

# Exercício anaeróbio, óxido nítrico e peroxidação lipídica

*Anaerobic exercise, nitric oxide and lipid peroxidation*

Ana Valado<sup>1</sup>, Leonel Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento das Ciências Laboratoriais Aplicadas na Saúde, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, IPC.

<sup>2</sup>IMAR, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

## RESUMO

**Introdução:** O exercício físico regular é considerado, não só, um factor importante para o bem-estar físico e psíquico do indivíduo como, pode mesmo, interferir no processo de envelhecimento, retardando-o. Contudo, a prática do exercício físico desencadeia uma situação de stress fisiológico, à qual o organismo responde activando mecanismos de adaptação. A disponibilidade de oxigénio e a libertação de óxido nítrico propiciam a formação de espécies reactivas de oxigénio, conduzindo à formação de lesões celulares e tecidulares graves.

**Objectivo:** Determinar o efeito do exercício anaeróbio intenso, em indivíduos treinados (atletas) e não treinados (controlo), na produção e libertação de óxido nítrico e na formação de radicais livres de oxigénio.

**Material e métodos:** No estudo participaram indivíduos jovens, voluntários, que constituíram dois grupos: atletas e grupo controlo, que não praticava desporto com regularidade. Realizou-se um teste anaeróbio supra-máximo, designado teste de *Wingate*. Procedeu-se à colheita de sangue em dois momentos, em repouso e 15 minutos após o exercício, à excepção dos lactatos. Por fim, efectuou-se o estudo laboratorial, determinando as concentrações de lactatos sanguíneos, óxido nítrico plaquetar e plasmático e de malonildialdeído plasmático.

**Resultados:** Os atletas manifestaram uma diminuição significativa em repouso e após exercício nos níveis de malonildialdeído, em relação ao grupo controlo. Nos atletas verificou-se, também, uma diminuição significativa, na concentração de lactatos, após exercício, relativamente ao controlo. Contrariamente, as concentrações de nitritos intraplaquetares, libertados pela plaqueta e totais apresentaram nos atletas, um aumento significativo, em repouso e após exercício, relativamente ao controlo.

**Conclusão:** As diferenças encontradas entre os grupos relacionam-se com o treino físico, parecendo estimular os mecanismos de adaptação, bem como as defesas antioxidantes dos atletas, conferindo maior protecção cardiovascular e maior protecção contra o stress físico e oxidativo, comparativamente aos indivíduos que não praticavam desporto com regularidade.

## PALAVRAS-CHAVE

exercício anaeróbio, óxido nítrico, MDA, stress oxidativo, ROS

## ABSTRACT

**Introduction:** The regular exercise is considered not only an important factor for the physical and mental wellbeing of the individual, as it may even interfere with the aging process, slowing it. However, the practice of physical exercise triggers a state of physiological stress which the body reacts activating adaptation mechanisms. The availability of oxygen and release of nitric oxide, provide the formation of reactive oxygen species, leading to the formation of cellular and tissue injuries.

**Objective:** Determine the effect of intense anaerobic exercise, in trained individuals (athletes) and untrained (control), in the production and release of nitric oxide and the formation of free radicals of oxygen.

**Material and Methods:** The study involved young volunteers, who formed two groups: athletes and control group not practiced sport regularly. A supra-maximal anaerobic test, called *Wingate* test, was implemented, followed by blood harvest on two occasions: at rest and 15 minutes after exercise, with the exception of lactate. Finally, blood lactate, plasmatic and platelet nitric oxide, and plasmatic malondialdehyde were quantified.

**Results:** The athletes showed a significant reduction in the malondialdehyde levels, at rest and after exercise, when compared to the control group. In athletes there was also a significant decrease in the concentration of lactate after exercise, compared to control. In contrast, intra-platelet nitrites concentrations, released by platelets, presented in athletes a significant increase at rest and after exercise, compared to control.

