturados na dupla ligação entre alguns átomos de carbono ocorre o início de uma reação em cadeia que irá alterar a estrutura da membrana. A esta reação se denomina peroxidação lipídica que é intensamente deletéria ao organismo (ARUOMA, 1994).

A peroxidação lipídica é uma das principais conseqüências do estresse oxidativo e uma das reações mais utilizadas para a avaliação do mesmo, sendo considerada como um indicador indireto da ação dos radicais livres (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 1990).

O exercício físico pode induzir a peroxidação lipídica conduzindo a problemas como inativação de enzimas da membrana celular, diminuição da efetividade do sistema imune, e progressão de doenças crônico-degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares (MIYAZAKI, *et al.*, 2001).

Dentre os aldeídos originados pela peroxidação lipídica na membrana está o malondialdeído (MDA) que tem sido objeto de grande interesse apesar de sua origem complexa e ainda não totalmente esclarecida. O MDA tem sido amplamente utilizado como marcador do estresse oxidativo (DRAPER, HADLEY, 1990).

Estudos têm demonstrado que o exercício físico intenso provoca estresse oxidativo em animais e humanos, estando possivelmente relacionado, por exemplo, com fadiga e lesões teciduais. Os fatores relacionados ao aumento de peroxidação lipídica através do exercício físico são a intensidade, nível de aptidão física, status antioxidante, o tecido a dieta e a recuperação (MIYAZAKI, *et al.*, 2001).

Apesar dos diversos trabalhos abordando o tema em questão, na literatura consultada apresentam-se lacunas em relação aos efeitos do exercício físico para análise da peroxidação lipídica. Diante disso, o presente estudo visou avaliar a influência do exercício físico aeróbico envolvendo medidas de peroxidação lipídica nos diferentes tecidos corporais em camundongos relacionando-as de uma forma separada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (GILLHAN *et al.*, 1997).

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

Os radicais livres são liberados durante a produção de energia, estão envolvidos com a fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. No entanto, em excesso apresentam efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação, agressão às proteínas e ao DNA (BARREIROS, DAVID, 2006).

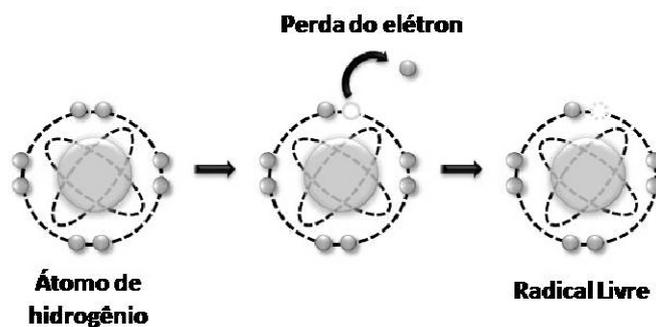


Figura 1 - Esquema representativo da geração de radicais (WOLKMER, 2009).

Conforme Schneider e Oliveira (2004), o oxigênio (O_2) que respiramos é metabolizado em nosso organismo da seguinte maneira: aproximadamente 85 a 90% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação diretas. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase

remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O_2 para formar água (em torno de 95 a 98% dos 85 a 90% citados acima). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio.

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO ou em inglês ROS: “Reactive Oxygen Species”) é produzida na cadeia respiratória mitocondrial, onde 95-98% do oxigênio consumido é reduzido à água e o restante utilizado na formação de ERO (2 a 5%). A molécula de oxigênio pode aceitar um total de quatro elétrons para ser reduzida a duas moléculas de água, mas pode, também, ser reduzida por um elétron por vez, levando à produção de ERO (CARDOSO, 2008).

O termo “Espécies Reativas de Oxigênio” inclui além dos Radicais Livres de Oxigênio (RLO) (como o radical superóxido e o radical hidroxila), espécies não-radicaís como, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mensageiro secundário na transdução de sinal intra e extra-celular), o ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante produzido por neutrófilos, o oxigênio singlet (uma forma altamente reativa do oxigênio) (BARREIROS, DAVID, 2006).

2.1.1 Principais espécies reativas de oxigênio

As EROs mais estudadas são, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) por serem produzidas em grande quantidade pelo metabolismo aeróbio (EVANS, HALLIWELL, 2001).

Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O radical superóxido é formado após a primeira redução do oxigênio molecular por elétron. O radical superóxido possui ação bactericida, sendo permeável a membranas, e produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, é capaz de oxidar moléculas como o ácido ascórbico e tiois (FERREIRA, MATSUBARA, 1990).

Radical hidroxila (OH^{\cdot})

É considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^{\cdot} com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi

produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1986; FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Por não possuir elétrons desemparelhados na sua última camada, geralmente não é considerado como um radical livre. Porém, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o OH^\bullet . O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{+2} . Assim, é altamente tóxico para as células, esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro. A reação do H_2O_2 com os metais de transição como o ferro e o cobre, é denominada reação de Fenton, onde há a liberação do radical hidroxila (HALLIWELL, CHIRICO, 1993).

Oxigênio singlet (1O_2)

É a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O 1O_2 tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença. Embora as ERO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Em condições fisiológicas normais, as EROs podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose. No entanto, o aumento na sua produção e/ou a redução na sua

eliminação gera um desequilíbrio fisiológico, caracterizando o estresse oxidativo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

O estresse oxidativo está relacionado a situações onde os mecanismos celulares pró-oxidantes (produção de ERO e ERN) superam os mecanismos de defesas incluindo os sistemas enzimáticos e outros antioxidantes. É um estado em que há uma elevada produção de espécies reativas. Este estado está comumente ligado a danos celulares como, por exemplo, peroxidação de lipídios, fragmentação de proteínas e ácidos nucleicos. A regulação adaptativa dos sistemas de defesa pode proteger, parcialmente ou totalmente, a célula contra os danos oxidativos, mas pode também levar a danos teciduais e eventualmente a morte celular por necrose ou apoptose (VALKO *et al.*, 2007). Portanto, caso não haja nenhum mecanismo de defesa eficiente, esse estado pode trazer prejuízos significativos à saúde.

Um alvo muito importante dos radicais livres é o DNA. A formação de radicais livres próximo ao DNA pode resultar na oxidação de bases de pirimidina e purina, e quebras na fita. Dentre as bases, a guanina é altamente sensível à oxidação (formação de 8-hidroxideoxiguanosina, 8-OhdG) mediado por radicais livres. Essas alterações no DNA têm sido associadas com processos mutagênicos e carcinogênicos. A partir da década de 80, cresceu o interesse sobre as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) através de estudos que revelaram que tais Radicais Livres estavam relacionados a doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, enfisema pulmonar, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Para lidar com este paradoxo, a célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas ERO geradas pelo metabolismo aeróbio, organizada em diferentes níveis. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

2.2 Sistema de Defesa Antioxidante

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Dessa forma, os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (JORDÃO JR. *et al.*, 1998; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

Os antioxidantes protegem o organismo inibindo as reações ligadas à formação de radicais livres, impedindo a perda da integridade celular e, ainda, reparando as lesões causadas por tais compostos (AMORIM, TIRAPEGUI, 2008).

Como as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para minimizar seus efeitos agressores. Cabe salientar que a composição das defesas antioxidantes difere de tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo, em um dado tecido (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

O equilíbrio entre a produção de radicais livres e defesa antioxidante serve para determinar o estado redox intracelular, que por sua vez desempenha um papel na otimização da função celular (ALLEN, TRESINE, 2000).

Células de mamíferos são dotados de vias de sinalização que são sensíveis para o meio redox intracelular e pode ser ativado pelo estresse oxidativo. Assim, perturbações transitórias no equilíbrio redox, causando uma mudança para uma ambiente mais oxidante, podem ocorrer via aumento na produção de RONS e / ou de defesa antioxidante diminuída e parecem servir como um "sinal" para a ativação de vários mecanismos de sinalização celular importante para a ideal função fisiológica (FISHER, BLOOMER, 2009).

Para uma melhor distinção entre os vários tipos de antioxidantes, essas biomoléculas são classificadas conforme a sua estrutura em enzimáticos e não-enzimáticos (URSO, CLARKSON, 2003).

2.2.1 Antioxidante Enzimático

O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a glutathione peroxidase (GPx); catalase (CAT); e superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000; BELLÓ, 2002). Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui as EROs e, conseqüentemente a oxidação de estruturas biológicas.

2.2.1.1 Glutathione peroxidase (GPx)

A GPX é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos para água e álcool, usando a glutathione como doador

de elétrons. A GPX está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial (MIYAMOTO *et al.*, 2003)

A GPx apresenta-se sob 4 formas: GPx1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA (RAYMAN, 2000).

A glutationa oxidada ou dissulfeto (GSSG) formada é regenerada para GSH através da glutationa redutase (GR) com transferência de elétron do NADPH. A atividade da GPx pode ser promovida pela suplementação dietética com selênio, e seus principais locais de ação são fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculos (MAXWELL, 1995).

2.2.1.2 Catalase (CAT)

A enzima CAT catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio. Na reação, uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água (CHANCE *et al.*, 1979). Está localizada, principalmente, no peroxissoma, entretanto, outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT.

Em animais, a catalase está presente em todos os órgãos vitais do corpo, principalmente no fígado, o qual possui uma concentração de peróxido de hidrogênio ligeiramente baixa (INOUE, 1994).

2.2.1.3 Superóxido-dismutase (SOD)

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas abundantes em células aeróbias e é das mais importantes enzimas antioxidantes. Por ser o primeiro grupo enzimático no combate aos radicais livres, cabe a ela a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2000).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está

localizada primariamente na mitocôndria. O papel benéfico e protetor da SOD vem sendo demonstrado numa variedade de patologias tanto clínicas quanto pré-clínicas (MAXWELL, 1995).

2.2.2 Antioxidantes Biológicos Não-Enzimáticos

Compreende os antioxidantes hidrofílicos (Glutathiona reduzida, vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina E e carotenóides). A glutathiona reduzida (GSH) é o principal antioxidante não-enzimático endógeno e pode ser encontrada em vários tecidos biológicos, sendo que no sangue, 99,5% da GSH é intra-eritrocitária. Sua função antioxidante se dá pela capacidade de ser um doador imediato de elétrons para neutralizar H_2O_2 e lipoperóxidos, e também pela capacidade de seqüestrar EROs e ERNs (NOZAL *et al.*, 1997; HALLIWELL, GUTERIDGE, 2000).

2.2.1.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas. (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

2.2.1.2 Vitamina E ou tocoferol

O termo vitamina E é a designação comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis. O alfa-tocoferol é o composto mais potente e a forma predominante da vitamina E. A vitamina E é encontrada em vegetais e oleaginosas, gérmen de trigo e em menores quantidades em carnes, peixes e vegetais. A recomendação diária para homens e mulheres são 15 mg/dia de alfa-tocoferol (SKOL, 1988).

O alfa-tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da lipoperoxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas. Ao interceptar o radical peroxila resultante da lipoperoxidação, torna-se oxidado formando o radical tocoferil, que poderá ser regenerado pelo ascorbato ou glutatona ou ubiquinol a alfa-tocoferol (POWERS, HAMILTON, 1999; ADAMS, BEST, 2002).

2.2.1.3 Vitamina C

A vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato) é hidrossolúvel e considerada como um antioxidante extracelular importante (FINAUD *et al.*, 2006). Fontes de vitamina C incluem frutas cítricas, morangos, melões, kiwis, tomates e folhas verdes. O cozimento pode destruir a vitamina, por isso, a melhor forma de obtê-la é através de alimentos *in natura*. A recomendação de ingestão diária é de 90 mg/dia para homens, 75 mg/dia para mulheres, com um acréscimo de 35 mg/dia para fumantes. Em pH fisiológico a vitamina C encontra-se na forma de ascorbato a qual é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H• para um radical. O ascorbato pode atuar como antioxidante diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar o alfa-tocoferol (SKOL, 1988).

2.3 Peroxidação Lipídica

Os lipídios constituem uma grande variedade de diferentes compostos hidrofóbicos que incluem ácidos graxos, fosfolipídios, esteróides, e outras substâncias. Os ácidos graxos são a maior fonte de combustível metabólico, além de serem moléculas estruturais da membrana celular. Os ácidos graxos são particularmente vulneráveis a peroxidação pelo ataque por OH⁻ (LITTLE, GLADEN, 1999).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos resultando na lipoperoxidação. As membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídeos, os quais possuem uma porção polar e duas hidrofóbicas. Geralmente, as “caudas” hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, e também no grau de instauração (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Quando ocorre um desequilíbrio metabólico, as ERO atacam os ácidos graxos insaturados das membranas celulares num processo chamado de peroxidação lipídica (PL). Este mecanismo resulta em modificações nos

lipídeos de membrana e esta perde suas características arquitetônicas, tornando-se mais firme e menos flexível. A ação das EROs na membrana leva a destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e formação de produtos citotóxicos (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos, assim como na formação das EROs.

