

Análise do perfil oxidativo de diferentes amostras biológicas de pacientes com lesão de ligamento cruzado anterior

Analysis of the oxidative profile of different biological samples of patients with anterior cruciate ligament injury

Análisis del perfil oxidativo de diferentes muestras biológicas de pacientes con lesión de ligamento cruzado anterior

Bruna Pierezan¹, Bruna Webber¹, Marlon Francys Vidmar², César Antônio de Quadros Martins³, Carlos Rafael de Almeida³, Luciano de Oliveira Siqueira⁴

RESUMO | O joelho é uma das articulações mais importantes para locomoção. No entanto, devido a sua complexidade, torna-se suscetível a diversos tipos de lesões, como a ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA). Essa complicação desencadeia um processo inflamatório, que pode culminar em formação de radicais livres e, conseqüentemente, em estresse oxidativo (EO). O objetivo do estudo foi comparar o perfil oxidativo de pacientes com lesão do LCA, analisando duas amostras biológicas: líquido sinovial e soro. Foram analisados 11 indivíduos do gênero masculino, com ruptura total do LCA, com idade superior a 18 anos. Coletou-se amostras de sangue e líquido sinovial 15 minutos antes da artroplastia e se analisou biomarcadores de EO, catalase, flavonoides e peroxidação lipídica, isto é, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados apontam menor concentração de flavonoides, combinada a aumento de TBARS e de atividade de catalase no soro quando comparado com o líquido sinovial. A análise dos resultados indica que a lesão de LCA induz a quadro de EO, caracterizado por consumo de antioxidantes e elevação de dano lipídico no líquido sinovial quando comparado com o soro, indicando que análises séricas podem não ser adequadas para medir EO em partes como a articulação do joelho.

Descritores | Joelho; Ligamento Cruzado Anterior; Radicais Livres; Biomarcadores; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT | The knee is one of the most important joints for locomotion. However, due to its complexity, it becomes susceptible to several types of injuries, such as the anterior cruciate ligament (ACL) rupture. This complication triggers an inflammatory process, which can lead to the formation of free radicals and, consequently, oxidative stress (OS). The objective of this study was to compare the oxidative profiles of patients with ACL injury, analyzing two biological samples: synovial fluid and serum. Eleven male subjects with total ACL rupture, older than 18 were analyzed. Blood samples and synovial fluid were collected fifteen minutes before arthroplasty. OS catalase biomarkers, flavonoids and lipid peroxidation (TBARS) were analyzed. The results indicate a lower flavonoid concentration, combined with an increase in TBARS and serum catalase activity when compared with synovial fluid. Analysis of the results indicates that the ACL injury induces OS, characterized by antioxidant consumption and elevated lipid damage in the synovial fluid, when compared with the serum, which indicates that serumal analyses may not be adequate to measure OS in compartments such as the knee joint.

Keywords | Knee; Anterior Cruciate Ligament; Free Radicals; Biomarkers; Oxidative Stress.

¹Graduada em Farmácia pela Universidade de Passo Fundo (UPF) – Passo Fundo (RS), Brasil.

²Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Porto Alegre (RS), Brasil.

³Mestre em Ciências pela Universidade de Passo Fundo (UPF) – Passo Fundo (RS), Brasil.

⁴Professor adjunto da Universidade de Passo Fundo (UPF) – Passo Fundo (RS), Brasil.

RESUMEN | La rodilla es una de las articulaciones más importantes para locomoción. Sin embargo, debido a su complejidad, se torna susceptible a diversos tipos de lesiones, como la ruptura del ligamento cruzado anterior (LCA). Esa complicación desencadena un proceso inflamatorio, que puede culminar en formación de radicales libres y, en consecuencia, en estrés oxidativo (EO). El objetivo del estudio fue comparar el perfil oxidativo de pacientes con lesión del LCA, analizando dos muestras biológicas: fluido sinovial y suero. Fueron analizados 11 individuos del género masculino, con ruptura total del LCA, con edad superior a 18 años. Se recogió muestras de sangre y fluido sinovial 15 minutos antes de la artroplastia y se analizó biomarcadores de EO, catalasa,

