

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PALISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**Efeito do resveratrol sobre o estresse oxidativo e lesão
muscular em ratos submetidos a esforço físico intenso**

**Kelly Elisângela Vendrame
Fisioterapeuta**

**ARAÇATUBA – SP
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**Efeito do resveratrol sobre o estresse oxidativo e lesão
muscular em ratos submetidos a esforço físico intenso**

Kelly Elisângela Vendrame
Orientador: Prof. Adj. Paulo César Ciarlini

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária –
UNESP, Campus de Araçatuba,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Fisiopatologia
Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA - SP
2012

Autorizo a reprovação e divulgação ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

VENDRAME, Kelly Elisângela

Prevenção do estresse oxidativo e lesão muscular em ratos tratados com resveratrol.

Araçatuba, 2012

55p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal. Área de concentração: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica - Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba.

Orientador: Paulo César Ciarlini

Palavras Chaves: exercício, antioxidante, natação.

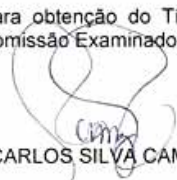
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Prevenção do estresse oxidativo e da lesão muscular em ratos tratados com
resveratrol.

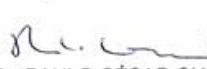
AUTOR: KELLY ELISÂNGELA VENDRAME

ORIENTADORA: Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(Fisiopatologia Médica e Cirúrgica) pela Comissão Examinadora.


Dr. JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO


Dr. MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA


Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 07 de fevereiro de 2012.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KELLY ELISÂNGELA VENDRAME– nascida em 15 de agosto de 1986, na cidade de Araçatuba, iniciou e concluiu o Curso de Fisioterapia na Fundação Municipal de Educação e Cultura de Santa Fé do Sul (2004-2007). Durante o período acadêmico desenvolveu atividades tais como monitoria e estágios extracurriculares e curriculares. Realizou pós graduação em Osteopatia e Terapia Manual, especializações em RPG/RPM, Pilates, Acupuntura e Dermato Funcional. Em 2010 ingressou no curso de mestrado da Pós Graduação em Ciência Animal da UNESP- Araçatuba colaborando em projetos de pesquisa do orientador e auxiliou em projetos de iniciação científica. Ainda durante o ano integralizou os créditos e desenvolveu seu projeto de pesquisa. Em 19 de dezembro de 2011 foi aprovada no exame geral de qualificação intitulado “**Prevenção do estresse oxidativo e lesão muscular em ratos tratados com resveratrol**” no qual faz parte desta dissertação.

Aos meus pais, Arlete e Luiz, com carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa oportunidade e vitória, por toda força, fé e coragem para encarar os desafios e dificuldades sem pensar em desistir ao decorrer dessa etapa da minha vida.

Ao Professor Dr. Paulo César Ciarlini pela orientação, paciência e confiança concedida para desenvolver essa pesquisa, pelas valiosas idéias e acima de tudo, pelo empenho e entusiasmo em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais, Arlete e Luiz, exemplos de dedicação, superação e esforço, por toda a educação que me transmitiram. Sou eternamente agradecida pelo apoio incondicional, sem o qual não alcançaria meus êxitos.

A minha irmã Luma por todo apoio, carinho e incentivos.

Aos meus familiares que me incentivaram nesta caminhada.

À toda equipe do Laboratório Clínico Veterinário e os Departamentos de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal e de Apoio, Produção e Saúde Animal pelo auxílio durante todos estes anos de trabalho. Em especial o Profº Ass. Adj. Mário Jefferson Louzada, á Juliana, Jamila e Cintia pela amizade e parceria durante a execução do projeto.

Aos técnicos Laine Margareth Gabas e Pedro Luis Florindo, todos os amigos Luis, Breno, Priscila, Anelise, Vânia, Jucilene e Daniel, que sem o apoio e dedicação de todos não seria possível a execução e conclusão desse trabalho de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista e á coordenadora do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal Prof. Adj. Juliana Regina Peiró pela oportunidade de realizar este curso de mestrado.

As agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado cedida e FAPESP (Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro possibilitando adquirir os recursos necessários para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Aos meus pacientes que souberam compreender minha ausência em alguns períodos e a secretária Jociely por toda ajuda na clínica.

Ao meu namorado Bruno pelo apoio e paciência durante essa etapa difícil em que muitas vezes é necessário passar mais tempo se dedicando aos estudos do que com as pessoas que amamos.

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	7
1. Contextualização do problema.....	8
1.1. Radicais livres e o estresse oxidativo.....	9
1.2. Estresse oxidativo e o exercício físico.....	11
1.3. Efeito do resveratrol e outros antioxidantes sobre o estresse oxidativo durante o esforço físico.....	16
2. Referências Bibliográficas.....	20
Capítulo 2.....	25
PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E LESÃO MUSCULAR EM RATOS TRATADOS COM RESVERATROL	
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	30
Resultados e Discussão.....	33
Conclusão.....	37
Agradecimentos.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
Apêndices.....	42

Efeito do resveratrol sobre o estresse oxidativo e lesão muscular em ratos submetidos a esforço físico intenso

RESUMO

O exercício físico intenso causa um maior consumo de oxigênio que induz ao estresse oxidativo capaz de danificar fibras musculares, proteínas e lipídeos corpóreos. O resveratrol (RV) é um potente antioxidante presente naturalmente em algumas plantas e com ação comprovada sobre o estresse oxidativo causado pela insuficiência renal e diabetes, prevenindo e/ou diminuindo consequências do infarto do miocárdio, hipercolesterolemia, câncer e Alzheimer. O presente estudo objetivou testar a hipótese de que ratos Wistar sedentários quando submetidos a um esforço físico intenso e tratados com RV (10mg/kg/dia) durante 10 dias apresentam menor estresse oxidativo e lesão muscular. O RV não alterou o perfil metabólico dos ratos mantidos em repouso e o exercício físico induziu no grupo não tratado com RV maior concentração plasmática de glicose ($p=0,0361$), aspartato aminotransferase ($p=0,0476$) e menor concentração de bilirrubina ($p=0,0176$). A capacidade antioxidante total foi maior no grupo tratado com resveratrol e submetido à natação ($p<0,001$). Os resultados obtidos comprovam que o esforço físico intenso nos animais sedentários induziu estresse oxidativo capaz de ocasionar lesão muscular e que tais efeitos indesejáveis podem ser atenuados com uso de resveratrol.

Palavras chaves: exercício, antioxidantes, natação.

ABSTRACT

The intense physical exercise increases the oxygen consumption and leads to oxidative stress that is able to damage muscle fibers, proteins and lipids from organism. Resveratrol (RV) is a potent antioxidant naturally found in some plants, its action is on oxidative stress caused by renal failure and diabetes, preventing and/or reducing the consequences of myocardial infarction, hypercholesterolemia, cancer and Alzheimer's disease. This study aimed to test the hypothesis that sedentary rats subjected to an intense physical and treated with RV (10mg/kg/day) for 10 days showed lower oxidative stress and muscle injury. The use of RV did not affect the metabolic profile in rats kept in rest, in the group not supplemented with RV the exercise increased plasmatic concentration of glucose ($p=0,0361$) and activity of aspartate aminotransferase ($p=0,0476$), while decreased concentration of total bilirubin ($p=0,0176$). An increased total antioxidant status was observed in the group supplemented with resveratrol and submitted to swimming ($p<0,001$). The results demonstrated that the intense physical effort in sedentary animals induced oxidative stress that can cause muscle muscle damage and that such effects can be attenuated with the use of resveratrol.

Keywords: exercise, antioxidants, swimming.

1. Contextualização do problema

O exercício intenso contribui para o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, denominado estresse oxidativo. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é capaz de melhorar a função e biogênese mitocondrial, promover proteção contra doenças cardiovasculares, câncer, colesterol e diabetes tipo II e conferir resistência contra o estresse oxidativo, danos e morte celular (BAUR et al., 2006; LAGOUGE et al., 2006). Há um grande interesse na medicina esportiva em se avaliar a ação de antioxidantes no controle do estresse oxidativo causado pelo esforço físico intenso, porém pouco se conhece quanto ao efeito antioxidante do RV nesta condição.

Objetivando investigar se o resveratrol atenua o estresse oxidativo e a lesão muscular induzida por exercício físico intenso em ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) sedentários, realizou-se uma revisão de literatura sistemática nos principais bancos de dados eletrônicos: Portal da Pesquisa, Web Science, Scielo e Science Direct, Bireme e Athena. A pergunta para a realização da revisão foi estruturada com três elementos conceituados na Medicina Baseada em Evidências, conforme preconizado por Castro (2001) – Situação: exercício; Intervenção: resveratrol; Desfecho: estresse oxidativo. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca na base de dados da Pubmed: "exercise"[MeSH Major Topic] AND ("resveratrol"[Supplementary Concept] OR resveratrol[Acknowledgments] OR resveratrol[Figure/Table Caption] OR resveratrol[Section Title] OR resveratrol[Body - All Words] OR resveratrol[Supplementary Concept] OR resveratrol[Title] OR resveratrol[Abstract]) AND ("oxidative stress"[MeSH Terms] OR oxidative stress[Acknowledgments] OR oxidative stress[Figure/Table Caption] OR oxidative stress[Section Title] OR oxidative stress[Body - All Words] OR oxidative stress[Title]

OR oxidative stress[Abstract]) AND "research and review articles"[filter]. Devido a escassez de artigos localizados (n=3) no PubMed a revisão foi expandida para outros bancos de dados (Portal da Pesquisa, Web Science, Scielo e Science Direct e Google acadêmico). Não foi utilizado qualquer limite quanto a espécie, idioma ou data de publicação e o período da pesquisa bibliográfica se estendeu até o dia 19.01.2012.

Para elaboração do artigo (Capítulo 2) utilizou-se os seguintes critérios de seleção da literatura: estudos randomizados, publicados em inglês e português, realizados em ratos e camundongos, com delineamento, metodologia e/ou objetivo similar ao do presente estudo. Para revisão geral que se segue foram selecionados textos de revisão de literatura sobre o tema e estudos realizados em outras espécies e com outros antioxidantes.