Deste modo, o processo de PL representa um evento citotóxico primário que desencadeia diversas injúrias às células, ocasionando destruição da estrutura da membrana e de mecanismos de troca de metabólitos, o que leva a apoptose celular (PETRY ÉR *et al.*; 2010).

Nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

A lipoperoxidação consiste em 3 fases: iniciação, propagação e término. Na fase de iniciação (1), o radical RL remove hidrogênio do ácido graxo insaturado produzindo um radical de lipídeo ($L\bullet$), que ao reagir com o oxigênio molecular forma o radical peroxila ($LOO\bullet$). Na propagação (2) o $LOO\bullet$ retira hidrogênio de outro lipídeo, formando o hidroperóxido de lipídeo (LOOH) e $L\bullet$ e assim sucessivamente. Na fase terminal (3), os radicais produzidos se combinam formando um não-radical. O LOOH pode sofrer outras reações produzindo aldeídos e alcanos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo dos reagentes, dentre outros. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxyononal (4-HNE) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O grau de peroxidação dos fosfolipídios é determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) e o método comumente aplicado de mensuração é o de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER, 1993).

As principais metodologias utilizadas para a avaliação da LPO em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Portanto, é importante utilizar as várias técnicas disponíveis, pois a sua escolha dependerá do propósito do investigador, ou seja, da fase do processo de LPO que se pretenda avaliar. Um método considerado ideal na mensuração da LPO deve: (1) identificar e quantificar produtos derivados especificamente do processo de peroxidação; (2) ter um baixo coeficiente de

variação, quando analisadas amostras diferentes de um mesmo indivíduo; (3) não estar sujeito a interferências de outras biomoléculas; (4) empregar técnicas robustas e, portanto, mais confiáveis; (5) não sofrer interferência direta da dieta e (6) ter sensibilidade para mensurar níveis basais dos produtos (GUTTERIGGE 1995; HALLIWELL, 2000).

2.3.1 Malondialdeído como Marcador de Peroxidação Lipídica

O Malondialdeído (MDA) é composto de três carbonos, e um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados (principalmente ácido aradônico) e seus ésteres, sendo formado pela cisão destes ácidos graxos, após a peroxidação (DUARTE *et al.*; 2008).

Aldeídos são geralmente espécies reativas capazes de formar adutos e complexos em sistemas biológicos e o MDA não é exceção, embora as principais espécies em pH fisiológico é o íon enolato que é de baixa reatividade relativa. Consistentes provas estão disponíveis para a reação entre MDA e macromoléculas celulares, como proteínas, RNA e DNA. Vários experimentos têm demonstrado que o MDA prontamente modifica proteínas e reage com DNA para formar adutos de desoxiguanosina e desoxiadenosina que pode ser mutagênico e estes podem ser quantificados em vários tecidos humanos (LYKKESFELDT, 2007).

Embora a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados é a principal fonte de MDA in vivo, outras fontes menores existe como subprodutos da geração de radicais livres por ionização radiação e da biossíntese de prostaglandinas (VALENZUELA, 1991).

A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular. O método introduzido por Yagi (1976) tem sido amplamente utilizado. O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência (553 nm). Se a formação de produtos derivados do MDA usualmente requer pH baixo e temperaturas elevadas (80-100 °C), algumas substâncias fluorescentes derivadas do MDA podem ser geradas em pH neutro e temperatura mais baixa (37 °C) (ANTUNES *et al.*; 2008).

Os produtos da lipoperoxidação podem ser classificados em primários (dienos conjugados e hidroperóxidos) ou secundários (isoprostanos e MDA). Apesar de ser produto

secundário a quantificação do MDA é usualmente utilizada para identificar situações oxidativas (FINAUD *et al.*, 2006). Existem diferentes métodos laboratoriais para a determinação do MDA, o mais empregado é quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MORRISSEY, SHEEHY, 1999).

O ensaio mais simples e mais freqüentemente usado para a oxidação lipídica é o ácido tiobarbitúrico TBA ou ensaio. Geralmente sob forte condição ácida e aquecimento, as amostras biológicas reagem com TBA levando à formação de rosa "produtos coloridos que podem ser mensurados por métodos colorimétricos ou fluorimétrico (LYKKESFELDT, 2007).

O teste padrão, introduzido por Kohn e Liversedge, em 1944, é bastante popular porque é simples e rápido, porém inespecífico. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. Essa reação, chamada de "teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (SRATB)", representa múltiplos métodos que utilizam o TBA, formando o complexo MDA: TBA (1:2), que tem absorção máxima em 532 nm e apresenta fluorescência ($\lambda_{exc} = 515 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 553 \text{ nm}$). Neste teste utiliza-se como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano ou tetraetoxipropano (YU *et al.*, 1986).

2.4 Exercício Físico

Segundo Thompson *et al.* (2003), a atividade física pode ser definida como um movimento físico produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético pelo organismo; e o exercício físico como uma atividade física estruturada e de repetição que visa melhora ou manutenção do condicionamento cardiorrespiratório e físico, incluindo força muscular, a composição corporal e flexibilidade.

As taxas metabólicas elevadas como resultado de exercício físico podem aumentar dramaticamente o consumo de oxigênio ($VO_{2máx}$) em até de 20 vezes em relação aos valores de repouso e 100 vezes a nível muscular (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O aumento do consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na formação de radicais livres de oxigênio, substâncias conhecidas simplesmente como radicais livres. Estas moléculas estão aumentadas nos exercícios de alta intensidade e extenuantes e foram relacionadas a um grande número de doenças como enfisema pulmonar, doenças inflamatórias, aterosclerose, câncer e envelhecimento. (SCHINEIDER, OLIVEIRA, 2004). Por outro lado, sabe-se que a atividade

física é uma conhecida forma de estresse e a exposição crônica a ela, chamada treinamento físico, é capaz de disparar adaptações em resposta a uma maior produção destes radicais livres (ALBRIGHT *et al.*, 2000).

A prática de exercícios físicos predominantemente aeróbios provoca aumento do fluxo de oxigênio na mitocôndria, sendo que aproximadamente dois a cinco por cento deste oxigênio não são completamente reduzidos, formando assim ERO. Por outro lado, apesar do exercício anaeróbio ser executado independente do aporte de oxigênio, a produção excessiva de ERO tem sido verificada durante esse tipo de esforço, provavelmente por outros mecanismos (SOUZA *et al.*, 2006).

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é considerada a principal fonte de radicais livres no exercício aeróbio. Vários dos centros de oxirredução existentes nos quatro complexos enzimáticos que compõem a cadeia respiratória podem ser oxidados por oxigênio molecular, resultando na formação de radical superóxido (VOLLARD, SHEARMAN, 2005).

Outro mecanismo considerado responsável pela produção de radicais livres no exercício é o processo de isquemia-reperfusão. Em exercícios realizados em intensidade acima do $VO_{2máx}$, o tecido muscular pode sofrer hipóxia, pela falta de circulação sanguínea após repetidas contrações (isquemia). A reoxigenação destes tecidos logo depois do rápido aumento no fluxo sanguíneo (reperfusão) pode levar à produção de radicais livres. Esta isquemia, seguida de perfusão causada pelo exercício intenso, promove a conversão de xantina desidrogenase (XD) em xantina oxidase (XO) e forma radical superóxido como subproduto final da reação (SMITH, REID, 2006).

Até recentemente, acreditava-se que a síntese de radicais livres na atividade física tinha apenas efeitos deletérios para o organismo. Hoje, é reconhecido que baixos níveis de radicais livres presentes na musculatura em repouso podem sinalizar etapas da contração normal. As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio modulam vários elementos da função celular, como captação de glicose, metabolismo mitocondrial, transcrição gênica e catabolismo muscular. Tais metabólitos ainda têm complexos efeitos autócrinos/parácrinos nos componentes celulares que regulam a contração (AMORIM, TIRAPEGUI, 2008).

O estresse oxidativo tem sido associado com a diminuição da performance, fadiga, dano muscular e excesso de treinamento (*overtraining*). Por essa razão, alguns pesquisadores sugerem que reduzir o estresse oxidativo pode melhorar a tolerância ao exercício bem como a performance física (POWERS *et al.*, 1999). Embora os benefícios do aumento no $VO_{2máx}$ sejam bem estabelecidos, um paradoxo bioquímico é verificado. O aumento no consumo máximo de O_2 é essencial para a aptidão cardiovascular e performance, porém o aumento no

consumo durante o exercício pode ser prejudicial. Dependendo do tipo e intensidade do exercício, têm sido propostos vários mecanismos na geração de ERO, segundo König e Berg (2002):

1) Aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ na cadeia respiratória.

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^{+} . A XO converte a hipoxantina para xantina e ácido úrico usando o oxigênio molecular como receptor de elétrons, formando assim o $O_2^{\bullet-}$.

3) Ativação de neutrófilos polimorfonucleares após danos musculares induzidos por exercício: o exercício leva à formação de várias células do sistema imune como neutrófilos, monócitos e macrófagos que são capazes de produzir ERO. Entre essas células, os neutrófilos são a maior fonte de produção de $O_2^{\bullet-}$ pela reação NADPH-oxidase.

4) Menor homeostase do cálcio em músculos estressados: o exercício leva a uma isquemia muscular e à diminuição da homeostase do Ca^{+} , o que favorece a produção de ERO por reações catalisadas pela XO (CHEVION *et. al.*, 2003).

Em geral os danos musculares causados pelo estresse oxidativo são mais evidentes em indivíduos pouco treinados, que realizam exercícios com intensidade e duração acima do seu estado de condicionamento físico. Já foi observado que o estresse oxidativo ocasionado pelo exercício agudo intenso pode ser minimizado, pela realização de um treinamento, com sobrecargas progressivas e ajustadas, antes dos indivíduos serem submetidos a um estresse agudo de alta intensidade (MYIAZAKI, *et al.*, 2001).

O exercício crônico aumenta a expressão da *Heat Shock Proteins (HSPs)*, proteínas de estresse com função de reparo e prevenção de danos teciduais, no músculo esquelético e cardíaco, por exemplo, sendo capaz de reduzir a extensão da apoptose (morte celular programada) em ratos que realizaram exercício aeróbico moderado, por diminuir os níveis de genes pró-apoptóticos, e aumentar os níveis de genes anti-apoptóticos (SIU *et al.*, 2004)

O envolvimento de exercícios de alta intensidade no estresse oxidativo tem sido demonstrado através da detecção direta de radicais livres, da demonstração de aumento na peroxidação lipídica e ainda pela diminuição dos níveis de antioxidantes em diversos órgãos após atividade física intensa (DAVIES *et al.*, 1982; ALESSIO, 1993).

A peroxidação lipídica parece ser um importante mecanismo pelo qual o exercício induz lesão e pode ser monitorada através da determinação da concentração de marcadores bioquímicos tais como, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e dienos conjugados (URSO, CLARKSON, 2003). Contudo, há ainda divergências sobre o papel da peroxidação lipídica na lesão muscular induzida por exercício intenso.

Tem sido relatado aumento na peroxidação lipídica, detectado através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), após exercícios de intensidades alta e moderada (ALESSIO, GOLDFARB, 1988). KANTER *et al.*, (1988), observaram aumento de 77% na concentração de TBARS no plasma de humanos após corrida exaustiva e no músculo e fígado de ratos após exercício intenso (DAVIES *et al.*, 1982).

Um dos produtos de peroxidação lipídica na membrana é o Malondialdeído, um dialdeído altamente reativo que eventualmente reage com o amino grupo de proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, induzindo a modificações estruturais das moléculas biológicas (MIYAZAKI *et al.*, 2001). Marzatico *et al.*, (1997), estudando maratonistas e velocistas, encontraram níveis de Malondialdeído (MDA) de repouso mais elevados nestes dois grupos de corredores, quando comparados a indivíduos sedentários.

Durante o exercício físico, o fígado parece ser um importante alvo da peroxidação lipídica, uma vez que, tanto o exercício submáximo quanto o exercício realizado até a exaustão em esteira, induzem aumento significativo nas concentrações de MDA (SOUZA *et al.*; 2006)

Apesar de não ter sido constatado uma relação entre dose-resposta no que se refere à intensidade do exercício quanto aos níveis de peroxidação lipídica, quando a mesma foi acompanhada através dos gases etano e pentano expirados durante o exercício progressivo, apresentou uma relação dose-resposta com o exercício. Tais resultados demonstraram que há remoção dos produtos de peroxidação lipídica na recuperação após o exercício de carga progressiva (LEAF *et al.*, 1997).