**Conclusion:** The differences between the groups are related to the physical training. There seems to be a stimulus of the adaptation mechanism and of the antioxidant defenses of the athletes, giving greater cardiovascular protection and greater protection against physical and oxidative stress, compared to individuals who do not practice sport regularly.

## KEYWORDS

anaerobic exercise, nitric oxide, MDA, oxidative stress, ROS

## INTRODUÇÃO

O exercício físico, realizado segundo alguns princípios e regras, considera-se benéfico, não só para a saúde, como parece interferir no processo de envelhecimento, retardando-o<sup>1-4</sup>.

Com o início do exercício físico, desencadeia-se no organismo um estímulo ao nível do sistema nervoso simpático, que conduz à libertação de substâncias vasoconstritoras. Continuando o exercício, verifica-se uma adaptação do sistema cardiovascular, com aumento do ritmo e força cardíacos, aumento da pressão arterial, adaptação do sistema respiratório, aumento do fluxo sanguíneo, incremento do metabolismo celular, elevação da concentração de glicose no sangue e aumento da glicólise, tanto no fígado como no músculo. Todos estes factores, em conjunto, contribuem para uma boa performance do exercício físico<sup>5,6</sup>.

Outra relevância é a presença de oxigénio, que sendo indispensável, pode tornar-se perigosa, promovendo stress oxidativo. O aumento do volume de oxigénio favorece a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), desencadeando stress oxidativo, com todas as consequências nefastas que daí advêm<sup>4,7-10</sup>. O acréscimo de ROS pode comprometer as defesas antioxidantes químicas e enzimáticas disponíveis no organismo. Assim, aconselha-se a implementação de hábitos alimentares com suplementos antioxidantes<sup>11-13</sup> e a sua associação com a actividade física regular<sup>4,11</sup>. De referir ainda, estudos que evidenciam o facto do óxido nítrico (NO) e espécies reactivas de nitrogénio (RNS) apresentarem valores elevados no organismo, durante o exercício físico<sup>4,9</sup>.

Relativamente à origem do stress oxidativo, são relevantes alguns factores como a duração e a intensidade do exercício físico<sup>12,14,15</sup>. O índice de peroxidação lipídica é avaliado pelos níveis de malonildialdeído, importante biomarcador de stress oxidativo<sup>4,9,12,16</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

No estudo, participaram 16 indivíduos voluntários, do sexo masculino, saudáveis, com idades compreendidas entre 18 e 21 anos de idade. A amostra foi dividida em dois grupos: atletas, constituído por 9 jogadores de *futsal* e controlo, formado por 7 indivíduos que não praticavam desporto com regularidade. Após apresentação e explicação do protocolo de trabalho, iniciou-se o estudo com medições antropométricas. O exercício anaeróbio foi avaliado pelo teste de *Wingate*. As colheitas de sangue periférico em ACD 3.8% (solução anticoagulante constituída por ácido cítrico, citrato de sódio e D-glucose), segundo metodologia descrita por Pollock e colaboradores<sup>17</sup>, foram realizadas em dois momentos, repouso e exercício, respectivamente, antes e 15 minutos após o teste de *Wingate*, para quantificação de NO plaquetar, NO plasmático e malonildialdeído (MDA).

## TESTE DE WINGATE

O teste de *Wingate* consistiu num *sprint* máximo de 30 segundos, realizado num cicloergómetro, contra uma resistência constante. Foi utilizado o modelo MONARK 824 E e seguida a metodologia descrita por Inbar e colaboradores<sup>18</sup>.

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE LACTATO

O sangue foi colhido em repouso e 5 minutos após o exercício. Seguiram-se as indicações do Kit comercial (Lactate; DR. LANGE Cuvette Test, LKM 140; DR.LANGE, Alemanha), baseado no método enzimático "LOX-PAP", segundo Böning e colaboradores<sup>19</sup>. Os resultados foram expressos em mmoles/L de lactato.

## QUANTIFICAÇÃO DE NO PLAQUETAR

As plaquetas são um óptimo modelo experimental, porque reflectem as alterações endoteliais, pelas semelhanças com o endotélio e células musculares lisas. A fracção plaquetar obtida por fraccionamento das amostras sanguíneas, aplicou-se a metodologia seguida por Pollock<sup>17</sup>.