1.1. Radicais livres e o estresse oxidativo

Os radicais livres são produzidos naturalmente pelo organismo por processos metabólicos oxidativos, são de extrema necessidade para ativação do sistema imunológico, na desintoxicação de drogas, para a produção de óxido nítrico em processos de relaxamento dos vasos sanguíneos e garantem a homeostase intracelular (DEATON; MARLIN, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

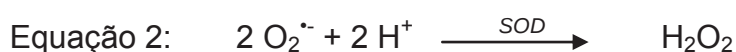
O radical livre é uma molécula com um ou mais elétron não pareado. Derivados não radicais de oxigênio, como o ozônio e peróxido de hidrogênio, são mais reativos que o oxigênio induzindo um dano oxidativo intenso. Radicais livres e derivados não radicais de oxigênio são denominados e espécies reativas de oxigênio (ERO) (DEATON; MARLIN, 2003).

Segundo Deaton; Marlin, (2003) e Schneider; Oliveira, (2004) o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez e a redução do oxigênio resulta na produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Equação 1).

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

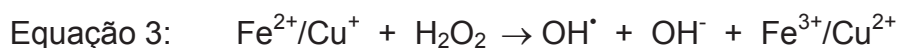


O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pelo processo de dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), com alta concentração nas células de mamíferos acelerando a reação a 10^4 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (Equação 2) (DEATON; MARLIN, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

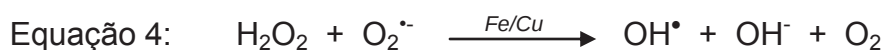


Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (DEATON; MARLIN, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O radical hidroxil pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (Equação 3), denominada Reação de Fenton.



Os íons de metais de transição podem catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil (Equação 4), Reação de Haber-Weiss (DEATON; MARLIN, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).



Os radicais superóxido e hidroxil têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas como os oxigênio singletes são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos derivados do oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), em função da maior reatividade para as biomoléculas, alterando o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem (DEATON; MARLIN, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O óxido nítrico (NO) pode reagir com superóxido formando peróxido nítrico (ONOO⁻) que apresenta um longo tempo de vida e é capaz de atravessar a membrana plasmática. Também pode induzir à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (Equação 5) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; POWERS; JACKSON, 2008).



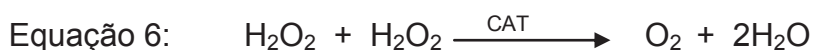
A moderada produção de radicais livres pelo organismo é essencial para a homeostase intracelular, porém em condições de estresse oxidativo a excessiva produção de ERO causa um desequilíbrio homeostático ocasionando danos a lipídios, proteínas e DNA celular, comprometendo as funções fisiológicas do corpo (JI 1995).

1.2. Estresse oxidativo e o exercício físico

Estresse oxidativo é um desequilíbrio onde espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como o superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil sobrepõem as defesas antioxidantes (POWERS et al., 1999; YU et al., 2006). O sistema de defesa endógena é constituído por vitaminas antioxidantes (vitamina A, C e E), ácido úrico,

glutathiona (GSH), bilirrubina, albumina e por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (CuZn- SOD-Citosólica e extracelular e Mn-SOD-mitocondrial), catalase (CAT-heme-enzima), glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GR/GPx – dependente e não dependente do selênio) (ARAÚJO et al., 2006; YU, 1994). Tais componentes plasmáticos atuam na defesa antioxidante intracelular eliminando superóxidos, hidropéroxidos e consequentemente prevenindo as reações em cadeia desses radicais livres que oxidam os substratos celulares (JI, 1995; ANTUNES NETO et al., 2007).

A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água (Equação 6) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).



A GPx tem o papel de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água (Equação 7) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).



As enzimas CAT e GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não ocorra a produção de radical hidroxil evitando o estresse oxidativo (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; POWERS; JACKSON, 2008).

Segundo Radák et al. (2003) durante o exercício, o superóxido pode ser formado no músculo de várias maneiras: 1) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra numa situação de anóxia muscular e é “reperfundida” pelo oxigênio durante, por exemplo, pausa após um esforço de alta intensidade; 2) por enzimas como xantina oxidase e 3) pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase. O músculo esquelético também produz óxido nítrico pela reação da enzima óxido nítrico-sintase (REID, 1996). O óxido nítrico

pode reagir com o superóxido para formar peroxinitito, um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao radical hidroxila (ROBERTS et al., 2009).

Durante a atividade física exaustiva ocorre um aumento no consumo de oxigênio decorrente do aumento do trabalho muscular, esse fato incrementa a produção de ERO e induz o estresse oxidativo, o qual é dependente da intensidade, duração, local do exercício e resistência a exaustão do indivíduo (VINÃ et al., 2000). O condicionamento físico adapta o sistema antioxidante do organismo, minimiza os danos musculares e plasmáticos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

No treinamento crônico, a formação de radicais livres estimula a biogênese mitocondrial e o aumento da produção de antioxidantes endógenos, porém o músculo esquelético submetido com carga de trabalho exaustivo sofre maior lipoperoxidação mensurada pela concentração plasmática das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Em ratos, durante o estresse oxidativo induzido por exercício físico realizado acima do limiar anaeróbio, ocorre aumento de malondialdeídos (MDA), produtos finais da peroxidação lipídica (JENKINS, 2010).

O exercício físico de alta intensidade com carga progressiva causa também um aumento na concentração sanguínea e muscular de lactato e uma depleção mais rápida do glicogênio muscular, antecipando a fadiga e redução da performance atlética (NETTO Jr et al., 2007). A depleção do lactato plasmático após o exercício é decorrente da sua remoção pelo fígado, rins e fibras musculares tipo I e menor biossíntese em função da maior oxidação de ácidos graxos e redução da glicólise anaeróbia (BROOKS, 1991).

O músculo contém altas concentrações de creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH), de modo que quando ocorre lesão muscular a atividade plasmática de tais enzimas aumenta (BRANCACCIO et al., 2006; NIE et al., 2010).

Em ratos treinados e sedentários a natação em diversas intensidades e durações induz á lesão muscular e o estresse oxidativo. Quando realizada por 10 semanas ocasionou dano ao tecido hepático e muscular, associado à diminuição de antioxidantes como a glutathione redutase e glutathione peroxidase (VENDITTI; Di MEO, 1996), 50 minutos de natação sem carga induziu maior metabolização de glutathione reduzida e 100 minutos com carga de 3% ou 5% do peso corporal ocasionou maior consumo de vitamina E (BACHUR et al., 2007), uma hora de natação aumentou a atividade da enzima catalase (TERBLANCHE, 2000), assim como maior concentração plasmática de AST, ALT, LDH ao ser realizada durante 90 minutos (LEE et al., 2009) e aumento da CK em ratos treinados com 80% da carga máxima tolerada (SOUZA et al., 2010).

O ácido úrico é antioxidante não enzimático que pode proteger o organismo contra o estresse oxidativo decorrente do esforço físico, sua concentração plasmática pode aumentar significativamente nessas condições (ANTUNES NETO et al., 2007). O ácido úrico é produzido a partir da degradação de compostos purínicos, por essa razão o aumento isolado na concentração plasmática não pode ser considerado uma resposta específica da adaptação ao estresse oxidativo induzida por exercício, contudo o conjunto de alterações nos antioxidantes endógenos contribui para atenuação do estresse oxidativo, eliminação de ERO e radicais hidroxila (BECKER et al., 1993; CRUZAT et al., 2007). A queda da relação glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSH) e do ácido úrico compromete as defesas

antioxidantes favorecendo o estresse oxidativo induzido por sobrecarga de treinamento físico (PALAZZETTI et al., 2003).

A bilirrubina é produzida pelo catabolismo da hemoglobina, atua como um potente antioxidante em situações de estresse oxidativo devido à capacidade de eliminar ERO, prevenir a peroxidação lipídica, desativar o radical hidroxil e proteger as células da alta concentração do peróxido de hidrogênio (MACLEAN et al., 2007; POWERS; JACKSON, 2008). Também sua função antioxidante se deve a ampliação do ciclo em que a bilirrubina é oxidada de volta a biliverdina e então é reciclada de volta a bilirrubina via biliverdina redutase (AGUIAR et al., 2006; POWERS; JACKSON, 2008). Entretanto o exercício intenso pode aumentar a concentração sanguínea de bilirrubina a fim de atenuar os danos oxidativos (POWERS; JACKSON, 2008).

O exercício físico intenso realizado por indivíduos saudáveis pode reduzir a capacidade antioxidante total (TAC) do organismo devido à excessiva produção de ERO, mas durante o período de recuperação pode ocorrer um aumento da concentração da TAC decorrente da injúria pró-oxidante inicial (FISHER-WELLMAN e BLOOMER et al., 2009). O treinamento regular induz à adaptação do sistema antioxidante endógeno e o uso de suplementação antioxidante contribui para minimizar a intensidade do dano oxidativo (FISHER-WELLMAN e BLOOMER et al., 2009; JI, 1995).

Em síntese, a atividade física moderada realizada regularmente e em ambientes adequados melhora a qualidade de vida e as defesas antioxidantes do organismo, enquanto que o exercício intenso aumenta a atividade metabólica e favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas, prejudicando a função celular (SASTRE et al., 1992; VINÃ et al., 2000).

1.3. Efeito do resveratrol e outros antioxidantes sobre o estresse oxidativo durante o esforço físico

A membrana dos eritrócitos é rica em lipídeos o que o torna sensível aos radicais livres liberados em excesso em condições como esforço físico extenuante, porém tal efeito deletério é minimizado “in vitro” pela ação antioxidante da vitamina C e E (SENTÜRK et al., 2001).

Em ratos e humanos há evidências de que o uso de antioxidantes como a vitamina C e E previne a hemólise pós-exercício em indivíduos sedentários (SENTÜRK et al., 2005), reduz a infiltração de neutrófilos no tecido muscular durante o exercício, reduzindo a produção de ERO e o estresse oxidativo (AOI et al., 2004; MONTILA et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que o resveratrol é capaz de inibir a morte de eritrócitos “suicidas” em humanos (QADRI et al., 2009).

Na medicina esportiva e veterinária há evidências de que o uso de suplementos antioxidantes como as vitaminas E e C, betacaroteno, coenzima Q10, N-acetilcisteína, ácido úrico e propranolol minimizam ou evitam os danos oxidativos musculares e plasmáticos induzidos pelo esforço físico moderado a intenso (AGUILÓ et al., 2005; FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009;). O exercício aumenta a concentração sanguínea de MDA e pentano, indicadores indiretos de peroxidação lipídica. Enquanto que uma dieta rica em vitaminas E, C e outros antioxidantes, reduz o estresse oxidativo e os danos musculares resultantes de atividade física intensa (CLARKSON; THOMPSON, 2000; NUNES et al., 2011).