Entretanto, mesmo que o exercício intenso induza a uma alteração significativa na produção de ERO, estudos recentes mostram que o exercício físico regular de endurance 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 ERO e os sistemas de reparos antioxidantes (ALESSIO, GOLDFARB, 1988).

Treinamento de endurance com exercício induzido protege contra o estresse oxidativo, elevando os níveis de enzimas antioxidantes no músculo esquelético e cardíaco.

Leeuwenburgh *et al.* (2001), descobriu que um programa de exercícios de 10 semanas aumentou a atividade da glutathiona peroxidase e superóxido dismutase na porção profunda do vasto lateral do músculo de ratos. Em outro estudo, detectou-se 33% aumento no conteúdo de glutathiona deste músculo em endurance ratos treinados. Os ratos também tinham 62% mais glutathiona peroxidase e 27% mais atividade da superóxido dismutase do que os controles não treinados. Além disso, Powers *et al.* (1994), descobriu que no músculo aumentam as enzimas antioxidantes induzidas pelo exercício físico quando os exercícios musculares são específicos.

A Peroxidação lipídica é dependente de diversos fatores, porém os resultados de diversos estudos envolvendo medidas de peroxidação lipídica frente ao estresse oxidativo induzido pelo exercício em diferentes órgãos e tecidos em diferentes modelos animais são contraditórios. Os fatores que estão relacionados à peroxidação lipídica durante e após o exercício são intensidade, nível de aptidão física, *status antioxidante* dos indivíduos, o tecido, a dieta e a recuperação, além do gênero (GINSBURG *et al.*, 2001).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos imediatos do exercício físico aeróbico sobre o estresse oxidativo em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar as respostas de stress oxidativo entre animais sedentários e exercitados;
- Analisar os níveis de malondialdeído plasmático em ambos os grupos;
- Analisar níveis de malondialdeído nos tecidos cardíaco e muscular estriado.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local e Período

O estudo foi realizado no Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande – MS, no período compreendido entre os meses de Novembro e Dezembro de 2011.

4.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 20 (vinte) *Camundongos (Mus musculus-Swiss)* fêmeas de padrão sanitário convencional - oriundos do Biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, (UFMS). Todos os animais tinham idade média de 4 semanas, com peso entre 19 e 24 gramas.

Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno com dimensões de 19,3 cm de largura, 30,3 cm de profundidade e 12,6 cm de altura, com tampas/grades de aço inoxidável contendo espaço para ração e água – Brasholanda ®. A temperatura foi mantida entre 21° a 23° C, em um fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro, em estante ventilada. Os locais de alojamento e experimentação eram isolados de focos de ruídos fortes evitando assim transtornos no comportamento e fisiologia dos animais.

A alimentação/hidratação aos animais se manteve *ad libitum* substituída a cada três dias. A ração ofertada foi da marca Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes®.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS conforme o protocolo n° 310/2011 (ANEXO A).

4.3 Delineamento

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos distintos de acordo com o exercício físico e eutanásia sendo cada grupo subdividido em controle GA: (Controle-Sententário = 10) e GB: (Exercício= 10).

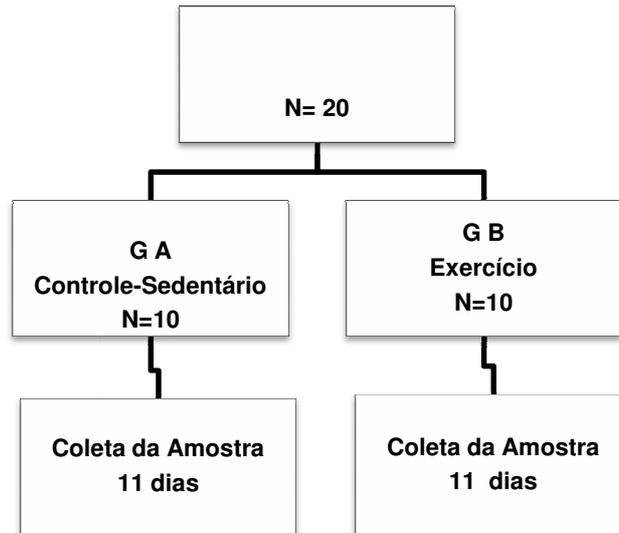


Figura 02: Distribuição dos grupos: Controle e Exercício.

4.4 Exercício Físico

Todos os animais passaram por um período de adaptação de sete dias isolados em caixas individuais. Após esse período os animais do grupo exercício (GB) foram submetidos um treinamento em uma roda giratória angulada com circunferência de 25 cm montada sobre um eixo articulado da marca Bioserv e contida em estrutura cilíndrica por 5 minutos durante 3 dias consecutivos. No quarto dia os animais do GB foram submetidos individualmente a um programa de exercício de única sessão com duração de quarenta e cinco (45) minutos. Os animais que se recusavam a correr eram encorajados com estímulos táteis em suas costas. Os que mesmo assim se recusavam a correr foram excluídos da amostra. Cada animal realizou exercício durante quarenta e cinco (45) minutos contínuos, e após foram submetidos à eutanásia. Os animais sedentários foram mantidos nas caixas durante todo o experimento e a alimentação foi retirada durante as sessões de exercício do grupo GB.

O peso dos animais foi aferido em balança de precisão com variação de um centésimo de grama marca Shimadzu. A pesagem foi realizada em todos os animais durante o estudo (no início para o período de adaptação, e no final do período de exercício) procedendo-se o registro em formulário próprio.



Figura 3- Roda de Corrida

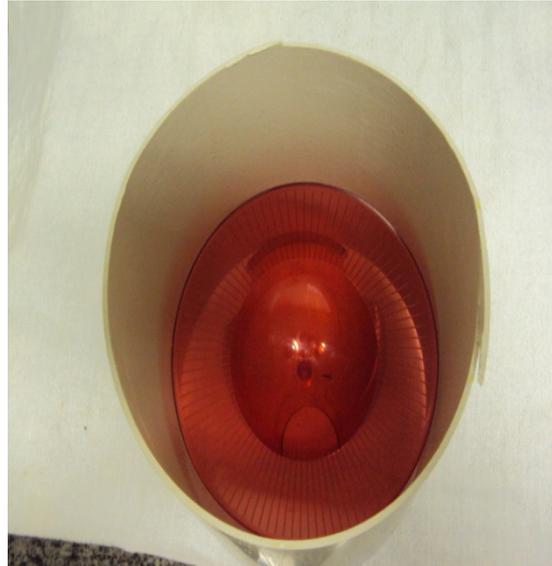


Figura 4- Roda de corrida em estrutura cilíndrica



Figura 5- Exercício Físico

4.5 Coleta da amostra e Armazenamento

Imediatamente após o término do exercício físico, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (10%) mais xilazina (2%), associadas em uma única seringa, na proporção de 1ml de quetamina (100mg) para 1ml de xilazina (20mg) e administrado 0,1mL da mistura para cada 100g de peso vivo do animal. Amostras de sangue foram coletadas através da punção cardíaca e armazenados em microtubos com anticogulante. O plasma foi separado, após centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos. O mesmo ficou armazenado a -86°C . Pós-coleta de amostras sanguíneas, os animais foram submetidos à eutanásia para a retirada dos

demais tecidos. Foi realizada a tricotomia da região torácica e a mesma foi aberta via incisão mediana transesternal, e o coração foi dissecado. Após foi realizada a tricotomia do membro inferior na parte posterior da pata do animal, e realizado o acesso caudal ao músculo gastrocnêmio e sóleo, onde foi realizada a dissecação muscular. Imediatamente após a coleta dos tecidos os mesmos foram lavados em solução de cloreto de Potássio (KCL) 1,15%, e armazenados em *eppendorf* identificados e congelados em nitrogênio líquido.

4.6 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia com administração intraperitoneal com uso letal de thiopental sódico (150 mg/Kg).

4.7. Avaliação de Peroxidação Lipídica

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada por meio da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) resultantes da peroxidação lipídica pelo método do TBA.

4.7.1 Quantificação de malondialdeído plasmático pelo método do TBARS

Amostras séricas de plasma foram descongeladas em temperatura ambiente, e adicionadas em tubos de ensaio identificados. Para cada 125 microlitros de plasma foram adicionados 250 microlitros de TBA. Terminada a pipetagem de amostra todos os tubos foram fechados com tampa rosca e colocados em banho Maria à temperatura de 94°C, onde permaneceram durante 1h. Após uma hora em banho Maria à 94°C as amostras foram resfriadas em repouso sob bancada à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos. Terminado o resfriamento, foram acrescentados a cada tubo de ensaio 1ml do reagente álcool n-Butílico. A seguir, cada um deles, individualmente, foi misturado em agitador de tubos tipo vortex, para que houvesse a máxima extração do MDA para a fase orgânica. Por fim, os tubos foram centrifugados a 3500rpm durante 10 minutos. Ao término da centrifugação a amostra foi separada em duas fases. Cerca de 3ml do sobrenadante corado foi colocado em cubetas para leitura no espectrofotômetro a 535 nm.

4.7.2 Quantificação de malondiadeído tecidual pelo método do TBA

O processo de homogeneação do tecido iniciou-se com o descongelamento da peça em temperatura ambiente seguida de uma nova lavagem da mesma em solução de KCl 1,15%. Após a peça foi retirada da solução de lavagem, seca cuidadosamente com gases e pesada em balança analítica. Com uma pipeta descartável, acrescentou-se solução de KCl 1,15% a uma proporção de 10:1 em massa. A peça imersa em solução de KCl 1,15% foi cortada em pequenos pedaços (os menores possíveis), visando facilitar a homogeneação. Após o becker contendo o material foi levado para homogeneação no triturador (Turrtec TE-102) O tempo de permanência da peça no aparelho assim como a sua potência foi regulado individualmente para cada tipo de tecido. Ao término, o homogenado foi passado para um tubo de ensaio. Em seguida, foi centrifugado a 2500rpm por 10 minutos. Foram pipetados 500 microlitros do sobrenadante, e adicionado cerca de 1 ml de TBA levado em banho maria por 1 hora. Após as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Terminado o resfriamento, foram acrescentados a cada tubo de ensaio 1ml do reagente álcool n-Butílico. À seguir, cada um deles, individualmente, foram misturados em agitador de tubos tipo Vortex (QL-901) por 40 segundos, e centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos. Cerca de 3ml do sobrenadante corado foi colocado em cubetas para leitura no espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de MDA em cada cubeta foi expressa em ng/ml.

Antes de iniciar a leitura das amostras o espectrofotômetro foi calibrado ajustado para leitura a **535nm**. A seguir, o aparelho foi zerado com a solução controle (branco), e realizada a leitura do controle padrão para MDA.

Para o cálculo da concentração de MDA foi utilizada uma equação obtida através da curva padrão de absorbância gerada por concentrações conhecidas como padrão.

4.7 Análise Estatística

As medidas das variáveis numéricas foram expressas em média \pm desvio padrão. Para comparação intergrupos utilizou-se o Teste *t* de *Student* para amostras independentes. A análise intragrupos foi feita utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) com *post hoc test* de *Tukey*. A normalidade dos grupos foi analisada através do teste de *Shapiro-Wilk*. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

A tabulação dos resultados foi feita no software Microsoft Office Excel 2007, e o cálculo de normalidade no programa Bioestat 5.0. A comparação dos dados e elaboração dos gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism 4.0.

5 RESULTADOS

Evidenciou-se aumento não significativo na comparação intergrupos dos níveis de MDA nos tecidos avaliados.