flavonoides y peroxidación de las grasas, o sea, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los resultados apuntan menor concentración de flavonoides, combinada a aumento de TBARS e de actividad de catalasa en el suero cuando comparado con el fluido sinovial. El análisis de los resultados indica que la lesión de LCA induce a cuadro de EO, caracterizado por consumo de antioxidantes y elevación de daño de las grasas en el fluido sinovial cuando comparado con el suero, indicando que análisis séricos pueden no ser adecuadas para medir EO en partes como la articulación de la rodilla

Palabras clave | Rodilla; Ligamento Cruzado Anterior; Radicales Libres; Biomarcadores; Estrés Oxidativo.

INTRODUÇÃO

O joelho é uma articulação intermédia do membro inferior, assumindo um dos papéis mais importantes durante a locomoção, o que o torna um alvo suscetível a diversas lesões, principalmente desportistas, pois é o alvo mais vulnerável de um atleta. A lesão de maior frequência em esportistas é a ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA)¹.

A lesão do LCA do joelho é responsável por aproximadamente 50% de todas as lesões ligamentares². O crescente número de praticantes de atividades físicas colabora para o aumento do índice dessa patologia. Nos Estados Unidos, são realizadas em torno de 70.000 reconstruções ligamentares ao ano por meio de procedimento cirúrgico³.

Uma das consequências da ruptura do LCA é o aumento da produção de radicais livres (RL) pelo organismo, desencadeado pela inflamação⁴. O aumento de RL está associado ao aumento do consumo de oxigênio (O₂) pelos tecidos ativos⁵, bem como pelo próprio processo inflamatório⁴⁻⁷.

A geração de RL ocorre como parte do processo fisiológico do organismo como respiração celular. Esses radicais ativos podem ter vários efeitos fisiológicos, como mecanismo de defesa contra a agressão de microrganismos, controle de estímulos e sinais moleculares⁸.

As células mediadoras de inflamação (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais) são recrutadas até o local da lesão em que, além de produzirem RL de O₂, vão provocar a formação de enzimas proteolíticas para reparo do tecido lesado⁹. Além disso, a ruptura do LCA promove aumento da produção de mediadores

inflamatórios e proteínas de fase aguda que podem agir como RL⁵. Dessa forma, o desequilíbrio entre a produção de radicais e as defesas antioxidantes, com predomínio dos RL, podem desencadear o estresse oxidativo (EO)^{6-8,10}.

Durante o EO, os RL na presença de moléculas de lípidios, DNA, proteínas, carboidratos ou proteoglicanos desencadeiam amplificação da lesão oxidativa aos tecidos subjacentes⁸, podendo acarretar lesão de células normais adjacentes ao local lesado, amplificando o processo inflamatório e oxidativo^{9,11,12}.

A determinação do EO depende da habilidade de aferição da presença de espécies reativas¹², as quais podem ser medidas diretamente, por meio de sua concentração em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, mediante avaliação do dano que causam¹³.

Por ser um procedimento de coleta simples, o dano oxidativo em humanos é rotineiramente determinado em amostras de sangue, uma vez que os biomarcadores se difundem do local da inflamação para o soro em que é determinado. Estudos em líquidos biológicos, como o líquido sinovial, são restritos, por se tratar de procedimento invasivo e relativamente traumático^{14,15}.

Não há relatos na literatura a respeito da comparação entre níveis dos biomarcadores bioquímicos de inflamatórios ou de EO no soro e em compartimentos, como o líquido sinovial, mantendo a dúvida de que em estudos de EO e inflamação em articulações podem ser usadas amostras de sangue como matriz biológica de diagnóstico de inflamação e de EO.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil oxidativo sistêmico (sangue) e local (líquido sinovial) de indivíduos com ruptura do LCA do joelho, com intuito de avaliar se parâmetros bioquímicos de

inflamação se difundem do tecido para o sangue e se equivalem de forma sistêmica nos indivíduos.

