



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em
Medicina (Cardiologia)



EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E CONSUMO DE ERVA MATE: ESTUDO DOS
EFEITOS RELACIONADOS ÀS ADAPTAÇÕES PROMOVIDAS POR INFARTO DO
MIOCÁRDIO

Tese de Doutorado

Fábio Luiz Candido Cahuê

Fevereiro, 2019

Fábio Luiz Candido Cahuê

EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E CONSUMO DE ERVA MATE: ESTUDO DOS
EFEITOS RELACIONADOS ÀS ADAPTAÇÕES PROMOVIDAS POR INFARTO DO
MIOCÁRDIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento, Profa. Dra. Verônica Salerno Pinto, Profa. Dra. Luciane Claudia Barcellos

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2019

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu filho, Luiz Henrique, que nasceu há poucos dias. Que a partir daqui eu possa ser para ele a melhor referência que eu puder ser, para que ele seja uma pessoa ainda melhor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado até aqui. Os percalços foram grandes, mas Ele me ajudou a manter o caminho e chegar até este momento.

Agradeço ao meu pai, Luiz Claudio (*in memoriam*) por toda uma vida dedicada a manter seus filhos estudando e ajudando no que podia. Essa conquista também é sua, pai!

Agradeço a minha mãe, Elza e ao meu irmão, Luiz Jr.! Família! Por horas nos conflitos, mas sempre com amor e carinho quando precisamos. Obrigado, vocês são minha base!

Agradeço à Nelaine, minha mulher, por me acompanhar por toda essa fase final do meu doutorado, e que me deu um suporte sobrenatural até aqui, além de me dar meu maior presente de todos: nosso filho, Luiz Henrique.

Agradeço a todos os meus amigos, àqueles que sempre estiveram comigo. Impossível citar nomes, mas eles sabem quem são e que moram no meu coração.

Agradeço ao meu orientador, José Hamilton, pelo suporte dado nesta caminhada, desde o final do mestrado até aqui. Obrigado, Mestre!

Finalmente, agradeço às minhas mães científicas, Professoras Verônica e Luciane, Vê e Lu, que são as que confiaram em mim seus projetos, seus laboratórios e que hoje posso chamar cada uma de amiga, de mãe. Sem vocês nada disso teria acontecido, pois foram vocês que regaram a semente que já havia em mim e fez crescer esse amor pela ciência. Amo vocês!

Lista de Abreviações

DCVs – Doenças Cardiovasculares

DCIs – Doenças Cardíacas Isquêmicas

Ca²⁺ - Cálcio

Na⁺ - Sódio

H⁺ - Hidrogênio

ATP – Adenosina Trifosfato

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

RLs – Radicais Livres

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

NOX – NADPH Oxidase

SOD – Superóxido Dismutase

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

VO₂ – Volume de Oxigênio

XO – Xantina Oxidase

Nrf2 - Ativador do Fator 2 Relacionado a NF-E2

4-HNE - 4-hidroxi-2-nonenal

RNA_m – Acido Ribonucleico mensageiro

GAPDH - Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase

PFK – Fosfofrutoquinase

AMP – Adenosina Monofosfato

CP – Creatina Fosfato

DNA - ácido desoxirribonucleico

I/R – Isquemia/Reperusão

AI – Área de infarto

PDVE – Pressão Desenvolvida do Ventrículo Esquerdo

HO-1 – Hemeoxigenase 1

mPTP - Poros de transição de permeabilidade mitocondrial

NF- κ B – Fator Nuclear kappa-B

iNOS – Oxido Nítrico Sintase induzida

eNOS – Oxido Nítrico Sintase endotelial

MATE – *Ilex paraguariensis* / erva mate

LDL – lipoproteína de baixa densidade

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares	13
1.2. Doença Cardíaca Isquêmica	14
1.3. Balanço Redox: Radicais Livres e Capacidade Antioxidante	15
1.3.1. Radicais Livres	15
1.3.2. Sítios de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	17
1.3.3. Balanço Redox: Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo	17
1.3.4. Estresse Redutor	19
1.4. Infarto Agudo do Miocárdio: Mecanismos Moleculares	20
1.4.1. Alterações Metabólicas.....	20
1.4.2. Alterações Metabólicas e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	21
1.5. Cardioproteção: Definição e Principais Estratégias	22
1.5.1. Vias de Sinalização Relacionados à Cardioproteção	23
1.6. Exercício Físico.....	25
1.6.1. Exercício Físico e Cardioproteção	26
1.7. Antioxidantes e Cardioproteção	27
1.7.1. Erva Mate	28
1.7.1.1. Erva Mate e Cardioproteção.....	30
2. Problema do Estudo	32