A quantificação de nitritos intraplaquetares e libertados pela plaqueta foi realizada segundo o método de Griess<sup>20</sup> e os resultados apresentados em nmoles/10<sup>9</sup> plaquetas.

## CONTAGEM DE PLAQUETAS

Na contagem de plaquetas foi utilizado um contador semi-automático CELL COUNTER AI 134.

## QUANTIFICAÇÃO DE NO PLASMÁTICO

A concentração de nitritos e nitratos plasmáticos foi realizada com o *Kit Nitralyzer™ II*, da *World Precision Instruments, Inc.*<sup>21</sup>. Os nitritos foram quantificados pelo método de Griess<sup>20</sup> e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ .

## MALONILDIALDEÍDO (MDA)

Os métodos laboratoriais desenvolvidos por alguns investigadores, para determinação de MDA, serviram de base ao método modificado por Proença<sup>22</sup>, aplicado no presente estudo, com os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ .

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A amostra foi analisada estatisticamente e os resultados foram expressos sob a forma de média  $\pm$  erro padrão, valores máximo e mínimo, representados entre parêntesis rectos.

Foi feita, também, a análise da variância (ANOVA unifactorial) dos dados da amostragem. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ . Os resultados relativos à significância estatística (ANOVA), só são referidos quando estes apresentam valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados das médias  $\pm$  erro padrão da idade e das características antropométricas, de ambos os grupos apresentam-se na Tabela 1. As determinações dos outros parâmetros, em repouso e 15 minutos após o teste de *Wingate*, nos dois grupos, estão representados na Tabela 2. Relativamente à concentração de lactatos sanguíneos em repouso, os atletas registaram (média  $\pm$  erro padrão)  $1,8 \pm 0,3$  mmoles/L de lactatos, enquanto o grupo controlo  $2,0 \pm 0,2$  mmoles/L. Na avaliação aos 5 minutos após o teste, os atletas apresentaram  $8,7 \pm 1,0$  mmoles/L, enquanto o controlo registou  $13,8 \pm 0,6$  mmoles/L. A diminuição de lactatos nos atletas após o exercício, em relação ao controlo, foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Actualmente, é frequente incentivar a prática do exercício físico como factor importante para o bem-estar do indivíduo. No entanto, o modo como se pratica o exercício físico, a via energética utilizada, os mecanismos de adaptação e a biodisponibilidade de oxigénio são factores essenciais, na performance do exercício físico.

O teste de *Wingate*, ao avaliar os indicadores de performance, apresentou resultados semelhantes nos dois grupos. O índice de fadiga apresentou uma tendência para diminuir nos atletas. Este resultado pode reflectir a ausência de treino no grupo controlo ou uma melhor adaptação dos atletas ao exercício<sup>23,24</sup>. >

Quanto à concentração de lactatos, cinco minutos após o exercício anaeróbio, foi significativamente mais baixa nos atletas ( $8,7 \pm 1,0$  mmoles/L) que no controlo ( $13,8 \pm 0,6$  mmoles/L), podendo evidenciar as diferenças de treino dos dois grupo<sup>2</sup>. Valores mais baixos poderão estar relacionados com a diminuição da glicogenólise muscular<sup>10,25</sup> ou com o aumento da capacidade de remoção do lactato<sup>25</sup>. Também é importante a elevação do débito cardíaco<sup>2</sup>, para rapidamente o lactato chegar ao fígado, ocorrer a gluconeogénese, produção de ATP e dar continuidade ao exercício físico. Estes resultados sugerem ainda, uma maior capacidade de recuperação dos atletas, com maior oxidação dos lactatos, aumento da eliminação renal ou maior transformação metabólica em glicose.