METODOLOGIA

Delineamento

Este trabalho é um estudo transversal com objetivo de avaliar a intensidade e a diferença do dano oxidativo entre o líquido sinovial e o sangue de pacientes com ruptura do LCA.

Casística

A amostra foi composta por 11 indivíduos do gênero masculino, com ruptura total do LCA associada ou não a lesão meniscal e/ou condral. Foram incluídos no estudo pacientes com idade superior a 18 anos que não fizeram uso de medicação anti-inflamatória nas 48 horas antecedentes à coleta e que não fizeram uso de suplementos antioxidantes.

Aspectos éticos

Todos os indivíduos foram informados dos objetivos e possíveis riscos do estudo e aceitaram participar voluntariamente. A seguir, foi assinado o termo de consentimento informado, conforme o Código de Nuremberg (1947), Declaração dos Direitos do Homem (1948) e a Declaração de Helsinque. O protocolo do estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, seguindo o regulamento 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, sob registro de nº 0164.0.398.000-11.

Modelo experimental

Inicialmente, cada participante do estudo foi submetido a anamnese para caracterização dos dados demográficos e determinação dos critérios de inclusão no estudo.

Para a realização das artroplastias, os pacientes foram previamente sedados e, 15 minutos antes do procedimento cirúrgico, coletou-se 8 mL de sangue da fossa antecubital, acondicionados em um tubo de ensaio sem anticoagulante. A seguir, coletou-se 4 mL de líquido sinovial, mediante punção do joelho (artrocentese) com agulha introduzida na região suprapatelar externa

(fundo de saco subquadrípital) e aliqotado em tubos de Eppendorf. Os procedimentos de coleta e cirúrgicos foram realizados no período da manhã.

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. O soro foi extraído e acondicionado em frascos Eppendorf para realização das dosagens bioquímicas. As amostras de soro e líquido sinovial foram armazenadas a -18°C até o momento das análises bioquímicas.

Análises bioquímicas

A capacidade de induzir a peroxidação lipídica foi aferida por meio da formação da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácida aquecida, conforme descrito por Esterbauer e Cheeseman¹⁶.

O teor de compostos fenólicos no soro dos indivíduos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu¹⁷.

A atividade da catalase se deu em meio com peróxido de hidrogênio, descrito anteriormente por Aebi¹⁵.

Após o procedimento experimental, as concentrações dos analitos foram medidas espectrofotometricamente com equipamento semiautomatizado Biosystems BTS 350.

Análise estatística

Cada variável foi submetida a análise estatística por meio do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e teste de variância de Levene, sendo o nível de confiança assumido de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Os resultados foram transcritos para uma planilha de trabalho e analisados estatisticamente por comparação de médias, utilizando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (dados não paramétricos) no pacote estatístico do SPSS 16.0, considerando $p < 0,05$ como nível mínimo de significância. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

RESULTADOS

A análise estatística dos resultados mostra diminuição estatisticamente significativa na concentração de polifenóis (flavonoides) no líquido sinovial quando comparado com o soro ($LS=2,9 \pm 0,9$; $S=8,0 \pm 4,4$). A determinação de polifenóis é um tipo de indicador de defesa antioxidante

e, assim, essa diminuição é indicativa de consumo desse substrato via RL oriundos da inflamação do LCA.