Tabela 1: média \pm desvio padrão dos níveis de malondialdeído (ng/mL) nos grupos analisados. Campo Grande, MS, 2011. (n = 20)

	Controle		Exercício		p
	Média	DP	Média	DP	
Plasma	1072,57	±354,46	1311,78	±221,13	0,0869
Músculo Cardíaco	663,35	±185,65	784,99	±257,17	0,2409
Músculo Estriado	934,18	±355,92	1106,42	±340,62	0,2835

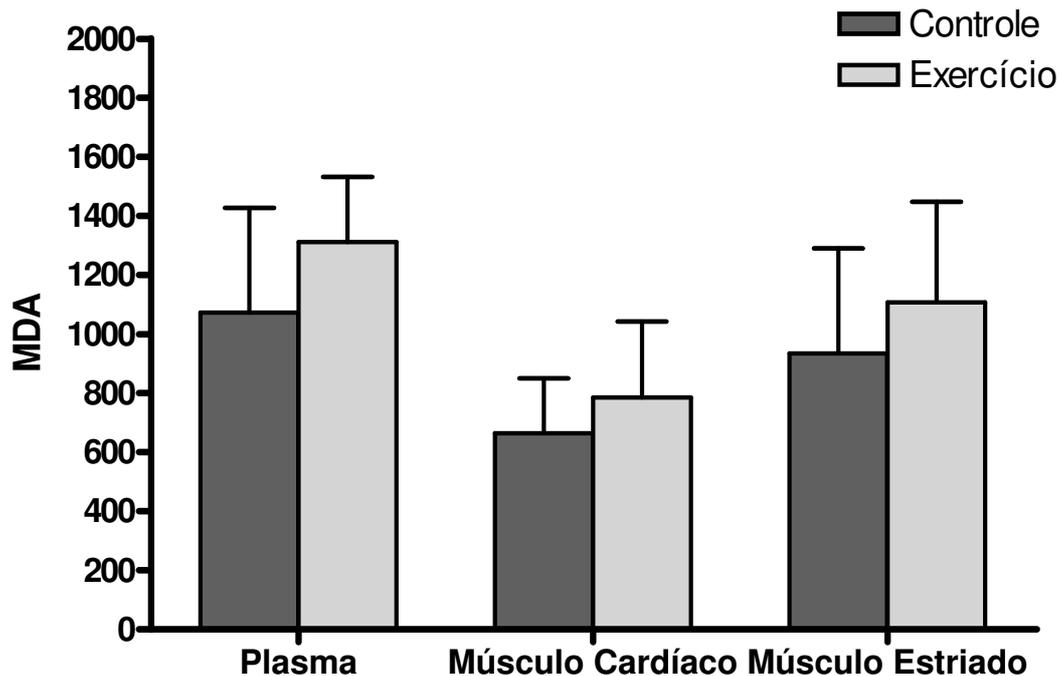


Figura 6: Níveis de MDA (ng/mL) no Plasma, Músculo Cardíaco, e Músculo Estriado entre os tecidos avaliados. (Teste *t* de Student; $p = 0,0869$), (Teste *t* de Student; $p = 0,2409$), (Teste *t* de Student; $p = 0,2835$).

Diferença significativa foi observada na comparação intragrupo dos níveis de MDA para o grupo Controle (ANOVA; $p = 0,0201$). O post hoc test de Tukey apontou valores significativamente inferiores de MDA no músculo liso em relação ao plasma.

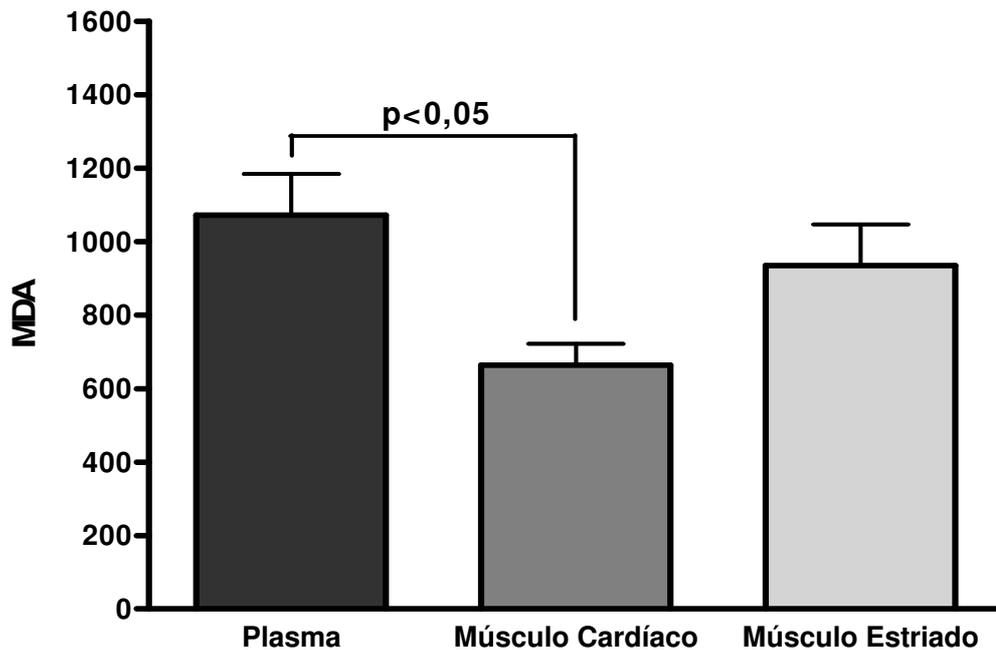


Figura 7: Comparação intragrupo nos níveis de MDA (ng/mL) entre plasma, músculo liso, músculo estriado para o Grupo Controle (ANOVA; $p = 0,0201$).

Na Análise de variância do grupo exercício observou-se diferença significativa na comparação entre os tecidos ($p = 0,0009$), com valores significativamente menores no músculo liso em relação ao Plasma (Tukey; $p < 0,001$), e maiores no músculo estriado em relação ao músculo Cardíaco (Tukey; $p < 0,05$).

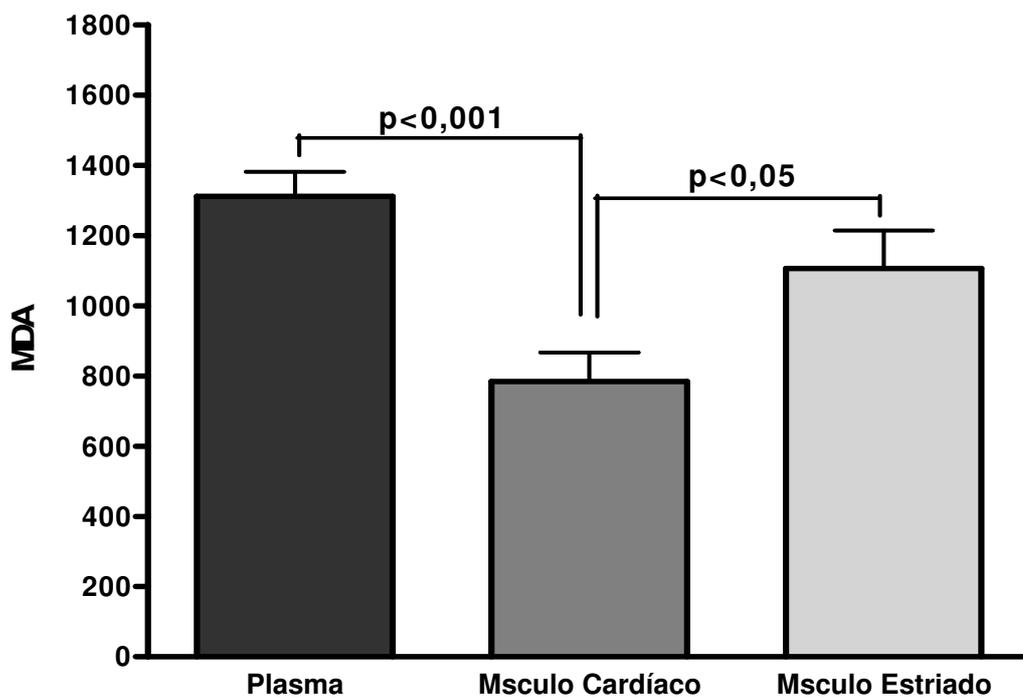


Figura 8: Comparação intragrupo nos níveis de MDA (ng/mL) entre os diversos tecidos analisados para o Grupo Exercício (ANOVA; $p = 0,0009$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou os efeitos do exercício físico aeróbico sobre biomarcadores do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica em camundongos. A atividade física é conhecida por promover saúde e bem-estar. O exercício também é responsável por aumentar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) pelo acréscimo do consumo de oxigênio mitocondrial nos tecidos. O desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas oxidantes dos tecidos pode provocar danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA. O dano oxidativo a lipoproteínas, em particular, lipoproteína de baixa densidade (LDL), é conhecida por desempenhar um papel num número de doenças associadas com o envelhecimento, tais como a doença cardiovascular, câncer e demência (ALDRED, MANJIT, 2011).

Estudos recentes demonstram que o aumento de espécies reativas de oxigênio provoca danos a lipoproteínas, lipídios, DNA e proteínas e o estresse oxidativo induzido por modificações destas moléculas têm sido implicado em doenças por muitos caminhos. Uma doença amplamente suposta a estar associada com stress oxidativo elevado é a doença aterosclerótica cardiovascular (DCV). O estresse oxidativo é acreditado por desempenhar um papel significativo na iniciação e progressão da aterosclerose (STROBEL *et al.*, 2011).

No presente estudo os níveis de MDA foram mensurados no sentido de observar a influência do exercício aeróbico sobre a formação de estresse oxidativo nos diferentes tecidos estudados. O método de avaliação utilizado foi escolhido por constar em muitos trabalhos na literatura, por ser considerado um veículo rápido e econômico para estudo de produtos finais de peroxidação lipídica. O malondialdeído (MDA) é um dos importantes produtos finais da peroxidação lipídica nos tecidos e é geralmente aceito como um índice da intensidade da peroxidação. O teor de MDA no plasma confirma que o exercício físico é capaz de gerar os radicais livres que, por sua vez, provocam peroxidação lipídica, o efeito está relacionado com a intensidade do exercício (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Historicamente, o método mais comum para medição da peroxidação lipídica através do malondialdeído tem sido ensaio com substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malondialdeído é um aldeído estável de decomposição e subproduto de peroxidação lipídica e pode ser medido diretamente através de HPLC, Cromatografia gasosa ou, espectrofotometria (KNIGHT *et al.*, 1988).

No presente trabalho as amostras foram colhidas para análise imediatamente após o término do exercício. Porém, devido à recuperação do fluxo sanguíneo renal nesse tempo, faz-se necessária a avaliação destes biomarcadores nos animais submetidos ao exercício intenso, em um tempo de repouso ainda maior do que o utilizado. Lipoperóxidos podem ser transferidos de um órgão ou tecido para outro e ser metabolizados por aqueles com alta capacidade oxidante. Isso é particularmente importante durante o exercício intenso porque a região esplênica tem seu fluxo sanguíneo grandemente diminuído nessa condição, enquanto é aumentado nos músculos esqueléticos. Assim, além da possibilidade de lipoperóxidos serem metabolizados por órgãos na região esplênica, fatores hemodinâmicos podem dificultar o transporte dos mesmos para essa região, elevando suas concentrações no plasma e demais tecidos onde os lipoperóxidos são produzidos durante o exercício físico intenso (SOUZA JR *et al.*, 2005). Essas afirmações apóiam-se em dados obtidos por Maugham *et al.*, (1989) que demonstraram que lipoperóxidos possuem suas concentrações aumentadas no plasma até seis horas após o exercício intenso.

O presente estudo avaliou os padrões de MDA em camundongos comparando os valores ao grupo controle como referência. Os valores de referência para os níveis de MDA total relatados na literatura apresentam grande variabilidade, estando relacionados com as condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios. Desta forma, os valores de MDA plasmático determinados para indivíduos saudáveis por Steghens *et al.* (2001), são $0,138 \pm 0,028 \mu\text{M}$, enquanto que para Pilz, Meineke e Gleiter (2000), são $2,16 \pm 0,29 \mu\text{M}$, em contraste com os valores obtidos por Sim *et al.* (2003) de $13,8 \pm 1,32 \mu\text{M}$, Londero e Greco (1996), de $0,85 \pm 0,25 \mu\text{M}$ e Mao *et al.* (2006), de $0,426 \pm 0,029 \mu\text{M}$. Considerando as variações entre os valores de referência citados, torna-se necessário a determinação de um intervalo de referência individualizado para cada método desenvolvido.

O exercício aeróbico utilizado neste estudo não foi capaz de induzir a elevação níveis de MDA em camundongos de maneira significativa em comparação ao grupo sedentário nos tecidos avaliados. No estudo de Child *et al.*, (1998), indivíduos treinados foram submetidos a uma prova de meia maratona simulada; observou-se, através da medida da capacidade antioxidante total e do ácido úrico, uma maior habilidade scavenger (capacidade de neutralizar os radicais livres formando compostos menos reativos) sobre os radicais livres do soro. Mas mesmo assim o exercício induziu aumento das concentrações de malondialdeído, sugerindo que tais respostas foram insuficientes para prevenir a lipoperoxidação induzida pelo exercício.

Nikolaidis *et al.*, (2006), ao submeterem homens fisicamente ativos a dois protocolos de exercício exaustivo, em esteira rolante, sendo um de longa e outro de curta duração, verificaram que ambos os protocolos de exercício induziram aumento na concentração plasmática de MDA. Em atletas submetidos a outros tipos de corrida de longa duração, Machefer *et al.*, (2007), observaram aumento na concentração plasmática de MDA, por até 72 horas após o exercício.

No respectivo trabalho não foi observado diferença significativa na comparação intergrupos dos níveis de MDA no tecido cardíaco avaliado, após treinamento em roda de corrida. O músculo cardíaco tem um alto consumo de oxigênio em condições de repouso. O fluxo sanguíneo coronário aumenta até quatro vezes a absorção de oxigênio durante o exercício. Embora seja essencial para o metabolismo aeróbio, o metabolismo de oxigênio aumentado pode levar a aumento do estresse oxidativo no coração durante o exercício físico (FRANKIEWICZ- JOZKO; FAFF; SIERADZAN-GABELSKA, 1996).