É sabido que o aumento de espécies vasoconstritoras é compensado com uma maior produção e libertação de substâncias vasodilatadoras como, por exemplo, o NO<sup>26-28</sup>. As plaquetas sintetizam o seu próprio NO, aumentando a eficiência do mecanismo de resposta, com produção e libertação de NO<sup>28</sup>. De seguida, a avaliação laboratorial demonstrou que o conteúdo plaquetar de nitritos (reflectindo a quantidade de NO) é mais elevado e significativo nos atletas que no grupo controlo (em repouso), sugerindo a existência de um mecanismo de adaptação ao exercício. De acordo com a avaliação laboratorial, foi detectado que, após o exercício anaeróbio, a concentração de nitritos intraplaquetares foi superior e significativa nos atletas, relativamente ao controlo (ver dados da Tabela 2). Isto porque, no grupo controlo, as plaquetas, pelas suas características morfológicas e

funcionais, ao serem activadas, em consequência do exercício, tendem a aderir e a formar agregados, podendo mesmo rebentar por não suportarem o atrito com as paredes dos vasos. Segundo Tozzi-Ciancarelli e colaboradores<sup>14</sup>, o exercício intenso aumenta a agregação plaquetar. Assim, os nitritos diminuem com o exercício, porque compensam a vasodilatação, contrariando o efeito das substâncias vasoconstritoras.

Relativamente à quantidade de nitritos plaquetares libertados, verificou-se um aumento nos conteúdos plaquetares dos atletas em repouso e após exercício, quando comparados com os do grupo controlo, em ambas as situações (Tabela 2). Estes resultados indicam que o teor de nitritos produzidos pela plaqueta reflecte a quantidade libertada pela mesma, parecendo contribuir para um desempenho mais eficiente do exercício físico. As justificações atrás apresentadas, para os nitritos intraplaquetares, são também válidas para os nitritos libertados pela plaqueta.

Quanto às concentrações de NO plasmático, resultantes do total de nitritos e nitratos, verificou-se que a concentração nos atletas tinha um comportamento idêntico ao encontrado nas plaquetas, onde a concentração de nitritos diminuía após o exercício (ver dados da Tabela 2). Facto que se explica pelo contributo do NO na vasodilatação, originando uma diminuição da resistência vascular periférica, facilitando a passagem do fluxo sanguíneo, que devido ao exercício, se encontra aumentado sobretudo em direcção aos músculos activos. No entanto, no controlo registou-se uma tendência para o aumento da concentração de nitritos

Tabela 1 - Idade e características antropométricas da amostra estudada (atletas e grupo controlo).

	n	Idade (anos)	Massa corporal (kg)	Estatura (cm)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Atletas	9	18,7 ± 0,2 (18,0 - 19,0)	62,9 ± 2,9 (54,0 - 84,5)	174,0 ± 1,9 (165,0 - 184,5)	20,8 ± 0,8 (18,1 - 27,0)
Controlo	7	19,4 ± 0,3 (19,0 - 21,0)	66,7 ± 3,3 (54,0 - 80,5)	173,0 ± 1,3 (167,7 - 177,2)	22,3 ± 0,9 (18,6 - 25,6)

IMC: índice de massa corporal

Os valores estão representados como média ± erro padrão e respectiva variação (valor mínimo e máximo).

Tabela 2 - Concentrações de nitritos intraplaquetares, nitritos plaquetares libertados, nitritos+nitratos plasmáticos e MDA, nos atletas e grupo controlo.

	Nitritos intraplaquetares (nmoles/10 <sup>9</sup> plaquetas)	Nitritos plaquetares libertados (nmoles/10 <sup>9</sup> plaquetas)	Nitritos + nitratos plasmáticos (μM)	MDA (μM)
Atletas				
- Repouso	11,2 ± 1,9 *	11,4 ± 1,2 *	17,1 ± 1,2	0,75 ± 0,03 *
- Após 15 min	10,2 ± 1,7 *	10,6 ± 1,5 *	15,7 ± 3,7	0,81 ± 0,05 *
Controlo				
- Repouso	6,6 ± 0,8	8,0 ± 1,1	13,8 ± 2,0	1,03 ± 0,09
- Após 15 min	5,8 ± 0,7	4,9 ± 0,8	15,7 ± 2,3	1,04 ± 0,08

\* p < 0,05 em relação ao respectivo controlo.