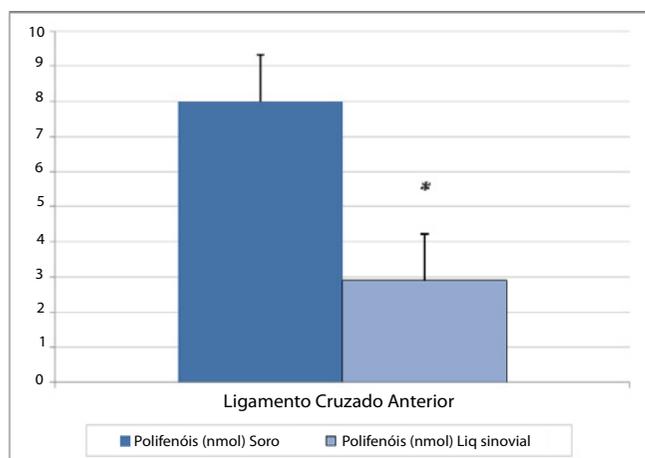


Gráfico 1. Análise comparativa da concentração de polifenóis no sangue e líquido sinovial de pacientes com ruptura de LCA. Resultados expressos como média±erro padrão. * $p < 0,01$ análise de dados não paramétricos pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

A análise da concentração de TBARS como indicador de dano lipídico via RL no soro e líquido sinovial de pacientes com ruptura do LCA (Gráfico 2) aponta aumento estatisticamente significativo no líquido sinovial quando comparado ao soro ($LS=1,8 \pm 1,76$; $S=0,06 \pm 0,04$). Esse achado indica dano lipídico provocado por RL no líquido sinovial. A implicação desse encontro é que a produção e o dano oxidativo podem se estender a todos os tecidos subjacentes banhados pelo líquido na articulação podendo amplificar o dano, mas que se difunde de forma muito limitada do ponto de vista sistêmico.

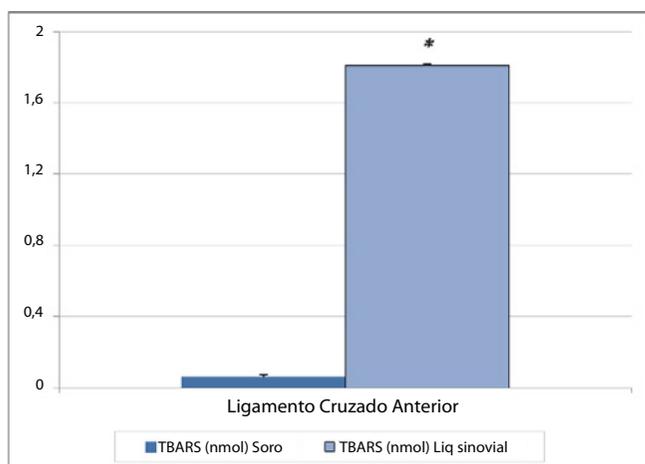


Gráfico 2. Análise comparativa da concentração de TBARS no sangue e líquido sinovial de pacientes com ruptura de LCA. Resultados expressos como média±erro padrão. * $p < 0,01$ Análise de dados não paramétricos pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

A catalase é uma enzima antioxidante implicada na neutralização de endoperóxidos. A determinação da atividade da catalase no soro e líquido sinovial de pacientes com ruptura do LCA (Gráfico 3) mostra maior atividade da enzima no líquido sinovial quando comparado com o soro ($LS=3,4 \pm 2,17$; $S=3,3 \pm 2,9$), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

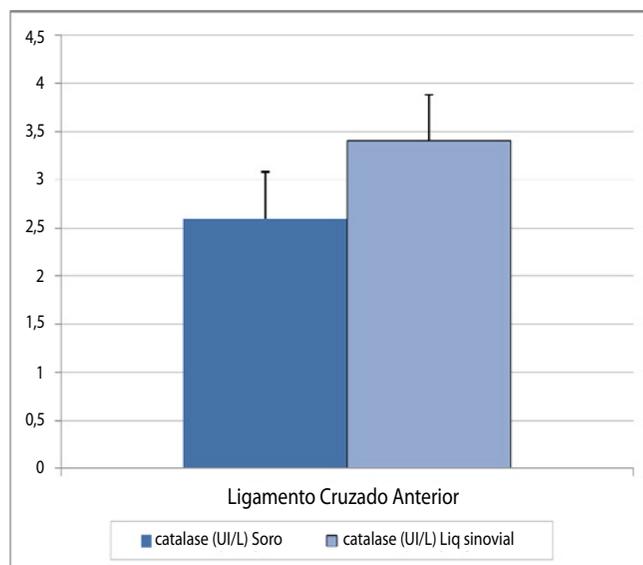


Gráfico 3. Análise comparativa da atividade da catalase no sangue e líquido sinovial de pacientes com ruptura de LCA. Resultados expressos como média±erro padrão

