

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DEPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU-SENSU* EM EDUCAÇÃO
FÍSICA

O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO TREINAMENTO AERÓBIO COM O
CONSUMO DE ERVA MATE EM CURTO PERÍODO DE TEMPO NA
CARDIOPROTEÇÃO DE RATOS WISTAR

Fábio Luiz Candido Cahuê

Fevereiro, 2015

FÁBIO LUIZ CANDIDO CAHUÊ

O Efeito da Associação do Treinamento Aeróbio com o Consumo de Erva Mate em Curto Período de Tempo na Cardioproteção de Ratos Wistar

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biodinâmica do Movimento (Educação Física), Escola de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientadora: Profa. Dra. Verônica Salerno Pinto

Co-orientação: Profa. Dra. Luciane Barcellos

Rio de Janeiro

2015

Dedicatórias

Aos meus pais, Luiz Claudio e Elza, por me ensinarem a ser quem eu sou.

À minha esposa, Michelle, por todo o amor e cumplicidade.

Agradecimentos

À Deus, por me conceder a graça da paciência, da resiliência e da busca incessante pelo conhecimento.

Aos meus pais, Luiz Claudio e Elza, e ao meu irmão, Luiz Junior, por sempre me apoiarem em tudo que fiz e escolhi, sempre acreditando no meu sucesso e na minha capacidade de realização.

À minha esposa, Michelle, que, além de sempre ter respeitado minhas escolhas, sempre as apoiou, me dando o suporte necessário para continuar em frente, em forma de amor, cumplicidade, companheirismo e paciência.

Às minhas orientadoras, Verônica e Luciane, minhas “mães na ciência”. Minhas principais referências na ética científica, no conhecimento e na liderança. Eu agradeço por toda a confiança, todas as broncas, pela paciência e pela amizade que com certeza perdurará por toda a minha vida.

À minha amiga Izaura, por ter me incentivado a buscar o conhecimento na pesquisa e por me apoiar e ajudar em diversas ocasiões. Obrigado, comadre!

À Simone Souza, que teve participação importante neste trabalho, iniciando e ajudando nos experimentos de isquemia/reperfusão e também por toda a ajuda quando, sem nenhum conhecimento em pesquisa, me ajudou pacientemente.

À amiga prof. Dra Elen Aguiar por toda a ajuda nos experimentos de isquemia/reperfusão.

Ao prof. Dr. José Hamilton Nascimento, que generosamente cedeu seu laboratório para os experimentos de isquemia/reperfusão e à aluna de mestrado Dahienne Ferreira por toda a ajuda na condução dos experimentos de isquemia/reperfusão.

Ao amigo Stephan Frankenfeld pela ajuda inestimável no experimento de atividade da NADPH Oxidase.

Aos meus alunos de Iniciação Científica Camilli Santos, Victor Andrade (hoje mestrando!), Sarah Ramos e Pedro Baião por toda a ajuda durante o desenho experimental. Muito obrigado por tudo!

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia do Treinamento físico por toda a ajuda no manejo dos animais e por sempre terem sido solícitos em oferecer e dar ajuda.

A todo o pessoal do Laboratório de Bioquímica do Treinamento físico e Motores Moleculares (em especial Diego Viana, Frederico Lima, Monique Passos, Marcelo Sant'Anna, Danielle Azeredo e Rodrigo Mello) por todas as conversas, brincadeiras e por toda a ajuda durante a elaboração deste trabalho.

Resumo

As Doenças Cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo. O Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é um evento relacionado às DCVs e consiste em longos períodos de isquemia, que podem ser seguidos por reperfusão. A sobrevivência a um IAM é determinada pela resistência do músculo cardíaco e este fenômeno é conhecido como cardioproteção. O treinamento físico e o uso de produtos naturais são estratégias relacionadas à promoção de cardioproteção. Neste trabalho a combinação do treinamento aeróbio e o consumo de *Ilex paraguariensis* (MATE) por um período curto de tempo foi estudado para investigar seus papéis na cardioproteção. Ratos Wistar machos (n=67, 250 ± 50g) foram divididos em quatro grupos: sedentário (SC), sedentário + MATE (SM), treinamento físico (EC) e treinamento físico + MATE (EM). Os grupos SM e EM receberam 1g/kg massa corporal/dia de MATE diluídos em 1 mL de água via gavagem. A rotina de treinamento físicos (grupos EC e EM) consistiu em 30 min com sobrecarga de 5% massa corporal. Após sete dias de intervenção os animais foram sacrificados e parte deles (n=36) foram induzidos a IAM *ex-vivo* (isquemia/reperfusão (I/R) global) e tiveram a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE) e a área de infarto (AI) avaliadas enquanto a outra parte (n=31) foram direcionadas para as análises de estresse oxidativo (peroxidação lipídica (TBARS), proteína carbonilada (PC), glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e razão GSH/GSSG) de atividade das enzimas antioxidantes (Catalase e Superóxido Dismutase (SOD)), da capacidade antioxidante sistêmica (capacidade antioxidante total (CAT), Ácido Úrico (AU)), dos biomarcadores de lesão celular (CK, LDH, TGO, TGP, Gama-GT), da concentração plasmática de nitrito e da atividade da NADPH Oxidase cardíaca. Os animais dos grupos SM e EC mostraram melhor PDVE e redução da AI após I/R comparado aos grupos EM e SC. No grupo EM, a concentração de PC encontrou-se maior no plasma em relação aos grupos SM e EC. No tecido cardíaco, porém, o conteúdo de PC foi maior no grupo SM comparado ao grupo EM. A atividade da SOD apresentou um aumento significativo em eritrócitos nos grupos SM, EC e EM enquanto que, em tecido cardíaco, o aumento foi visto somente no grupo EC. A razão GSH/GSSG teve um aumento significativo no tecido cardíaco do grupo SM

comparado ao grupo EC. Uma diminuição significativa no Gama-GT plasmático foi vista no grupo EM comparado ao grupo EC. Nenhuma mudança foi observada para a atividade das enzimas catalase e NADPH oxidase cardíaca, bem como na CAT e nas concentração plasmática de nitrito e AU. Os dados sugerem que o consumo de MATE inibiu as adaptações antioxidantes promovidas pelo treinamento físico aeróbio. Este estudo mostrou pela primeira vez a cardioproteção promovida pelo consumo de MATE por curto período de tempo. Os resultados sugerem que o efeito pro-oxidante do consumo do MATE pode ter um papel importante na cardioproteção.

Palavras-chave: exercício aeróbio, erva mate, cardioproteção

Abstract

Cardiovascular disease is a leading cause of death that includes Acute Myocardial Infarction (AMI) consisting of long periods of ischemia that can be followed by reperfusion. Survivability to an AMI is often determined by the endurance of cardiac muscle, known as cardioprotection. Strategies to improve cardioprotection have highlighted exercise and the use of natural products. Here, a combination of aerobic training and MATE (*ilex paraguariensis*) for a short period of time was studied to investigate their influence on cardioprotection. Male Wistar rats (n=67, 250 ± 50g) were divided into four groups: sedentary (SC), sedentary + MATE (SM), exercise (EC) and exercise + MATE (EM). Groups SM and EM received 1g/kg body weight (b.w.)/day of MATE via gavage. Exercise (groups EC and EM) consisted of swimming for 30 min while weighted with 5% b.w. The protocols were applied for seven days and then were sacrificed. A model of AMI (global ischemia/reperfusion – I/R) were made in 36 animals to analyze left ventricle development pressure (LVDP) and infarction area (IA) and 31 animals were used to analyze oxidative stress biomarkers (lipid peroxidation (TBARS), protein carbonyls (PC), reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and GSH/GSSG ratio) antioxidant enzymes activity (Catalase and Superoxide Dismutase (SOD)), systemic antioxidant capacity (Total Antioxidant Capacity (TAC), Uric Acid (UA)), cellular lesions biomarkers (CK, LDH, TGO, TGP, Gama-GT), nitrite plasma concentration and cardiac NADPH Oxidase activity. Animals in groups SM and EC showed better LVDP and reduced IA after I/R compared to those in groups EM and SC. In the EM group, plasmatic concentration of PC was increased compared to SM and EC. In cardiac tissue, however, PC was increased for the SM group compared to the EM group. For SOD activity, a significant increase was observed in erythrocytes for SM, EC and EM groups while in cardiac muscle, an increased was measured only in the EC group. The GSH/GSSG ratio had a significant increase in cardiac tissue of the SM group compared to the EC group. A significant decrease in plasma Gama-GT was seen in the EM group compared to the EC group. No changes were observed for catalase activity, cardiac NADPH oxidase activity, plasma nitrite levels, plasma uric acid concentrations or lipid peroxidation. Overall, the data suggests that MATE consumption

inhibited the antioxidant adaptations promoted by aerobic exercise. Further, this study showed for the first time a cardioprotection from the consumption of MATE for a short-time period. Together, the results suggest that the pro-oxidant effect from consuming MATE could play a role in cardioprotection.

Keywords: aerobic exercise, *ilex paraguariensis*, cardioprotection

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Gráfico demonstrativo das causas de morte no mundo em 2011.	1
Figura 2 - Gráfico de predição de risco de eventos cardiovasculares associados à idade, níveis de colesterol, pressão arterial sistólica, tabagismo e diabetes mellitus, para países da América, incluindo o Brasil.....	2
Figura 3 - Esquema representativo do processo de redução da Coenzima Q, resultando na produção de ânion superóxido.	4
Figura 4 - Esquema representativo das vias de produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio, bem como os direcionamentos para as vias antioxidantes e de sinalização protetora e deletéria.....	5
Figura 5 - Esquema representativo das defesas antioxidantes em meio biológico.....	5
Figura 6 - Esquema ilustrativo dos mecanismos que levam à lesão por isquemia/reperfusão no miocárdio.	8
Tabela 1 - Quadro demonstrativo de estudos relacionados à cardioproteção e seus resultados referentes à Área de Infarto (AI) e Pressão Desenvolvida do Ventrículo Esquerdo (PDVE).....	10
Figura 7 - Figura ilustrativa dos principais compostos do MATE.....	13
Figura 8 - Esquema representativo da linha experimental adotada neste estudo.	18
Figura 9 - Pressão Desenvolvida (PD) durante experimento de isquemia/reperfusão global.	25
Figura 10 - Área de Infarto analisada após isquemia/reperfusão e marcação da área viável com TTC	26
Figura 11 - Atividade da NADPH Oxidase em tecido cardíaco. 30 e 60 minutos representam o tempo de reperfusão do tecido cardíaco nos grupos controle sedentários (SC) e MATE (SM).....	27
Figura 12 - Capacidade Antioxidante Total plasmática mensurada pela inibição da auto-oxidação do DPPH.....	27
Figura 13 - Dosagem de Nitrito plasmático.....	28
Figura 14 - Dosagem de Ácido Úrico plasmático.....	29

Figura 15 - Peroxidação lipídica avaliada no plasma e no tecido cardíaco, através de mensuração dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
Figura 16- Carbonilação de Proteínas analisada em plasma e no tecido cardíaco.	30
Figura 17 – Concentrações de GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG no plasma e no tecido cardíaco.	31
Figura 18 - Atividade da Catalase em eritrócito e no tecido cardíaco.....	32
Figura 19 - Atividade da SOD analisada em eritrócito e em tecido cardíaco...	33
Tabela 2 - Biomarcadores de Lesão Celular.....	35

Lista de Abreviações

DCVs – Doenças Cardiovasculares

WHO – World Health Organization

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

NROs – Espécies Reativas de Nitrogênio

ATP – Adenosina Trifosfato

$\cdot\text{O}_2^-$ - Ânion Superóxido

XO - Xantina Oxidase

SOD - Superóxido Dismutase

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

GPx - Glutathione Peroxidase

GSH - Glutathione Reduzida

GR - Glutathione Redutase

GSSG - Glutathione Oxidada

DNA – Ácido desoxirribonucléico

UV – Ultravioleta

Na^+/K^+ ATPases – Bombas de Sódio/Potássio ATPases

Ca^{2+} – Cálcio

$\text{HO}\cdot$ - Radical Hidroxila

$\text{ONOO}\cdot$ - Peroxinitrito

$\text{NO}\cdot$ - Óxido Nítrico

TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmico Pirúvica
Gama-GT – Gamaglutamiltranspeptidase
LDH – Lactato Desidrogenase
CK – Creatina Quinase
HSP72 – Heat Shock Protein 72
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida
NOS – Óxido Nítrico Sintase
SC – Sedentário Controle
SM – Sedentário Mate
EC – Treinamento físico Controle
EM – Treinamento físico Mate
I/R – Isquemia/Reperusão
TTC - trifeniltetrazolio clorido
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazi
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)
b-NADPH – beta nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
DNPH - 2,4-Dinitrofenilhidrazina
TCA – Ácido Tricloroacético
TMP - 1,1,3,3-tetrametoxipropano
TBA – Ácido Tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias Reagentes ao Ácido Tiobarbitúrico

PBS – Tampão Fosfato Salino

DTT – Ditionitrito

EGTA – ácido tetraacético glicol etileno

PMSF – Fenilmetilsulfonil Fluorido

HRP - Horseradish Peroxidase

ANOVA – análise de variância

PD – Pressão Desenvolvida

4-HNE - 4-Hidroxi-2-Nonenal

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Doenças Cardiovasculares	1
1.2. Balanço Redox: Radicais Livres e Capacidade Antioxidante	3
1.3. Injúria Cardíaca por Isquemia/Reperusão, Equilíbrio Redox e Cardioproteção	6
1.3.1. Biomarcadores de Lesões Muscular e Hepática: Indicadores de Stress Oxidativo Sistêmico e Relação com Cardioproteção	9
1.3.2. Cardioproteção: Principais Estratégias	9
1.4. O Treinamento físico Físico e Seus Efeitos na Cardioproteção	11
1.5. O Ilex paraguariensis (St. Hill)	12
1.5.1. Os efeitos do MATE na Cardioproteção	14
2. Problema do Estudo	15
3. Objetivos	16
3.1. Objetivos Gerais	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Animais	17
4.2. Protocolo Experimental	17
4.3. Sacrifício	18
4.4. Experimento de Injúria por I/R	18
4.5. Avaliação da Área de Infarto	19
4.6. Preparação das Amostras	19
4.7. Análise dos Biomarcadores de Lesão Muscular e Hepática	20
4.8. Análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT)	20

4.9.	Análise dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo	20
4.9.1.	Razão GSH/GSSG	20
4.9.2.	Carbonilação de Proteínas	21
4.9.3.	Peroxidação Lipídica	22
4.9.4.	Ácido Úrico	22
4.10.	Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes	22
4.10.1.	Catalase	22
4.10.2.	Superóxido Dismutase (SOD)	23
4.11.	Análise da Atividade da NADPH Oxidase e Óxido Nítrico	23
4.12.	Dosagem de Proteína e Hemoglobina	24
4.13.	Análise Estatística	24
5.	Resultados	25
5.1.	Pressão Desenvolvida e Área de Infarto	25
5.2.	Atividade da NADPH Oxidase	26
5.3.	Capacidade Antioxidante Total (CAT)	27
5.4.	Concentração Plasmática de Óxido Nítrico	28
5.5.	Ácido Úrico	28
5.6.	Peroxidação Lipídica e Carbonilação de Proteínas	29
5.7.	Equilíbrio Redox	30
5.8.	Atividade das Enzimas Antioxidantes	32
5.9.	Biomarcadores de Lesão Muscular e Hepática	33
6.	Discussão	35
7.	Conclusões	44
8.	Referências	45

1. Introdução

1.1. Doenças Cardiovasculares

Atualmente as doenças cardiovasculares (DCVs) são consideradas as principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2011). Conforme mostra a figura 1, no mundo, 34% de todas as mortes são provocadas por doenças do sistema cardiovascular, e, de todas as causas não conhecidas (33%), estima-se que 48% estejam associadas as DCVs. No Brasil estima-se que 24% da população já foi diagnosticada para hipertensão, e que 40% das pessoas acima dos 45 anos tenham hipertensão ou outras doenças associadas às DCVs, como dislipidemia ou diabetes mellitus (Brasil, 2014).