O resveratrol (3,5,4 'trihidroxiestilbeno) é um polifenol presente em uvas, vinhos, amendoins e raízes de *Polygonum cuspidatum* e *Ruibarbo* (*Rheum rhaponticum*) em mamíferos melhorara a função e biogênese mitocondrial, promove proteção contra doenças cardiovasculares, câncer, colesterol e diabetes tipo II (BAUR et al., 2006;

LAGOUGE et al., 2006). Também altera o catabolismo protéico, função muscular e confere resistência contra o estresse oxidativo, danos e morte celular de células de músculo esquelético durante o exercício físico (BAUR et al., 2006). O trans-resveratrol é comercialmente disponível e relativamente estável se for protegido de pH alto e luz (NAYLOR, 2009).

O glucosídeo de resveratrol pode ser absorvido pelo intestino delgado e metabolizado pelo fígado (SOMOZA, 2005). Assim como os glucosídeos de flavonóides, a excreção é por via urinária (SOMOZA, 2005). Walle et al. (2004) observaram que após uma dose oral de 25 mg de ^{14}C -resveratrol (110 mmol) em seis seres humanos, o início do pico de concentração equivalente do resveratrol no plasma foi de 491 ± 90 ng/mL uma hora após a dose inicial. Seis horas após houve um segundo pico em todos os indivíduos de 290 ± 68 ng/mL.

O polifenol resveratrol é potente antioxidante bem absorvido por via oral, rapidamente metabolizado e não apresenta registro de toxicidade significativa em humanos (COTTART et al., 2010). A bioatividade do resveratrol administrado por via oral em ratos *Wistar* foi investigado (WENZEL et al., 2005) e os resultados sugerem que efeitos antioxidantes obtidos em estudos “in vitro” possam não ser evidenciados em ensaios “in vivo”. O resveratrol (10 μM) foi capaz de aumentar em 30-45% o sistema redox da membrana eritrocitária humana de modo que seu uso pode ser benéfico em condições em que há diminuição do potencial antioxidante plasmático (PANDEY; RIZVI, 2010).

Ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e suplementados com resveratrol (22mg ou 186 mg/kg/dia durante seis semanas) tiveram aumento da sobrevida e aumento do tamanho, conteúdo e atividade mitocondrial da fibra muscular não-oxidativa, o que contribuiu para um aumento no consumo máximo de

oxigênio das fibras musculares e maior resistência à fadiga muscular ao realizarem exercício na esteira (BARGER et al., 2008).

O resveratrol exerce uma variedade de benefícios à saúde que incluem a eliminação direta da ERO (STOJANOVIC et al., 2001), a inibição da xantina oxidase (JIA et al., 2008) e a ativação de vias intracelulares que melhoram o metabolismo e induzem a biogênese mitocondrial (BAUR et al., 2006).

O resveratrol melhora as habilidades motoras dos ratos obesos e idosos durante exercícios físicos, estimula a biossíntese de mitocôndrias no músculo esquelético e fígado (BAUR; SINCLAIR, 2006; SUN et al., 2010; SUN et al., 2011), além de conferir proteção a síndrome metabólica e degeneração senil (BAUR; SINCLAIR, 2006). Ikizler et al. (2006) relatam que 20 mg/kg/dia de resveratrol administrado em ratos durante 14 dias protege o músculo esquelético de lesão celular e do estresse oxidativo induzido por um protocolo Isquemia/Reperusão, sendo avaliados pela concentração plasmática de mioglobina, LDH, CK, MDA, carbonila e proteína sulfidril. Suplementação 0,05% de resveratrol em ratos idosos durante 10 dias e submetidos a exercício isométrico do músculo gastrocnêmio e sóleo diminuiu o estresse oxidativo muscular (peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, atividade da xantina oxidase e razão GSH/GSSH) (RYAN et al., 2010).

A atividade física estimula uma resposta hiperglicêmica relacionada com o aumento da atividade glicogenolítica muscular e hepática por estimulação do sistema nervoso simpático (TAN et al., 1992). Segundo Rogatto (2004) a gliconeogênese contribui com o aumento da glicemia em ratos submetidos à natação em função de elevações na secreção de hormônios glicocorticoides durante a atividade física. Há registro de que tratamento com 10 mg/kg/dia de resveratrol por 30 dias atenua a hiperglicemia em ratos induzidos a diabetes mellitus, assim como

os níveis séricos de ALT, AST, ureia, creatinina, colesterol e triglicérides (SCHMAZ 2011).

O exercício físico agudo quando realizado sem condicionamento pode induzir um aumento da concentração sérica de colesterol e glicose (AFONSO et al., 2003) ou uma diminuição (Young et al., 2007), porém condicionamento físico promove maior redução do colesterol (Sikatar et al., 2011). O RV inibe a oxidação de LDL e a produção e secreção de lipoproteínas, assim como o aumento da atividade do receptor hepático de LDL, contribuindo para menor taxa de colesterol total circulante (ARIBAL et al., 2009).

2. Referências Bibliográficas

AGUIAR, C.R.; FALCÃO, M.C.; RAMOS, J. L.A.; Estresse oxidativo no recém-nascido: a bilirrubina como antioxidante. *Revista Paulista de Pediatria*, v.24, n.4, p.363-366, 2006.

AFONSO, M.; SOUZA, C.N.; ZAGATTO, A.M.; LUCIANO, E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. **Motriz**, v.9, n.2, p.87-92, 2003.

ANTUNES NETO, J.M.; PILATTI, L.S.; AGOSTINHO FILHO, J.P.; MAGALHÃES, N.P. Cinética de marcadores de estresse oxidativo e fisiológico em condições de corrida exaustiva. **Revista Brasileira de Educação Física, Esporte e Dança**, v.2, p.56-68, 2007.

ARAUJO, G.G.; ARAÚJO, M.B.; MOTA, C.S.A.; D'ANGELO, C.R.R.A.; MANCHADO, F.B.; LUCIANO, E. Respostas fisiológicas ao exercício agudo em ratos obesos tratados com metformina. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.6, p.393-396, 2007.

ARAÚJO, M.B.; PRADA, F.J.A.; MELLO, M.A.R. Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço. **Motriz, Revista de Educação Física**, v.12, n.3 p.307-312, 2006.

AOI, W.; NAITO, Y.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; SAKUMA, K.; ICHIKAWA, H.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p.480-487, 2004.

BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A.; LERIN, C.; KALRA, A.; ALLARD, J.S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P.J.; POOSALA, S.; BECKER, K.G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K.W.; SPENCER, R.; LAKATTA, E.G.; COUTEUR, D.; SHAW, R.J.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D.K.; CABO, R.; SINCLAIR, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v.444, p.337-342, 2006.

BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, p.493-506, 2006.

BACHUR, J.A.; S.B.; GARCIA, VANNUCCHI, H.; JORDAO, A.A.; CHIARELLO, P.G.; ZUCOLOTO, S. Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v.32, p.190-196, 2007.

BARGER, J.L.; KAYO, T.; VANN, J.M.; ARIAS, E.B.; WANG, J.; HACKER, T.A.; WANG, Y.; RAEDERSTORFF, D.; MORROW, J.D.; LEEUWENBURGH, C.; ALLISON, D.A.; SAUPE, K.W.; CARTEE, G.D.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T.A. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. **PLoS ONE**, v.3, n.6, p.1-10, 2008.

BECKER, B.F. Towards the physiological function of uric acid. **Free Radical & Biology Medicine**, v.14, p.615-631, 1993.

BRANCACCIO, P.; LIMONGELLI, F.M.; MAFFULLI, N. Monitoring of serum enzymes in sport. **British Journal of Sports Medicine**, v.40, p.96-97, 2006.

BROOKS, G.A. Current concepts in lactate exchange. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.23, p.895-906, 1991.

CASTRO, A. A. Revisão sistemática e meta-análise. 2001. Disponível em: <<http://www.metodologia.org/meta1.PDF>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p.637-46, 2000.

COTTART, C.H.; NIVET-ANTOINE, V.; LAGUILLIER-MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J.L. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.54, p.7-16, 2010.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C.; TIRAPEGUI J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.5, p.337-342, 2007.

DEATON, C.M.; MARLIN D.J. Exercise-Associated Oxidative Stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.2, n.3, p.278-291, 2003.

FISCHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dynamic Medicine**, v.8, p.1-25, 2009.

IKIZLER, M.; OVALI, C.S.; DERNEK, N.E.; SEVIN, B.; KAYGISIZ, Z.; KURAL, T. Protective effects of resveratrol in ischemia–reperfusion injury of skeletal muscle: a clinically relevant animal model for lower extremity ischemia. **Chinese Journal of Physiology**, v.49, p.204-209, 2006.

JENKINS, R.R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p.670-674, 2000.

JIA, Z.; ZHU, H.; MISRA, B.R.; MAHANEY, J.E.; LI, Y.; MISRA, H.P. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.313, p.187-194, 2008.

Jl, L.L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.6, p.1079-86, 1995.

LAGOUGE, M.; ARGMANN, C.; GERHART-HINES, Z.; MEZIANE, H.; LERIN, C.; DAUSSIN, F.; MESSADEQ, N.; MILNE, J.; LAMBERT, P.; ELLIOTT, P.; GENY, B.; LAAKSO, M.; PUIGSERVER, P.; AUWERX, J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, v.127, p.1109-1122, 2006.

LEE, F.-T.; KUO, TZ-Y.; LIOU, S.-Y.; Chien, C.-T. Chronic *Rhodiola rosea* Extract Supplementation Enforces Exhaustive Swimming Tolerance. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.37, n.3, p.557-72, 2009.

MACLEAN, P.D.; DRAKE, E.C., ROSS, L., BARCLAY, C. Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.600-609, 2007.

NAYLOR, A.J.D. Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle. **Life Science**, v.84, p.637-640, 2009.

NETTO JR.J.; BRAILE, D.M.; CECCHINI, R.; CICOGNA, A.C.; GUARNIER, F.A.; PASTRE, C.M.; OLIVEIRA JR, S.A.; SUGISAKI, M.; PASTRE E.C. Comportamento da produção de espécies reativas de oxigênio em miocárdio de ratos submetidos a treinamento de baixa intensidade em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.6, p.411-415, 2007.