3. Objetivos.....	33
3.1. Objetivo Geral	33
3.2. Objetivos Específicos	33
4. Artigo 1	34
5. Materiais e Métodos.....	39
5.1. Animais	39
5.2. Protocolo Experimental	39
5.3. Homogenização do Tecido Cardíaco	40
5.4. Western Blotting.....	41
5.5. Quantificação da Expressão de RNAm	42
5.5.1. Extração de RNA e Transcrição Reversa	42
5.5.2. Desenho dos Primers	42
5.5.3. Teste de Eficiência dos Primers	42
5.5.4. Ensaio de qRT-PCR	43
5.6. Atividade da Glutathiona Peroxidase	44
5.7. Dosagem de Proteína	44
5.8. Análise Estatística	44
6. Resultados.....	45
6.1. O Consumo de MATE e o Exercício Aeróbio de Baixa Intensidade em Curto Período Modula a Interação Nrf2-Keap1.....	45
6.2. O Consumo de MATE Aumenta a Expressão de Nfe2l2 e Keap1	46

6.3. O Consumo de MATE Aumenta a Expressão de Genes Associados à Ativação da Nrf2	47
6.4. O Exercício Físico Reduz a Expressão de Nox2	48
6.5. A Atividade da Glutathione Peroxidase é Reduzida Pelos Tratamentos Experimentais.....	49
7. Discussão	50
7.1. Mate, Cardioproteção e Estresse Redutor	50
7.2. A Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e a Diminuição da Expressão de Nox2 Explicam a Cardioproteção Induzida pelo Exercício e o Uso de MATE Associado ao Exercício Inibe as Adaptações Associadas às Intervenções	53
8. Conclusões	56
9. Referências.....	57
Anexo I – Gráficos do Artigo 1 em Alta Resolução	66

Lista de Figuras e Tabelas

- Figura 1** - Gráfico ilustrativo dos eventos cardiovasculares durante uma isquemia prolongada. Adaptado de Powers et al. (2014). 15
- Figura 2** - Esquema ilustrativo dos mecanismos que levam à lesão por isquemia/reperfusão no miocárdio. Adaptado de Powers *et al.* (2013).21
- Figura 3** - Figura ilustrativa dos principais compostos do MATE. Adaptado de Bracesco *et al.* (2011).29
- Figura 4** - Demonstrativo gráfico da linha experimental.39
- Figura 5** - Quantificação das proteínas Nrf2 e Keap1 por Western Blotting. (A) Quantificação de Nrf2 na fração citoplasmática. (B), Quantificação de Nrf2 em fração nuclear. (C) Quantificação de Keap1 em fração citoplasmática. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.46
- Figura 6** - Quantificação de RNAm dos genes Nfe2l2 (Nrf2) e Keap1 dos grupos experimentais. (A) Expressão de RNAm do gene Nfe2l2 (Nrf2). (B) Expressão de RNAm do gene Keap1. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.....47
- Figura 7** - Expressão de RNAm associadas a enzimas antioxidantes. (A) Sod1, (B) Sod2, (C) Catalase, (D) Hmox1, (E) Gpx1 e (F) Gpx3. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.48
- Figura 8** - Expressão de RNAm de Nox2. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.....49
- Figura 9** - Atividade da enzima Glutathiona Peroxidase. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.50

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs), suas fórmulas e características fisiológicas. Adaptado de Domej et al. (2014) e Oliveira & Schoffen (2010).....16

Tabela 2 - Desenho, senso e reverso, dos primers utilizados neste estudo.....43

1. Introdução

1.1. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares

As doenças cardíacas isquêmicas (DCI) são a maior causa de morte no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde obtidos no ano de 2015 (OMS, 2015) mostram que o índice de morte associada a essas doenças é de 119 mortes por 100.000 habitantes, o que é 40% maior que a segunda causa de mortes no mundo: o derrame ou acidente vascular encefálico (AVE). No continente americano esta diferença é ainda maior, ficando em mais de 240% quando comparado ao AVE. No Brasil os números também são preocupantes. Siqueira *et al.* (2017) estimam que as mortes por doenças cardiovasculares (DCVs) em 2015 chegaram a aproximadamente 27% de todas as causas de morte e que os gastos com internações, intervenções cirúrgicas e consultas chegaram a mais de cinco bilhões de reais. Estes dados apontam para um alto custo promovido pelas DCVs para o sistema público de saúde.