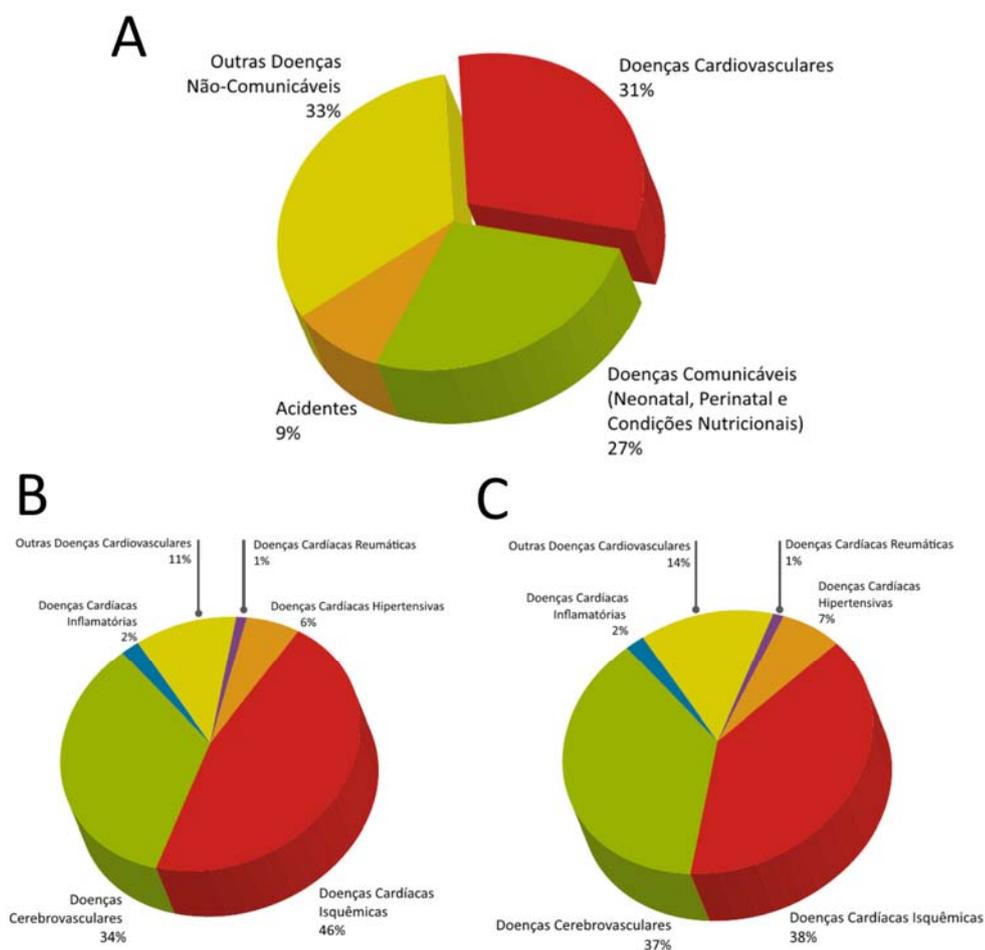


Figura 1 - Gráfico demonstrativo das causas de morte no mundo em 2011. **A** - Causas de morte no mundo. **B** - Causas de morte relacionadas às DCVs em homens. **C** - Causas de morte relacionadas às DCVs em mulheres. Adaptado de WHO (2011).

A DCV está associada a vários fatores de risco, como obesidade, comorbidades como a hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, distúrbios da tireóide, tabagismo e/ou sedentarismo (Figura 2). Os riscos de morte por eventos cardiovasculares, nos casos de DCVs associadas à idade e às co-morbidades citadas anteriormente, chegam a aumentar em mais de 40% por ano de vida. Mais de 30% da população mundial está acima do peso ideal (IMC > 25 kg/m²) e no Brasil mais de 17% da população é obesa (WHO, 2011; Brasil, 2014).

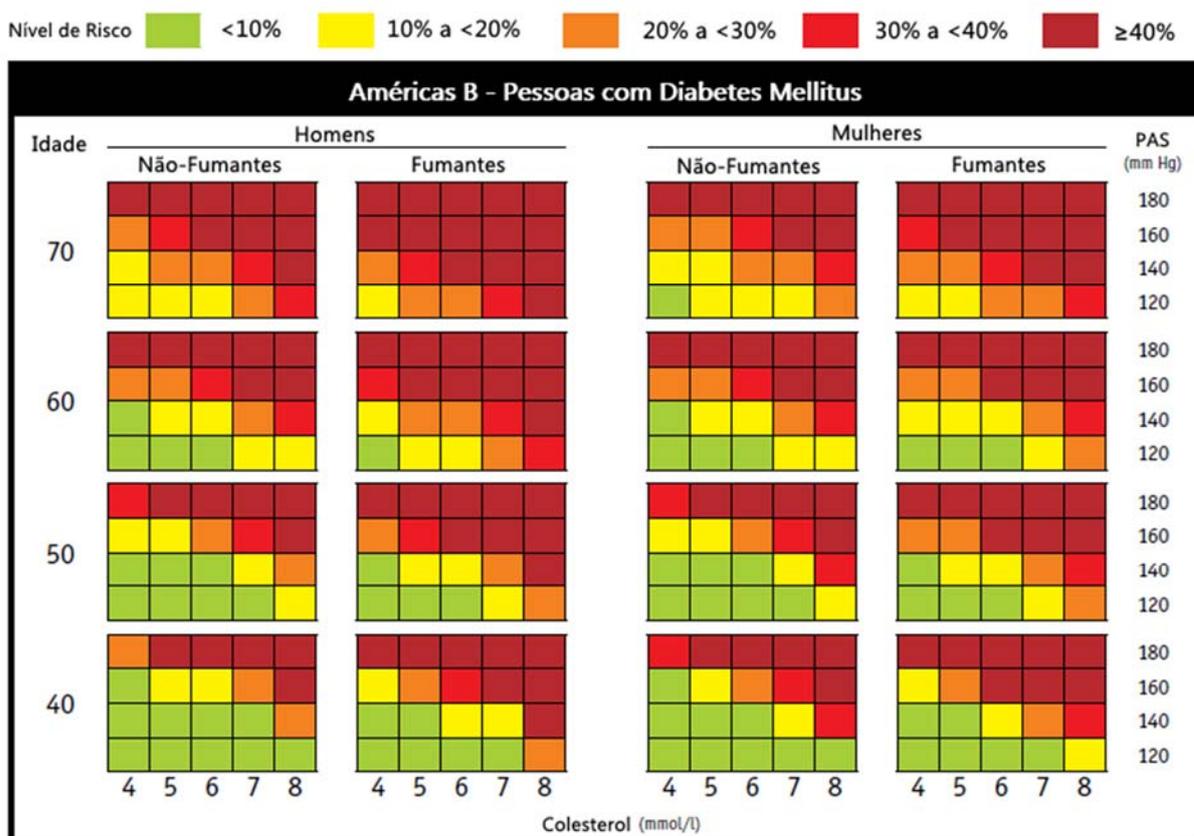


Figura 2 - Gráfico de predição de risco de eventos cardiovasculares associados à idade, níveis de colesterol, pressão arterial sistólica, tabagismo e diabetes mellitus, para países da América, incluindo o Brasil. Níveis de Colesterol Total expressos como mmol/L. Para efeito de conversão, 4 mmol/L = 154 mg/dL; 8 mmol/L = 308,8 mg/dL. Cálculo baseado na conversão proposta por Heart UK, 2014. Adaptado de WHO/ISH, 2007.

As DCVs quase sempre são assintomáticas, o que eleva ainda mais os riscos de eventos cardiovasculares, como por exemplo a angina e o infarto agudo do miocárdio (IAM). A angina é um sintoma da DCV caracterizada por dor no peito, que surge quando uma área do miocárdio entra em sofrimento, em resposta a isquemia ou por uma arritmia que pode ou não ter origem em uma isquemia. O IAM é

provocado por uma isquemia coronariana, que pode ter como pivô um trombo ou uma placa de atheroma, causando hipóxia e morte dos cardiomiócitos nutridos pelo vaso ocluído (Pesaro *et al.*, 2004). O risco de morte após um IAM depende de uma série de fatores, como tamanho da área nutrida pelo vaso bloqueado (Pesaro *et al.*, 2004) ou manutenção do balanço redox da área atingida pelo infarto durante a isquemia e, principalmente, durante a reperfusão, sendo este último uma variável modulada pela prática de treinamento físicos físicos e pela dieta (Powers *et al.*, 2014). Segundo a WHO (2011), cerca de 46% das causas de morte ligadas às DCVs em homens são por conta de doenças cardíacas isquêmicas - àquelas que podem gerar episódios de IAM – enquanto que, em mulheres, 38% dessas mortes são ligadas a esse tipo de DCV (Figura 1).

1.2. Balanço Redox: Radicais Livres e Capacidade Antioxidante

Os radicais livres são moléculas que contém um ou mais elétrons não pareados na última camada eletrônica (Halliwell & Gutteridge, 2007). Essas moléculas são responsáveis por diversos processos fisiológicos essenciais, dentre eles a ativação e funcionamento do sistema imune (Kohchi *et al.*, 2009), modulação do metabolismo energético (Radak *et al.*, 2013), entre outros. Os radicais livres podem ser descritos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (NROs).

As EROs podem ser produzidas por compostos exógenas (radiação UV e nuclear, alimentação, drogas, poluição, toxinas e xenobióticos) e por reações endógenas através da respiração mitocondrial e da atividade de enzimas citoplasmáticas (Kohen & Nyska, 2002). Durante o processo de produção de ATP pela mitocôndria, cerca de 5% de todo o oxigênio utilizado no processo recebe um elétron na sua última camada, resultando na produção de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (Becker, 2004). Esse evento acontece entre os complexos I e III, onde a ubiquinona (ou Coenzima Q) utiliza dois elétrons e dois prótons para ser convertida em ubiquinol (ou Coenzima Q reduzida) (Figura 3). Durante esse processo o intermediário da reação (semiquinona) pode sofrer redução por uma molécula de O_2 , dando origem ao $\cdot\text{O}_2^-$ (Carreras *et al.*, 1994).

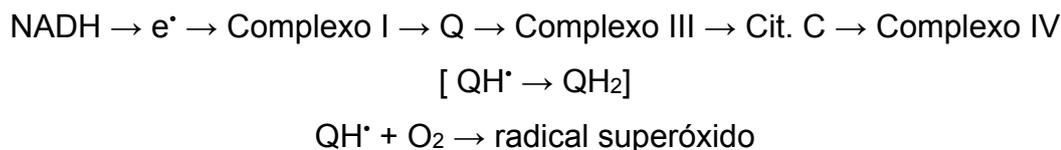


Figura 3 - Esquema representativo do processo de redução da Coenzima Q, resultando na produção de ânion superóxido. e⁻ = elétron; Q = Coenzima Q; QH^{*} = forma semiquinona da Coenzima; QH₂ = Coenzima Q reduzida. Retirado de Ribeiro *et al.*, 2005.

A molécula de ⁻O₂ também pode ser produzida no citoplasma, pelas enzimas NADPH Oxidase e Xantina Oxidase (XO). Esses dois últimos mecanismos somam-se ao maquinário produtor de ⁻O₂, que sofre rápida dismutação pela enzima Superóxido Dismutase (SOD). A SOD promove a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A enzima Xantina Oxidase também é capaz de gerar H₂O₂ pelas reações de oxidação e redução da hipoxantina e xantina, respectivamente (Harrison, 2002). Em baixas concentrações o ⁻O₂ e o H₂O₂ exercem papel fundamental na sinalização dependente de ROS para diversos mecanismos celulares essenciais para a sobrevivência celular (Kohen & Nyska, 2002). As moléculas de H₂O₂ podem ser rapidamente convertidas em H₂O e O₂ pela enzima Catalase; ou podem ser convertidas em H₂O pela Glutathione Peroxidase (GPx), oxidando uma molécula de glutathione reduzida (GSH). A enzima Glutathione Redutase (GR) é responsável pela redução da glutathione oxidada (GSSG), mantendo esse sistema cíclico. Esse sistema de enzimas, composto pela SOD, Catalase, GPx e GR é considerado o sistema de defesa antioxidante enzimático (Halliwell & Gutteridge, 2007) (Figura 4).

A capacidade antioxidante não compreende somente o sistema de defesa antioxidante enzimático. Alguns compostos exógenos que podem ser ingeridos na dieta, como por exemplo o ácido ascórbico (Vitamina C), polifenóis e carotenos são conhecidos como compostos varredores, que possuem a capacidade de doar um elétron para o radical livre sem perder sua estabilidade molecular. Outros compostos como o Ácido Úrico (AU), fruto da ação da XO, o GSH, a carnosina, entre outros também possuem papel antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 2007). A figura 5 representa um sumário das principais vias de defesa antioxidante.

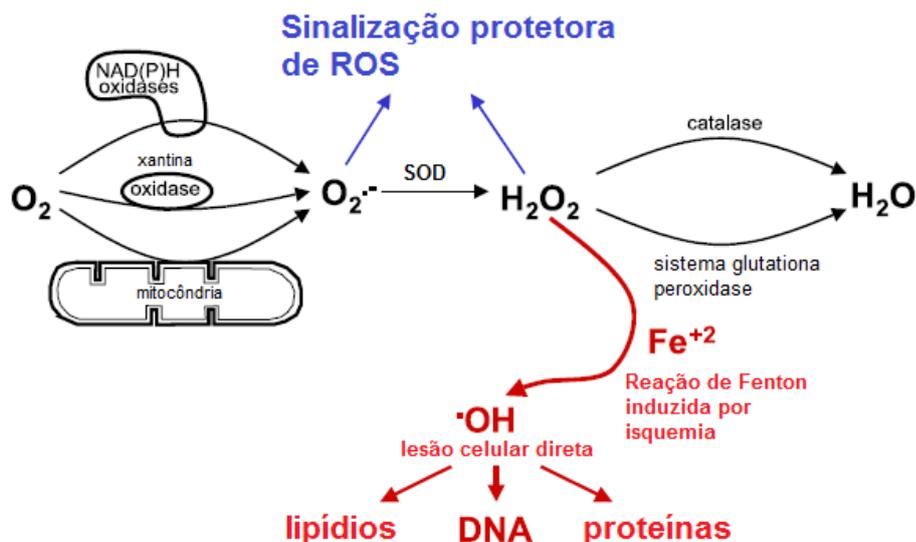


Figura 4 - Esquema representativo das vias de produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio, bem como os direcionamentos para as vias antioxidantes e de sinalização protetora e deletéria. Adaptado de Becker *et al.*, 2004.

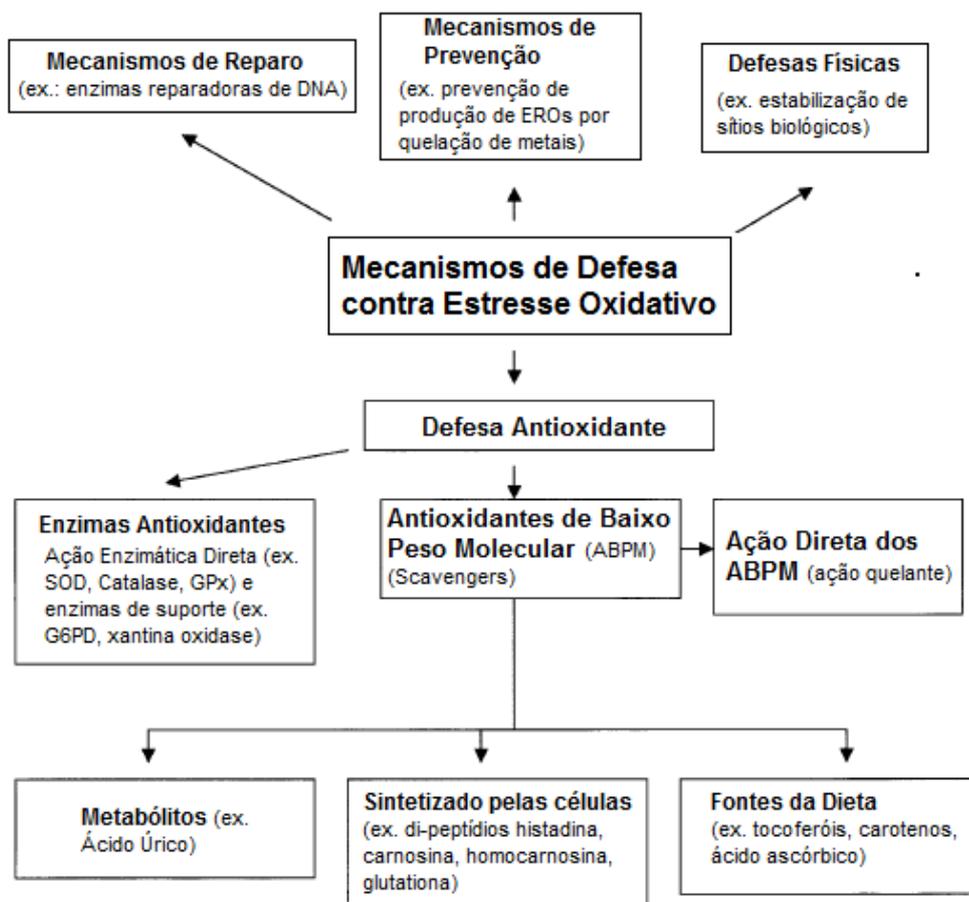


Figura 5 - Esquema representativo das defesas antioxidantes em meio biológico. Adaptado de Kohen & Nyska, 2002.

O equilíbrio redox é, por definição, o balanço entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante total. A manutenção desse equilíbrio é fundamental para a manutenção da vida celular (Kohen & Nyska, 2002). Quando há uma diminuição da capacidade antioxidante ou um aumento na produção de EROs, ou os dois acontecem concomitantemente, há um desequilíbrio oxidativo que pode levar a danos ao DNA, aos lipídeos e as proteínas. As EROs reduzem a capacidade de reparo do DNA potencializando o acúmulo de mutações; promovem a peroxidação de lipídeos de membrana o que pode levar ao rompimento da membrana lipídica, com extravasamento do conteúdo celular; promovem a carbonilação de proteínas, levando a uma mudança conformacional e perda da função fisiológica. Estas alterações a nível celular podem ativar processos de apoptose ou necrose (Halliwell & Gutteridge, 2007). Situações como a prática (aguda) de treinamento físicos físicos, a exposição à radiação UV e o fumo geram um desequilíbrio redox, aumentando a produção de EROs e diminuindo a capacidade antioxidante. Porém, o uso de alimentos com propriedades antioxidantes e o treinamento físico promovem uma melhora do equilíbrio redox, gerando uma proteção contra o aumento exacerbado ocasional de EROs (Davison *et al.*, 2012).