NIE, J.; TONG T.K.; GEORGE, K.; FU F.H.; LIN H.; SHI, Q. Resting and post exercise serum biomarkers of cardiac and skeletal muscle damage in adolescent runners. **Scandiavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v.20, p.1-5, 2010.

NUNES, L.A.S.; SILVA, F.O.C.; CEGLIO A.C.; VENTURINI, T.S. Efeitos da suplementação com *Panax ginseng* sobre parâmetros de estresse oxidativo e lesão muscular induzidos por exercício exaustivo agudo em ratos. **Revista Ciências em Saúde**, v.1, n.1, 2011.

PALAZZETTI, S.; RICHARD M.J.; FAVIER, A.; MARGARITIS, I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.28, p.588-604, 2003.

PANDEY K. B.; RIZVI S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans Oxidative Medicine and Cellular Longevity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, n.1, p.2-12; 2010.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiological Reviews**, v.88, n.4, p.1243–1276, 2008.

POWERS, S.K.; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.31, n. 7, p.987-997, 1999.

QADRI, S.M.; FÖLLER, M.; LANG, F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by Resveratrol. **Life Science**, v.85, p.33-38, 2009.

RADÁK, Z.; APOR, P.; PUCSOK, J.; BERKES, I.; OGONOVSKY, H.; PAVLIK, G.; NAKAMOTO, H.; GOTOS, S. Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. **Life Science**, v.72, p.1627-33, 2003.

REID, M. B. React oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. **News in Physiology Science**, v.11, p.114-119, 1996.

ROBERTS, K.; KUNAL, K.; SINDHU, C. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Science**, v.84, p.705-712, 2003.

ROGATTO, G.P.; OLIVEIRA, C.A.M.; FARIA, M.C.; LUCIANO, E. Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. **Motriz**, v.10, n.2, p.61-66, 2004.

RYAN, M.J.; JACKSON, J.R.; HAO, Y.; WILLIAMSON, C.L.; DABKOWSKI, E.R.; HOLLANDER, J.M.; ALWAY, S.E. Suppression of oxidative stress by resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscles of aged mice. **Journals of Gerontology: Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v.65, n.8, p.815-831, 2010.

SASTRE, J.; ASENSI, M.; GASCO, E.; PALLARDO, F.V.; FERRERO, J.A.; FURUKAWA, T. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. **American Journal of Physiology**, v.263, p.992-995, 1992.

SCHNEIDER, A.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, p.4, 2004.

SENTÜRK, U.K.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M.R.; KIPMEN, D.; YALÇIN Ö.; BOR- KÜÇÜKATAY, M.; YESILKAYA, A.; BASKURT, O.K. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, v.91, p.1999-2004, 2001.

SENTÜRK, U.K.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; KOÇER, G.; ÖZKAYA, Y.G.; YESILKAYA, A.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; ÜYÜKLÜ, M.; YALÇIN Ö.; BASKURT, O.K. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but trained human. **Journal of Applied Physiology**, v.99, p.1434-1441, 2005.

SCHMATZ, R.; PERREIRA, L.B.; STEFANELLO, N.; MAZZANTI, C.; SPANEVELLO, R.; GUTIERRES, J.; BAGATINI, M.; MARTINS, C.C.; ABDALLA, F.H.; SERRES, J.D.S.; D.Z.; VIEIRA, J.M.; CARDOSO, A.M.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, v.94, p.374-383, 2011.

SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.49, p.472-481, 2005.

SOUZA, R. A. ; MIRANDA, M.; XAVIER, H. ; SALLES, B. F.; SIMÃO, R.; OSÓRIO, R. A. L.; RIBEIRO, W. Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre marcadores enzimáticos de dano muscular de ratos sedentários e exercitados com natação. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v.24, n.3, p.343-352, 2010.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.391, p.79-89, 2001.

SUN, L.; SHEN, W.; LIU, Z.; GUAN, S.; LIU, J.; DING, S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Scienc**, v.86, n.1-2, p.39-44, 2010.

SUN, M.; QIAN, F.; SHEN, W.; TIAN, C.; HAO, J.; SUN, L.; LIU, J. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, p.1-12; 2011.

TAN, N.; MORIMOTO, K.; SUGIURA T.; MORIMOTO, A. MURAKAMI, N.; Effects of running training on the blood glucose and lactate in rats during rest and swimming. **Physiology & Behavior**, v. 51, n.5, p.927-931, 1992.

TAULER, P.; AGUILÓ, A.; GIMENO, I.; GUIX, P.; TUR, J.A.; PONS, A. Different effects of exercise tests on the oxidant enzyme activities in lymphocytes and neutrophils. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, p.479-484, 2004.

TERBLANCHE, S. E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. **Cell Biology International**, v.23, n.11, p.749-53, 2000.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.331, n.1, p.63-8, 1996.

VINÃ, J.; GIMENO, A.; SASTRE.; J.; DESCO, C.; ASENSI, M.; PALLARDO F.V. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats: role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. **IUBMB Life**, v.49, n.6, p.539-44, 2000.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M.H.; OATIS JR, J.E.; WALLE, K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v.32, n.12, p.1377-1382, 2004.

WENZEL, E.; SOLDI, T.; ERBERSDOBLER, H.; SOMOZA, V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to *Wistar* rats. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.49, p.482-494, 2005.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-161, 1994.

YU, B.P.; CHUNG, H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.127, n.5, p.436-43, 2006.

Prevenção do estresse oxidativo e lesão muscular em ratos tratados com resveratrol

Prevention of oxidative stress and muscle damage in rats treated whit resveratrol

Kelly Elisângela Vendrame¹; Luis Gustavo Narciso¹; Breno Fernando Martins de Almeida¹; Priscila Preve Pereira¹; Anelise Maria Bosco¹; Jucilene Conceição Souza²; Vania Machado de Luna Freire Arcoverde¹; Daniel Lemes Rodrigues³; Mário Jéfferson Quirino Louzada⁴; Paulo César Ciarlini¹.

¹Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), UNESP, Araçatuba/SP, Brasil.

²Assistente de Apoio Acadêmico do Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), UNESP, Araçatuba/SP, Brasil.

³Estudante de Iniciação Científica e Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), UNESP, Araçatuba/SP, Brasil.

⁴Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), UNESP, Araçatuba/SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Rua Clóvis Pestana, n. 793, Araçatuba/SP, CEP 16050-680.

Aos cuidados de Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini.

E-mail: ciarlini@fmva.unesp.br

Telefone: +55 18 36361413

Declaro não haver conflito de interesse entre os autores.

Resumo

O exercício físico intenso causa um maior consumo de oxigênio que induz ao estresse oxidativo capaz de danificar fibras musculares, proteínas e lipídeos corpóreos. O resveratrol (RV) é um potente antioxidante presente naturalmente em algumas plantas e com ação sobre o estresse oxidativo causado pela insuficiência renal e diabetes, prevenindo e/ou diminuindo consequências do infarto do miocárdio, hipercolesterolemia, câncer e Alzheimer. O presente estudo objetivou testar a hipótese de que ratos Wistar sedentários quando submetidos a um esforço físico intenso e tratados com RV (10mg/kg/dia) durante 10 dias apresentam menor estresse oxidativo e lesão muscular. O RV não alterou o perfil metabólico dos ratos mantidos em repouso e o exercício físico induziu no grupo não tratado com RV maior concentração plasmática de glicose ($p=0,0361$), aspartato aminotransferase ($p=0,0476$) e menor concentração de bilirrubina ($p=0,0176$). A capacidade antioxidante total foi maior no grupo tratado com resveratrol e submetido á natação ($p<0,001$). Os resultados obtidos comprovam que o esforço físico intenso nos animais sedentários induziu estresse oxidativo capaz de ocasionar lesão muscular e que tais efeitos indesejáveis podem ser atenuados com uso de resveratrol.

Palavras chaves: exercício, antioxidante, natação.

Abstract

The intense physical exercise increases the oxygen consumption and leads to oxidative stress that is able to damage muscle fibers, proteins and lipids from organism. Resveratrol (RV) is a potent antioxidant naturally found in some plants, its action is on oxidative stress caused by renal failure and diabetes, preventing and/or reducing the consequences of myocardial infarction, hypercholesterolemia, cancer and Alzheimer's disease. This study aimed to test the hypothesis that sedentary rats subjected to an intense physical and treated with RV (10mg/kg/day) for 10 days showed lower oxidative stress and muscle injury. The use of RV did not affect the metabolic profile in rats kept in rest, in the group not supplemented with RV the exercise increased plasmatic concentration of glucose ($p=0,0361$) and activity of aspartate aminotransferase ($p=0,0476$), while decreased concentration of total bilirubin ($p=0,0176$). An increased total antioxidant status was observed in the group supplemented with resveratrol and submitted to swimming ($p<0,001$). The results demonstrated that the intense physical effort in sedentary animals induced oxidative stress that can cause muscle muscle damage and that such effects can be attenuated with the use of resveratrol.

Keywords: exercise, antioxidant, swimming.

Introdução

Estresse oxidativo é um desequilíbrio em que espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como o superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil sobrepõem as defesas antioxidantes [1,2]. O sistema de defesa endógeno é constituído por vitaminas antioxidantes (vitamina A, C e E), ácido úrico, glutathione, bilirrubina, albumina e por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase [1]. Tais componentes plasmáticos atuam na defesa antioxidante intracelular eliminando as ERO e consequentemente prevenindo as reações em cadeia desses radicais livres que oxidam os substratos celulares [3].

A moderada produção de ERO nas fibras musculares é fisiologicamente importante para o aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} [4], aumento da força de contração muscular, regulação da expressão gênica e metabolização da glicose [5]. A excessiva produção de ERO e óxido nítrico pelas fibras musculares durante a

contração muscular decorrente do exercício físico induz à redução da força contrátil, à fadiga muscular [4] e causa lesão no músculo esquelético [5].

O exercício físico extenuante causa um desequilíbrio da homeostase intracelular entre pró-oxidantes e antioxidantes decorrente do aumento de ERO geradas pelo maior consumo de oxigênio [6]. O estresse oxidativo decorrente de uma sessão de exercício físico pode causar danos a lipídios, proteínas e DNA, assim como lesões das fibras musculares, dor e inflamação [6,7]. A intensidade do dano oxidativo e aumento da atividade plasmática de creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) é dependente da intensidade, duração, ambiente e resistência à exaustão do indivíduo [8, 9,10].