Gul *et al.* (2006), estudou um protocolo de 8 semanas de treinamento em esteira para a produção de enzimas antioxidantes e diminuição da peroxidação lipídica no tecido cardíaco de ratos. Os efeitos do exercício exaustivo agudo também foram investigados. O treinamento de resistência consistiu de corrida em esteira 1,30 h 5 dias por semanas para 8 semanas. Para o exercício exaustivo agudo, esteira graduada onde a velocidade foi aumentada gradualmente para 2,1 km/h a 95 min, e mantida constante até que os ratos foram esgotados. O Malondialdeído nível em tecido cardíaco não foi afetado pelo exercício exaustivo agudo em ratos sedentários e exercitados.

Neste estudo o exercício realizado em camundongos teve duração de 45 min, onde os resultados divergem aos citados, com valores de lipoperoxidação significativamente maiores no músculo estriado em relação ao músculo cardíaco. O músculo cardíaco e esquelético são tecidos funcionais muito diferentes. Arévalo *et al.* 1999, determinou as atividades de TBARS, SOD total, Cu- Zn-SOD e MnSOD, e os padrões de isoenzimas da SOD no músculo esquelético e cardíaco de ratos Wistar machos, jovens e idosos, em repouso e após o exercício rigoroso. O treinamento de exercício rigoroso foi realizado em uma esteira, com velocidades diferentes e inclinação. A média de tempo de exaustão para os ratos jovens foi de 55 min. Não houve diferenças nos níveis de lipoperoxidação após o exercício em ambos os tecidos.

Chiaradia *et al.* (1998), realizou um estudo para avaliação da peroxidação lipídica no plasma assim como seus efeitos sobre a lesão no músculo esquelético de cavalos. Os animais foram submetidos ao treinamento físico por 3 meses, 30 minutos por dia, 6 dias por semana, e a intensidade relativa de exercício foi gradualmente aumentada. Ele concluiu que o

exercício utilizado foi insuficiente para causar uma significativa lise das células do músculo esquelético. Os resultados obtidos indicaram que o exercício físico que adotado foi capaz de modificar tanto MDA e glutatona no conteúdo sanguíneo.

Não foram encontrados dados significativos a respeito da atividade dos níveis de MDA na comparação entre os grupos controle e exercício nos tecidos avaliados. Porém quando realizado o exercício, o músculo estriado se mostrou mais sensível à ação de lipoperoxidação comparado ao músculo cardíaco.

Com relação ao treinamento de força e estresse oxidativo, encontram-se poucos estudos disponíveis. Em um deles foi constatado que, quando a contração isométrica predomina no treino de força, ocorrem lesões oxidativas em biomoléculas demonstradas com mensurações sanguíneas de lipoperoxídios (SOUZA JR *et al.*, 2005).

Radák *et al.*(1995), após submeterem ratos a nove semanas de treinamento de natação, sendo as primeiras seis semanas com duração de 60 min e as demais com duração de 90 min, não verificaram modificações significativas de MDA no músculo gastrocnêmio, 24 h após a última sessão de treinamento. Por outro lado, Liu *et al.*(2000), após oito semanas de treinamento em esteira, verificaram maiores valores de MDA, nos músculos cardíaco e vasto lateral, após 48 h após da última sessão de treinamento com ratas. Entretanto, o mesmo não se confirmou após exercício agudo até exaustão. Alessio e Goldfarb (1988), por sua vez, após submeterem ratos a 18 semanas de treinamento em esteira, verificaram menores valores de MDA em repouso, no fígado e na porção profunda do músculo vasto lateral, quando comparados aos valores encontrados em indivíduos sedentários.

Ji (2002), demonstrou que em músculo esquelético uma carga isolada de trabalho exaustivo produzia um aumento de LPO e que a atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase, GPx, SOD e CAT estava significativamente aumentada.

Sabe-se que a destruição oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, é bastante lesiva por ser uma reação de auto-propagação na membrana (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1989). As controvérsias sobre os efeitos do exercício sobre a peroxidação lipídica são inúmeras, provavelmente, devido às diferentes intensidades e durações dos protocolos de exercício (ALESSIO, GOLDFARB, 1988). Neste trabalho não houve alterações nas análises do estresse oxidativo nos camundongos submetidos à sessão única de exercício aeróbico. Finalmente, como alternativas de estudo recomenda-se utilizar intervalos maiores associado a diferentes períodos para a coleta das amostras e análises de estresse oxidativo induzido pelo exercício.

7 CONCLUSÃO

O exercício físico aeróbico promoveu aumento não significativo sobre os níveis de estresse oxidativo em camundongos.

Evidenciou-se aumento não significativo nas análises de malondialdeído plasmático entre os grupos avaliados.

Em ambos os grupos pode se observar que o músculo cardíaco mostrou-se menos sensível à peroxidação lipídica quando comparado ao músculo estriado e plasma.

8 REFERÊNCIAS

Albright A, Franz M, Hornsby G, Kriska A, Marrero D, Ullrich I, et al. American college of sports medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32: 1345-60.

Adams AK, Best TM. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *The Physician and Sports Medicine.* 2002; 20 (5): 1-13.

Aldred S, Manjit, R. A moderate intensity exercise program did not increase the oxidative stress in older adults. *Arch gerontol Geriatr.* 2011; 53:350–353.

Alessio HM, GOLDFARB AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol;* 1988; 64:1333-6.

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (3):463-499.

Amorim AG, Tirapegui J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. *Rev. Nutr., Campinas.* 2008; 21(5): 563-575.

Antunes MV, Lazzaretti C, Camargo DG, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008; 44 (2): 279-287.

Arévalo AN, Canavate C, Del-Pino MJS. Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Aging research reviews.* 1999; 108:207–17.

Auroma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32 (7): 671-83.

Barreiros ALBS, David JM. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Rev. Quim Nova.* 2006; 29 (11): 113-123.

Belló A. Dano oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. Porto Alegre: Editora Ulbra, 2002; p. 15-19.

Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, Mckenze MJ, Consit LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stres. *J Strength Cond Res.* 2005; 19 (2): 276-85.

Cardoso-Silvano F. Efeitos terapêuticos do exercício físico em modelo animal de artrite. [Tese]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2008.

Chance B, Sies CH, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*1979; 59: 527-605.

Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100, (9): 5119-5123.

Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A. Porciello F. Antonioni MT, Gaiti A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp. biochem physiol Part B Biochem mol biol.* 1998; 119: 833–36.

Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc.* 1998; 30: 1603-7.

Davies KJA, Dhringarpure R. Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and inflammatory neuromuscular diseases. *Neurology.* 2006; 66:93-6.

Draper H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-31.

Duarte M, Noal RM, Bem AF. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. *RBAC.* 2008; 40(2): 101-6.

Elsayed NM. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition.* 2001; 17 (10): 828-34.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(5): 779-786. Supplement.

Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr.* 2006; 85 (2): 67-74.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil.* 1997; 43(1): 61-8.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress - Relationship with Exercise and Training. *Sports Med.* 2006; 36 (4): 327-358.

Frankiewicz - Jozko A, Faff J, Sieradzan-Gabelska B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur.J. Appl. Physiol.* 1996; 74: 470-74.

Gillham B, Papachistodoulou DK, Thomas JH. *Wills' : biochemical basis of medicine.* 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltda, p. 196-202, 1997.

Ginsburg GS, Otoole M, Rimm E, Douglas PS, Rifai N. Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon. *Ginsburg-gender and exercise-induced lipid peroxidation. Clin Chim Acta.* 2001; 305(1-2):131-9.

Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin F, Siktar E, Polat MF, Akar S, Akcay F, Dane S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp. biochem. physiol.,A, Comp. physiol.* 2006; 143: 239–245.

Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem.* 1995; 41 (12): 1819-29.

Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward ? *Cardiovas. Res.* 2000; 47: 410-18.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57: 715-25.

Halliwell B, Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Nova York: Oxford University Press. 2007;1: 851.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 3ed. New York: Oxford, 1999.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.

Halliwell B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986; 246: 501-14.

Halliwell B, Gutteridge, JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in biology and medicine.* 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

Hershiko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.* 1989; 26 (4): 277-85.

Inoue M. Protective mechanism against reactive oxygen species. En: *The Liver. Biology and Pathology*. Raven Press. 1994; 443-60.

Ji LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:82-92.

Jordão Junior AF, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação Lipídica e Etanol: Papel da Glutathiona Reduzida e da Vitamina E. *Medicina*, Ribeirão Preto. 1998;31: 434-49.

Kanter MM, Nolte LA, Holloszy JO. Efficacy of an antioxidant vitamin mixture on peroxidation at rest and portexercise. *J Appl Physiol*. 1993; 74: 965-69.

Knight JA, Pieper RK, Mc Clellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*. 1988; 34:2433-8.

Konig D, Berg A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. *Österreichisches J. Für Sportmedizin*. 2002; 3.

Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Med Chem*. 2001; 8 (7): 829-38.

Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy. A review of the literature. *Reprod Toxicol*. 1999; 13: 347-52.

Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*. 2000; 89 (1):21-28.

Longo UG, Oliva F, Denaro V, Maffulli N. Oxygen species and overuse tendinopathy in athletes. *Disability and Rehabilitation*. 2008; 30 (20-22): 1563–1571.

Londero D, Greco PL. Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehydethiobarbituric acid adduct in plasma. *J Chromatogr A*. 1996; 729: 207-210.

Lykkesfeldt, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta*. 2007; 380: 50–58.

Machefer G, Groussard C, Zouhal H, Vincent S, Youssef H, Faure H, Malardé L, Gratas-Delamarche A. Nutritional and Plasmatic Antioxidant Vitamins Status of Ultra Endurance Athletes. *J Am Coll Nutr*. 2007; 26:311- 316.

Mao J, Zhang H, Luo J, Li L, Zhao R, Zhang R, Liu G. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci*. 2006; 832 (1): 103-08.

Matsuo M, Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. *Free Radicals in Exercise and Aging*. Champaign: Human Kinetics, 2001; 1-33.

Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995; 39: 345-61.

Marzaticof, Pansarasao, Bertorelli L, Somenzini L, Dellavalleg. 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.

Maughan RJ, Donnelly AR, Gleeson M, Whitin PH, Walker KA. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve*. 1989; 12: 332-6.

Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem*. 2003; 384: 567-74.

Miyazaki H, Oh-Ishi S, Ookawara T, Kiazaki T, Toshinai K, Ha S, Hagas S, Ji LI, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2001; 84: 1-6.

Morrissey PA, Sheehy PJA. Optimal nutrition: vitamin E. *Proc Nutr Soc.* 1999; 58:459-68.

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38:1443-50.

Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Marinero P, Moral O, Manzanos L, Rodriguez E. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Journal of Chromatography A.* 1997; 778 (1-2): 347-53.

Petry ÉR, Alvarenga ML, Cruzat VF, Tirapegui J. Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. *R. bras. Ci. e Mov.* 2010;18 (4): 90-9.

Pilz J, Meineke I, Gleiter C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2000; 742: 315-25.

Powers SK, Hamilton K. Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med.* 1999; 18: 525–36.

Powers SK, Ji LL, Leuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1999; 31: 987-97.

Radák Z, Asano K, Inoue M, Kiazaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* 1995; 79(1):129- 35.

Rayman M P. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000; 356: 233-41.

Schneider CDE, Oliveira, AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* 2004; 10: 87-90.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985; 311(1152): 617-31.

Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DEL. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003; 785: 337-44.

Smith MA, Reid MB. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Resp Physiol Neurobiol.* 2006; 151(2-3): 229-41.

Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J.* 2004; 18: 1150- 2.

Sokol R J. Vitamin e deficiency and neurologic disease. *Ann. Rev. Nutr.* 1988; 8: 851-73.

Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2011; 147: 191–201.

Souza CF, Fernandes LC, Cyrino. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Durante o Exercício Aeróbico e Anaeróbico. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.* 2006; 8 (2):102-9.

Souza Jr TP, Oliveira PR, Pereira B. Exercício físico e estresse oxidativo. *Rev Bras Med Esporte.* 2005; 11(1): 91-6.

Steghens JP, Kappel ALV, Denis I, Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radical Biol Med.* 2001; 31(2): 242-49.

Thompson PD, Bucher D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation.* 2003; 107(24): 3109-16.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003; 189: 41-54.

Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci*. 1991; 48: 301-9.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 44-84.

Vollard NBJ, Shearman JP, Cooper CE. Exercise induced oxidative stress. Myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*. 2005; 35(12): 1045-62.