As concentrações foram determinadas em repouso e 15 minutos após o exercício anaeróbio. Os valores representam as médias ± erro padrão.

+ nitratos após o exercício (Tabela 2). Facto que poderá explicar-se pela possível conversão de NO em peroxinitrito. As alterações observadas, apesar de serem pouco significativas, podem ser atribuídas às condições do exercício como intensidade, duração e frequência, factores que influenciam as manifestações após exercício e o nível de stress oxidativo desencadeado<sup>12,14,15</sup>.

Deste modo, o grupo controlo pode apresentar menor quantidade de NO (sob a forma de nitritos), mas um aumento de radicais livres de oxigénio, aumentando deste modo os mecanismos de peroxidação.

No sentido de pesquisar alterações na extensão da peroxidação lipídica, foram determinadas as concentrações plasmáticas de malondialdeído nos atletas e no grupo controlo. Verificou-se que os valores de MDA foram superiores no grupo controlo, relativamente aos atletas, em repouso e após exercício. Os atletas apresentaram alterações significativas nos valores de MDA, em repouso e após exercício (ver dados da Tabela 2). O aumento das concentrações de MDA plasmático, registado no grupo controlo, poderá advir da elevação dos nitritos + nitratos plasmáticos, em consequência das defesas anti-radicalares estarem diminuídas comparativamente aos atletas. No grupo controlo, já os valores de MDA em repouso estavam aumentados ( $1,03 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ) e, neste caso, poderá ser resultado da influência dos mecanismos de adaptação originada pela ausência de treino no controlo. Considerado o MDA, um bom biomarcador de stress

oxidativo<sup>9</sup>, os resultados parecem confirmar a hipótese de que o exercício é benéfico, uma vez que induzem a redução do stress oxidativo.

Assim, parece-nos poder sugerir que os resultados apresentados são concordantes com outros estudos similares<sup>2</sup>, podendo reforçar a ideia de que o exercício físico regular melhora a capacidade do organismo, na prevenção dos efeitos tóxicos de peroxidação lipídica.

Sabendo que o exercício físico, por mobilizar maior quantidade de oxigénio, favorece o aumento de ROS, estas espécies poderão ter origem em consequência do aumento da produção de NO por, conversão em peroxinitrito. Contudo, esta situação parece não se verificar no nosso estudo, uma vez que diminui a quantidade de MDA plasmático nos atletas, reflectindo uma diminuição da peroxidação proveniente das ROS.

A diminuição de MDA pode resultar do aumento das defesas antioxidantes. Assim, o aumento da produção de NO não é convertido em ROS mas, provavelmente, utilizado no relaxamento vascular.

Em jeito de conclusão, parece-nos que a prática de exercício físico não desenvolveu mais a via glicolítica, mas aumentou a capacidade de activação/resposta de outros sistemas: maior capacidade cardiocirculatória e maior protecção contra o stress físico e oxidativo. A prática do exercício físico parece ainda contribuir para uma recuperação activa mais rápida e eficaz, visível pela menor quantidade de lactatos para a mesma intensidade de esforço. ■