A natação exaustiva em ratos treinados e sedentários gera dano ao tecido hepático e muscular, associado à diminuição de antioxidantes como a glutathione redutase e glutathione peroxidase [11], maior metabolização de glutathione reduzida e vitamina E [12], aumento da atividade das enzimas catalase [13] e superóxido dismutase [7], assim como maior concentração plasmática de AST, ALT, LDH [14] e CK [15].

Há evidencia do uso de suplementos antioxidantes como as vitaminas E e C, betacaroteno, coenzima Q10, N-acetilcisteína, ácido úrico e propranolol minimizam ou evitam os danos oxidativos musculares e plasmáticos induzidos pelo esforço físico moderado a intenso [16]. Em humanos saudáveis exercício aumenta a concentração plasmática de malondialdeído (MDA), indicador indireto de peroxidação lipídica [17]. Enquanto que uma dieta rica em antioxidantes, reduz o estresse oxidativo e os danos musculares resultantes de atividade física intensa [17].

Nunes et al. (2011) [18] relatam que em ratos a suplementação com o antioxidante *Panax ginseng* minimizou estresse oxidativo e a lesão muscular induzida por natação. Neste estudo observou-se que a suplementação com antioxidante e a natação não causaram aumento sérico de ácido úrico, CK, ALT e da capacidade antioxidante total (TAC), entretanto o tratamento com ginseng promoveu uma maior proteção do tecido muscular de forma que o aumento de MDA e a AST de ratos submetidos à natação foi menor.

O resveratrol (RV) é um polifenol presente em uvas, vinhos, amendoins e raízes de *Polygonum cuspidatum* e *Ruibarbo* (*Rheum raphanistrum*) capaz de promover proteção contra doenças metabólicas, melhorando a função e biogênese mitocondrial [19,20]. Este antioxidante exerce em camundongos uma variedade de benefícios à saúde que incluem a inibição da xantina oxidase, eliminação direta de ERO, prevenção da oxidação lipídica e protéica, além da inibição da agregação plaquetária [21,22,23,24].

No mundo moderno o sedentarismo é um problema de saúde pública, sendo grande o interesse por tratamentos que previnem o estresse oxidativo que ocorre em indivíduos sedentários que praticam eventualmente uma atividade física. Há evidências de que o RV previne a oxidação lipídica, aumenta a atividade da catalase, altera o catabolismo protéico, a função muscular e confere resistência contra o estresse oxidativo, danos e apoptose de células do músculo esquelético durante o exercício físico em camundongos [19,24].

Estudos experimentais sobre estresse do esforço físico realizados com ratos têm sido considerados como os mais confiáveis que os realizados em humanos, uma vez que permitem minimizar diversos fatores que podem influenciar parâmetros utilizados para avaliar a lesão muscular, metabolismo oxidativo e antioxidante [16].

Entretanto são escassas as investigações sobre o efeito antioxidante do RV sobre o estresse oxidativo decorrente do esforço físico em ratos [25, 26].

No presente estudo foi investigada a hipótese de que ratos sedentários submetidos a um esforço físico intenso e tratados com RV apresentam menor estresse oxidativo e lesão muscular.

Material e Métodos

Esta pesquisa foi realizada de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba segundo as resoluções brasileiras (Lei nº. 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº. 26.645 de 10 e julho de 1934), conforme aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da UNESP, Campus de Araçatuba (protocolo FOA-0568/11).

Quarenta ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos adultos com aproximadamente 350 gramas foram mantidos em ambiente climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no Laboratório de Biofísica da UNESP, em gaiolas comuns com número de quatro em cada e alimentados com ração de mesma qualidade e fabricante (Purina®) e água a vontade.

Todos os ratos, depois de numerados e sorteados, foram aleatoriamente submetidos a quatro tratamentos: Grupo N-R- constituído de ratos (n=10) em repouso e tratados via oral por gavagem com 1 mL de solução aquosa de NaCl 0,9% por 10 dias; Grupo N-R+ constituído de ratos (n=10) em repouso e tratados via oral por gavagem com 1mL de solução aquosa de RV (10mg/kgPV/10dias); Grupo N+R- constituído de ratos (n=10) submetidos ao esforço físico intenso de natação e tratados via oral por gavagem com 1 mL de solução aquosa de NaCl 0,9% por 10

dias; e Grupo N+R+ constituído de ratos (n=10) submetido ao esforço físico intenso de natação e tratados via oral por gavagem com 1mL de solução aquosa de RV (10mg/kgPV/10dias).

Ratos dos grupos N-R+ e N+R+ foram tratados por dez dias e a última dose foi administrada 30 minutos antes do esforço físico com uma dose oral de RV comercial^a (10mg/kg PV/dia) equivalente a recomendada para ratos por Schmatz et al. [27].

Os animais dos grupos N+R- e N+R+ foram submetidos a um período de três dias de adaptação com início no sétimo dia de tratamento com resveratrol: primeira sessão de 5 minutos com água (30°C ± 1°C) na profundidade de 5 cm e ambiente climatizado (22 ± 2°C); segunda sessão de 10 minutos com água na profundidade de 15 cm e terceira sessão de 15 minutos com água na profundidade de 40cm [28].

Após o décimo dia experimental, todos os ratos dos grupos N+R- e N+R- foram submetidos a uma única sessão de 50 minutos de exercício físico intenso objetivando induzir lesão muscular por estresse oxidativo, conforme protocolo preconizado por Bachur et. al. (2007) [12]. Para tal utilizou-se um tanque de 60 centímetros de altura e 20 de diâmetro com água para natação individual, sendo monitorado possível desconforto e exaustão conforme Veskokis et al. (2009) [29].

As amostras de sangue total dos ratos em repouso foram colhidas juntamente com as dos ratos submetidos á natação, exatamente duas horas depois do exercício. Para tal, os ratos foram sedados com Cloridrato Xilazina 2% (3mg/kg) e Cloridrato de Cetamina (30mg/kg) de acordo com o peso corporal, em seguida foram colhidos 5 mL de sangue total por punção cardíaca e armazenados em frascos heparinizados (10 UI/mL) para imediata obtenção do plasma por centrifugação (3600

^a Terratermal® Brasil

g/10 minutos). A eutanásia foi realizada com dose excessiva de Cloridato Xilazina 2% e Cloridrato de Cetamina de acordo com o peso corporal.

Para a avaliação do perfil metabólico foi complementado com a dosagem de colesterol pelo método enzimático (oxidase/peroxidase)^b, glicose pelo método enzimático (glicose oxidase/peroxidase)^c, ureia pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase)^d e creatinina pelo método cinético (picrato alcalino)^e.

Para avaliação do estresse oxidativo, utilizando conjunto de reativo comercial, foi quantificado o TAC pelo método inibição de formação de cátion de ABTS[®] (2.2'-Azino diethyl-bezothiazoline sulfonic acid)^f monitorado com padrão antioxidante específico para automatização^g, assim como a concentração plasmática de albumina pelo método de verde de bromocresol^h, bilirrubina pelo método Van der Berghⁱ e ácido úrico pelo método enzimático (uricase/peroxidase)^j.

A fim de evitar interferência da hemólise os biomarcadores plasmáticos de lesão muscular AST^k, ALT^l, CK^m e LDHⁿ foram mensurados por métodos enzimáticos UV.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas a 37°C em um analisador automatizado^o, previamente calibrado com calibrador comercial^p e controles nível I^q e II^r.

^b Cholesterol, Cód.11505, BioSystems, Barcelona, Spain.

^c Glucosa, Cod.11503, BioSystems, Barcelona, Spain.

^d Urea/BUN-UV, Cod. 11516, BioSystems, Barcelona, Spain.

^e Creatinine, Cod.11502, BioSystems, Barcelona, Spain.

^f Total antioxidant status, cat. NX2332, Randox laboratories, UK.

^g Anti-oxidants standard, cat. NX2615, Randox laboratories, UK.

^h Albumine, Cod.11574, BioSystems, Barcelona, Spain.

ⁱ Bilirrubina Espectrofotométrica Cod. 11510, BioSystems, Barcelona, Spain.

^j Uric acid, Cod.11802, BioSystems, Barcelona, Spain.

^k Aspartate aminotransferase (AST/GOT), Cod. 11830, BioSystems, Spain.

^l Alanina Aminotransferase (ALT/GPT) Cod 1156 BioSystems, Spain.

^m Creatina kinase (CK), Cod. 11556, BioSystems, Spain.

ⁿ Lactato Desidrogenase (LDH), Cod. 12580 A25, BioSystems, Barcelona, Spain.

^o Analisador automático BTS, mod. 370 plus, BioSystems, Barcelona, Spain.

^p Calibrator serum, Cód.18011, BioSystems, Barcelona, Spain.

^q Assayed control serum level I, Cód. 18005, BioSystems, Barcelona, Spain.

Após os estudos das distribuições das variáveis quanto à normalidade (teste KS) e homocedasticidade (Teste Bartlett), conforme preconizado por ZAR (1984) [30], para as comparações entre os quatro grupos experimentais das variáveis não paramétricas e paramétricas, foram utilizadas as provas de Kruskal-Wallis e ANOVA, respectivamente. As análises estatísticas supracitadas foram feitas com auxílio de um programa computacional estatístico^s.

Resultados e Discussão

Os valores do perfil bioquímico dos ratos controle em repouso (N-R-) e que não foram tratados com RV (Tabela 1) ficaram dentro da faixa de referência da espécie [18,31,32,33], refletindo o estado de higidez observado no exame físico.

Tabela 1- Perfil bioquímico sérico (média e desvio-padrão) de ratos Wistar sedentários submetidos ou não ao tratamento com resveratrol (10mg/Kg PV) por 10 dias e submetido a 50 minutos de natação: N-R- (em repouso e não tratados com resveratrol; N-R+ (em repouso e tratados com resveratrol); N+R- (natação e não tratados com resveratrol); N+R+ (natação e tratados com resveratrol).