Outra situação importante, trata-se da análise da prevalência das DCVs. No mundo, em adultos entre 30 e 49 anos, a DCI é a segunda causa de morte, ficando atrás da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou, popularmente, AIDS) e, em adultos entre 50 a 59 anos, a DCI é mais prevalente como causa de morte (WHO, 2015), sugerindo que grande parte das mortes por DCI/DCVs ocorrem na população economicamente produtiva. No Brasil, estima-se que o prejuízo associado à mortalidade da população economicamente ativa por DCVs em 2015 foi de mais de 21 milhões de reais (Siqueira *et al.*, 2017). Estes dados apontam um problema de saúde pública e investigações que busquem entender e desvendar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à DCI, bem como desenvolver formas de profilaxia e tratamento dos eventos cardíacos maiores (infarto agudo do miocárdio, por exemplo) são necessários para diminuir o impacto das DCVs na sociedade.

1.2. Doença Cardíaca Isquêmica

Também conhecida como Doença Arterial Coronariana, a doença cardíaca isquêmica é caracterizada por uma interrupção do fluxo sanguíneo (isquemia) em consequência do estreitamento de artérias coronárias por deposição de gordura (ateroma), rompimento de placa aterosclerótica e formação de trombo que obstrui parcial ou totalmente uma artéria menor, ou por anormalidade no tônus da parede vascular. Com a interrupção do suprimento de oxigênio, a mitocôndria perde capacidade de manter a fosforilação oxidativa, diminuindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) e, conseqüentemente, a contratilidade miocárdica (Opie, 1990). Em paralelo a isso ocorre uma diminuição do pH gerando acidose, aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmática, levando a um quadro de contratura diastólica e outras alterações a nível molecular, que podem levar à apoptose ou necrose celular (Powers *et al.*, 2014). A irreversibilidade e extensão da lesão promovida pela isquemia prolongada depende do tamanho da área de risco, duração do evento de isquemia, presença de circulação colateral ou fluxo residual na artéria infartada e temperatura do miocárdio (Ferdinandy *et al.*, 2007).

Numa situação de isquemia miocárdica temporária, conforme mostra a figura 1, a rápida restauração do fluxo sanguíneo (reperusão) ao tecido isquêmico pode reverter as disfunções cardíacas, que se limitam a arritmias cardíacas. Contudo, entre 5 e 20 minutos de isquemia, o miocárdio entra em um estado de perturbação elétrica causado, dentre outros eventos, pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela maior concentração de Ca^{2+} citoplasmático. Após 20 minutos de isquemia a injúria se torna irreversível, causando morte celular por necrose ou apoptose, caracterizando o infarto do miocárdio (Bolli e Marban, 1999).

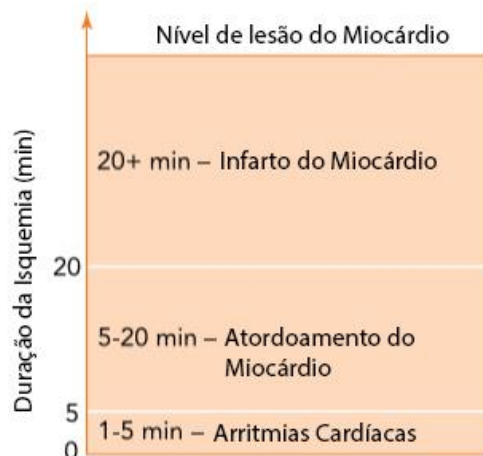


Figura 1 - Gráfico ilustrativo dos eventos cardiovasculares durante uma isquemia prolongada. Adaptado de Powers *et al.* (2014).

1.3. Balanço Redox: Radicais Livres e Capacidade Antioxidante

1.3.1. Radicais Livres

Radicaes livres (RLs) são moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados na última camada eletrônica (Halliwell, 2006). Os RLs 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. Entretanto, a produção exacerbada de RLs pode levar a uma alta interação com proteínas de sinalização, DNA e bicamada lipídica de membrana, potencializando vias de apoptose, como por exemplo a via das caspases, que levam a morte celular (Halliwell, 2006; Murphy e Steenbergen, 2008).

Os RLs podem ser classificados quanto à sua molécula de origem, a partir de reações de oxirredução (Halliwell, 2006). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são as RLs formadas a partir de moléculas de O₂, sendo essas as principais espécies de RLs produzidas em meio biológico (Halliwell, 2006). Outra importante espécie de RLs são as de Nitrogênio (ERNs), que também podem exercer efeito sinalizador e deletério. Na tabela 1 é possível verificar as principais EROs e ERNs, bem como a ocorrência de produção e características bioquímicas de cada uma.