Wellman KF, Bloomer, R. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *DynaMed*. 2009; 8 (1): 1-25.

Wolinsky I, Hickoson JR, JF. *Nutrição no Exercício e no Esporte*. 2ed. São Paulo: Roca, 1996.

Wolkmer P. *Estudo da Peroxidação Lipídica in vivo e in vitro em ratos infectados experimentalmente com Trypanosoma evansi [Tese]*. Santa Maria; Universidade Federal de Santa Maria; 2009.

Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med*. 1976; (15): 212-6.

Yu LW, Latriano L, Duncan S, Hartwick R, Wityg. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and *trans-trans*-muconaldehyde. *Anal. Biochem*. 1986; 156: 326-33.

APÊNDICES

APÊNDICE A- PESAGEM DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO

Grupo Controle			Grupo Exercício		
	Pré-experimento	Pós-experimento		Pré-experimento	Pós-experimento
1	21.67g	21.70 g	11	23.45 g	23.45 g
2	21.93g	22.68 g	12	22.23 g	21.13 g
3	21.20 g	22.41 g	13	21.98 g	22.8 g
4	20.48 g	20.52 g	14	25.40 g	25.28 g
5	21.48 g	22.24 g	15	21.24 g	21.47 g
6	22.41 g	22.62 g	16	22.77 g	22.59 g
7	24.11 g	23.82 g	17	24.30 g	23.72 g
8	19.38 g	19.58 g	18	21.21 g	20.96 g
9	21.80 g	20.25 g	19	23.27 g	23.32 g
10	22.50 g	22.70 g	20	22.74 g	22.30 g

APÊNDICE B- LEITURA DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Grupo Controle				Grupo Exercício	
1	0,155	1724,57	11	0,125	1390,78
2	0,053	589,69	12	0,080	890,10
3	0,070	778,83	13	0,100	1112,62
4	0,076	845,59	14	0,122	1357,40
5	0,106	1179,38	15	0,102	1134,87
6	0,109	1212,76	16	0,132	1468,66
7	0,084	934,60	17	0,147	1635,56
8	0,141	1568,60	18	0,120	1335,15
9	0,080	890,10	19	0,138	1535,42
10	0,090	1001,36	20	0,113	1257,26

MDA: 0,396 (medida padrão)

Equação

F_1 – fator de correção

$F_1 = 4.406 / 0,396$

$F_1 \times$ absorvância da amostra

APÊNDICE C- LEITURA DAS AMOSTRAS TECIDUAIS

Leitura Músculo Liso

Grupo Controle			Grupo Exercício		
1	0,065	710,64 nn	11	0,062	677,84 nn
2	0,055	601,31 nn	12	0,093	1016,76 nn
3	0,068	743,44 nn	13	0,070	765,31 nn
4	0,071	776,24 nn	14	0,114	1246,36 nn
5	0,043	470,11 nn	15	0,047	513,85 nn
6	0,042	467,30 nn	16	0,038	415,45 nn
7	0,038	415,45 nn	17	0,061	666,91 nn
8	0,093	1016,76 nn	18	0,092	1005,83 nn
9	0,057	623,18 nn	19	0,057	623,18 nn
10	0,074	809,04 nn	20	0,084	918,37 nn

Leitura Músculo Estriado

Grupo Controle			Grupo Exercício		
1	0,071	776,24	11	0,093	1016,76
2	0,065	710,64	12	0,062	677,84
3	0,052	568,51	13	0,081	885,84
4	0,060	655,98	14	0,106	1158,89
5	0,085	929,30	15	0,081	885,57
6	0,090	983,97	16	0,137	1497,82
7	0,079	863,70	17	0,076	830,90
8	0,103	1126,09	18	0,108	1180,76
9	0,057	623,18	19	0,167	1825,81
10	0,101	1104,23	20	0,101	1104,23

Valor MDA: 0,403

ANEXOS

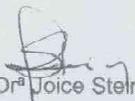
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 310 da Pesquisadora Mônica Cruvinel de Lima referente ao projeto de pesquisa, "Efeito do exercício físico sobre a formação de antioxidantes", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 20 de maio de 2011.

Campo Grande (MS), 23 de maio de 2011.



Dr^a Joice Stein
Coordenadora da CEUA

ANEXO B- ARTIGO

Evaluation of oxidative stress in mice subjected to aerobic exercise^I.**Avaliação do estresse oxidativo em camundongos submetidos ao exercício físico aeróbico**

Mônica Cruvinel de Lima ^I, Guido Marks ^{II}, Iandara Schettert Silva ^{III}, Baldomero Antonio Kato da Silva ^{IV}, Lourdes Zélia Zanoni Cônsolo ^V, Gabriel Bogalho Nogueira ^{VI}.

^I Fellow Master degree, Postgraduate Program in Health and Development in the West Central Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Main author. Responsible for the intellectual and scientific content of the study.

^{II} PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Health and Development in the West Central Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Tutor. Responsible for conception and critical revision.

^{III} PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Health and Development in the West Central Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Surgical Procedures and critical revision.

^{IV} PhD, Associate Professor, Piauí Federal University, Piauí-PI, Brazil. Statistical analysis and critical revision.

^V PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Health and Development in the West Central Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Responsible for laboratory analysis.

^{VI} Fellow Master degree Health and Development in the West Central Region, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Experimental Procedures and critical revision.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the influence of aerobic exercise on oxidative stress in mice. **Methods:**

The study included twenty female mice *Mus musculus*-Swiss divided into two groups: sedentary control (GA) and exercise (GB), each containing ten animals. All animals underwent an adaptation period of seven days isolated in individual boxes. After this period, the animals in the exercise group (GB) were trained in angled running wheel with circumference of 25 cm assembled on an articulated axle during 5 minutes for 3 consecutive days. On the fourth day, they underwent an exercise program of one session lasting 45 minutes. The evaluation of oxidative stress was performed by determining the levels of malondialdehyde derived of lipid peroxidation by the TBA method. The samples were read in a spectrophotometer at 535 nm.

Results: No significant difference was observed in the intergroup comparison of MDA levels in the tissues evaluated. A significant difference was observed in the intragroup comparison of MDA levels in the control group ($p = 0.0201$). The Tukeys' post hoc test indicated significantly lower values of MDA in the smooth muscle in relation to plasma. In the analysis

of variance in the exercise group, a significant difference between tissues ($p = 0.0009$), with significantly lower values in the smooth muscle in relation to plasma ($p < 0.001$) and higher in striated muscle in relation to smooth muscle ($p < 0.05$), was observed.

Conclusion: There was no change in the analysis of oxidative stress in mice which were undergone a single session of aerobic exercise.

Key words: oxidative stress, aerobic exercise, lipid peroxidation.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência do exercício físico aeróbico sobre o estresse oxidativo em camundongos.

Método: Participaram do estudo 20 camundongos (*Swiss*), distribuídos em dois grupos: controle-sedentário (GA) e exercício (GB) cada um contendo dez animais. Todos os animais passaram por um período de adaptação de sete dias. Após os animais do grupo (GB) receberam treinamento em roda giratória angulada montada sobre eixo articulado por 5 minutos durante 3 dias consecutivos. No quarto dia foram submetidos à única sessão de exercício por 45 minutos. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada por meio dos níveis de malondialdeído pelo método do TBA. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 535nm. **Resultados:** Não houve diferença significativa na comparação intergrupos nos tecidos avaliados. Diferença significativa foi observada na comparação intragrupo para o GA ($p = 0,0201$). O post hoc test de Tukey apontou valores significativamente inferiores no músculo liso em relação ao plasma. A análise de variância do GB apontou diferença significativa entre os tecidos ($p = 0,0009$), com valores menores no músculo liso em relação ao plasma ($p < 0,001$), e maiores no músculo estriado em relação ao músculo liso ($p < 0,05$).

Conclusão: Não houve alteração nas análises de malondialdeído tecidual entre os grupos avaliados.

Descritores: estresse oxidativo, exercício aeróbico, peroxidação de lipídeos.

Introduction

Oxygen is a fundamental molecule for the survival of aerobic organisms, used both for the production of energy through the electron transportation chain in the mitochondria of eukaryotes and in the cell membrane of several bacteria, it is also necessary for innumerable fundamental metabolic pathways. The oxygen consumed has the aerobic system as the main

metabolic pathway, that is, the mitochondria. This system is responsible for 85 to 90% of the total oxygen consumption, The remaining 10 to 15% is used by oxidase and oxygenases enzymes and by chemical direct oxidation reactions.

Simultaneously, the oxygen consumption generates intra and extra cellular toxic substances, creating the oxygen paradox, due to the existing balance among its advantages and disadvantages. These toxic substances are generated during the electron transportation, enzyme reaction, or even anti oxidation reactions and are commonly called Reactive Oxygen Species (ROS).²

The oxidative stress can be described as the imbalance among the formations of the reactive oxygen species and the antioxidant system, generating a potential oxidative damage to the structure of the cells. Accordingly, the balance among the pro oxidants and the antioxidants is essential for the maintenance of the homeostasis of the cells (redox balance).³

Reactive oxygen species, if in lethal sub-doses, act as intracellular expression gene modifiers, and can mediate the processes of cells proliferation and differentiation. In higher levels, these substances can start or execute the death of the cell by apoptosis.⁴

Inappropriate life habits such as alcohol ingestion, smoke, inadequate diet, inappropriate environment conditions (such as exposure to non-ionizing UV radiation and short waves, pollution, high relative humidity and high temperature), psychological states (which cause emotional stress), ageing and extreme physical exercise training are also related to oxidative stress.⁵

The amount of species produced during the exercise is directly related to the speed of the aerobic metabolism. The exercise increases the muscles oxidative processes, leading to a general increase in ROS generation and of its sub products in the human body.⁶

The exercises practiced excessively by athletes can promote ROS exposition which can exceed the protection effect of any adaptable response achieved during tanning. Other factors that can overcome the exercise inducing the oxidative damage, for instance, is the anti oxidative nutritional deficiency. During the execution of the low intensity and duration exercise protocols, antioxidant defenses seem to be enough against the ROS production, but in high intensity and duration levels of exercise, these defenses are no longer enough, resulting in oxidative damage to the tissue.⁷

The random nature of the attacks carried out by ROS causes difficulties to the characterization of its products reaction, but every biological molecule is susceptible to its oxidative lesions. The polyunsaturated lipid oxidation in the cells break through the biological membrane structures, and the oxidative lesions on the DNA can suffer mutations. When the

free radicals escape from the antioxidant system and attack the unsaturated fatty acids located in the double bond between some carbon atoms, a chain reaction starts and alters the membrane structure. This reaction is named lipid peroxidation which is intensively deleterious to the organism.⁸

The lipid peroxidation is one main consequence of the oxidative stress and one of the most used reactions to evaluate it, being considered an indirect indicator of free radicals action.⁹

Physical exercise can induce the lipid peroxidation resulting in problems such as the inactivation of the enzymes of cell membranes, decrease of the immune system effectiveness, and the progression of chronic-degenerative diseases such as cancer and cardiovascular illnesses.¹⁰

Between the aldehydes originated from lipid peroxidation in the membrane is the malondialdehyde (MDA) which has been the object of great interest despite its complex and not yet fully understood origin. The MDA has been widely used as an oxidative stress marker.¹¹

Studies have shown that intense physical exercise causes oxidative stress in animals and humans, being possibly related, for instance, to fatigue and tissue lesions. The factors related to the increase of lipid peroxidation from physical exercise are intensity, level of physical fitness level, antioxidant status, the tissue, the diet and recovery.¹⁰

Although there are numerous studies addressing this topic, in many consulted articles, it was possible to notice gaps related to the determination of a training protocol for the lipid peroxidation analysis via the MDA in different body tissues in animal model. Accordingly, this study's aim was to evaluate the influence of aerobic physical exercise over the oxidative stress in mice.

Methods

This study was conducted at the animal research area of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul university, in Campo Grande – MS, during the period between November and December of 2011.

The sample consisted of twenty female mice (*Mus musculus*) Swiss, consistent with the conventional sanitary standard – coming from the animal research area of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, (UFMS) university. All animals were about four-week old, weighing between 19 and 24 grams.

The animals were confined in individual polypropylene cages of the following dimensions: 19.3 cm wide, 30,3 cm deep and height of 12.6 cm. The lid and the bars were made of stainless steel and the cage contained a place for food and water – Brasholanda. The temperature was kept between 21° and 23° C, in a photoperiod of 12 hours on a ventilated shelf. The place of accommodation and experimentation were isolated from loud noises in order to avoid behavioral and physiological disruption.

The feeding/hydration of the animals was kept ad libitum replaced every three days. The food offered was of the brand Nuvilab CR1 – Nuvital nutrientes®.