1.3. Injúria Cardíaca por Isquemia/Reperfusão, Equilíbrio Redox e Cardioproteção

A falta de transporte de oxigênio e a mudança de padrão de metabolismo energético (do metabolismo lipídico para o glicolítico) leva a área a um quadro de acidose e hipóxia (Vogt *et al.*, 2002). Há redução na produção de ATP que, em consequência disso, leva a diminuição da atividade das bombas Na^+/K^+ ATPases e dos canais de Ca^{2+} dependente de voltagem. A diminuição do influxo de Ca^{2+} para o interior da célula promove o desacoplamento mitocondrial o que reduz a produção de ATP (Garcia-Dorado *et al.*, 2012). Na tentativa de manter a concentração intracelular de Ca^{2+} o retículo sarcoplasmático libera estoques de Ca^{2+} de seu interior, tornando a concentração de Ca^{2+} extremamente elevada para a sobrevivência celular. Esse aumento leva a ativação da protease ativada por Ca^{2+} Calpaína, que sinalizam para processos de apoptose (Powers, Smuder, *et al.*, 2014) (Fig. 6). A própria degradação mitocondrial, em decorrência do aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} , em uma situação de produção exacerbada de

EROs, sinaliza vias de apoptose, como por exemplo a via das caspases (Murphy & Steenbergen, 2008).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) pela mitocôndria é aumentada durante a isquemia, em resposta a hipóxia, causando desequilíbrio no estado redox. A produção de $\cdot\text{O}_2^-$ se torna crítica em função do aumento do escapamento de elétrons da matriz mitocondrial. Além disso, nesse processo, a mitocôndria sofre com a diminuição da sua capacidade antioxidante, pela diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da catalase, responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . O $\cdot\text{O}_2^-$ é altamente reativo com outras moléculas, sendo rapidamente convertido em radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) quando interage com o H^+ e em peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) quando interage com outro radical livre, o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). $\text{HO}\cdot$ e $\text{ONOO}\cdot$ tem alta capacidade de interação com proteínas de sinalização, DNA e bicamada lipídica de membrana. A literatura mostra que a produção exacerbada de EROs, em situações patológicas como o IAM, é o principal meio de injúria e morte celular (Powers, Smuder, *et al.*, 2014). Portanto, o aumento de $\cdot\text{O}_2^-$ oriundo da mitocôndria é o principal responsável pela promoção do desequilíbrio redox oriundo da isquemia (Zweier & Talukder, 2006).

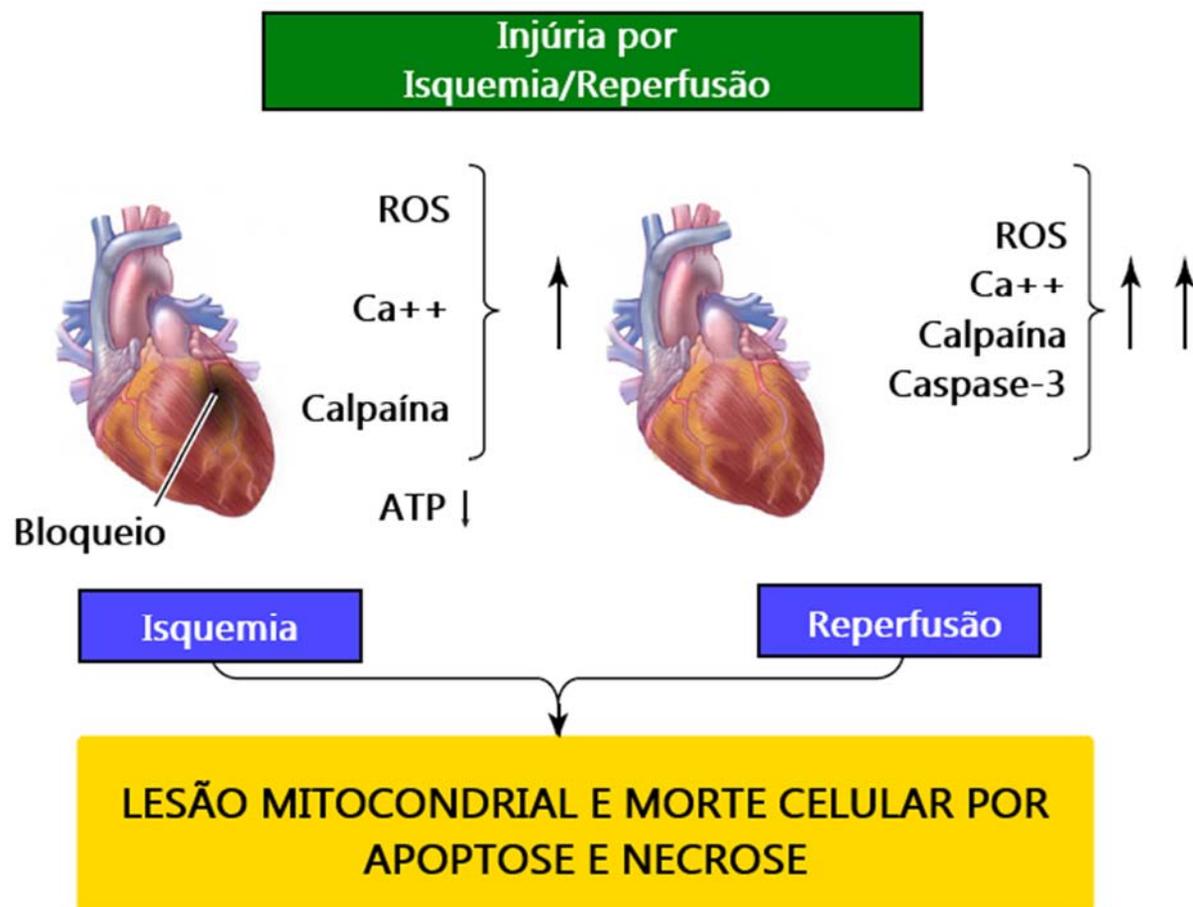


Figura 6 - Esquema ilustrativo dos mecanismos que levam à lesão por isquemia/reperusão no miocárdio. Adaptado de Powers *et al.*, 2013.

No citosol também há o aumento da produção de EROs e NROs. Durante a isquemia a atividade das NADPH Oxidases (NOXs – principalmente a NOX2, mais presente no tecido cardíaco) é aumentada em resposta a hipóxia (Bedard e Krause, 2007). O $\cdot\text{O}_2^-$ produzido pelas NOXs reage com o NO^* oriundo da maior ativação da Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), resultando na produção de ONOO^* (Jiao *et al.*, 2009).

Toda essa cascata de eventos se agrava na reperfusão, quando a região atingida pela isquemia volta a receber oxigênio e nutrientes. O *burst* (sobrecarga) de O_2 potencializa a produção de EROs e NROs, além de aumentar ainda mais a concentração de Ca^{2+} citosólica pelas vias descritas acima, aumentando o potencial de morte celular via apoptose e alterações de permeabilidade e ou lesão da membrana celular em resposta ao estresse oxidativo (Zweier & Talukder, 2006).

1.3.1. Biomarcadores de Lesões Muscular e Hepática: Indicadores de Stress Oxidativo Sistêmico e Relação com Cardioproteção

Em uma situação de aumento de estresse oxidativo, ocorre o aumento da permeabilidade de membrana celular em função do aumento da peroxidação lipídica. A alteração dos lipídeos de membrana leva ao escapamento de enzimas citoplasmáticas para a corrente sanguínea (Kalafati *et al.*, 2010). Algumas enzimas citoplasmáticas encontradas no sangue são utilizadas clinicamente para avaliar a lesão hepática (TGO, TGP e Gama-GT) ou para avaliar o nível de lesão muscular (LDH e CK) (Di Bonito *et al.*, 2009; Salvaggio *et al.*, 1991). Ramos *et al.* (2013) mostraram que o aumento dos níveis plasmáticos de TGO, TGP, Gama-GT e LDH acompanham o aumento do estresse oxidativo hepático, mensurado pelo aumento de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas após uma única sessão de treinamento físico de natação de alta intensidade em ratos Wistar. Em um modelo de falha cardíaca promovida por isoproterenol, Thomes *et al.* (2010) mostraram que o aumento das concentrações séricas de TGO, TGP e LDH está relacionado a uma menor cardioproteção. Estes trabalhos sugerem que o aumento da concentração plasmática dessas enzimas podem estar relacionados com o estresse oxidativo em diferentes tecidos, como fígado e coração, sendo assim estes parâmetros podem ser analisados em um contexto de cardioproteção.

1.3.2. Cardioproteção: Principais Estratégias

A capacidade do músculo cardíaco de reestabelecer os parâmetros de contratilidade, sobrevivendo a agressão causada pela injúria de isquemia/reperfusão pode ser chamada de cardioproteção (Kubler & Haass, 1996). Os principais parâmetros relacionados à cardioproteção é a área de infarto (AI) e a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE). A literatura relacionada a cardioproteção não estabelece um valor definido para caracterizar cardioproteção, como pode-se observar na tabela 1.

Tabela 1 - Quadro demonstrativo de estudos relacionados à cardioproteção e seus resultados referentes à Área de Infarto (AI) e Pressão Desenvolvida do Ventrículo Esquerdo (PDVE).

Autor, Ano	Desenho Experimental	Resultados (AI)	Resultados (PDVE)
Zhang <i>et al.</i> , 2010	Tratamento com doses sub-letais de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), 25 min. de isquemia, com 60 min de reperfusão. (<i>ex vivo</i>)	-	Melhora de 15% em relação ao grupo controle.
Powers <i>et al.</i> , 2008	Treinamento Aeróbio por 10 semanas, 4 dias por semana, 75-80% VO2Máx., entre 30 e 90 min/dia. 20 min. de isquemia com 10 min. de reperfusão (<i>in vivo</i>)	-	Melhora de 15% em relação ao grupo controle.
Ji <i>et al.</i> , 2010	Tratamento com insulina (60 U/l) por perfusão intravenosa (4 ml/kg/h por 3 h, começando 5 min antes da reperfusão). 30 min. de isquemia com 3 horas de reperfusão. (<i>in vivo</i>)	Melhora de 37,5% em relação ao grupo controle positivo.	Melhora de 11% em relação ao grupo controle positivo.
Hamilton <i>et al.</i> , 2003	Treinamento Aeóbio (5 dias, 60 min/dia, 60-70% VO2Máx) associado a dieta com antioxidantes. 20 ou 60 min. de isquemia com 60 ou 120 min. de reperfusão (<i>in vivo</i>)	Melhora de 300% comparando as intervenções ao grupo controle negativo	Melhora de 20% comparando as intervenções ao grupo controle negativo
Koga <i>et al.</i> , 2011	Animais nocaute (KO) para o Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF). 15 ou 30 min. de isquemia com 40 min. de reperfusão (<i>in vivo</i>) para as análises de PDVE. 15 ou 30 min. de isquemia com 4 ou 24 horas de reperfusão para as análises de AI.	Melhora de 10% em relação ao grupo MIF-KO	Melhora de 100% em relação ao grupo MIF (15 min. de isquemia com 4 horas de reperfusão).
Lonborg <i>et al.</i> , 2010	Pós-condicionamento isquêmico de pacientes com infarto agudo do miocárdio com segmento ST elevado. Quatro ciclos de 30 seg. de isquemia com 1 min. de reperfusão.	Melhora de 19% em relação ao grupo controle	-

Vários estudos têm investigado os mecanismos envolvidos no processo de isquemia e reperfusão, na busca de estratégias que possam levar a cardioproteção, e, conseqüentemente, a sobrevivência de um indivíduo vítima de um IAM. A melhora da capacidade antioxidante, do metabolismo energético e da modulação autonômica são alguns exemplos de adaptações que podem levar à cardioproteção (Omar *et al.*, 2012; Powers *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014). Sluijter *et al.* (2014) citam novas estratégias terapêuticas para a cardioproteção como intervenções no sistema imune, em fatores de crescimento, em epigenética e outras vias através do uso de fármacos. Porém, intervenções não medicamentosas podem ser aplicadas facilmente e podem proporcionar adaptações sistêmicas e *in loco* eficazes. Vários trabalhos sugerem o treinamento físico (aeróbio e contra-resistência) e/ou intervenções na dieta (uso de complexos antioxidantes, vitaminas e produtos naturais, como o *Panax ginseng* e a soja) como estratégias para a cardioproteção (Rodrigues *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2003, Karmazyn *et al.*, 2011; Hamilton, 2007).

1.4. O Treinamento Físico e Seus Efeitos na Cardioproteção

Em um mundo onde o sedentarismo ocupa lugar de destaque entre as causas de todas as doenças relacionadas ao estilo de vida, existem cada vez mais evidências científicas que suportam a hipótese de que o treinamento físico físico é necessário para a promoção da saúde e da qualidade de vida. O treinamento físico proporciona a melhora de todas as valências físicas (força, condicionamento aeróbio, equilíbrio, agilidade, flexibilidade), além de benefícios para a saúde mental (Garber *et al.*, 2011), e portanto é essencial para a manutenção de uma vida saudável em humanos.

O treinamento físico também é considerado um tratamento não medicamentoso para muitas doenças cardiovasculares e metabólicas, como a hipertensão arterial (Pescatello *et al.*, 2004), diabetes (Colberg *et al.*, 2010) e a hipercolesterolemia (Manu *et al.*, 2013). Esses efeitos são vistos tanto em trabalhos com humanos quanto com modelo animal.

Com relação a cardioproteção existem fortes evidências que sugerem que o treinamento físico é capaz de melhorar diversos mecanismos que induzem a esse benefício. Rodrigues *et al.* (2014) mostraram que o treinamento físico aeróbio de

intensidade leve a moderada por oito semanas é capaz de promover cardioproteção pela melhora das funções autonômicas e melhora da capacidade cardiorrespiratória. Hamilton *et al.* (2003) mostraram que o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada por cinco dias é capaz de proporcionar cardioproteção pelo aumento da expressão de HSP72, uma proteína que responde à hipóxia e que neste contexto inibe a sinalização que leva a morte celular independente da via das caspases. Soufi *et al.* (2011) sugeriram que doze semanas de treinamento físico contra-resistência são capazes de levar à cardioproteção pela diminuição da área de infarto e do aumento da performance cardíaca. Powers *et al.* (2014) enumeram outras adaptações que o treinamento físico pode gerar para induzir à cardioproteção, como mudança do fluxo glicolítico durante a isquemia/reperfusão, alterações na sinalização promovida por NO^{*}, melhora na performance dos canais de potássio e melhora na capacidade antioxidante. Este último é considerado um dos principais indutores de lesão por injúria de isquemia/reperfusão e um dos mais estudados atualmente.

1.5. O *Ilex paraguariensis* (St. Hill)

A *Ilex paraguariensis*, ou erva mate (MATE), é um vegetal muito utilizado para a elaboração de chá e de bebidas diversas. É encontrado na América do Sul, tendo prevalência na região sul do Brasil, Argentina e Uruguai (Bracesco *et al.*, 2011). O MATE é conhecido por possuir ação antioxidante, sendo rico em polifenóis (Schinella *et al.*, 2000). Filip *et al.* (2001) verificou que o MATE é a erva com maior concentração de flavonóides entre todas as espécies da família *Ilex*, superando o vinho tinto. Outro estudo comparando o MATE com o vinho e outras bebidas consideradas antioxidantes foi feito por Actis-Goretta *et al.* (2002), mostrando que o MATE, assim como as outras bebidas testadas, tem efeito antioxidante dose-dependente.

Alguns efeitos adaptógenos já foram relatados em diversos trabalhos. Dentre eles podemos citar o efeito modulador da oxidação de glicose e do metabolismo lipídico (Silva *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012), anti-inflamatório (Schinella *et al.*, 2014) e modulador de adipogênese (Gosmann *et al.*, 2012).