*Novos conteúdos em <http://diag.roche.pt>*



**As melhores soluções à distância de um clique**

**Toda a Informação sobre a Roche  
Diagnostics ao seu dispôr.**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Taddei S, Galetta F, Viridì A, Ghiadoni L, Salvetti G, Franzoni F, Giusti C, Salvetti A. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation*. 2000;101:2896-2901.
- 2 Carneiro AL, Lopes T, Moreira AL. Mecanismos de Adaptação ao Exercício Físico. Oporto University. 2002;1-24.
- 3 Apor P, Radi A. Physical exercise, oxidative stress and damage. *Orv Hetil*. 2006;147:1025-1031.
- 4 Souza CF, Fernandes LC, Cyrino ES. Produção de espécies reativas de oxigénio durante o exercício aeróbio e anaeróbio. *Rev. Bras. Cineantropom Desempenho Hum*. 2006;8(2):102-109.
- 5 Guyton AC, Hall JE. *Fisiologia Humana e Mecanismo das Doenças*. Guanabara Koogan. 1998.
- 6 Costa F, Christensen NJ, Farley G, Biaggioni I. NO modulates norepinephrine release in human skeletal muscle: implications for neural preconditioning. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2001;280(5):R1494-R1498.
- 7 Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*. 1995;9:526-533.
- 8 Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medicinal Chemistry*. 2001;8:721-738.
- 9 Sousa Jr TP, Oliveira PR, Pereira B. Exercício físico e estresse oxidativo. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Rev Bras Med Esporte*. 2005;vol.11:91-96.
- 10 Araujo GG, Gobatto CA, Hirata RD, Hirata MH, Cavagliari CR, Verlengia R. Physiological responses to detection overtraining. *Rev da Educação Física/UEM*. 2008;19 (2):275-289.
- 11 Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*. 1995;79 (3):675-686.
- 12 Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1997;37:235-239.
- 13 Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. *Rev Bras Med Esporte*. 2007;13 (5):336-342.
- 14 Tozzi-Ciancarelli MG, Penco M, Di Massimo C. Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol*. 2002; 86:266-272.
- 15 Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*. 2003;108:530-535.
- 16 Souza CF, Fernandes LC, Cyrino ES. Production of reactive oxygen species during the aerobic and anaerobic exercise. *Rev Bras Cineantropom. Desempenho Hum*. 2006;8:102-109.
- 17 Pollock WK, Rink TJ, Irvine RF. Liberation of [3H] arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2 loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. *Biochem J*. 1986;235:869-877.
- 18 Inbar O, Bar-Or O, Skinner JS. The Wingate anaerobic test. *EUA: Human Kinetics*. 1996;110.
- 19 Böning D, Clasing D, Weicker H. Stellenwert der Laktatbestimmung in der Leistungsdiagnostik. *Gustav Fischer, Stuttgart*. 1994.
- 20 WPI. Griess Reaction Nitrite kit – Instruction Manual. *World Precision instruments, Inc*. 2001b;1-9.
- 21 WPI. Nitralyzer™ II – Instruction Manual. *World Precision instruments, Inc*. 2001a;1-10.
- 22 Proença MT. Marcadores periféricos de stress-oxidativo na doença de Parkinson: neurotoxicidade da L-Dopa. Tese de mestrado. *Universidade de Coimbra*. 2002;1-121.
- 23 Valado A. Exercício anaeróbio, catecolaminas, óxido nítrico e peróxidos plasmáticos. Tese de mestrado. *Universidade de Coimbra*. 2004;1-94.
- 24 Valado A, Pereira L, Tavares PC, Fontes Ribeiro C. Effect of the intense anaerobic exercise on nitric oxide and malondialdehyde in studies of oxidative stress. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. 2007;1,vol.1:32-36.
- 25 Collomp KR, Ahmaidi SB, Caillaud CF, Audran MA, Chanal JL, Préfaut CG. Effects of benzodiazepine during a Wingate test: interaction with caffeine. *Med Sci Sports Exerc*. 1993;25:1375-1380.
- 26 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmac Rev*. 1991;43:109-142.
- 27 Schechter AN, Gladwin MT, Cannon RO. NO solutions?. *J Clin Invest*. 2002;109:1149-1151.
- 28 Muruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994;1200:1-6.
- 29 Metin G, Atukeren P, Alturfan AA, Guyasar T, Kaya M, Gumustas MK. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Med J*. 2003;97:979-986.

Ana Maria de Figueiredo Valado  
 Rua 5 de Outubro S. Martinho do Bispo  
 Apartado 7006 3046-854 Coimbra  
 Tel: 239802430 Telm: 933254281  
 E-mail: valado@estescoimbra.pt