DISCUSSÃO

O crescente interesse pela prática de atividades físicas nos dias atuais faz com que se eleve o número de complicações associadas, como o rompimento de LCA. A ruptura do LCA é a lesão de joelho de maior prevalência que, além de causar instabilidade articular no joelho, pode desencadear alterações a nível sistêmico¹⁸.

O joelho é uma das articulações mais vulneráveis do corpo durante exercícios pois, ao mesmo tempo que desenvolve movimentos complexos, tem que associá-los à manutenção do peso corporal, o que dificulta ainda mais sua atividade^{19,20}. Citando as partes envolvidas com a articulação, o LCA é o mais acometido²¹ e, conforme descrito por Cintra Neto²², quando rompido, acarreta diversas consequências para essa articulação pois a instabilidade permanente é mais alta do que qualquer outra lesão articular.

Segundo Sebben et al.²³, o processo inflamatório (como o verificado após uma lesão no LCA) acarreta na produção de RL, que são produzidos incessantemente

durante a ocorrência de processos metabólicos e desencadeiam um mecanismo de EO²⁴, que nada mais é do que um desequilíbrio entre sistemas oxidantes e defesas antioxidantes, sendo favorável aos primeiros^{24,25}. De acordo com Pereira²⁶, a produção de RL com a consequente formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) é o que envolverá toda a problemática.

A relação que se estabelece entre o surgimento de um processo oxidativo no organismo após lesão articular no joelho ainda não foi bem fundamentada no que se refere a comparações entre amostras de líquido sinovial e soro, porém, segundo Baccarin²⁷, é possível afirmar que, de modo geral, esse processo desencadeia desequilíbrio na relação entre oxidantes e antioxidantes. Os RL estão envolvidos na amplificação do dano inflamatório do líquido sinovial via EO^{28,29}. A maior parte dos estudos analisados avaliam o grau de estresse oxidativo no plasma dos pacientes e não no próprio líquido, como realizado neste estudo. As diferenças apontadas aqui mostram que o dano oxidativo é maior no local da inflamação e que essa intensidade não reflete diretamente de forma sistêmica (soro).

A análise dos resultados para flavonoides, eleito neste estudo como biomarcador antioxidante hidrossolúvel (Gráfico 1), mostra diminuição estatisticamente significativa da concentração desses compostos no líquido sinovial induzido provavelmente por seu consumo via RL do processo inflamatório, o que não foi refletido no soro dos pacientes.

A meia-vida dos RL é extremamente curta, sendo quase impossível determiná-los em condições clínicas normais. No entanto, o dano oxidativo é possível de ser determinado analiticamente. O dano lipídico via RL pode ser determinado mediante análise da peroxidação lipídica^{16,25,26}. A dosagem de TBARS se trata de um produto da oxidação de lipídeos via RL, também denominada lipoperoxidação³⁰.

A análise do dano lipídico pela determinação de TBARS demonstra dano oxidativo significativamente mais elevado no líquido sinovial quando comparado com o soro (Gráfico 2). A correlação dos resultados elencados nos Gráficos 1 e 2 aponta que a lesão de LCA provoca consumo de antioxidantes combinado a maior dano lipídico induzido por RL de forma mais intensa no local da inflamação e que isso não repercutiu de forma sistêmica. O impacto desse desequilíbrio culmina no EO que pode ser amplificado por grau e tempo de lesão do paciente. Além disso, o líquido sinovial num perfil de EO pode expandir o dano oxidativo a tecidos subjacentes banhados por ele, agravando o quadro oxidativo e inflamatório.