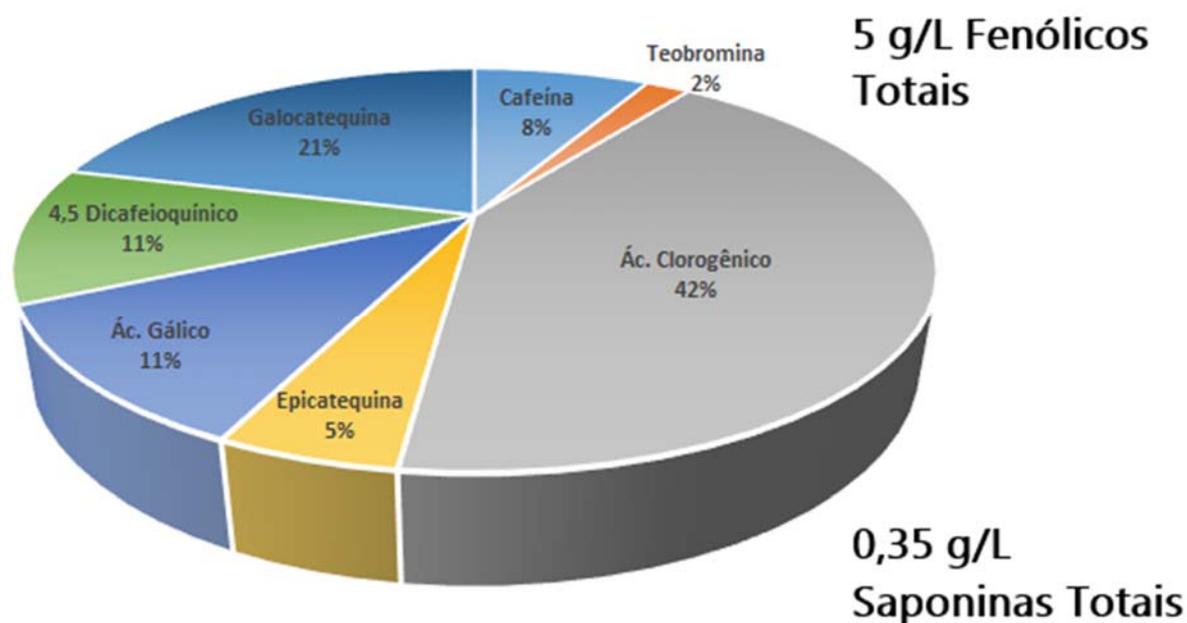


Figura 7 - Figura ilustrativa dos principais compostos do MATE. Adaptado de Bracesco *et al.*, 2011.

Os efeitos adaptógenos do MATE, em sua maioria, estão relacionados a sua capacidade antioxidante devido a presença de polifenóis e flavonoides bem como seus efeitos sobre o metabolismo energético, que pode receber influência tanto dos compostos citados anteriormente quanto das metilxantinas e das saponinas, também presentes na planta (Fig. 7). Gugliucci e Stahl (1995) estudaram pela primeira vez o efeito antioxidante do MATE, mostrando uma diminuição da oxidação de LDL por H₂O₂ *in vitro*. O mesmo efeito foi confirmado *in vivo*, por ingestão oral, pelo mesmo autor, porém a dose utilizada neste trabalho não foi divulgada (Gugliucci, 1996). Bracesco *et al.* (2003) verificou que o MATE é capaz de reduzir o dano em DNA provocado por H₂O₂ em *Saccharomyces cerevisiae*, além de ter visto a mesma proteção contra oxidação de moléculas de LDL, utilizando doses de 50g/L e 200g/L de MATE, respectivamente, preparado por infusão. O efeito protetor contra nitração proteica foi mostrado por Bixby *et al.* (2005), onde o MATE, na dose de 50g/L feito por infusão, foi capaz de inibir a nitração provocada por ONOO^{*} em cultura de células de macrófagos RAW 264.7 e em células mamárias 31EG4. Filip *et al.* (2007) demonstraram que o MATE, em concentrações a partir de 10µg/mL, aumenta a atividade e secreção da enzima peroxidase salivar, grande responsável

pela proteção bucal, em ratos Wistar machos. Lanzetti *et al.* (2008) mostraram que o tratamento oral e retroperitoneal com MATE na dose de 150mg/kg foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica, a migração de macrófagos e neutrófilos e a expressão de TNF- α em pulmões de camundongos fumantes. Milioli *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento retroperitoneal com doses de 250 e 500mg/kg de MATE foi capaz de diminuir os sintomas do mal de Parkinson em camundongos, e relacionaram com o efeito depressor da produção de NO, seguido de uma atividade não-dopaminérgica, pelo aumento da atividade da apomorfina. O efeito do MATE na expressão de enzimas antioxidantes foi caracterizado por Matsumoto *et al.* (2009). Estes autores mostraram que o consumo de 5g de MATE aumentou a capacidade antioxidante total e a expressão gênica das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase, além de diminuir a peroxidação lipídica após sete dias de tratamento. Recentemente, Schinella *et al.* (2014) demonstrou que o MATE, na dose de 250mg/kg, promoveu efeito anti-inflamatório sistêmico e tópico, pela redução da inflamação induzida em orelhas e patas de camundongos. O mecanismo revelado neste estudo foi a redução da atividade da Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) e da Ciclooxygenase-2, mecanismos que são promotores de lesão tecidual em situação de desequilíbrio redox (Kohen e Nyska, 2002).

1.5.1. Os efeitos do MATE na Cardioproteção

Existe somente um trabalho caracterizando o efeito cardioprotetor do MATE (Schinella, *et al.*, 2005). Neste trabalho, foi utilizado coração de ratos *Wistar* isolado perfundido com solução contendo ou não MATE. O grupo de corações perfundidos com solução contendo MATE (30 μ g/mL) obteve melhor performance cardíaca e menor área de infarto que o grupo controle, sugerindo a indução de efeito cardioprotetor. Para determinar um possível mecanismo cardioprotetor os autores submeteram os mesmos corações a perfusão com solução contendo MATE e L-NAME, um inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS). Os corações perfundidos com L-NAME tiveram a performance cardíaca diminuída e a área de infarto aumentada em comparação aos corações perfundidos somente com MATE. Estes resultados sugerem que o mecanismo responsável pela cardioproteção está associado ao aumento da atividade da NOS.

2. Problema do Estudo

O aumento da capacidade do músculo cardíaco responder aos quadros de isquemia e reperfusão, através do aumento da capacidade antioxidante é de fundamental importância para a sobrevivência após um IAM (Powers *et al.*, 2014).

A literatura mostra que a atividade física é capaz de melhorar a capacidade antioxidante tanto de humanos quanto de animais treinados (Powers, Sollanek, *et al.*, 2014). Em paralelo a atividade física, manipulações dietéticas, como por exemplo a suplementação com vitamina C, também vem sendo associadas a proteção antioxidante (Rodrigo *et al.*, 2013).

O MATE possui em sua composição várias moléculas que apresentam ação antioxidante (Schinella *et al.*, 2000). Devido a suas propriedades antioxidantes já descritas na literatura o MATE poderia funcionar como um importante coadjuvante no processo de cardioproteção. Schinella *et al.* (2005) demonstraram o efeito do MATE na redução da área de lesão cardíaca após infarto, contudo estes autores não avaliaram o uso do MATE como bebida e sim através de perfusão de corações isolados. O consumo do MATE nunca foi avaliado com intuito de verificar o efeito cardioprotetor desta bebida. Tendo em vista que a administração oral pode alterar a estrutura e a biodisponibilidade das moléculas que compõem esta bebida, é de extrema importância avaliar se os efeitos cardioprotetores sugeridos por Schinella *et al.* (2005) serão observados através do consumo. Em paralelo a isso, a associação do MATE com o treinamento físico, que também apresenta efeito cardioprotetor, não foi avaliada. Portanto, há uma lacuna na literatura no que concerne ao uso do mate como bebida visando processos de cardioproteção, bem como a associação do mesmo com o treinamento físico.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é verificar o efeito cardioprotetor da associação de um período curto de treinamento físico aeróbio associado ao consumo de MATE.

3.2. Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- a) Avaliar se o consumo de MATE associado ou não ao treinamento físico aeróbio é capaz de melhorar a performance cardíaca e a área de infarto após injúria de isquemia/reperfusão;
- b) Mensurar se a capacidade antioxidante sistêmica e cardíaca é alterada pelo consumo de MATE associado ou não ao treinamento físico aeróbio
- c) Avaliar os marcadores de estresse oxidativo a nível sistêmico e cardíaco nos diferentes grupos experimentais;
- d) Determinar se o consumo de MATE associado ou não ao treinamento físico aeróbio é capaz de alterar a concentração plasmática de marcadores de lesão celular;
- e) Avaliar se o consumo de MATE associado ou não ao treinamento físico aeróbio modula a concentração plasmática de nitrito e a atividade da NADPH Oxidase cardíaca.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados 63 ratos Wistar machos com dois meses de idade, pesando 250 ± 50 gramas. Foram utilizados 32 animais para os experimentos de isquemia/reperfusão e 31 animais para os demais experimentos. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (21 °C) com ciclo claro/escuro de 12 horas invertido. A ração (dieta padrão – ICR, Brasil) e a água foram mantidos *ad libitum* durante todo o experimento. Todos os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética de Trabalho com Animais do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob o número EEFD004.

4.2. Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos: sedentário controle (SC – n=17), sedentário + suplementação com MATE (SM – n=15), treinamento controle (EC – n=19) e treinamento + suplementação com MATE (EM – n=16). Os animais dos grupos SC e EC foram tratados oralmente via gavagem com veículo (água, 1 mL), enquanto os animais dos grupos SM e EM receberam a dose de 1 g/kg do peso corporal de MATE, diluídos em 1 mL de água, tendo sua dose ajustada a cada dois dias pelo peso do animal. O MATE foi preparado por diluição simples, utilizando o pó solúvel liofilizado MATE LEÃO (Leão, Curitiba, Brasil). A dose de 1g/kg de MATE é o equivalente a 1,5L de MATE (Miranda *et al.*, 2008). Antes do período de treinamento (natação) todos os animais foram adaptados ao meio aquático durante 3 dias consecutivos, 1 min por dia, sem sobrecarga. Os animais dos grupos SC e SM mantiveram o tempo de nado, sem sobrecarga, do período de adaptação ao longo do período de treinamento, enquanto os animais dos grupos EC e EM foram submetidos a um treinamento aeróbio de intensidade baixa/moderada, com 5% do peso corporal acoplado a parte proximal da cauda, por 30 minutos. A intervenção teve duração de sete dias.

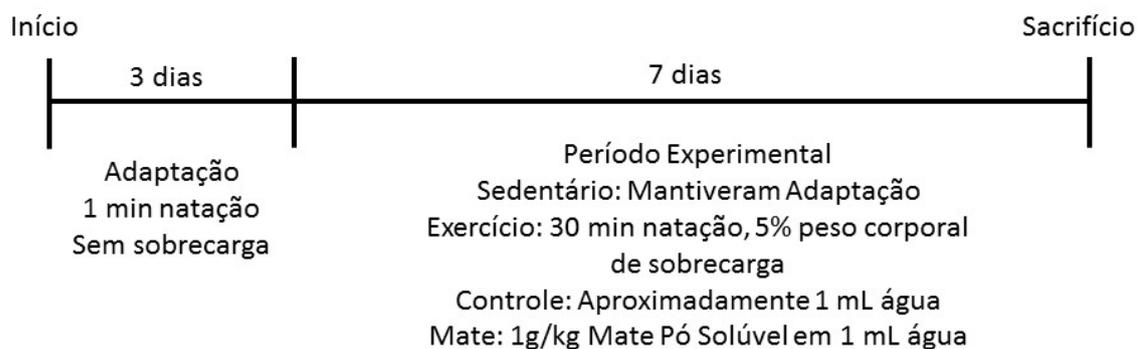


Figura 8 - Esquema representativo da linha experimental adotada neste estudo.

4.3. Sacrifício

Os animais foram sacrificados por decaptação 24 h após o último dia de treinamento. No momento do sacrifício cada grupo foi dividido em dois subgrupos: controle (NORM) e injúria por isquemia/reperfusão (I/R). O sangue foi coletado em tubos com heparina e imediatamente colocados em gelo para tratamento e análise posterior. Os corações foram retirados imediatamente após o sacrifício e utilizados frescos para o experimento de I/R.

4.4. Experimento de Injúria por I/R

Os corações dos animais do grupo I/R foram retirados rapidamente e colocados em um recipiente contendo solução de Krebs Henseleit modificada (118mM NaCl, 4.7mM KCl, 25mM NaHCO₃, 1.2mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄, 11mM glicose, e 1.25mM CaCl₂, pH 7.4 aerada com gás contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂). Os corações foram canulados pela artéria aorta em um aparato de Langendorff com fluxo constante (10 mL.min⁻¹ a 37 ± 0.5 °C). Um balão de latex foi colocado dentro do ventrículo esquerdo através da valva mitral e a pressão foi mantida a 10 mm Hg, como descrito anteriormente por Chaves *et al.* (2006). Os corações foram perfundidos com solução de Krebs por 30 min para estabilização da pressão e do ritmo. Após este período a perfusão foi parada por 30 min, induzindo a isquemia por um período de 30 min. Após o período de isquemia os corações foram novamente perfundidos por 60 min caracterizando o período de reperfusão. A aquisição e análise da pressão desenvolvida foi feita através do software *PowerLab*

Chart 4 for Windows (ADInstruments, EUA), e seus valores foram expressos como percentual do período controle.

4.5. Avaliação da Área de Infarto

Após o experimento de injúria por I/R, a área de infarto foi determinada como o descrito anteriormente por Chaves *et al.* (2006). Os átrios foram descartados e os ventrículos foram fatiados transversalmente em pedaços de aproximadamente 1,5 mm do ápice até a base e então encubados em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 1% (peso:vol) trifeniltetrazolio clorito (TTC) por 4 min a 37°C. Após a incubação as fatias foram colocadas em tampão fosfato 100 mM contendo formaldeído a 10% (vol/vol) por 24 horas para aumentar o contraste entre o tecido viável (marcado) e necrosado (não marcado). Após esse período as fatias foram secadas e colocadas entre dois *slides* de vidro e suas imagens foram adquiridas digitalmente em scanner. A área de infarto foi determinada por planimetria, utilizando o software ImageJ (Nacional Institute of Health, EUA, versão 1.48). Os valores foram expressos em percentual da área total.

4.6. Preparação das Amostras

O sangue foi centrifugado (1.800 x g, 15 min, 4 °C). O sobrenadante (plasma) foi coletado, aliquoteado e armazenado em freezer -80 °C para análises posteriores. O *pellet* foi ressuspensão com solução salina 0.9% (vol:vol) gelada e centrifugado (1.800 x g, 15min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* novamente ressuspensão com solução salina e centrifugado. Este procedimento foi repetido três vezes para obtenção de eritrócitos. Os eritrócitos foram aliquoteados e armazenado a -80 °C para análises posteriores.

Para a preparação do tecido cardíaco foi utilizado o protocolo descrito por Chaves *et al.* (2006), com modificações. Logo após o sacrifício o coração foi retirado e lavado com solução salina 0,9%. Após a lavagem os átrios foram desprezados e os ventrículos aliquoteados em tubos eppendorf e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. Após o congelamento as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

Para a preparação do homogenato de tecido cardíaco foram utilizado 200 mg de tecido, que receberam 1,8mL de solução tampão (10mM Tris-HCL pH 7,4 em

solução salina 0,9%, 1 mM PMSF e 0,5 µg/mL de aprotinina). O tecido foi processado e centrifugado a 20.000 x g. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer -80 °C para análises posteriores.

4.7. Análise dos Biomarcadores de Lesão Muscular e Hepática

As enzimas TGO, TGP, Gama-GT, Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) foram mensuradas no plasma, utilizando kit comercial Doles e Bioclin, seguindo especificações do fabricante.

4.8. Análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT)

O protocolo utilizado para a análise da CAT foi o de inibição da auto-oxidação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazi (DPPH) (Janaszewska & Bartosz, 2002). Para a análise de plasma, 20µL da amostra sofreu desproteíntização por acetonitrila 100% (v/v), segundo o método proposto por Chrzczanowicz *et al.* (2008). A amostra foi centrifugada (1800 x g, 5 min, 4°C) e então 20µL sobrenadante foi diluído em 380 µL de tampão PBS (10 mM, pH 7,4). Em seguida foram adicionados 400 µL de solução 0,1 mM de DPPH diluídos em metanol e o volume total foi encubado por 30 minutos a temperatura ambiente e em privação de luz. A leitura das amostras foi realizada em comprimento de onda de 520 nm e o seu cálculo foi baseado em curva-padrão de DPPH feita somente com tampão PBS. Os resultados são mostrados em percentual de inibição da auto-oxidação do DPPH.

4.9. Análise dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo

4.9.1. Razão GSH/GSSG

O protocolo utilizado para mensurar as concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH) e Glutathiona Oxidada (GSSG) foi o descrito por Rahman *et al.* (2006). Para as análises de plasma (430µL) e homogenato de tecido cardíaco (250µL) foram adicionados a 70 µL de Ácido Sulfosalicílico (0,23 M) e 20µL de Triton-X 100. As amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos a 4°C e depois o sobrenadante foi retirado, aliqotado e armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

Para realizar as medidas de GSH, 1,4mL de solução tampão Fosfato de Potássio 100mM e EDTA 5mM foi adicionado a 200µl de plasma ou homogenato de

tecido cardíaco. Em seguida, adiciona-se 120µl de DTNB e 120µl de Glutathione Redutase (GR) e a mistura foi homogeneizada por trinta segundos. Após a homogeneização foi adicionado 120µl de β -NADPH (0,8 mM) e, então, foi realizada a leitura por 120 segundos, com intervalo de trinta segundos. O comprimento de onda utilizado para leitura foi de 420nm. A concentração foi expressa em μ M (plasma) ou μ M/mg proteína (tecido cardíaco) a partir da variação da absorbância gerada pela formação de 2-nitro-5-tiobenzóico. A concentração final foi obtida através de fórmula gerada pela regressão linear da curva padrão de GSH.