Marcador	N-R-	N-R+	N+R-	N+R+
Colesterol (mmol/L)	1,98 ± 0,30 ^a	2,05 ± 0,31 ^a	1,85 ± 0,39 ^a	1,85 ± 0,24 ^a
Glicose (mmol/L)	18,04 ± 3,58 ^b	20,60 ± 4,67 ^{ab}	24,37 ± 6,77 ^a	23,78 ± 6,79 ^{ab}
Ureia (mmol/L)	8,60 ± 1,20 ^a	9,01 ± 1,20 ^a	8,71 ± 1,83 ^a	8,72 ± 1,18 ^a
Creatinina (μmol/L)	34,87 ± 6,97 ^a	35,84 ± 7,58 ^a	41,30 ± 8,84 ^a	36,42 ± 3,88 ^a
Proteína Total (g/L)	66,64 ± 4,95 ^a	68,00 ± 6,21 ^a	63,64 ± 5,22 ^a	68,60 ± 7,73 ^a
TAC (mmol/L)	0,73 ± 0,19 ^b	0,78 ± 0,10 ^b	0,85 ± 0,10 ^b	1,12 ± 0,10 ^a
Albumina (g/L)	25,45 ± 1,73 ^a	25,27 ± 2,15 ^a	23,82 ± 2,44 ^a	25,10 ± 2,07 ^a
Bilirrubina total (μmol/L)	9,45 ± 2,82 ^{ab}	10,46 ± 3,46 ^a	6,49 ± 2,31 ^b	8,24 ± 2,95 ^{ab}
Ácido úrico (mmol/L)	0,10 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,06 ^a	0,10 ± 0,01 ^a
AST (UI/L)	112,27 ± 18,06 ^b	117,91 ± 25,22 ^{ab}	143,45 ± 27,22 ^a	129,60 ± 41,07 ^{ab}
ALT (UI/L)	58,27 ± 6,12 ^a	64,64 ± 12,78 ^a	66,36 ± 11,78 ^a	63,10 ± 12,13 ^a
CK (UI/L)	333,64 ± 168,05 ^a	376,18 ± 185,05 ^a	479,18 ± 171,84 ^a	437,90 ± 220,71 ^a
LDH (UI/L)	328,18 ± 147,72 ^a	437,18 ± 305,56 ^a	446,91 ± 157,41 ^a	405,30 ± 258,98 ^a

* Letras não coincidentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05) segundo pós-teste de Tukey/Dunn.

^r Assayed control serum level II, Cód. 18007, BioSystems, Barcelona, Spain.

^s Graphpad Instat.

Os valores de glicose plasmática dos ratos em repouso e não tratados com RV (N-R-) (Tabela 1) foram superiores aos de referência considerados por Thrall et al. (2007) [33] e Kaneko et al. (2008) [34], o que é explicado pelo fato de que os ratos não foram submetidos a restrição alimentar.

O resveratrol não alterou o perfil bioquímico sérico dos ratos sedentários sem exercício (N-R+) em relação ao grupo sedentário controle (N-R-) (Tabela 1), evidenciando que a dosagem e o tempo de administração do RV utilizados são seguros, não sendo evidenciado qualquer efeito colateral associado à lesão muscular, renal, hepática ou alteração metabólica. Estes resultados são similares aos de Schmatz et al. (2011) [27] que igualmente não observaram alteração nos níveis séricos de colesterol, glicose, ureia, creatinina, AST e ALT.

Os ratos não tratados com RV e submetidos à natação (N+R-) apresentaram glicemia significativamente superior (Tabela 1) àqueles mantidos em repouso (N-R-). Esta diferença deve-se ao fato da atividade física estimular uma resposta hiperglicêmica relacionada com o aumento da atividade glicogenolítica muscular e hepática por estimulação do sistema nervoso simpático [35]. A gliconeogênese contribui com o aumento da glicemia em ratos submetidos à natação em função de elevações na secreção de hormônios glicocorticoides durante a atividade física [36].

Há registro de que o tratamento com 10 mg/kg/dia de resveratrol por 30 dias atenua a hiperglicemia em ratos com diabetes mellitus [27]. No presente estudo, os ratos tratados e exercitados não apresentaram diferença estatística em relação ao controle tratado e sedentário, reforçando a hipótese que o resveratrol pode ter contribuindo para atenuar a hiperglicemia resultante do esforço físico.

Houve apenas uma sutil diminuição da concentração plasmática de colesterol total decorrente da natação (Tabela 1), resultado similar ao relatado por Siktar et al.

(2011) [37]. É sabido que o colesterol apenas é reduzido após o condicionamento físico adquirido com a prática diária de exercício físico [38].

A maior atividade plasmática de AST foi observada nos ratos não tratados com RV e submetidos ao esforço físico intenso da natação (N+R-), indicando maior lesão muscular neste grupo. Outros estudos igualmente observaram aumento de AST em ratos submetidos à natação [14] e corrida [38].

Os demais marcadores de lesão muscular analisados (ALT, CK e LDH) não diferiram (Tabela 1) entre os ratos em repouso (N-R-, N-R+) e os que nadaram (N+R-, N+R+). Resultados similares foram observados em ratos submetidos a treinamento de natação por 60 minutos [39] e natação até exaustão [18]. Sabidamente a meia-vida da CK é mais curta e a atividade das enzimas utilizadas como marcadores de lesão muscular podem variar de acordo com os diferentes protocolos de exercício, intensidade, tempo de execução e modalidade de atividade física [16,40].

A atividade de AST plasmática dos ratos submetidos à natação tratados (N+R+) foi menor do que os não tratados (N+R-), porém tal diferença não foi significativa (Tabela 1). Entretanto, considerando que a atividade plasmática da AST é proporcional ao número de células lesadas [10], pode-se concluir que os ratos submetidos à natação e tratados com RV apresentaram menor grau de lesão muscular do que o grupo não tratado (Tabela 1), sugerindo que este antioxidante foi capaz de atenuar tal lesão. Resultados similares sobre a prevenção da lesão muscular e do estresse oxidativo com uso de RV já haviam sido comprovados em ratos idosos [22] submetidos a exercício isométrico do músculo gastrocnêmio e sóleo [24].

A bilirrubina é um importante antioxidante endógeno e pode aumentar decorrente ao exercício físico [1], porém uma concentração significativamente menor foi observada nos ratos com maior atividade sérica de AST (Tabela 1). Este resultado sugere que a menor concentração de bilirrubina pode ter contribuído para a maior lesão muscular observada neste grupo, uma vez que não houve diferença entre os grupos em relação aos demais antioxidantes endógenos mensurados (albumina e ácido úrico). A redução da bilirrubina tem sido associada com o aumento de alguns antioxidantes como a Vitamina C e E [41,42,43]. Portanto é razoável hipotetizar que nos primeiros momentos após o estresse físico um aumento compensatório na síntese desses antioxidantes possa ter causado a diminuição da concentração sérica de bilirrubina observada nos ratos submetidos à natação.

O ácido úrico é outro antioxidante não enzimático que pode proteger o organismo contra o estresse oxidativo decorrente do esforço físico, sua concentração plasmática pode aumentar significativamente nessas condições [1]. No presente experimento não houve alteração do ácido úrico duas horas após o exercício de natação (Tabela 1), assim como observado por Nunes et al. (2001) [18]. Por ser produzido a partir da degradação de compostos purínicos, o aumento isolado na concentração plasmática não pode ser considerada uma resposta específica da adaptação ao estresse oxidativo induzida por exercício [1,44]. Os mecanismos envolvidos com o estresse oxidativo são complexos e acredita-se que um conjunto de alterações nos antioxidantes endógenos contribui para atenuação do estresse oxidativo, eliminação de ERO e radicais hidroxila [17,44].

Segundo alguns autores, o exercício físico intenso pode reduzir a capacidade antioxidante do organismo decorrente da excessiva produção de ERO e o treinamento físico regular promove uma adaptação do sistema antioxidante

endógeno minimizando o dano oxidativo [16,3]. Entretanto, duas horas após a natação os ratos tratados com RV apresentaram valores de TAC significativamente superiores aos dos demais grupos (Tabela 1), sugerindo uma adaptação do sistema oxidante já nos primeiros momentos do estresse causado pelo esforço muscular extenuante. Venditti e Di Meo (1996) [11] também observaram aumento do TAC imediatamente após exercício intenso de natação em indivíduos sedentários. O aumento de TAC é resultado da injúria pró-oxidante inicial e o tratamento com antioxidante pode contribuir para esse aumento [16].

Embora o conjunto dos resultados demonstre que a lesão muscular de ratos sedentário submetidos à natação pode ser atenuada pelo uso do RV, há necessidade de ampliar esta investigação com outras doses e marcadores de estresse oxidativo para melhor entender os mecanismos envolvidos com o aumento da capacidade antioxidante total que contribuíram para minimizar o estresse muscular.

Conclusão

O estresse oxidativo e a lesão muscular em ratos sedentários submetidos ao esforço físico intenso foram atenuados com uso do antioxidante resveratrol.

Agradecimentos

À FAPESP e CAPES pelo subsídio necessário para o desenvolvimento da pesquisa científica. Ao apoio técnico de Laine Margareth Gabas e Pedro Luis Florindo, a todos da equipe do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal e do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), UNESP, Araçatuba/SP, Brasil.

Referências Bibliográficas

- [1] Powers, S. K.; Jackson, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.* October. 88(4): 1243–1276; 2008.
- [2] Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74(1):139-62; 1994.
- [3] Ji, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free. Radic. Biol. Med.* 18(6):1079-86; 1995.
- [4] Andrade, F. H.; Reid, M. B.; Allen, D.G.; Westerblad, H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.* 509 (2):565-75; 1998.
- [5] Araújo, M. B.; Voltarelli, F. A.; Manchado-Gobatto, F. B.; Moura, L. P.; Mello, M. A. R. Treinamento em diferentes intensidades e biomarcadores de estresse oxidativo e do metabolismo glicídico musculoesquelético de ratos. *Rev. da Ed. Física.* 21(4):695-707; 2010.
- [6] Deaton, C. M.; Marlin D. J. Exercise-Associated Oxidative Stress. *Cli.Tech. in Equine. Pra.* 2(3):278-291; 2003.
- [7] Ji, L. L. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *P. S. E. B. M.* 222: 283-292, 1999.
- [8] Vinã, J.; Gimeno, A.; Sastre.; J.; Desco, C.; Asensi, M.; Pallardo F.V. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats: role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life.* 49(6):539-44; 2000.
- [9] Brancaccio, P.; Limongelli, F.M.; Maffulli, N. Monitoring of serum enzymes in sport. *Br. J. Sports. Med.* 40(2): 96–97, 2006.
- [10] Nie, J.; Tong T. K.; George, K.; Fu F. H.; Lin H.; Shi, Q. Resting and post exercise serum biomarkers of cardiac and skeletal muscle damage in adolescent runners. *Scand J Med Sci Sports.* 20:1-5; 2010.
- [11] Venditti, P.; Di Meo, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 331(1):63-8; 1996.
- [12] Bachur, J. A.; S. B.; Garcia, Vannucchi, H.; Jordao, A. A.; Chiarello, P. G.; Zucoloto, S. Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32:190–196; 2007.
- [13] Terblanche, S. E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. 23(11):749-53; 1999.
- [14] Lee, F.–T.; Kuo, Tz-Y.; Liou, S.-Y.; Chien, C.-T. Chronic *Rhodiola rosea* Extract Supplementation Enforces Exhaustive Swimming Tolerance. *Am. J. Chin. Med.* 37(3):557-72; 2009.