Rodrigues e Barboni³¹ mencionam que a função da catalase está implicada na decomposição de endoperóxidos provenientes do metabolismo celular normal. Essa conversão é uma forma de proteção ao organismo contra o EO³², caso contrário, os endoperóxidos exerceriam ações degradativas e tóxicas sobre alguns tipos celulares, como eritrócitos³¹. A análise estatística dos resultados aponta que não houve diferença significativa da atividade dessa enzima no líquido sinovial quando comparado com o soro. Considerando que a catalase é uma enzima antioxidante produzida pelo organismo em condições de EO e que a lesão de LCA geralmente é de caráter agudo, é possível que esse encontro seja reflexo de que o organismo ainda não se adaptou à condição inflamatória provocada pela lesão. Em uma fase de cronificação, possivelmente a atividade dessa enzima apresentaria aumento.

Todos os pacientes avaliados foram tratados durante a fase aguda da lesão, o que poderia justificar o EO de forma mais intensa no local da inflamação quando comparada com o soro. Isso indica que estudos de EO relacionados à lesão de LCA que utilizam o soro como matriz biológica podem apresentar sérias limitações quando realizados durante a fase aguda, uma vez que durante a cronificação os biomarcadores podem se difundir para o sangue e se alterando de forma sistêmica.

O estudo se limita pelo baixo número amostral em razão do procedimento de coleta de ambas amostras biológicas serem invasivas. Estudos futuros avaliando pacientes durante a fase aguda e fase crônica podem esclarecer se as alterações de EO sistêmicas podem ser utilizadas com confiança em estudos de lesão de LCA, uma vez que os resultados aqui obtidos permitem concluir que durante a fase aguda o soro não é uma amostra que reflete a real intensidade do processo de EO local.

O EO no líquido sinovial pode ser amplificado pelo dano a tecidos sadios banhados pelo mesmo líquido, o que pode agravar o dano e a condição clínica dos pacientes. Nesse sentido, o uso de antioxidantes se mostra uma alternativa promissora na condução clínica e pós-operatória desses pacientes.

CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o perfil oxidativo das amostras de soro e líquido sinovial de pacientes com ruptura do LCA apresentaram maior consumo de antioxidantes,

associado a maior dano oxidativo provocado por RL, indicando condição de EO induzido pela lesão de LCA.

A comparação da medida de EO entre o soro e o líquido sinovial aponta que estudos desses biomarcadores no soro durante a fase aguda podem subestimar a real intensidade do dano inflamatório local.