Para o ensaio de Glutathione Reduzida (GSSG) 2µl de vinilpiridina foram adicionados a 200µl de plasma ou tecido cardíaco por uma hora, em ambiente escuro. Após este tempo foi adicionado 12µl de trietanolamina para ajustar o pH. Os passos seguintes foram os mesmos da dosagem de GSH.

4.9.2. Carbonilação de Proteínas

A aferição do nível de carbonilação de proteínas foi realizada segundo o método proposto por Margolis *et al.* (2007). O método consiste na avaliação da formação de hidrazonas, através da reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com o radical carbonil, que é adicionado na estrutura química das proteínas quando sofrem o ataque das EROs.

A duas alíquotas de 50µL de amostra foi adicionado 50µL de TCA 20% e a mistura incubada por 15 min em gelo. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado na primeira alíquota 500µL HCL 2,5M e na segunda alíquota 500µL de DNPH 10 mM. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (20-24°C) por uma hora, sendo agitada a cada 15 minutos. Após a incubação uma nova centrifugação foi realizada, a 15000 x g por 5 minutos a 4°C. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e então foi adicionado 1mL TCA 10%. As amostras foram mais uma vez agitadas e outra centrifugação foi feita (15000 x g, 5 min, 4°C). Após esta centrifugação o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1mL de solução contendo Acetato de Etila e Etanol (1:1, v:v), agitado e centrifugado (15000 x g, 5 minutos, 4°C). Este processo se repetiu por três vezes. Ao fim da última lavagem o precipitado foi ressuspenso em 1mL Uréia (5 M pH 2,3) e incubado a 37°C por 15 min e centrifugado (15000 x g, 3 min, 4°C). As leituras foram

realizadas no comprimento de onda de 375 nm. Os dados foram expressos em nMol/mg de proteína.

4.9.3. Peroxidação Lipídica

Para as análises de peroxidação lipídica em plasma e em tecido cardíaco foi utilizado o protocolo descrito por Feldman (2012). Para 50µL de amostra foram utilizados 150µL de solução fosfato 100 mM, pH 7,4. Após esta diluição foi adicionado as amostras 200µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% e então esta mistura foi incubada por 15 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 2200 x g por 15 minutos. Após a centrifugação 300µL do sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 300µL de solução de ácido tiobarbitúrico (67 g em 1 mL DMSO e 9 mL de água). Então as amostras foram incubadas em banho maria por duas horas a 95°C e em seguida resfriadas a 4°C por 15 minutos. Uma alíquota de 150µL de amostra foi retirada para leitura em placa de Elisa no comprimento de onda de 532 nm. O cálculo para concentração foi feito segundo a curva padrão, feita com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) 500mM (4,167 mL em 1 mL de etanol absoluto e 49 mL de água). Os valores são apresentados em nM de TBARS (plasma) e nM/mg proteína (tecido cardíaco).

4.9.4. Ácido Úrico

Para a dosagem de ácido úrico em plasma e tecido cardíaco, importante metabólito da via da xantina oxidase (XO), foi utilizado o kit Bioclin, seguindo as especificações do fabricante.

4.10. Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes

4.10.1 Catalase

A atividade da enzima Catalase foi mensurada em eritrócito, conforme o método proposto por Aebi (1984). O eritrócito foi diluído em solução salina 0.9% (1:1, v/v) e 10 µL desse preparado foi analisado em 1 mL de solução contendo 50 mM PBS, pH 7,0 na ausência ou presença de 30 mM H₂O₂. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos. A absorbância das amostras e do branco foram registrados a cada 15 segundos. Os resultados foram expressos em k/mg proteína para o tecido cardíaco e em k/mg Hb para eritrócito.

4.10.2 . Superóxido Dismutase (SOD)

Para a mensuração da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi utilizado o método proposto por Misra e Fridovich (1972), que consiste em aferir a inibição da auto-oxidação da adrenalina em adenocromo pela atividade da SOD. A oxidação de adrenalina gera adenocromo que é detectado a 480 nm. 1 U de SOD é definida como a concentração capaz de inibir 50% da oxidação de adrenalina.

Para isso foram utilizados 10µL de amostra que foi diluído em 970µL de tampão glicina 50mM, pH 10,2. Para iniciar a reação foram acrescentados 10µL de catalase 0,0024 g/mL e 17µL de adrenalina 60mM (com adição de 15µL de HCl 12M para cada 1mL de solução). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 480nm por 180 segundos, com o registro de leitura a cada 10 segundos, e o cálculo foi feito com base na leitura da auto-oxidação da adrenalina sem a amostra (branco). Os resultados foram expressos em U/g Hb para eritrócito e U/mg proteína para o tecido cardíaco.

4.11. Análise da Atividade da NADPH Oxidase e Óxido Nítrico

A concentração plasmática de Óxido Nítrico foi mensurada indiretamente através da dosagem de nitrito, um dos seus principais metabólitos. A mensuração de nitrito foi realizada utilizando o kit Griess Reagent Promega (EUA) seguindo especificações do fabricante.

A atividade da NADPH Oxidase foi mensurada pela geração de H₂O₂ no homogenato de tecido cardíaco, retirado durante experimento de isquemia/reperfusão, com 30 e 60 minutos de reperfusão, segundo o método descrito por Fortunato *et al.* (2013). O músculo cardíaco (250 mg) foi homogeneizado em 2 mL de tampão de homogeneização (50 mM PBS, pH 7,2, contendo 0,25 M Sacarose, 0,5 mM Ditioneitol (DTT), 1 mM EGTA, 5 mg/ml aprotinina e 34,8 mg/mL PMSF). O homogenato foi feito de maneira manual, em potter de vidro, com 10 homogeneizações com pistão de teflon mantido em recipiente a 4°C. Após homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (100.000 x g, 35 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 0,5 mL de solução de homogeneização e armazenado a -80°C até o momento da análise.

Para a dosagem da atividade enzimática, 10 ug/mL de proteína do homogenato foi incubada em 150 mM PBS, pH 7.2 contendo SOD (100 U/mL; Sigma-Aldrich, EUA), HRP (0,5 U/mL; Roche, EUA), Amplex Red (50 IM; Molecular Probes, EUA), 1 mM EGTA e 0,1 M b-NADPH (Sigma-Aldrich, EUA), este último sendo colocado no meio imediatamente antes da leitura. A mensuração foi realizada por fluorescência em um leitor de placas Elisa (Victor X4, PerkinElmer), a 30°C, usando excitação de 530 nm e emissão de 595 nm. Os resultados foram expressos em nmol H₂O₂/mg proteína/hora.

4.12. Dosagem de Proteína e Hemoglobina

A dosagem de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976). A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo kit comercial Bioclin, seguindo orientações do fabricante.

4.13. Análise Estatística

Os dados são descritos no texto como média \pm erro padrão da média. Para todas as análises estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni para verificar as diferenças entre os grupos. As análises foram feitas através do programa GraphPad Prism, versão 6.01, para Windows.

5. Resultados

5.1. Pressão Desenvolvida e Área de Infarto

Pode ser observado na figura 9 que após 30 min de isquemia a pressão desenvolvida (PD) na reperfusão foi significativamente maior no grupo SM em comparação com o grupo a SC. Este efeito foi observado a partir dos 15 minutos de reperfusão ($p < 0,05$). O grupo EC desenvolveu uma pressão maior a partir dos 25 minutos de reperfusão quando comparado ao grupo SC. A partir de 30 minutos de reperfusão, a PD do grupo EC foi significativamente maior que SC e EM. ($p < 0,01$). A associação do treinamento físico aeróbio com a ingestão de MATE em sete dias reverteu os efeitos observados na PD quando os tratamentos foram realizados separadamente.

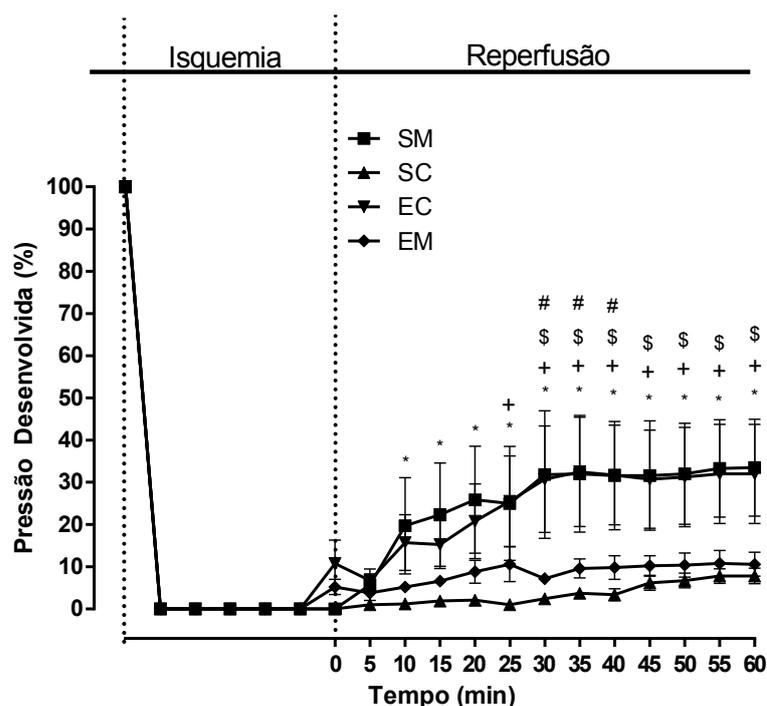


Figura 9 - Pressão Desenvolvida (PD) durante experimento de isquemia/reperfusão global. Dados exibidos em média \pm erro padrão da média. * SM vs. SC; + EC vs. SC; \$ SM vs. EM; # EC vs. EM. SM n=6; SC n=4; EC n=4; EM n=5. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. $p < 0,05$.

Visando avaliar se os resultados obtidos na PD se refletiam na área de lesão do músculo cardíaco após 60 min de reperfusão, logo após a injúria por isquemia/reperfusão os corações sofreram análise planimétrica e a área de infarto

foi quantificada. Pode ser observado na figura 10 que a área de infarto foi significativamente menor nos grupos SM e EC em comparação com os grupos SC e EM. Estes dados corroboram com os dados de pressão desenvolvida.

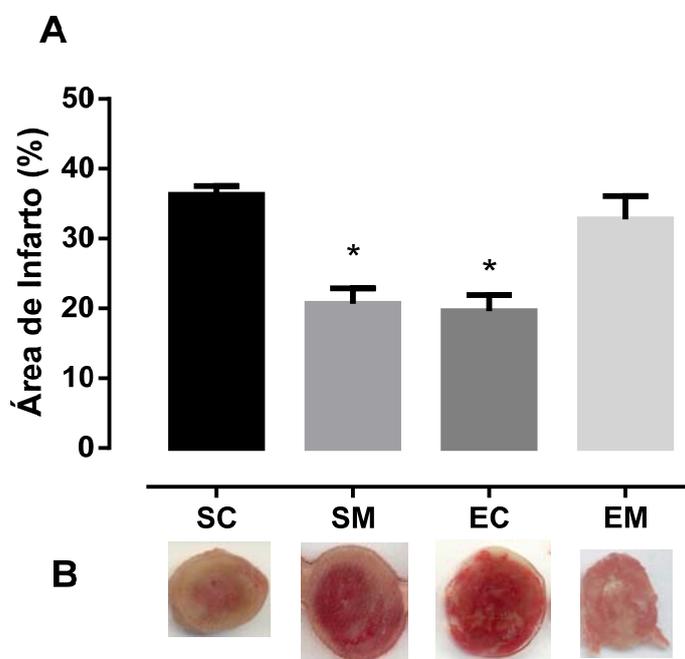


Figura 10 - Área de Infarto analisada após isquemia/reperfusão (A) e marcação da área viável com TTC (B). Dados exibidos em média \pm erro padrão. * SM vs SC, EC vs SC, SM vs EM e EC vs. EM. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. $p < 0,05$. SC: n=4; SM: n=6; EC: n=6; EM: n=4.

5.2. Atividade da NADPH Oxidase

Uma possível explicação para melhora das variáveis cardíacas é a redução do estresse oxidativo. Uma das enzimas citossólicas responsáveis por aumentar a produção de superóxido é a enzima NADPH oxidase. A atividade desta enzima só foi avaliada nos grupos SC e SM. Como mostrado na figura 11 não houve diferença significativa na atividade da NADPH Oxidase em nenhum dos tempos de reperfusão analisados.

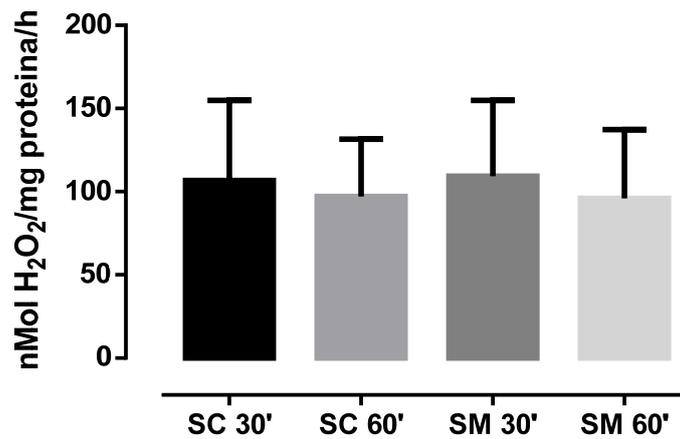


Figura 11 - Atividade da NADPH Oxidase em tecido cardíaco. 30 e 60 minutos representam o tempo de reperfusão do tecido cardíaco nos grupos controle sedentários (SC) e MATE (SM). Dados exibidos em média \pm erro padrão. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. n=4 para cada grupo.

5.3. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Um dos mecanismos de cardioproteção está relacionado a redução do estresse oxidativo. Visando verificar se a melhora observada nas figuras 9 e 10 poderiam estar relacionadas a um aumento da capacidade antioxidante sistêmica, avaliamos a CAT plasmática. Sistemicamente não observamos diferença significativa na CAT entre os diferentes grupos experimentais (Fig. 12).

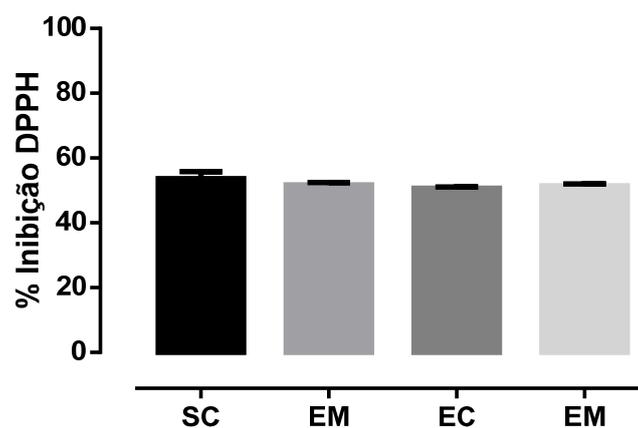


Figura 12 - Capacidade Antioxidante Total plasmática mensurada pela inibição da auto-oxidação do DPPH. Dados mostrados como média \pm erro padrão. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. SC: n=5; SM: n=5; EC: n=8; EM: n=9.

5.4. Concentração Plasmática de Óxido Nítrico

Tendo em vista que a produção de óxido nítrico vem sendo associada a uma possível cardioproteção avaliamos a produção desta molécula a nível sistêmico. Não observamos diferença significativa na concentração plasmática de nitrito entre os grupos (Fig. 13).

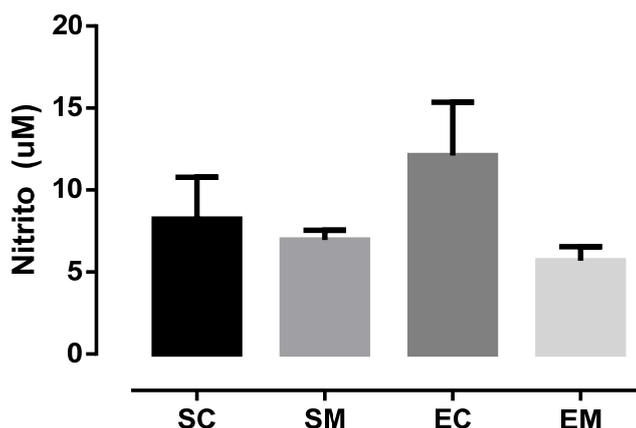


Figura 13 - Dosagem de Nitrito plasmático. Dados exibidos em média \pm erro padrão. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. SC: n=6; SM: n=5; EC: n=8; EM: n=8.

5.5. Ácido Úrico

O Ácido Úrico (AU), principal metabólito da via xantina oxidase (XO) que também é uma via importante na produção de ânion superóxido no citoplasma, foi analisado para verificar, de maneira indireta, se as intervenções foram capazes de modular a XO. Como pode ser visto na figura 14, não houve diferença significativa na concentração de ácido úrico plasmático entre os grupos.