Every procedure was done according to the international rules for animal experimentation. The study was submitted to the analysis of the Ethics Committee for Animal Usage/CEUA/UFMS and approved in accordance with the 310/2011 protocol (Appendix A).

The animals were randomly divided into 2 distinct groups according with the time of adjustment, physical exercise and euthanasia being each group sub divided into group GA: (Control-Sedentary = 10) and group GB (Exercise = 10).

Physical Exercise

Every subject underwent an equal adaptation period of seven days isolated in individual cages. Afterwards, the animals of the exercise group (GB) received a training on an angled running wheel with circumference of 25 cm assembled on an articulated axle (brand Biosery), during 5 minutes for three consecutive days. On the fourth day the animals in the GB group were subjected to an exercise program of one forty-five minute single session. The animals which refused to run were encouraged by light back pats. The ones which still refused to run were excluded from the sample. Each animal ran for forty five (45) continuous minutes, then they were submitted to euthanasia for posterior analysis. The sedentary animals were kept in the cages for the entire experiment period and the feed was removed during group GB exercise sessions.

The animals' weight was measured by an accurate scale of the brand Shimadzu (variation: one hundredth of a gram). During the study every animal was weighed (at the beginning for the adaptation period and at the end of the exercise period) resulting in an individual record form.

Sample collection and storage

After the end of the physical exercise, the animals were anesthetized with a single intra peritoneal injection containing ketamine (10%) and xylazine (2%), in the ration of 1ml of ketamine (100mg) for each 1ml of xilazina (20mg). It was administered 0.1mL of the mixture for each 100g of live weight of the animals. The blood samples were obtained by cardiac puncture and stored into microtubes containing anticoagulants. The plasma was separated by centrifugation at 3500 rpm for five minutes. Then it was stored for later analysis. After the blood samples were collected, the animals were submitted to euthanasia by a lethal dose of sodium thiopental (150mg/Kg), to collect the other tissues. Afterwards, the trichotomy of the thoracic region was performed, then, the region was opened by a median trassternal incision and the heart was dissected. Subsequently the trichotomy of the lower limb was performed in the posterior part of the animal's paw, followed by a caudal access to the gastrocnemius and soleus muscle for the muscle dissection. Immediately after the tissue collection, they were washed in potassium chloride (KCL) solution 1.15%, stored in Eppendorf, identified and frozen in liquid nitrogen for later analysis.

Evaluation of the Lipid Peroxidation

The evaluation of the oxidative stress was performed through determination of the malondialdehyde (MDA) levels, resulted from the lipid peroxidation by means of the TBA.

Quantification of the plasmatic malondialdehyde by the method of thiobarbituric acid (TBA) or test

Plasma seric samples were thawed at room temperature and added to identified test tubes. 250 micro liters of TBA were added for each 125 micro liters of plasma. After the pipetting of the sample all tubes were closed with a screw cap and heated in a water-bath at 94°C for one hour. Subsequently the samples were cooled by resting over a counter at room temperature for 15 minutes. After the cooling process, 1ml of n-Butyl Alcohol reagent was added to each test tube. Then, each tube was individually mixed in the vortex agitator, in order to reach the maximum MDA extraction to the organic phase. Lastly the tubes were centrifuged at 3500 rpm for ten minutes and divided into two phases. About 3ml of the colored supernatant was placed in cuvettes for spectrophotometer reading at 535nm.

Quantification of the tissue malondialdehyde by the method of thiobarbituric acid (TBA) or test

The homogenization process of the tissue started with the thawing of the sample at room temperature, followed by washing it in the same KCl 1.15% solution. The sample was, then, removed from the washing solution, carefully dried with gases and weighed on an analytical scale. Using a disposable pipette, the KCl 1.15% solution was added in a ratio of 10:1 mass. The sample immersed in KCl 1.15% solution was cut in small pieces (as small as possible), in order to facilitate the homogenization. Then, the becker containing the material was taken to the grinder (Turratec TE-102) for homogenization. The time of stay of the sample in the machine and its power were adjusted individually for each type of tissue. At the end, the homogenate material was placed in a test tube. Subsequently, it was centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes. 500 micro liters of supernatant were pipetted and 1ml of TBA was added, then it was heated in water-bath for one hour. Afterwards the samples were cooled at room temperature for 15 minutes. After the cooling, it was added to each test tube 1ml of n-Butyl alcohol reagent. Then, each tube was individually mixed in the vortex agitator (QL-901) for 40 seconds and centrifuged at 3,500 rpm for 10 minutes. About 3ml of the colored supernatant was placed in cuvettes for spectrophotometer reading at 535nm. The concentration of MDA in each cuvette was expressed in nmol of MDA/mg of protein. Before starting the sample reading, the spectrophotometer was calibrated and adjusted for a reading at 535nm. Then, the equipment was zeroed with a control solution (white), and the control standard reading for MDA was performed. For the concentration computation of MDA it was used an equation obtained from the standard curve of the absorbance generated by concentrations known as standard.

Statistical Analysis

The numerical variable measures were expressed in means \pm standard deviation. For the intergroup comparison it was performed an analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Tukey test. The normality of the groups was analysed according to their distribution through Shapiro Wilk's test. The significance level considered for this study was $p \leq 0.05$.

The software Microsoft Office Excel 2007 was used for the tabulation of the results, and the Bioestat 5.0 program was used to calculate normality. The comparison of the data and the making of the graphs were done using the GraphPad Prism 4.0 program.

Results

No significant difference was observed in the intergroup comparison of MDA levels in the evaluated tissues.

Significant difference was observed when comparing the levels of MDA between the exercise group and the control group (ANOVA; $p = 0.0201$). The Tukey's post hoc test showed significantly lower amounts of MDA in smooth muscle than in the plasma.

The analysis of variance in the exercise group showed significant differences when comparing the tissues ($= 0.0009$), with significantly lower amounts in the smooth muscle than in the plasma (Tukey; $p < 0.001$), and higher in the striated muscle than in the smooth muscles (Tukey; $p < 0.05$).

Table 1: means \pm standard deviation of the levels of MDA (ng/mL) of the analysed groups. Campo Grande, MS, 2011. (n = 20)

	Control	Exercise	p
Plasma	1072,57 \pm 354,46	1311,78 \pm 221,13	0,0869
Smooth muscle	663,35 \pm 185,65	784,99 \pm 257,17	0,2409
Striated muscle	934,18 \pm 355,92	1106,42 \pm 340,62	0,2835

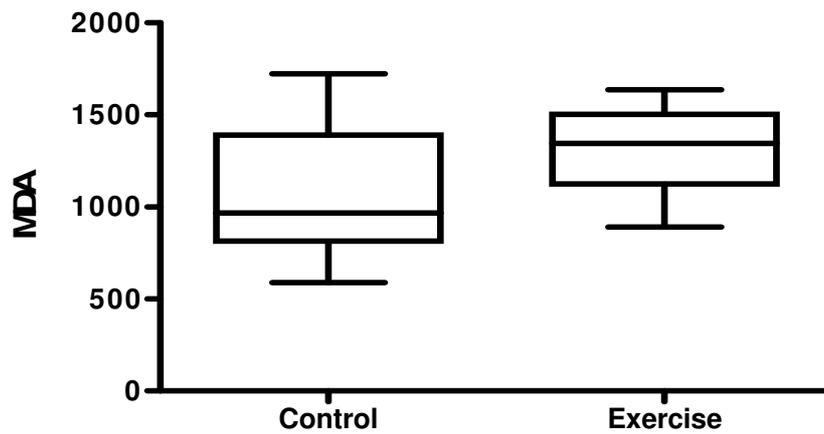


Figure 1: Comparison of levels of MDA (ng/mL) in Plasma between groups (Student t test; $p = 0.0869$).

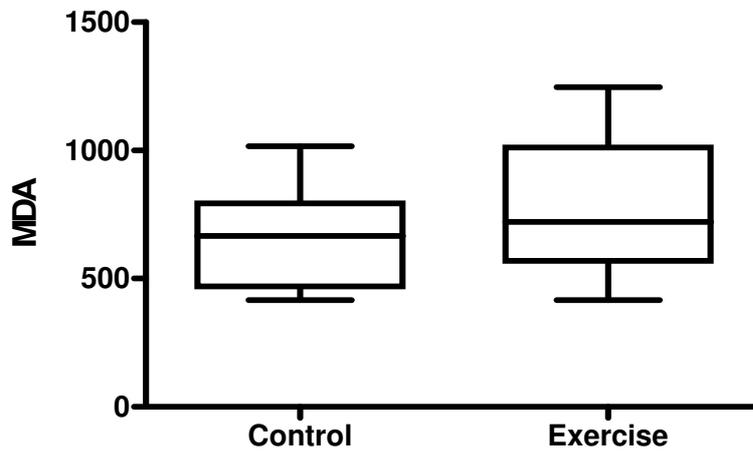


Figure 2: Comparison of levels of MDA (ng/mL) in Smooth Muscle between groups (Student t test; $p = 0.2409$).

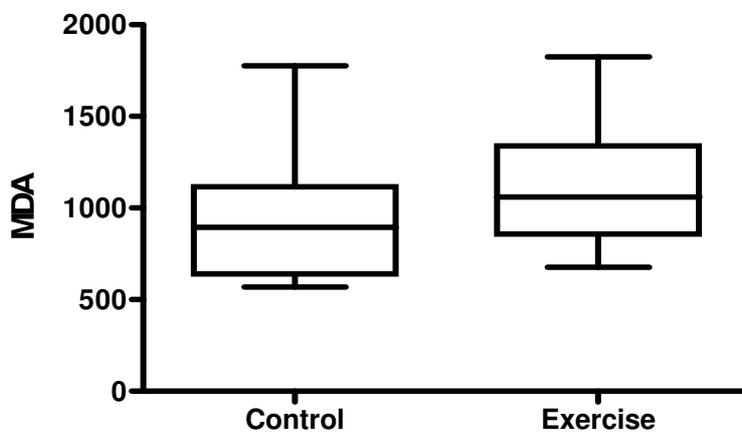


Figure 3: Comparison of levels of MDA (ng/mL) in Striated Muscle between groups (Student t test; $p = 0.2835$).

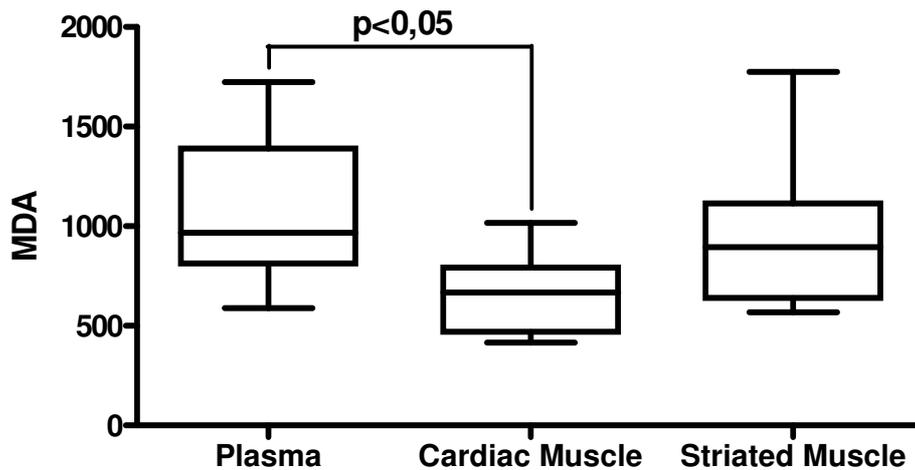


Figure 4: Intragroup comparison of the levels of MDA (ng/mL) in the various analysed tissues for the Control Group (ANOVA; $p = 0.0201$).

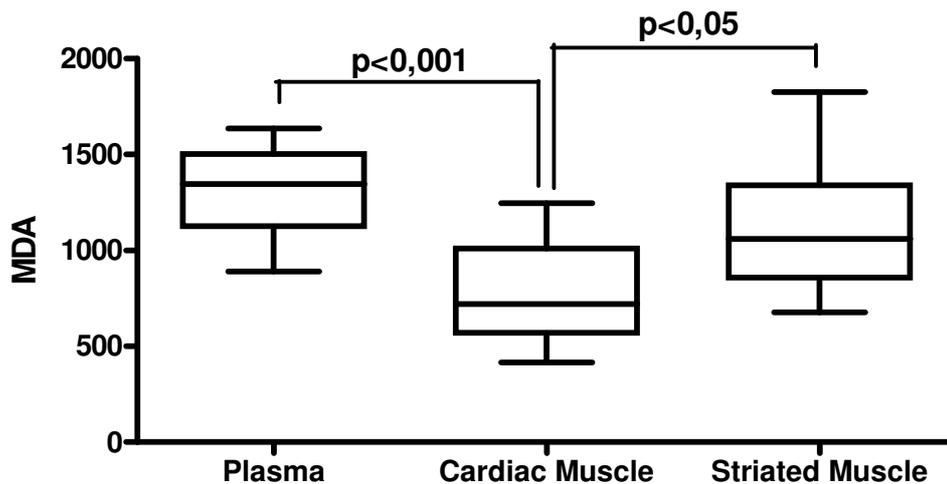


Figure 5: Intragroup comparison of the levels of MDA (ng/mL) in the various analysed tissues for the Exercise Group (ANOVA; $p = 0.0009$).