REFERÊNCIAS

1. Ferretti M, Amaro JT, Cohen M. Lesão do LCA: diagnóstico. Soc Bras de Ortopedia e Traumatologia. 2007.
2. Bollen S. Ligament injuries of the knee: limping forward? Br J Sports Med. 1998;32:82-4 [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/sVRh6y>.
3. Cohen M, Amaro JT, Ejnisman B, Carvalho RT, Nakano KK, Peccin MS, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction after 10 to 15 years: association between meniscectomy and osteoarthritis. Arthroscopy. 2007;23(6):629-34. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/SiS1iD>.
4. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc Trans. 2002;30(2):280-5. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/p5hwPS>.
5. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. Eur J Clin Invest. 2003;33(10):924-30. [acesso em 31 maio 2017] Disponível em: <https://goo.gl/knVysl>.
6. Zoppi CC, Antunes-Neto J, Catanho FO, Goulart LF, Motta e Moura N, Macedo DV. Alterações em biomarcadores de EO, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. Rev Paul Educ Fis. 2003;17(2):119-30. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/UX9b66>.
7. Zanella AM, Souza DRS, Godoy MF. Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo. Arq Ciênc Saúde. 2007;14(2):107-12. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/U9i6ai>.
8. Ramos VA, Ramos PA, Dominguez MC. Papel do estresse oxidativo na manutenção da inflamação em pacientes com artrite reumatóide juvenil. J Pediatr. 2000;76(2):125-32. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/eOoy0D>.
9. Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, Bourgeois JM, Hogben C, Tarnopolsky MA. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. J Appl Physiol. 2000;89(6):2325-32. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/5Wf3IT>.
10. Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey C. Membrane lipid oxidation. Boca Raton: CRC Press. 1991;151-70.
11. Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. Rev Bras Med Esporte. 2007;13(5):336-42. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/XOx7C2>.
12. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol. 2004;142(2):231-55. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/LQQUIE>.
13. Reyes GC, Sánchez IR, Calzada-Mendoza CC, Olivares-Corichi IM. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. Rev Endocrinol Nutr. 2006;14(4):233-6. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/vXqGKy>.
14. Andrade GJC, Felix VB, Carvalho RWF, Falcão PGCB. Alterações bioquímicas do líquido sinovial nas disfunções têmporomandibulares. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac; 2009;9(4):67-72. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/dkB4yH>.
15. Aebi H. Catalase in vitro. Meth Enzymol. 1984;105:121-6. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/xF8Nxc>.
16. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Meth Enzymol. 1990;186:407-21. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/8qK8TO>.
17. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82:47-95. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/zLyJto>.
18. Silva RR, Matos MA, Silva DJA, Abreu MS. Associação entre tempo de ruptura do LCA e frequência de outras lesões articulares do joelho. Rev Bras Ortop. 2006;41(7):268-71. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/cTZWUT>.
19. Macnicol MF. O joelho com problema. 2. ed. São Paulo: Manole; 2002.
20. Isidório MS. Exercício e estresse oxidativo. Rev Min Educ Fis. 2007;15(1):70-86. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/1ti5QX>.
21. Camanho GL, Camanho LF, Viegas AC. Reconstrução do ligamento cruzado anterior com tendões dos músculos flexores do joelho fixos com Endobutton. Rev Bras Ortop. 2003;38(6):329-36. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/CQkLnU>.
22. Cintra PFA Neto. Influência da lesão condral na concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas no líquido sinovial. São Carlos. Dissertação [Mestrado] – Universidade Federal de São Carlos; 2006.
23. Sebben V, Guedes JM, Bertolin TE, Tagliaro ML, Tourinho Filho H. Radicais livres: qual a influência do exercício no envelhecimento humano? EFDportes.com [periódico na internet]. 2011;(15):153. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/XR4pbw>.
24. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Influência de processos Redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. Rev Bras Reumatol. 2008;48(1):17-24. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/gAqch3>.
25. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minin VPR, Bressan, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. Nutrire Rev Soc Bras Alim Nutr. 2008;33(2):111-28.
26. Pereira B. Radicais Livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. Motriz Rev Educ Fis. 1996;2(2):71-9. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/X2JsNS>.
27. Reis AGMS, Baccarin RYA. The cross-sectional area of the superficial digital flexor tendon of trained and

- untrained Thoroughbred racehorses. *Cienc Rural*. 2010;40(8):1786-90. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010000800018>[acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/7e7h7x>.
28. Castro MAC. Estudo comparativo da produção de radicais livres e catalase nos exercícios de intensidade e duração moderadas. Brasília, DF. Dissertação [Mestrado] - Universidade Católica de Brasília; 2003.
29. Buzzini SRR, Matsudo VKR. Radicais livres, exercícios e envelhecimento. *Rev Bras Ciênc. Mov*. 1990;4(4):61-85. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/zN6fPO>.
30. Silva AA, Ferreira DOL, Santarosa BP, Damasceno DC, Dias A, Gonçalves RC. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars) em eritrócitos de ovinos submetidos à biopsia pulmonar. *Cienc Animal Bras*. 2009;1:282-5. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/qBWRtg>.
31. Rodrigues AAAO, Barboni SAV. Revisão bibliográfica sobre a ausência da atividade da catalase em humanos: importância deste conhecimento para cirurgiões dentistas. *Sitientibus*, 1998;19:87-98. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/72J5nO>.
32. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*. 2006;29(1):113-23. [acesso em 31 maio 2017]. Disponível em: <https://goo.gl/HTSfvo>.