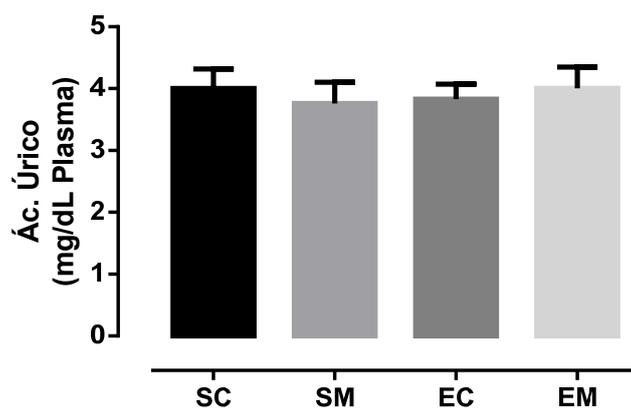


Figura 14 - Dosagem de Ácido Úrico plasmático. Dados exibidos em média \pm erro padrão. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. SC: n=7; SM: n=7; EC: n=9; EM: n=8.

5.6. Peroxidação Lipídica e Carbonilação de Proteínas

Com o intuito de avaliar se os tratamentos com MATE e treinamento físico aeróbio alteraram o estado redox sistêmico, avaliamos a peroxidação lipídica. Como pode ser observado, não houve alteração significativa na peroxidação lipídica nos grupos analisados, tanto no plasma (Fig. 15A) quanto no tecido cardíaco (Fig. 15B). Contudo, vale ressaltar que há uma tendência ao aumento de peroxidação lipídica no grupo SM quando comparado ao grupo SC no tecido cardíaco ($p=0,07$).

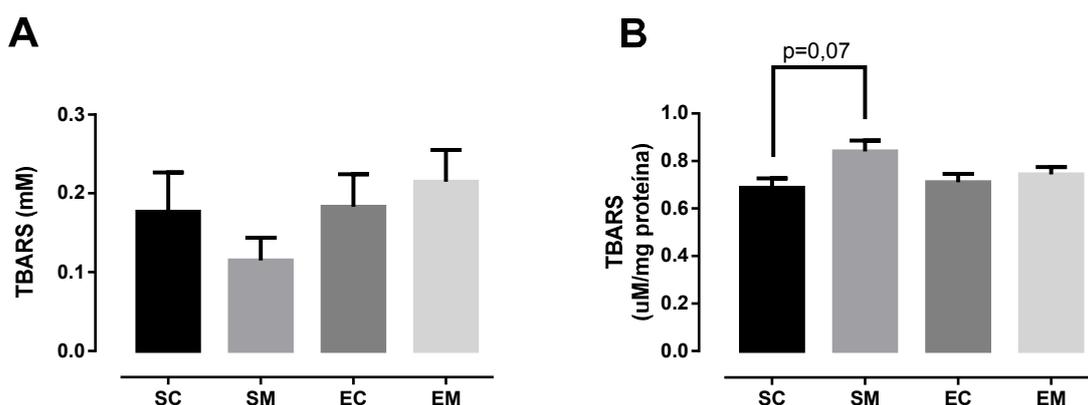


Figura 15 - Peroxidação lipídica avaliada no plasma **(A)** e no tecido cardíaco **(B)**, através de mensuração dos compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Dados exibidos em média \pm erro padrão. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. SC: n=6; SM: n=8; EC: n=9; EM: n=7 para análises em plasma. SC: n=6; SM: n=7; EC: n=7; EM: n=7 para análises em tecido cardíaco.

Com relação a carbonilação de proteínas, no plasma o grupo EM apresentou um aumento significativo em relação aos grupos SM e EC (Fig. 16A). Com relação ao grupo SC, o grupo EM não apresentou diferença estatística. Contudo, há uma tendência no aumento de proteína carbonilada neste grupo em relação ao grupo SC ($P=0,052$). Este dado sugere que a nível sistêmico a associação do treinamento físico aeróbio com o consumo de MATE aumenta a carbonilação de proteínas. Já no tecido cardíaco, a carbonilação de proteínas se mostrou aumentada no grupo SM em relação ao grupo EM (Fig. 16B). Este dado sugere que no tecido cardíaco o consumo de MATE aumenta a dano oxidativo nos animais sedentário e o treinamento aeróbio se contrapõem a este efeito do MATE.

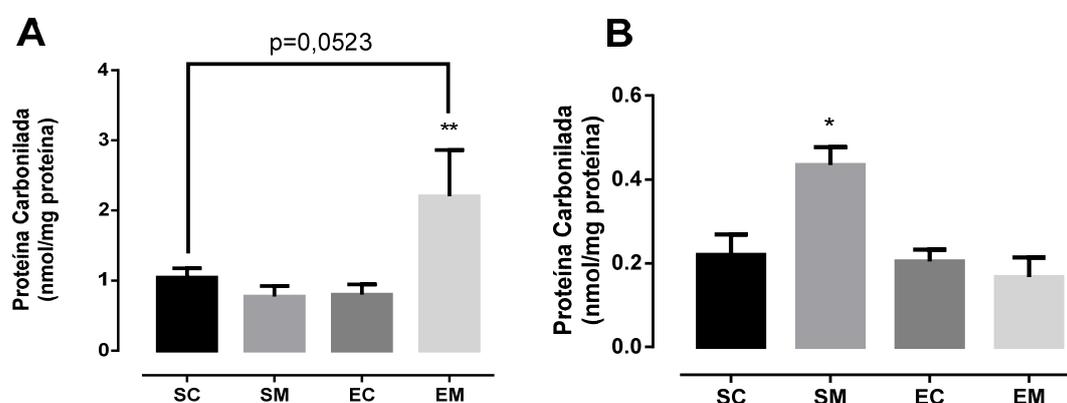


Figura 16- Carbonilação de Proteínas analisada em plasma **(A)** e no tecido cardíaco **(B)**. Dados exibidos em média \pm erro padrão. * SM vc EM; ** EM vs SM e EC. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. $p < 0,05$. SC: n=6; SM: n=6; EC: n=8; EM: n=4 para análises em plasma. SC: n=6; SM: n=7; EC: n=7; EM: n=7 para análises em tecido cardíaco.

5.7. Equilíbrio Redox

A razão GSH/GSSG é utilizada como um padrão de equilíbrio redox. Tendo em vista que o MATE possui moléculas antioxidantes e o treinamento físico aeróbio promove aumento das concentrações de GSH em diferentes tecidos, fomos avaliar se o consumo desta bebida poderia alterar a razão GSH/GSSG.

Tanto no plasma (Fig 14A e B) quanto no tecido cardíaco (Fig. 14D e E) a concentração de GSH e GSSH não foi significativamente alterada entre os diferentes grupos experimentais. A razão GSH/GSSG, que determina o equilíbrio redox, não foi alterada a nível sistêmico (Fig. 14C). Porém, no tecido cardíaco houve um aumento

significativo na razão GSH/GSSG no grupo SM em comparação ao grupo EC. Este dado sugere que o consumo de MATE por sete dias promoveu uma melhora do equilíbrio redox do músculo cardíaco.

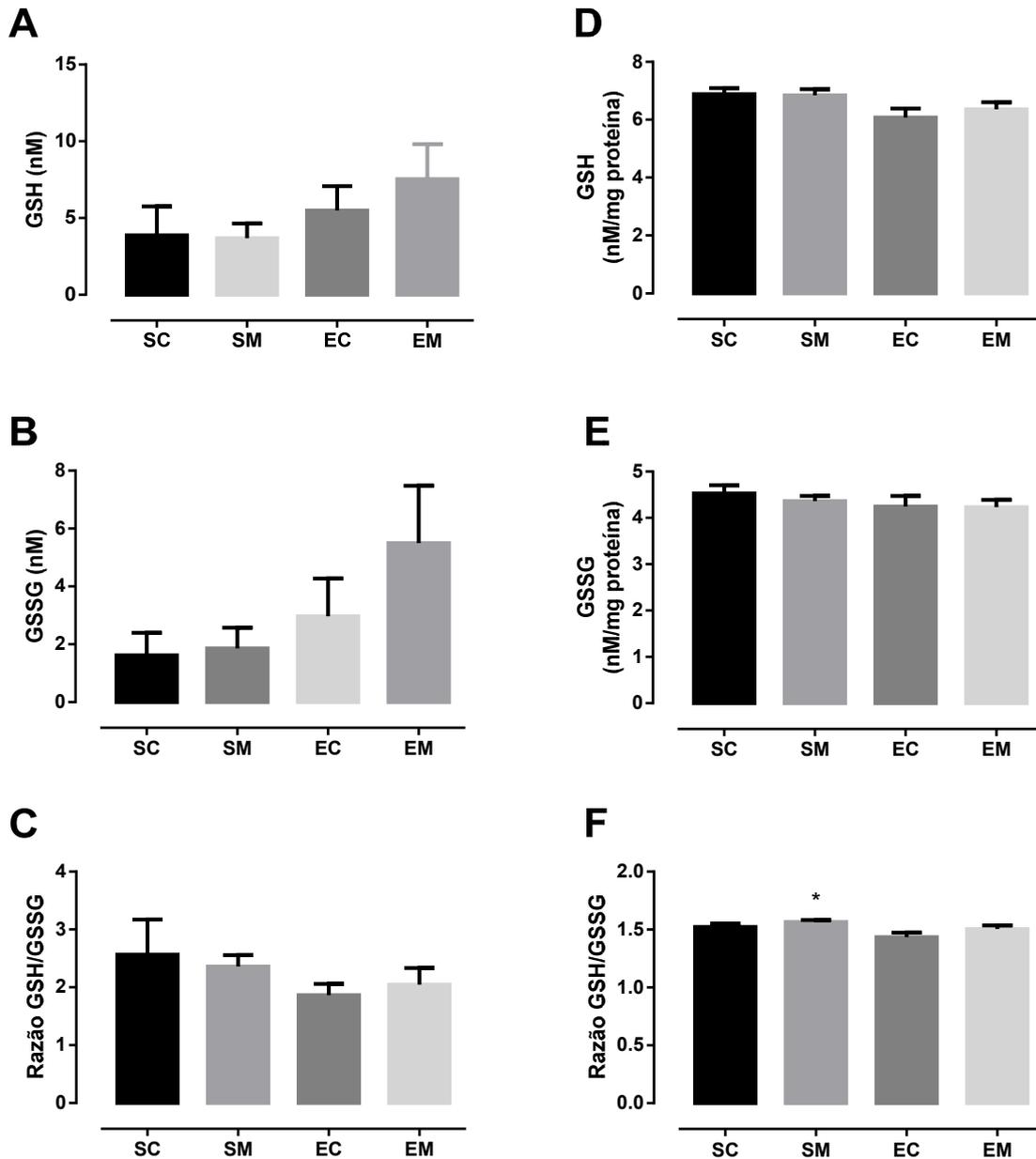


Figura 17 – Concentrações de GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG no plasma (**A, B e C**) e no tecido cardíaco (**D, E e F**), respectivamente. Dados mostrados como média ± erro padrão. * SM vs. EC. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com post-hoc de Bonferroni. SC: n=6; SM: n=7; EC: n=9; EM: n=8 para análises em plasma. SC: n=6; SM: n=7; EC: n=7; EM: n=7 para análises em tecido cardíaco.

5.8. Atividade das Enzimas Antioxidantes

A atividade da catalase foi avaliada no eritrócito e no tecido cardíaco dos diferentes grupos experimentais. Tanto em eritrócitos (Fig. 18A) quanto no músculo cardíaco (Fig. 18B) não observamos alterações significativas na atividade da catalase nos diferentes grupos experimentais. Contudo, vale ressaltar que houve uma tendência a um aumento significativo da atividade desta enzima no grupo EC em comparação ao grupo EM ($p=0,067$) nos eritrócitos (Fig. 18A). Este dado aponta para uma possível adaptação sistêmica da atividade da catalase em resposta ao treinamento físico aeróbio, que é perdida quando o animal ingere MATE.

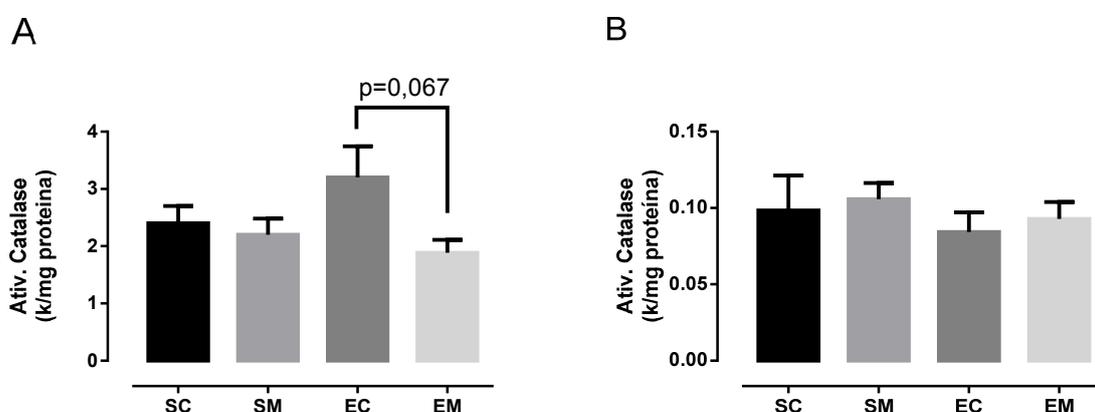


Figura 18 - Atividade da Catalase em eritrócito (**A**) e no tecido cardíaco (**B**). Dados exibidos em média \pm erro padrão. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. $p < 0,05$. SC: $n=6$; SM: $n=6$; EC: $n=7$; EM: $n=7$ para análises em eritrócito. SC: $n=6$; SM: $n=7$; EC: $n=7$; EM: $n=7$ para análises em tecido cardíaco.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) também foi avaliada. Em eritrócito o grupo SC teve atividade da SOD menor em relação aos outros grupos (Fig 19A), enquanto no tecido cardíaco o grupo EC teve a atividade da SOD aumentada em relação aos grupos SC e SM (Fig. 19B). Estes dados indicam que a nível sistêmico, em sete dias, tanto o treinamento físico aeróbio quanto o MATE são capazes de modular a atividade da SOD, sem que um tratamento interfira no outro. Enquanto que, no tecido cardíaco, o MATE inibiu o aumento da atividade enzimática promovida pelo treinamento físico aeróbio.

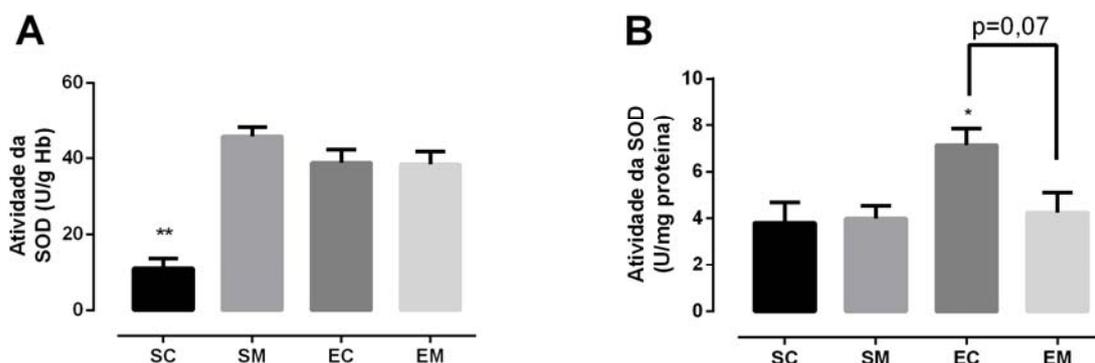


Figura 19 - Atividade da SOD analisada em eritrócito **(A)** e no tecido cardíaco **(B)**. Dados exibidos em média \pm erro padrão da média. * EC vs. SC e EC vs. SM; ** SC vs SM, EC e EM. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. $p < 0,05$. SC: n=6; SM: n=6; EC: n=7; EM: n=7 para análises em eritrócito. SC: n=6; SM: n=7; EC: n=7; EM: n=7 para análises em tecido cardíaco.

5.9. Biomarcadores de Lesão Muscular e Hepática

As modificações sistêmicas de marcadores de estresse oxidativo nem sempre representam alterações teciduais. Tendo em vista este conceito as concentrações de biomarcadores de lesão tecidual foram analisadas.

Pode ser observado na tabela 3 que o grupo sedentário tratado com MATE (SM) teve uma concentração de CK plasmática significativamente menor em comparação com o grupo treinado com consumo de MATE (EM). Este resultado sugere que o aumento de CK no grupo EM se deve ao treinamento físico aeróbio e não ao consumo de MATE. Com relação a concentração plasmática de LDH não houve diferença significativa entre os grupos analisados

Não foi observado diferença significativa nas concentrações plasmáticas de TGO e TGP entre os grupos experimentais (Tabela 3). Contudo, concentração plasmática de Gama-Glutamil Transferase (GGT), um importante marcador de lesão hepática, se mostrou reduzida no grupo EM em relação ao grupo EC. Este dado sugere que o mate promoveu uma hepatoproteção, reduzindo assim o extravasamento de GGT para o plasma.