Discussion

This study aim was to verify the effects of aerobic physical exercise on the biomarkers of oxidative stress through the lipid peroxidation in mice. Physical activity is known to promote health and welfare. The exercise is also responsible for raising the production of reactive oxygen species (ROS) through the addition of mitochondrial oxygen consumption by the tissues. The imbalance between the ROS production and the oxidant defenses of the tissues can result in oxidative damages to proteins, lipids and DNA. The oxidative damage to

lipoprotein, particularly, low density lipoprotein (LDL), is known to have an important role in a number of age related diseases such as cardiovascular diseases, cancer and dementia.¹²

Recent studies demonstrate that the growth of reactive oxygen species causes damages to lipoproteins, lipids, DNA and proteins. The oxidative stress induced by the modifications of these molecules has been known to be involved in diseases by many ways. One disease, suggested to be associated with high oxidative stress is the atherosclerotic cardiovascular disease (ASVD). The oxidative stress is believed to have a significant role in the initiation and progression of atherosclerosis.¹³

In this study the level of MDA was measured in order to observe the influence of aerobic exercise on the oxidative stress formation in various tissues. The evaluation method used was chosen for being mentioned in several articles, being considered a fast and economical means of studying the final products of lipid peroxidation. The malondialdehyde (MDA) is one of the important final products of the tissues lipid peroxidation and is usually accepted as a peroxidation intensity index. The MDA content in the plasma confirms that physical exercise is capable of generating free radicals that, in turn, causes lipid peroxidation. The effect is related to the intensity of the exercise.²

Historically, the most common method for measuring lipid peroxidation through malondialdehyde has been the reaction with reactive substances of the thiobarbituric acid (TBA). The malondialdehyde is a stable decomposed aldehyde and subproduct of the lipid peroxidation and can be measured directly through the HPLC, gas chromatography or spectrophotometry.¹⁴

In his study, the samples were collected for analysis immediately after the end of the exercise sessions. However, due to the recovery of the kidney blood flow, it was necessary to wait for a longer period in order to evaluate these biomarkers in the animals submitted to intense exercise. Lipoperoxides can be transferred from one organ or tissue to another and be metabolized by those with higher oxidant capability. This is particularly important during intense exercise because the splanchnic region has its blood flow greatly reduced under these conditions, while it is increased in the skeletal muscles. Thereby, besides the possibility of the lipoperoxides being metabolized by organs from the splanchnic region, hemodynamic factors can hinder the blood flow in this region, increasing its concentration in the plasma and other tissues where the lipoperoxides are produced during intense physical exercise.¹⁵ These findings, are supported by a study conducted by Maughan *et. al.*¹⁶, which demonstrates that lipoperoxides have their concentration increased in the plasma up to six hours after intense exercise.

The aerobic exercise used for this study was not able to induce a significant growth in the MDA levels in mice, comparing with the sedentary groups, based on the assessed tissue. In the study conducted by Child *et al.*¹⁷, trained individuals were submitted to a simulation of a half marathon test; it was possible to observe, by measuring the total antioxidant capability and the uric acid level, a higher scavenger ability (the ability of neutralizing free radicals producing a less reactive compound) over the free radicals of the serum. Even so, the exercise induced higher concentrations of malondialdehyde, suggests that these responses were insufficient to prevent lipoperoxidation by exercise.

Nikolaidis *et al.*¹⁸, put physically active men through two exhaustive exercise protocols, on a conveyor belt, being one long and the other short duration. They verified that both exercise protocols induced the increase in the MDA plasmatic concentration. In athletes submitted to other types of long lasting run, Machefer *et al.*¹⁹ observed the raise in the MDA plasmatic concentration, up to 72 hours after the exercise.

This study assessed the MDA patterns in mice in comparison with the control group value as reference. The reference value for the levels of total MDA reported in literature show great variability, being related to the experiment conditions used in different studies. Thus, the MDA plasmatic value determined for healthy individuals by Steghens *et al.*²⁰, is $0.138 \pm 0.028 \mu\text{M}$, while for Pilz, Meineke and Gleiter²¹, is $2.16 \pm 0.29 \mu\text{M}$, contrasting with the values obtained by Sim *et al.*²², $13.8 \pm 1.32 \mu\text{M}$, Londero and Greco²³, $0.85 \pm 0.25 \mu\text{M}$ and Mao *et al.*²⁴, $0.426 \pm 0,029 \mu\text{M}$. Considering the variations between values in the mentioned reference, it becomes necessary to determine an interlude as individual reference for each designed method.

In the present study it was not observed significant differences when comparing the intergroup levels of MDA in the cardiac tissues analysed after the training in the running wheel. The cardiac muscle has a high consumption of oxygen in resting conditions. The coronary blood flow increases the oxygen absorption by up to four times during exercise. Although, it is essential for the organism aerobic metabolism, high oxygen metabolism can lead to an increase in oxidative stress in the heart during physical exercise.²⁵

Gul *et al.*²⁶, studied an eight-week training protocol in conveyor-belt for the production of antioxidants enzymes and decrease of the lipid peroxidation in the cardiac tissues in mice. The effects of exhaustive exercise were also investigated. The resistance training consisted of running in conveyor belt, 1.30h for five days per week during 8 weeks. For the exhaustive exercise, the belt was graduated so the speed was increased gradually to 2.1km/h at 95 minutes, and kept constant until the mice were exhausted. The

malondialdehyde level in cardiac tissue was not affected by exhaustive exercise in sedentary and exercised mice.

For this study the exercise performed by the mice lasted 45 minutes, and the results differ from the mentioned above, with significantly higher lipoperidation in striated muscle than in smooth muscle. The cardiac and skeletal muscles are different functioning tissues. Arévalo *et al.*²⁷ determined the activities of TBARS, total SOD, Cu-Zn-SOD and MnSOD, and the isoenzyme pattern of the SOD in the skeletal and cardiac muscle in male, young and old Wistar mice, in rest and after exhaustive exercise. The exhaustive exercise training was executed on a conveyor-belt, at different speeds and inclination. The average time of exhaustion for young mice was 55 minutes. There was no differences in lipoperoxidation levels after exercise in either tissue.

Chiaradia *et al.*²⁸, conducted a study to evaluate the lipid peroxidation in plasma and its effects on skeletal muscle lesion in horses. The animals were submitted to physical training for three months, 30 minutes per day, 6 days a week and the relative intensity of the exercise was gradually increased. The conclusion was that the exercise was insufficient because of the significant lysis of the skeletal muscle cells. However, the results obtained indicated that the physical exercise adopted for the study was enough to modify MDA and gluathione in the blood content.

No significant data was found regarding the activity of the levels of MDA in the analysed tissues when comparing the control and the exercise groups . However, the striated muscle showed higher sensitivety to the action of lipoperoxidation in comparison with smooth muscle.

There are not many studies regarding the strength training and oxidative stress. In one of them it was established by measuring the blood lipoperoxyde that, when the isometric contraction predominates in the strength training, oxidative lesions occur in the biomelecule.¹⁵ Radák *et al.*²⁹, after submitting mice to a nine-week swimming training, 60 minutes long in the first six weeks and three weeks being 90 minutes long, did not verify significant changes in MDA in gastrocnemius muscle 24 hours after the last training session. On the other hand, Liu *et al.*³⁰ verified, after eight weeks of training on a conveyor-belt, higher levels of MDA in the cardiac and vatus lateralis muscles, after 48 hours of the last training session in female mice. However, the same result was not observed after exhaustive exercise. Alessio and Goldfarb³¹, in turn, after submitting mice to a eighteen-week training on conveyor-belt, verified lower levels of MDA at rest, in the liver and in the deeper portion of the vastus lateralis muscle, when compared to the values of sedentary individuals.

Ji³², observed that an isolated exhaustive work load produced an increase of the LPO in skeletal muscles and that the activity of the antioxidant glutathione reductase enzymes, Gpx, SOD and CAT were significantly higher.

It is known that free radicals can attack every main class of bio-molecule, being the lipids the most susceptible. The oxidative destruction of the polyunsaturated fatty acids, known as the lipid peroxidation, is considerably harmful for being a reaction of self-propagation in the membrane³³. The disputes about the effects of exercise over the lipid peroxidation are innumerable, probably, due to differences in intensity and duration of the exercise protocols³¹. In this work there was no change in the analysis of the oxidative stress in the mice that underwent one single session of aerobic exercise.

Conclusion

There was no change in the analysis of the tissue malondialdehyde between the evaluated groups.

In the exercise group it was observed that the smooth muscle was less sensitive to lipid peroxidation when compared to the striated muscle and to the plasma.

References

1. Schneider CDE, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004; 10: 87-90.
2. Halliwell B, Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press. 2007;1: 851.
3. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985; 311(1152): 617-631.
4. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2005; 19 (2): 276-85.
5. Elsayed NM. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition*. 2001; 17 (10): 828-34.
6. Wolinsky I, Hickson JR, JF. *Nutrição no Exercício e no Esporte*. 2ed. São Paulo: Roca, 1996.

7. Longo UG, Oliva F, Denaro V, Maffulli N. Oxygen species and overuse tendinopathy in athletes. *Disability and Rehabilitation*. 2008; 30 (20-22): 1563–1571.
8. Auroma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 1994; 32 (7): 671-83.
9. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 1-85.
10. Miyazaki H, Oh-Ishi S, Ookawara T, Kiazaki, T.; Toshinai K, Ha S, Hagas, Ji LI, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2001; 84: 1-6.
11. Draper H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 421-31.
12. Aldred S, Manjit, R. A moderate intensity exercise program did not increase the oxidative stress in older adults. *Arch gerontol Geriatr*. 2011; 53: 350–353.
13. Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2011; 147: 191–201.
14. Knight JA, Pieper RK, Mc Clellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*. 1988; 34:2433–8.
15. Souza Jr TP, Oliveira PR, Pereira B. Exercício físico e estresse oxidativo. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11(1): 91-96.
16. Maughan RJ, Donnelly AR, Gleeson M, Whittin PH, Walker KA. Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve*. 1989; 12: 332-6.
17. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc*. 1998; 30: 1603-7.
18. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladii-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Scie Sports Exerc*. 2006; 38:1443-1450.
19. Machefer G, Groussard C, Zouhal H, Vincent S, Youssef H, Faure H, Malardé L, Grastas-Delamarche A. Nutritional and Plasmatic Antioxidant Vitamins Status of Ultra Endurance Athletes. *J Am Coll Nutr*. 2007; 26:311- 316.
20. Steghens JP, Kappel ALV, Denis I, Collmbel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radical Biol Med* 2001; 31(2): 242-249.

21. Pilz J, Meineke I, Gleiter C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography as the 2,4- dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B: Anal. Technol Biomed Life Sci* 2000; 742: 315-325.
22. Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DEL. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003; 785:337-344.
23. Londero D, Greco PL. Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehydethiobarbituric acid adduct in plasma. *J Chromatogr A.* 1996; 729: 207-210.
24. Mao J, Zhang H, Luo J, Li L, Zhao R, Zhang R, Liu G. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.* 2006; 832 (1): 103-108.
25. Frankiewicz- Jozko A, Faff J., Sieradzan-Gabelska B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur J Appl Physiol* 1996; 74: 470–474.
26. Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin F, Siktar E, Polat M F, Akar S, Akcay F, Dane S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comp. biochem. physiol.,A, Comp. physiol.* 2006; 143: 239–245.
27. Arévalo AN, Canavate C, Del-Pino MJS. Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Aging research reviews.* 1999; 108:207–217.
28. Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A. Porciello F. Antonioni MT, Gaiti A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp. biochem physiol Part B Biochem mol biol.* 1998; 119: 833–836.
29. Radák Z, Asano K, Inoue M, Kiazaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol.* 1995; 79(1):129- 135.
30. Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol.* 2000; 89 (1):21-28.
31. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol.* 1988; 64: 1333-6.

32. Ji LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:82-92.
33. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
-

Correspondence:

Mônica Cruvinel de Lima
Rua Silvio Romero, 420/ AP. 203
79041-610, Campo Grande –MS Brasil
Telephone number.: (5567) 92494133
monicacruvinel@hotmail.com

¹ Research performed at Postgraduate Program in Health and Development of the West Central Region of Brazil, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS. Brazil. Part of Master degree thesis. Tutor: Guido Marks.