- [15] Souza, R. A. ; Miranda, M.; Xavier, H. ; Salles, B. F.; Simão, R.; Osório, R. A. L.; Ribeiro, W. Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre marcadores enzimáticos de dano muscular de ratos sedentários e exercitados com natação. Rev. Bras. Educ. Fís. Esporte. 24(3):343-352; 2010.
- [16] Fischer-Wellman, K.; Bloomer, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dy. Med. 8:1-25; 2009.
- [17] Clarkson, P.M.; Thompson, H.S. Antioxidants: what role they play in physical activity and health? Am J Clin Nutr. 72:637-46; 2000.
- [18] Nunes, L. A. S.; Silva, F. O. C.; Ceglio A. C.; Venturini, T. S. Efeitos da suplementação com *Panax ginseng* sobre parâmetros de estresse oxidativo e lesão muscular induzidos por exercício exaustivo agudo em ratos. Rev. Ciê. em Saúde. 1(1); 2011.
- [19] Baur, J.A.; Sinclair, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat. Rev. Drug. Discov. 5(6):493-506; 2006.
- [20] Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; Geny, B.; Laakso, M.; Puigserver, P.; Auwerx, J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . Cell. 127:1109-1122; 2006.
- [21] Stojanovic, S.; Sprinz, H.; Brede, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. Arch. Biochem. Biophys. 391(1):79-89, 2001.
- [22] Ikizler, M.; Ovali, C.S.; Dernek, N.E.; Sevin, B.; Kaygisiz, Z.; Kural, T. Protective effects of resveratrol in ischemia–reperfusion injury of skeletal muscle: a clinically relevant animal model for lower extremity ischemia. Chinese Journal of Physiology, 49:204-209; 2006.
- [23] Jia, Z.; Zhu, H.; Misra, B.R.; Mahaney, J.E.; Li, Y.; Misra, H.P. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. Mol. Cell. Biochem. 313:187-194; 2008.
- [24] Ryan, M.J.; Jackson, J.R., Hao, Y.; Williamson, C.L.; Dabkowski, E.R.; Hollander, J.M.; Alway, S.E. Suppression of oxidative stress by resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscles of aged mice. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 65(8):815-831; 2010.
- [25] Sun, L.; Shen, W.; Liu, Z.; Guan, S.; Liu, J.; Ding, S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. Life Sci. 86(1-2):39–44; 2010.

- [26] Sun, M.; Qian, F.; Shen, W.; . Tian, C.; Hao, J.; Sun, L.; Liu, J. Mitochondrial nutrients stimulate performance and mitochondrial biogenesis in exhaustively exercised rats. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 1-12; 2011.
- [27] Schmatz, R.; Perreira, L. B.; Stefanello, N.; Mazzanti, C.; Spanevello, R.; Gutierrez, J.; Bagatini, M.; Martins, C. C.; Abdalla, F. H.; Serres, J. D. S.; D. Z.; Vieira, J. M.; Cardoso, A. M.; Schetinger, M. R.; Morsch, V. M. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*. 94:374-383; 2011.
- [28] Araujo, G.G.; Araújo, M.B.; Mota, C.S.A.; D'angelo, C.R.R.A.; Manchado, F.B.; Luciano, E. Respostas fisiológicas ao exercício agudo em ratos obesos tratados com metformina. *Rev. de Ed. Fís.* 13(6):393-396; 2007.
- [29] Veskoukis, A. S.; Nikolaidis, M. G.; Kyparos, A.; Kouretas, D.; Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free. Radic. Biol. Med.* 47(10):1371-1374; 2009.
- [30] Zar, J.H.; *Bioestatistical analysis*. 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 718p; 1984.
- [31] Freitas, J. S.; Carneiro Junior, M. A.; Franco, F. S. C.; Rezende, A. S.; Santos, A. S.; Maia, H. O.; Marins, J. C. B.; Natali A.J. Treinamento aeróbio em natação melhora a resposta de parâmetros metabólicos de ratos durante teste de esforço. *Rev. Bras. Med. Esporte*. 16(2):134-138; 2010.
- [32] Santos, M. R. V.; Souza, V. H.; Menezes, I. A. C.; Bitencurt, J. L.; Rezende-Neto J. M.; Barreto, A. S.; Cunha, F. A.; Marçal, R. M.; Teixeira-Silva, F.; Quíntans-Júnior, L. J.; Barbosa, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Sc. Plena*. 10(6); 2010.
- [33] Thrall, M. A.; Baker, D. C.; Lassen, E. D.; DeNicolo, D.; Fettman M. J.; Lassen, E. D.; Rebar, A.; Weiser, G. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 516p; 2004.
- [34] Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6.ed. San Diego: Academic Press. 1000p; 2008.
- [35] Tan, N.; Morimoto, K.; Sugiura T, Morimoto, A.; Murakami, N.; Effects of running training on the blood glucose and lactate in rats during rest and swimming. *Physiol. Behav.* 51(5):927-31; 1992.
- [36] Rogatto, G. P.; Oliveira. C. A. M.; Faria, M. C.; Luciano, E. Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. *Motriz*. 10(2):61-66; 2004.

- [37] Şıktar, E.; Ekinçi, D.; Şıktar, E.; Beydemir, Ş.; Gülçin, İ.; M. Günay. Protective role of L-carnitine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 668(3):407-13; 2011.
- [38] Van Der Meulen, J.H.; Kuipers H.; Drukker, J. Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *J. Appl. Physiol.* 71(3): 999-1004; 1991.
- [39] Santos, R. V. T.; Caperuto, É. C.; Rosa, L. F. B. P. C. Efeitos do aumento na sobrecarga de treinamento sobre parâmetros bioquímicos e hormonais em ratos. *Ver. Bras. Med. Esporte.* 12(3); 2006.
- [40] Frankiewicz-Józko, 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. Occup. Physiol.* 74(5):470-474; 1996.
- [41] Adaramoye, O.; Ogungbenro, B.; Anyegbu, O.; Fafunso, M. Protective Effects of Extracts of *Vernonia amygdalina*, *Hibiscus sabdariffa* and Vitamin C against Radiation-induced Liver Damage in Rats. *J. Radiat. Res.* 49:123-131; 2008.
- [42] Aguiló, A.; Tauler, P.; Fuentespina, E.; Tur, J. A.; Córdova, A.; Pons, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol. Behav.* 84(1):1-7; 2005.
- [43] Montilla, P.; Cruz, A.; Padillo, F. J.; Túnez, I.; Gascon, F.; Muñoz, M. C.; Gómez, M.; Pera, C. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. *J. Pineal. Res.* 31:138–144; 2001.
- [44] Becker, B. F. Towards the physiological function of uric acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 14:615-631; 1993.

Apêndices

FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE

Official Journal of the Society for Free Radical Biology and Medicine - An Affiliate
Journal of the International Society for Free Radical Research (SFRR)

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.1
•	Editorial Board	p.1
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0891-5849

DESCRIPTION

Free Radical Biology and Medicine is an international, interdisciplinary journal that publishes original contributions and reviews on a broad range of topics relating to redox biology, signaling, biological chemistry and medical implications of free radicals, reactive species, oxidants and antioxidants.

AUDIENCE

Biochemists, physiologists, pathologists, toxicologists.

IMPACT FACTOR

2010: 5.707 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

ADONIS
BIOSIS
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents
EMBASE
EMBiology
Elsevier BIOBASE
MEDLINE®
Science Citation Index
Scopus
Toxicology Abstracts

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Kelvin Davies, University of Southern California (USC), Los Angeles, CA, USA

Associate Editors

Victor Darley-Usmar, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
Phyllis Dennery, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA
Henry Forman, University of California at Merced, Merced, CA, USA
Matthew Grisham, Louisiana State University (LSU) Health Sciences Center, Shreveport, LA, USA
Harry Ischiropoulos, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA
Balaraman Kalyanaraman, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA
Giovanni Mann, King's College London, London, UK
Kevin Moore, University College London Medical School, London, UK
L. Jackson Roberts, II, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA

Distinguished Editorial Board

Bruce Ames, University of California at Berkeley, Oakland, CA, USA
Irwin Fridovich, Duke University, Durham, NC, USA
Louis Ignarro, UCLA David Geffen School of Medicine, Los Angeles, CA, USA
Michael Karin, University of California at San Diego (UCSD), La Jolla, CA, USA
Salvador Moncada, University College London (UCL), London, UK
Etsuo Niki, Human Stress Signal Research Center, Osaka, Japan
Sten Orrenius, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
Joan Selverstone Valentine, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

International Editorial Board

Julie Andersen, Buck Institute for Age Research, Novato, CA, USA
Shannon Bailey, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
Grzegorz Bartosz, University of Lodz, Lodz, Poland
Joseph Beckman, Oregon State University, Corvallis, OR, USA
George Booz, University of Mississippi, Jackson, MS, USA
Ralf Brandes, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt, Germany
Regina Brigelius-Flohe, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE) Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Germany
Paul Brookes, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA
Garry Buettner, University of Iowa, Iowa City, IA, USA
Enrique Cadenas, University of Southern California (USC), Los Angeles, CA, USA
Jean Cadet, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Grenoble, France
Sharon Campbell, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA
Arthur Cederbaum, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA
Fong-Fong Chu, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, CA, USA
Richard Cohen, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA
Dana Crawford, Albany Medical College, Albany, NY, USA
Carroll Cross, University of California at Davis, Davis, CA, USA
Michael Davies, Heart Research Institute, Sydney, NSW, Australia
Dale Dickinson, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
Michael Espey, National Cancer Institute (NCI), Bethesda, MD, USA
Cesar Fraga, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
Balz Frei, Oregon State University, Corvallis, OR, USA
Cecilia Giulivi, University of California at Davis, Davis, CA, USA
Mark Gladwin, University of Pittsburgh Medical Center (UPMC), Pittsburgh, PA, USA
Neil Granger, Louisiana State University (LSU) Health Sciences Center, Shreveport, LA, USA
Kathy Griendling, Emory University, Atlanta, GA, USA
Tilman Grune, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany
Stanley Hazen, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA
Bradford Guy Hill, University of Louisville, Louisville, KY, USA
Neil Hogg, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA
James Hurst, Washington State University, Pullman, WA, USA
Tetsuro Ishii, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan
Sushil Jain, Louisiana State University, Shreveport, LA, USA
Yvonne Janssen-Heininger, University of Vermont, Burlington, VT, USA
David Jourdain, Albany Medical College, Albany, NY, USA
Valerian Kagan, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA
John Keaney, UMass Medical School, Worcester, MA, USA
Christopher Kevil, Louisiana State University (LSU) Health Sciences Center, Shreveport, LA, USA
Santiago Lamas, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain
Jack R. Lancaster, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
Aimee Landar, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
Francesco Laurindo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
Ronald Mason, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Research Triangle Park, NC, USA
James May, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA

Joe McCord, University of Colorado, Aurora, CO, USA
Thomas McIntyre, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA
Andres Melendez, Albany Medical College, Albany, NY, USA
Richard Naftalin, King's College London, London, UK
Valerie O' Donnell, Cardiff University, Cardiff, UK
Terry Oberley, University of Wisconsin Hospital, Madison, WI, USA
Pal Pacher, National Institutes of Health (NIH), Rockville, MD, USA
Manisha Patel, University of Colorado, Aurora, CO, USA
Rakesh Patel, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
George Perry, University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX, USA
Claude Piantadosi, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA
Giuseppe Poli, Università di Torino, Orbassano, Torino, Italy
Edward Postlethwait, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
Henrik Poulsen, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Denmark
Rafael Radi, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
Sue Goo Rhee, Ewha Womans University, Seoul, South Korea
Homero Rubbo, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
Christian Schoneich, University of Kansas, Lawrence, KS, USA
Paul Schumacker, Northwestern University, Chicago, IL, USA
Rajinder Singh Sohal, University of Southern California (USC), Los Angeles, CA, USA
Douglas Spitz, University of Iowa, Iowa City, IA, USA
Daret St. Clair, University of Kentucky, Lexington, KY, USA
Jonathan Stamler, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA
Roland Stocker, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia
Maret Traber, Oregon State University, Corvallis, OR, USA
Fulvio Ursini, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy
Albert van der Vliet, University of Vermont, Burlington, VT, USA
Jeannette Vasquez-Vivar, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA
José Viña, Universitat de València, Valencia, Spain
Carl White, National Jewish Medical and Research Center, Denver, CO, USA
David Wink, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA
Christine Winterbourn, Christchurch School of Medicine, Christchurch, New Zealand
Junji Yodoi, Kyoto University, Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Free Radical Biology & Medicine is an international, interdisciplinary journal that publishes original contributions and reviews on a broad range of topics relating to redox biology, signaling, biological chemistry and medical implications of free radicals, reactive species, oxidants and antioxidants.

Types of paper

Full-length research articles, Review articles, Hypothesis papers, Methods articles and Letters to the Editor.

Original Articles: Original articles are the normal medium of publication. Although there is no fixed length, articles should be as concise as possible, while providing sufficient information for the work to be repeated and for the claims of the authors to be judged by the readers.

Reviews: These are contributed by scientists who are leading specialists in their field of expertise, normally at the invitation of the Editors. Authors wishing to contribute a review paper are advised first to contact the Reviews Editor, Dr. Henry Forman. Please e-mail the outline and abstract of the proposed review to frbm@elsevier.com before submission.

Letters to the Editor: Letters to the Editor are intended to stimulate discussion and debate in areas of general concern and controversy in free radical and oxidant research, and generally reflect the personal opinions of the author(s). They should be written in a continuous style and should normally not exceed two printed pages and contain no more than one figure and table.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the *Free Radical Biology & Medicine* online submission system, <http://ees.elsevier.com/frbm>. For questions on the submission or reviewing process, please contact the Editorial Office at frbm@elsevier.com.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Animal experiments

Where animals have been used in a study, the institutional ethical or animal welfare Authority under which the work was conducted must be stated, along with the specific authorisation reference number. Circumstances relating to animal experimentation must meet the *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. These guidelines are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm, or the *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Your Paper-Your Way

As part of the Your Paper-Your Way service, authors may submit a PDF version of their manuscript for use in the refereeing process. This PDF file can be in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your work. It should contain high enough quality figures for refereeing. References can be in any style or format, as long as the full paper title is present. After revision, at acceptance, source files of the paper, figures, tables and figure captions will then be required to produce the final published version - not before.

Submission in the traditional way is also still possible.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process (see above). Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/frbm>

Referees

A minimum of four suitable potential reviewers (please provide their name, email addresses, and institutional affiliation) should be provided. When compiling this list of potential reviewers please consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the manuscript subject area; must not be from your own institution; at least two of the suggested reviewers should be from another country than the authors'; and they should not have recent (less than four years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.

PREPARATION

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

The Editors strongly encourage graphical abstracts and suggest that amongst the examples given <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>, that example 11 and 12 best reflect the sort of graphical abstract most suited to this field and journal.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Following the abstract, list keywords for indexing. These keywords should cover precisely the contents of the submitted paper and should give readers sufficient information as to the relevance of the paper to their particular field.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and abbreviations

Stylistic details must be kept constant. For example, electron spin resonance is abbreviated either ESR or EPR (for electron paramagnetic resonance). Either can be used, but both should be given and stated as equivalent at the first mention. (This is the recommendation of the International EPR Society.) Formulas for radicals follow IUPAC recommendations and contain a superscripted (not centered) large dot that precedes a charge, if any. Thus, superoxide is represented by $\text{O}_2^{\cdot -}$, not O_2^- , or some other permutation.

Other examples are $\text{HO}^{\cdot}$ or $\cdot\text{OH}$ (not $\text{OH}^{\cdot}$), $\text{RO}^{\cdot}$, $\text{ROO}^{\cdot}$ / $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$, etc. In the text, names of radicals are preferred, rather than using formulas in the middle of sentences. For names of radicals, use alkoxyl, peroxy, and hydroxyl and not alkoxy, peroxy, etc. (correct nomenclature requires the 'l' on the end of radicals, as in methyl, hydroxyl, etc.). Use tert, not t-, etc., for abbreviations. For example, CORRECT: tert-butoxyl, sec-peroxyl; INCORRECT: t-butoxy, s-peroxy.

Wherever possible, nomenclature and abbreviations should be in accordance with internationally agreed rules. When an enzyme or compound is first mentioned in the text, specification by its code number accompanied by its systematic name (as distinct from its trivial name) is requested by the Editors, but not checked for correctness.

Official names of drugs are preferred to trade names.

Standard three-letter codes for the common amino acids may be used freely and without definition, but the one-letter codes should be restricted to comparisons of long protein sequences. Similar considerations apply to nucleosides and nucleotides. Standard three-letter codes for carbohydrates and for purine and pyrimidine bases may also be used. All other abbreviations should be defined when they first appear in the text. If an extensive list of abbreviations is used, please provide an alphabetical list with definitions followed by the references at the end of the article.

Temperatures denoted by an unqualified degree symbol are assumed to be Celsius. For solution strengths, percentages should be expressed by the sign %, followed in cases of ambiguity by w/w, w/v, or v/v [e.g., 5% (w/v) means 5 g/100 ml].

All non-standard abbreviations should be defined in a footnote.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular Interactions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Type references double-spaced and number them consecutively in the order in which they are first mentioned in the text, not alphabetically. Cite references in the text, tables, and legends in sequential, numerical order, placing the numbers in square brackets. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first mention in the

text of the particular table or figure. Journal titles are to be abbreviated according to the List of Journals Indexed in Index Medicus published by the U.S. Department of Health and Human Services. Examples of reference style are as follows:

Journal:

[1] Muller, F. L.; Lustgarten, M. S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43:477-503; 2007.

Book:

[2] Van Faassen, E.; Vanin, A., eds. *Radicals For Life: the Various Forms of nitric oxide*. Amsterdam: Elsevier; 2007.

Chapter in edited book:

[3] Zuo, L.; Clanton, T. L. Detection of reactive oxygen and nitrogen species in tissues using redox-sensitive fluorescent probes. In: Sen, C. K.; Packer, L., eds. *Redox cell biology and genetics, part A. Methods in enzymology*, volume 352. San Diego: Academic Press; 2002: 307-325.

Abstract:

[4] Freeman, B.; Aslan, M. Tissue oxidation and nitration reactions in a mouse model and humans with sickle cell disease (abstract). *Free Radic. Biol. Med.* 33:S298; 2002.

Manuscripts that have been accepted for publication may be cited as "in press" in the reference list using the estimated year of publication:

[5] Aguirre, J.; Lambeth, J.D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* In press; 2010.

Reference to a paper as "in press" implies that it has been accepted for publication. Evidence (e.g., a photocopy of the note of acceptance from the journal concerned) should accompany the submitted typescript. Papers that are "in press" should be included as a number in the text. Other papers submitted before or simultaneously with the paper in question should be included as a number in the text and in the References section, stating the name of the journal. Copies of papers that are submitted elsewhere should be provided for inspection by the Editors. Omission of this information will delay publication and may lead to redating of a submitted manuscript. Papers presented at scientific meetings that are not available in published form should not be cited as references in the References section.

Unpublished results should not be listed in the References section. In the text they are mentioned as follows: "(Tervoort MV and Glimcher J, unpublished data)". When unpublished results are cited, the data should be provided for the Editors' information when essential for proper evaluation, or if requested.

A personal communication should be mentioned in the text as follows: "(Tervoort MV, personal communication)". Authors should not make unauthorized use of personal communications. Personal communications are not to be included in the Reference section.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your

files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Full Online Submission

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal - preferred but not essential.
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: http://www.adobe.com/products/reader/tech_specs.html.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via support@elsevier.com.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"Efeito antioxidante do Resveratrol sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e o estresse oxidativo em ratos submetidos ao exercício físico intenso"*, sob a responsabilidade de **PAULO CÉSAR CIARLINI** está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado em 10/3/2011, de acordo com o Processo FOA-0568/11.

Araçatuba, 15 de março de 2011.


FABIANO ANTONIO CADIOLI
Vice-Presidente da CEUA

mfsr.