Tabela 2 – Biomarcadores de Lesão Celular.

	CK (U/L)	LDH (U/L)	TGO (U/mL)	TGP (U/mL)	GGT (U/L)
SC	1028 ± 238,4; n=7	193,2 ± 26,79; n=6	3,15 ± 0,15; n=7	2,68 ± 0,19 n=6	8,288 ± 2,354; n=6
SM	448,5± 157,5; n=7*	232,9 ± 25,8; n=6	3,02 ± 0,22; n=7	2,45 ± 0,65; n=6	10,72 ± 1,5; n=7
EC	1243 ± 147,4; n=9	225,8 ± 16,77; n=9	3,8 ± 0,51; n=9	2,52 ± 0,31; n=8	13,54 ± 1,31; n=9
EM	1531 ± 334,7; n=7	270,5 ± 22,04; n=8	3,35 ± 0,39; n=7	2,68 ± 0,45; n=8	6,18 ± 1,24; n=7 \$
p	< 0,05	-	-	-	< 0,05

Dados exibidos como média ± erro padrão. * SM vs EM, # SM vs SC, \$ EM vs EC. A comparação foi realizada por ANOVA *two-way*, com *post-hoc* de Bonferroni. p < 0,05.

6. Discussão

Algumas das características morfológicas e funcionais que descrevem a cardioproteção são a área de infarto e a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), respectivamente. As duas análises foram avaliadas após a injúria por isquemia e reperfusão (I/R) e, nesse estudo, verificou-se que houve uma maior manutenção da função cardíaca durante a reperfusão através do consumo do MATE e da prática do treinamento aeróbio de intensidade baixa/moderada por sete dias. Nossos dados também mostram que a associação do com o consumo de MATE promove a perda da cardioproteção gerada pelas intervenções em separado. Com relação a verificação da área de infarto, houve uma diminuição promovida pelo consumo do MATE e pelo treinamento aeróbio. Quando o treinamento aeróbio foi associado ao consumo do MATE não houve alterações na área de infarto, corroborando com os dados de função cardíaca.

Os resultados deste trabalho relacionados ao consumo de mate corroboram com os que foram encontrados por Schinella *et al.* (2005), porém, também pela primeira vez, foi testado a eficácia do consumo de MATE na cardioproteção. Kuible & Haass (1996) classifica a cardioproteção de duas formas: adaptação fisiológica e terapêutica. Ao verificar que o consumo de MATE pode levar a cardioproteção, pode-se então sugerir que esta pode ser uma abordagem terapêutica na prevenção da injúria por isquemia/reperfusão. Os resultados relacionados ao treinamento aeróbio também estão alinhados com a literatura. Rodrigues *et al.* (2014) verificaram a cardioproteção induzida pelo treinamento físico aeróbio em um protocolo de oito dias de treinamento aeróbio. Nesse trabalho foi sugerido que o treinamento aeróbio por oito dias leva a uma melhora do sistema autonômico, justificando a cardioproteção após infarto agudo do miocárdio (IAM) promovido pela oclusão da artéria coronária esquerda.

Uma das principais adaptações que podem levar a cardioproteção é a melhora da responsividade do sistema antioxidante a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Diversos trabalho tem mostrado que o treinamento aeróbio é capaz de modular os mecanismos de defesa antioxidante e os de produção de EROs e NROs e, desta forma, promover cardioproteção. Powers *et*

al. (1998), mostraram que dez semanas de treinamento físico aeróbio periodizado (75-80% VO₂Máx, 30-90 min/dia) foram capazes de proporcionar cardioproteção em ratos submetidos a protocolo de isquemia/reperfusão *in vivo*. Por outro lado, há relatos de cardioproteção através do uso de produtos naturais com potencial antioxidante. Li *et al.* (2012) mostraram que o composto Ginsenosídeo Rb1 é eficaz na diminuição do estresse oxidativo em cardiomiócitos expostos a H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Ma *et al.* (2013) verificaram que o tratamento prévio por sete dias com extrato das raízes da espécie *Astragalus membranaceus*, bastante utilizado na China e em outros países da Ásia, reduziram significativamente a área de infarto além de melhorar a performance cardíaca e diminuir o extravazamento de Lactato Desidrogenase (LDH), da isoforma cardíaca da Creatina Quinase (CK-MB) e Troponina Cardíaca (cTnI). Além disso, este estudo verificou uma diminuição da concentração de malonildialdeído (MDA) e um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) em tecido cardíaco.

Schinella *et al.* (2005) sugeriram que o possível mecanismo cardioprotetor modulado pelo MATE seria a regulação da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS). Visando avaliar esta possibilidade, quantificamos a concentração de nitrito em plasma, como forma de mensuração sistêmica indireta da produção de óxido nítrico (NO). No nosso modelo experimental não houve alteração na concentração de nitrito plasmático, sugerindo que, possivelmente, o mecanismo responsável pela cardioproteção vista no modelo experimental deste estudo não é o mesmo que o visto pelo estudo de Schinella *et al.* (2005). Uma possível explicação para esta diferença pode estar relacionada a diferença experimental entre o consumo do mate que foi realizado por nós e a perfusão direta de mate no miocárdio feita no trabalho de Schinella *et al.* (2005). Diversos compostos bioativos contidos no MATE são absorvidos e metabolizados no sistema gastrointestinal, sofrendo assim modificações químicas importantes que gerarão os efeitos já citados anteriormente (Oliveira, 2013; Murad, 2013). Esta metabolização não aconteceria no tecido cardíaco, durante a perfusão com o MATE, não gerando assim as mesmas adaptações vistas em nosso estudo.

Outro mecanismo que estaria envolvido com a cardioproteção seria o de modulação da enzima NADPH Oxidase (NOX). O ânion superóxido produzido pela atividade da NOX, em reação com NO produzido pela enzima Óxido Nítrico Sintase

Induzida (iNOS), resulta em peroxinitrito (ONOO^{*}), espécie reativa de nitrogênio com alto poder de reatividade, e uma das principais responsáveis pela injúria promovida por isquemia/reperfusão (Jiao *et al.*, 2009). Farah *et al.* (2013) estudaram o efeito cardioprotetor do treinamento físico aeróbio. Ratos Wistar foram submetidos a treinamento por 5 semanas, 5 vezes ao dia, 45 minutos por dia, a 70% da velocidade máxima obtida em teste máximo. Este protocolo foi suficiente para aumentar a atividade da eNOS, mensurada pela sua fosforilação, e pelo aumento da concentração de nitrito no ventrículo esquerdo. Porém o aumento exarcebado da produção de NO pela eNOS após injúria por I/R também leva a um aumento da produção de ONOO^{*}, causando perda da cardioproteção. Portanto, uma possibilidade relacionada a cardioproteção observada por nós seria uma redução da atividade da NOX, promovida pelo tratamento com MATE. Nossos resultados não mostraram nenhuma modulação na atividade desta enzima nos grupos que consumiram MATE, portanto a cardioproteção observada neste grupo não pode ser atribuída a uma modulação da atividade da NOX. Os dados de atividade da NOX somados aos dados de concentração plasmática de nitrito sugerem que o mecanismo de modulação da produção de ONOO^{*} não é modulada pelo consumo de MATE e pela prática de treinamento físicos aeróbios em curto período de tempo.

O consumo de MATE, porém, parece modular os biomarcadores de estresse oxidativo de maneira diferenciada, dependendo do tempo de tratamento, da dose e do tecido analisado. Boaventura *et al.* (2011) mostrou que o consumo de 1L/dia de MATE por 90 dias, com ou sem intervenção alimentar, não alterou a peroxidação lipídica ou a carbonilação de proteínas em plasma de sujeitos dislipidêmicos. Bravo *et al.* (2013) verificou que não houve diferença significativa na peroxidação lipídica e na carbonilação de proteína em plasma de animais submetidos ao consumo *ad libitum* de MATE; no entanto, quando analisados os níveis de malondialdeído (MDA - principal biomarcador de peroxidação lipídica) e carbonilação de proteínas em tecido hepático, os autores mostraram um aumento promovido pelo consumo de MATE nos animais normolipidêmicos, sugerindo um provável efeito pró-oxidante do MATE para este tecido. Corroborando com os dados de Boaventura *et al.* (2011) não observamos aumento na peroxidação lipídica plasmática do grupo que consumiu MATE. Contudo, houve uma tendência ao aumento desse biomarcador em tecido cardíaco no grupo SM. Quando analisamos a carbonilação de proteínas no plasma

foi visto que o ataque das EROs às proteínas foi maior no grupo EM em comparação aos grupos SM e EC. Embora a diferença entre os grupo EM e SC não tenha apresentado significância, há forte tendência ao aumento de PC no grupo EM em relação ao controle, visto que o p foi de 0,0523. Corroborando com Boaventura *et al.* (2011) o consumo de MATE não promoveu aumento na carbonilação de proteína a nível plasmático, porém, interessante, a associação do consumo de MATE ao treinamento físico físico gerou um aumento na carbonilação de proteínas. Este dado sugere que esta associação gera um quadro pró-oxidativo sistêmico. Em contrapartida, no tecido cardíaco houve aumento de PC no grupo que ingeriu mate em comparação com o grupo EM. Este dado sugere que a nível cardíaco o MATE tem efeito pró-oxidante e que o treinamento físico se opõe a este efeito. Vale ressaltar ainda que os nossos dados corroboram com a hipótese de efeito anti e pró-oxidante tecido-dependente

A cardioproteção induzida pelo consumo de MATE pode estar relacionado ao efeito pró-oxidante observado por nós no tecido cardíaco. Um dos principais mecanismos que promovem adaptações relacionadas a cardioproteção é o pré-condicionamento isquêmico, que é definido por Kübler e Haas (1996) como a tolerância isquêmica gerada por curtos períodos de isquemia/reperfusão. Este mecanismo gera um aumento controlado na produção de EROs, que promove o aumento da capacidade antioxidante pelo aumento da ativação do Fator 2 Relacionado a NF-E2 (NRF2). A NRF2 é um dos principais fatores de transcrição associados a expressão de mRNA relacionados às enzimas antioxidantes. Com isso, há uma diminuição das vias promotoras de lesão mitocondrial e apoptose relacionado a injúria por I/R (Huang *et al.*, 2014; Stein *et al.*, 2012). Este conceito tem sido explorado e estudos com pré-condicionamento induzido por vitaminas, fármacos e produtos naturais são descritos na literatura. Veskokoukis *et al.* (2012) analisou os efeitos *in vitro* e *in vivo* de um extrato do bagaço da uva rico em polifenóis. Neste estudo os autores encontraram um aumento significativo de peroxidação lipídica em eritrócitos e em tecido cardíaco no grupo que consumiu o extrato e realizou a rotina de treinamento físico. Knab *et al.* (2014) mensurou os parâmetros de estresse oxidativo em ciclistas após suplementação com uma bebida rica em polifenóis, a base de frutas secas, por 17 dias. Nos últimos 3 dias de suplementação os ciclistas foram submetidos a uma sessão de treino com duração

de 2h15min e intensidade de 70%-75% do VO₂Máx. Foi observado um aumento de 82% na carbonilação de proteínas em plasma, que, segundo o autor, não sofreu influência da suplementação, sugerindo que o extrato utilizado no estudo não gerou alterações no perfil inflamatório e oxidativo em ciclistas treinados. Liu *et al.* (2014) mostraram que o pré-condicionamento induzido pelo consumo de quercetina leva à cardioproteção, diminuindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase, da Glutathione Peroxidase (GPx) e da Glutathione Redutase (GR) em tecido cardíaco. Porém, Casuso *et al.* (2014) mostraram que a suplementação com quercetina por cinco dias foi capaz de aumentar a carbonilação de proteína em cérebro de ratos Wistar, sugerindo também que a quercetina manifesta um efeito pró-oxidante. Zhang *et al.* (2010) observou que o tratamento com concentrações sub-letais de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), um dos principais compostos relacionados à peroxidação lipídica, promoveu cardioproteção aumentando a performance da PDVE após injúria por I/R, e verificou que este efeito está relacionado a uma maior ativação de NRF2 no coração. O efeito pró-oxidante promovido pelo consumo de MATE mostrado neste estudo em tecido cardíaco pode estar promovendo o aumento da expressão de mRNA de enzimas antioxidantes durante a injúria por I/R via ativação de NRF2. Este aumento de expressão de mRNA relacionados às enzimas antioxidantes já foi relatado anteriormente por Matsumoto *et al.* (2009), com o mesmo tempo de consumo de MATE utilizado neste estudo, em mulheres saudáveis.

Os níveis de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) são bons parâmetros do estado redox a nível celular. No nosso trabalho foi mostrado que o consumo de MATE leva a um aumento significativo da razão GSH/GSSG, em comparação ao treinamento físico aeróbio no tecido cardíaco. Este aumento pode ser justificado pelo aumento da carbonilação de proteínas provocado pelo consumo de MATE, aumentando a mobilização do sistema antioxidante. Este fenômeno já foi relatado anteriormente *in vitro* por Mukherjee *et al.* (2007) em células endoteliais. Neste estudo foi visto que 30 mM de N-Acetilcisteína (NAC), um antioxidante com radical tiol, foi capaz de aumentar os níveis de GSH (aumentando também a razão GSH/GSSG) e, com a mesma concentração, verificou-se uma maior carbonilação de proteínas. Mukherjee *et al.* (2007), nesse mesmo trabalho, mostra uma diminuição da carbonilação de proteínas quando utilizadas concentrações menores de NAC.

Este trabalho mostra que o NAC, em altas concentrações, apesar de melhorar a razão GSH/GSSG, promove um efeito pró-oxidante. Nós utilizamos a dose de 1g/kg de peso corporal da erva, diluído em 1 mL de água. Esta concentração equivale ao consumo de 1,5L de MATE em condições de consumo humano (Miranda *et al.*, 2008). Visto que esta concentração pode ser alta para o consumo de animais de pequeno porte, pode-se fazer um paralelo com o trabalho de Mukherjee *et al.* (2007).

As enzimas antioxidantes são essenciais para a manutenção do equilíbrio redox. Quando células cardíacas são submetidas a períodos prolongados de isquemia seguido de reperfusão as enzimas antioxidantes sofrem uma queda em sua atividade, em resposta a alterações fisiológicas como diminuição do pH, aumento das concentrações de Ca^{++} entre outras alterações (Tullio *et al.*, 2013). Porém, essas enzimas também sofrem adaptações positivas, levando a uma manutenção do estado redox. Hamilton *et al.* (2003) mostraram que o treinamento aeróbio de intensidade moderada a alta (60-70% $VO_2Máx$, 30 a 50 minutos/dia) por cinco dias consecutivos foi capaz de promover o aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) em tecido cardíaco. Estes autores atribuíram a cardioproteção observada ao aumento da atividade da SOD. Este mesmo trabalho também contou com a intervenção por suplementação de antioxidantes como o ácido ascórbico, a NAC e catequinas, por seis semanas, antes do protocolo de treinamento, e viram que não houve mudanças na atividade da SOD promovida pela suplementação de antioxidantes. Também não observaram mudanças na atividade da Catalase cardíaca depois da suplementação e da rotina de treinamento físicos. Em nosso trabalho foi verificado um aumento significativo da SOD em eritrócito nos grupos SM, EC e EM, além de um aumento significativo na atividade da SOD em tecido cardíaco no grupo EC, comparado aos grupos SC e SM. O aumento da atividade da SOD em eritrócitos foi mostrado em estudos com cavalos (Lamprecht *et al.*, 2012) e em ratas Wistar jovens e idosas (Pereira, 2013). Interessantemente não observamos diferença na atividade da SOD em eritrócito entre o grupo EM e os grupos SM e EC, sugerindo que a associação do consumo de MATE com o treinamento físico aeróbio não modula a atividade da SOD, sendo esta modulação feita somente pelo consumo de MATE ou pelo treinamento físico aeróbio. O aumento da atividade da SOD no grupo EC em comparação aos grupos SC e SM no tecido cardíaco, a manutenção da atividade da Catalase em todos os grupos no

tecido cardíaco e a tendência encontrada na comparação da atividade da Catalase entre os grupos EC e EM em eritrócito ($p = 0,07$) mostram um comportamento semelhante ao que foi visto no trabalho de Hamilton *et al.* (2003). Uma causa provável para este comportamento é a alta capacidade antioxidante do MATE, que, associado ao treinamento físico aeróbio, pode estar promovendo um retardamento na adaptação da SOD, levando assim a uma diminuição da cardioproteção induzida pelo treinamento físico.

Evidências recentes apontam para um papel modulador do consumo de compostos com alta capacidade antioxidante no perfil inflamatório e oxidativo. Carrera-Quintanar *et al.* (2014) estudaram as adaptações relacionadas ao estresse oxidativo de neutrófilos e linfócitos após 21 dias de treinamento de força com ênfase em treinamento físicos excêntricos, com suplementação de antioxidantes. Neste trabalho um grupo consumiu um extrato de *Lippia Citriodora*, outro consumiu uma bebida feita a base de amêndoa, e um terceiro grupo consumiu uma mistura dos dois antioxidantes, além do grupo controle que não consumiu antioxidantes. Foi mostrado que o consumo dos dois antioxidantes somados diminuíram significativamente a expressão de mRNA de Mn-SOD, de Cu-Zn-SOD e de GR em neutrófilos. Michailidis *et al.* (2013) verificou as vias de inflamação e de estresse oxidativo após uma sessão de 300 contrações excêntricas e oito dias de suplementação com NAC. Todos os biomarcadores de estresse oxidativo foram potencializados pela suplementação com NAC e, após oito dias de suplementação, houve uma diminuição significativa do torque de força muscular no grupo que recebeu a suplementação de NAC. Em paralelo, os autores demonstraram via dosagens de interleucinas, que o grupo que recebeu NAC apresentava um perfil inflamatório reduzido. A redução do perfil inflamatório levou a inibição da fosforilação de mTOR e a ativação de MyoD, que são responsáveis pela ativação das vias de síntese de proteínas e de diferenciação de células satélites, diminuindo assim a recuperação muscular e, portanto, justificando a diminuição do torque de força muscular. Essas evidências mostram que o consumo exacerbado de antioxidantes pode inibir as adaptações do sistema antioxidante relacionadas ao treinamento físico, podendo assim inibir também a cardioproteção induzida por este tipo de intervenção. Estes achados corroboram com os resultados apresentados por nós,

com redução da cardioproteção quando há associação entre consumo de MATE e treinamento físico.

Os biomarcadores de lesão celular em plasma podem ser considerados como as respostas teciduais ao estresse oxidativo. As enzimas CK e LDH, quando encontradas no plasma, indicam lesão a nível muscular, enquanto TGO, TGP e GGT são parâmetros de função hepática (Ramos *et al.*, 2013). Um estudo recente mostrou que as concentrações plasmáticas de creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e gama-glutamil transferase (GGT) aumentam em resposta a uma única sessão de treinamento aeróbio de alta intensidade, sendo esta última enzima também encontrada em valores significativamente altos em resposta a uma única sessão de treinamento aeróbio de intensidade baixa (Ramos *et al.*, 2013). No nosso trabalho vimos que a concentração de CK no plasma se mostrou menor no grupo SM quando comparado com o grupo EM. Este dado sugere uma possível proteção promovida pelo consumo do MATE, que é atenuada quando o treinamento aeróbio é praticado concomitantemente ao consumo de MATE. Com relação ao tecido hepático, nossos dados mostram que há uma diminuição da concentração plasmática de GGT no grupo EM se comparado ao grupo EC, sugerindo assim uma hepatoproteção promovida pelo consumo do MATE associado ao treinamento físico.. Esta provável hepatoproteção promovida pelo consumo de MATE já foi relatada por Martins *et al.* (2009). Estes autores mostraram que camundongos suíços submetidos a doses diárias de 0,5g/kg de peso corporal apresentaram redução da peroxidação lipídica hepática. Nossos dados para o grupo EM corroboram com os dados de Martins *et al.* (2009). Contudo vale ressaltar que pela primeira vez é observado uma diminuição da lesão hepática promovida pelo treinamento físico através do consumo de MATE. A ausência de alteração na concentração de GGT no grupo SM em comparação com o grupo SC pode ser explicada em função do curto período de consumo do MATE (7 dias), já que Martins *et al.* (2009) suplementou os animais por 60 dias.

Os dados mostrados neste trabalho mostram um novo panorama para o consumo do MATE. A cardioproteção induzida pelo treinamento físico aeróbio já é bem caracterizada na literatura, mas a sua associação ao consumo de MATE, um alimento largamente consumido na América do Sul, ainda não havia sido estudado.

O pré-condicionamento promovido pelo consumo do MATE e a inibição da adaptação da superóxido dismutase ao treinamento físico aeróbio causado pela associação com o consumo da erva representa um novo norteamento para os estudos relacionados o consumo de MATE a redução dos eventos cardiovasculares, bem como a promoção de cardioproteção.

Tendo em vista que a maior parte das análises do sistema antioxidante no tecido cardíaco foram realizadas sem injúria por I/R, não podemos sugerir quais as adaptações as intervenções podem promover nessa situação. Portanto, outros estudos são necessários para elucidar os efeitos do consumo de MATE no sistema antioxidante durante e após a injúria por I/R.

7. Conclusões

O treinamento físico aeróbio por sete dias, conforme já é relatado pela literatura, promove cardioproteção e uma das vias envolvidas neste fenômeno é o aumento da atividade da SOD cardíaca. Este fenômeno também é visto a nível sistêmico. O consumo de MATE promove cardioproteção e uma provável justificativa seria o ambiente pró-oxidativo gerado pelo consumo da erva, proporcionando um pré-condicionamento. A melhora do balanço redox mostrada pelo consumo de MATE pode estar relacionado a este pré-condicionamento.

O consumo de MATE associado ao treinamento físico, em sete dias, não proporciona cardioproteção, provavelmente por uma inibição da adaptação das enzimas antioxidantes promovida pelo treinamento físico.

As adaptações vistas em plasma e eritrócito se diferenciam das percebidas em tecido cardíaco, sugerindo uma provável adaptação tecido-dependente.

O aumento da carbonilação de proteínas em plasma promovido pelo consumo do MATE associado ao treinamento físico aeróbio em sete dias pode estar relacionado com uma tendência a uma diminuição da atividade da Catalase em eritrócito, observado no mesmo grupo.

A diminuição do extravasamento de Gama-GT promovida pelo treinamento físico através do consumo de MATE sugere um efeito hepatoprotetor

8. Referências

ACTIS-GORETTA, L. *et al.* Comparative study on the antioxidant capacity of wines and other plant-derived beverages. **Ann N Y Acad Sci**, v. 957, p. 279-283, Maio 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

BECKER, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. **Cardiovasc Res**, v. 61, n. 3, p. 461-470, Fev 2004.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 245-313, Jan 2007.

BIXBY, M. *et al.* Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**, v. 77, n. 3, p. 345-358, Jun 2005.

BOAVENTURA, B. C. *et al.* Association of mate tea (Ilex paraguariensis) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657-64, Jun 2012.

BRACESCO, N. *et al.* Antioxidant activity of a botanical extract preparation of Ilex paraguariensis: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **J Altern Complement Med**, v. 9, n. 3, p. 379-387, Jun 2003.

BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 3, p. 378-384, Jul 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRASIL. **Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Ministério da Saúde. Brasília, p.120. 2014

CASUSO, R. A. *et al.* The combination of oral quercetin supplementation and exercise prevents brain mitochondrial biogenesis. **Genes Nutr**, v. 9, n. 5, p. 420, Sep 2014.

CARRERAS, M. C. *et al.* Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Lett**, v. 341, n. 1, p. 65-68, Mar 1994.

CARRERA-QUINTANAR, L. *et al.* Effect of polyphenol supplements on redox status of blood cells: a randomized controlled exercise training trial. **Eur J Nutr**, Oct 19 2014.

CHRZCZANOWICZ, J. *et al.* Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, n. 3, p. 342-9, 2008.

COLBERG, S. R. *et al.* Exercise and type 2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Exercise and type 2 diabetes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 12, p. 2282-2303, Dez 2010.

CHAVES, E. A. *et al.* Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 99, n. 4-5, p. 223-30, Jun 2006.

DAVISON, G. *et al.* The effect of acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. **Eur J Nutr**, v. 51, n. 1, p. 69-79, Fev 2012.

DI BONITO, P. *et al.* Association of elevated serum alanine aminotransferase with metabolic factors in obese children: sex-related analysis. **Metabolism**, v. 58, n. 3, p. 368-372, Mar 2009.

EVA FELDMAN. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. **Animal Models of Diabetic Complications Consortium (AMDCC Protocols)**, v. Version 1, 2012.

FARAH, C. *et al.* Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. **Basic Res Cardiol**, v. 108, n. 6, p. 389, Nov 2013.

FILIP, R. *et al.* Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, Nov 2001.

FILIP, R. *et al.* Effect of Ilex extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 4, p. 649-655, Abr 2007.

FORTUNATO, R. S. *et al.* Sexual dimorphism of thyroid reactive oxygen species production due to higher NADPH oxidase 4 expression in female thyroid glands. **Thyroid**, v. 23, n. 1, p. 111-119, Jan 2013.

GARBER, C. E. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 7, p. 1334-1359, Jul 2011.

GARCIA-DORADO, D. *et al.* Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. **Cardiovasc Res**, v. 94, n. 2, p. 168-180, Maio 2012.

GOSMANN, G. *et al.* Phenolic compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 67, n. 2, p. 156-161, Jun 2012.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 224, n. 2, p. 338-344, Jul 1996.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 35, n. 1, p. 47-56, Jan 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. Oxford University Press, 2007. 849.

HAMILTON, K. L. *et al.* Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 7, p. 800-9, Apr 1 2003.

HAMILTON, K. L. Antioxidants and cardioprotection. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 9, p. 1544-53, Sep 2007.

HARRISON, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 6, p. 774-797, Set 2002.

HUANG, X. S. *et al.* Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for hypoxic preconditioning-mediated delayed cardioprotection. **Mol Cell Biochem**, v. 385, n. 1-2, p. 33-41, Jan 2014.

JANASZEWSKA, A.; BARTOSZ, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 62, n. 3, p. 231-236, 2002.

JI, L. *et al.* Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 4, p. E871-80, Apr 2010.

JIAO, X. Y. *et al.* INO-4885 [5,10,15,20-tetra[N-(benzyl-4'-carboxylate)-2-pyridinium]-21H,23H-porphine iron(III) chloride], a peroxynitrite decomposition catalyst, protects the heart against reperfusion injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 328, n. 3, p. 777-784, Mar 2009.

KARMAZYN, M.; MOEY, M.; GAN, X. T. Therapeutic potential of ginseng in the management of cardiovascular disorders. **Drugs**, v. 71, n. 15, p. 1989-2008, Oct 22 2011..

KALAFATI, M. *et al.* Ergogenic and antioxidant effects of spirulina supplementation in humans. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 1, p. 142-151, Jan 2010.

KNAB, A. M. *et al.* Effects of a freeze-dried juice blend powder on exercise-induced inflammation, oxidative stress, and immune function in cyclists. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 39, n. 3, p. 381-5, Mar 2014.

KOHCHI, C. *et al.* ROS and innate immunity. **Anticancer Res**, v. 29, n. 3, p. 817-821, Mar 2009.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, n. 6, p. 620-650, Nov-Dez 2002.

KOGA, K. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor provides cardioprotection during ischemia/reperfusion by reducing oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 7, p. 1191-202, Apr 2011

KUBLER, W.; HAASS, M. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. **Heart**, v. 75, n. 4, p. 330-333, Abr 1996.

LANZETTI, M. *et al.* Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375-381, Abr 2008.

LAMPRECHT, E. D.; WILLIAMS, C. A. Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 920932, 2012.

LI, J. *et al.* The effects of ginsenoside Rb1 on JNK in oxidative injury in cardiomyocytes. **Arch Pharm Res**, v. 35, n. 7, p. 1259-67, Jul 2012.

LIU, H. *et al.* Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats. **Gene**, v. 545, n. 1, p. 149-55, Jul 15 2014.

LONBORG, J. *et al.* Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. **Circ Cardiovasc Interv**, v. 3, n. 1, p. 34-41, Feb 1 2010.

MA, X. *et al.* Extracts from *Astragalus membranaceus* limit myocardial cell death and improve cardiac function in a rat model of myocardial ischemia. **J Ethnopharmacol**, v. 149, n. 3, p. 720-8, Oct 7 2013.

MANNU, G. S. *et al.* Evidence of lifestyle modification in the management of hypercholesterolemia. **Curr Cardiol Rev**, v. 9, n. 1, p. 2-14, Feb 2013.

MARGONIS, K. *et al.* Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 6, p. 901-10, Sep 15 2007.

MARTINS, F. *et al.* Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **Br J Nutr**, v. 101, n. 4, p. 527-32, Feb 2009.

MATSUMOTO, R. L. *et al.* Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1775-1780, Mar 2009.

MILIOLI, E. M. *et al.* Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytother Res**, v. 21, n. 8, p. 771-776, Ago 2007.

MICHAILIDIS, Y. *et al.* Thiol-based antioxidant supplementation alters human skeletal muscle signaling and attenuates its inflammatory response and recovery

after intense eccentric exercise. **Am J Clin Nutr**, v. 98, n. 1, p. 233-45, Jul 2013.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972.

MIRANDA, D. D. *et al.* Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261-5, Jul 2008.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 581-609, Apr 2008.

MURAD, L. D. **EFEITOS DOS ÁCIDOS CAFEICO E 5-CAFEOILQUÍNICO SOBRE O CRESCIMENTO E CAPTAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO**. Rio de Janeiro, p.119. 2013. (Dissertação de Mestrado)

MUKHERJEE, T. K. *et al.* High concentration of antioxidants N-acetylcysteine and mitoquinone-Q induces intercellular adhesion molecule 1 and oxidative stress by increasing intracellular glutathione. **J Immunol**, v. 178, n. 3, p. 1835-44, Feb 1 2007.

OLIVEIRA, D. M. D. **Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**. São Paulo, p.141. 2013. (Tese de Doutorado)

OMAR, M. A.; VERMA, S.; CLANACHAN, A. S. Adenosine-mediated inhibition of 5'-AMP-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase during reperfusion enhances recovery of left ventricular mechanical function. **J Mol Cell Cardiol**, v. 52, n. 6, p. 1308-1318, Jun 2012.

PATSOUKIS, N. *et al.* Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. **Neurosci Lett**, v. 357, n. 2, p. 83-86, Mar 2004.

PESARO, A. E.; SERRANO, C. V., JR.; NICOLAU, J. C. Acute myocardial infarction - acute coronary syndrome with ST-segment elevation. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 2, p. 214-220, Abr-Jun 2004.

PESCATELLO, L. S. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 3, p. 533-553, Mar 2004.

PEREIRA, A. A. F. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar senis**. Araçatuba. 2013. (Dissertação de Mestrado)

POWERS, S. K. *et al.* Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1468-77, Nov 1998.

POWERS, S. K.; QUINDRY, J. C.; KAVAZIS, A. N. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 193-201, Jan 15 2008.

POWERS, S. K. *et al.* Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 1, p. 27-38, Jan 2014.

POWERS, S. K. *et al.* Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: the antioxidant players and cardioprotection. **Free Radic Res**, v. 48, n. 1, p. 43-51, Jan 2014.

RADAK, Z. *et al.* Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 10, p. 1208-1246, Abr 2013

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nat Protoc**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006.

RAMOS, D. *et al.* Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 38, n. 5, p. 507-511, Maio 2013.

RESENDE, P. E. *et al.* The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **J Ethnopharmacol**, v. 144, n. 3, p. 735-740, Dez 2012.

RIBEIRO, S. *et al.* A FORMAÇÃO E OS EFEITOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO MEIO BIOLÓGICO. **Biosci. J.**, v. 21, n. 3, p. 133-149, Sept./Dec. 2005 2010.

RODRIGO, R.; PRIETO, J. C.; CASTILLO, R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. **Clin Sci (Lond)**, v. 124, n. 1, p. 1-15, Jan 2013

RODRIGUES, F. *et al.* Cardioprotection afforded by exercise training prior to myocardial infarction is associated with autonomic function improvement. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 14, n. 1, p. 84, 2014.

SALVAGGIO, A. *et al.* Body mass index and liver enzyme activity in serum. **Clin Chem**, v. 37, n. 5, p. 720-723, Maio 1991.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clin Nutr**, v. 24, n. 3, p. 360-366, Jun 2005.

SCHINELLA, G. *et al.* An Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis* Reduces Carrageenan-Induced Edema and Inhibits the Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Animal Models of Inflammation. **Planta Med**, v. 80, n. 12, p. 961-968, Ago 2014.

SCHINELLA, G. R. *et al.* Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 269, n. 2, p. 357-360, Mar 2000.

SILVA, R. D. *et al.* The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, n. 6, p. 818-826, Set 2011.

SLUIJTER, J. P. *et al.* Novel therapeutic strategies for cardioprotection. **Pharmacol Ther**, Maio 2014.

SOUFI, F. G. *et al.* Role of 12-week resistance training in preserving the heart against ischemia-reperfusion-induced injury. **Cardiol J**, v. 18, n. 2, p. 140-145, 2011.

STEIN, A. B. *et al.* Carbon monoxide induces a late preconditioning-mimetic cardioprotective and antiapoptotic milieu in the myocardium. **J Mol Cell Cardiol**, v. 52, n. 1, p. 228-36, Jan 2012.

THOMES, P. *et al.* Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 52-7, Dez 2010.

TULLIO, F. *et al.* Redox balance and cardioprotection. **Basic Res Cardiol**, v. 108, n. 6, p. 392, Nov 2013.

VESKOUKIS, A. S. *et al.* The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 185867, 2012.

VOGT, A. M. *et al.* Regulation of glycolytic flux in ischemic preconditioning. A study employing metabolic control analysis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 27, p. 24411-24419, Jul 2002.

WHO. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. World Health Organization. Geneva, p.164. 2011

ZHANG, Y. *et al.* 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. **J Mol Cell Cardiol**, v. 49, n. 4, p. 576-86, Oct 2010.

ZWEIER, J. L.; TALUKDER, M. A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiovasc Res**, v. 70, n. 2, p. 181-190, Maio 2006.