Tabela 1 - Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs), suas fórmulas e características fisiológicas. Adaptado de Domej *et al.* (2014) e Oliveira (2010).

Nome	Fórmula	Características	Ocorrência
Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	Altamente instável, radical mais potente na indução a dano celular, função sinalizadora, plasticidade sináptica	Quase todas as células aeróbias
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Não é radical livre (não tem elétron despareado). Interage com proteínas e lipídeos. Função sinalizadora, geração de outras EROs	Dismutação da $\cdot\text{O}_2^-$ pela Dismutase (SOD)
Radical Hidroxila	$\cdot\text{OH}$	Altamente instável, Interage com DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos	Formado através da radiólise da água
Radical Alcoxil	$\text{RO}\cdot$		Produto da reação com lipídeos
Radical Peroxil	$\text{ROO}\cdot$		Produto da reação com lipídeos
Ânion Hipocloreto	OCl^-		Gerada pela mieloperoxidase
Oxigênio Singleto	$^1\text{O}_2$	Molécula de oxigênio induzida. Associada a mudanças no DNA.	Gerada por fagócitos, indução luminosa e reações catalizadas por peroxidases.
Radical Hidroperoxil	$\text{HO}_2\cdot$	Forma protonada da $\cdot\text{O}_2^-$. Interage com membranas.	A partir das reações com H_2O_2 .
Ozônio	O_3	Toxina ambiental.	
Óxido Nítrico	$\cdot\text{NO}$	Sinalizador celular, vasodilatador	A partir da atividade da Óxido Nítrico Sintase (NOS)
Peroxinitrito	ONOO^-		A partir da interação entre $\cdot\text{NO}$ e $\cdot\text{O}_2^-$

1.3.2. Sítios de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de EROs pode ocorrer em sítios onde o Oxigênio pode ser oxidado. Durante o processo de produção de ATP na mitocôndria o ânion superóxido (O_2^-) pode ser produzido entre os complexos I e III (Ribeiro *et al.*, 2005). Nesta área a ubiquinona, ou Coenzima Q, pode ser reduzida a ubiquinol ao receber dois elétrons. Contudo, neste processo, somente um elétron é doado por vez, gerando um intermediário chamado semiquinona, que pode interagir com uma molécula de O_2 , gerando O_2^- (Carreras *et al.*, 1994). Este processo é potencializado quando a necessidade de produção de ATP pela mitocôndria aumenta (no caso do exercício físico, por exemplo) (Radak *et al.*, 2013), quando a oferta de O_2 diminui por tempo prolongado (no caso de uma isquemia) ou quando há uma quantidade oferta de O_2 após longo tempo de isquemia (Powers *et al.*, 2014).

Outro sítio de produção de EROs é a classe de enzimas NADPH Oxidase. Estas enzimas produzem duas moléculas de O_2^- a partir da oxidação de uma molécula de NADPH, doando dois elétrons para duas moléculas de O_2 . As isoformas desta classe de enzimas são NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 (Bedard e Krause, 2007). A enzima Xantina Oxidase, que participa da via de catabolismo das purinas, também produz O_2^- na conversão de hipoxantina em xantina como um intermediário da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas enzimas podem ter sua atividade potencializada, por exemplo, quando a célula sofre um estresse metabólico, aumentando a utilização de ATP ou diminuindo a produção através da via aeróbia (por exemplo durante hipóxia prolongada) (Terada *et al.*, 1992; Li e Shah, 2003).

1.3.3. Balanço Redox: Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo

Para controlar a quantidade intracelular de EROs e mantê-los em níveis fisiológicos necessários para a sobrevivência celular e processos adaptativos, um sistema de ação antioxidante se faz presente. A Superóxido Dismutase (SOD) promove a conversão de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima Xantina Oxidase (XO) também é capaz de gerar H_2O_2 pelas reações de oxidação de hipoxantina em xantina e de xantina em ácido úrico (Harrison, 2002). As moléculas de H_2O_2 podem ser rapidamente convertidas em H_2O e O_2 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 de forma cíclica. Esse sistema de enzimas, composto pela SOD, Catalase, GPx e GR é considerado o sistema de defesa antioxidante enzimático (Halliwell, 2006).

Além do 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, 2006).

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 e 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, 2006). Situações como a prática (aguda) de exercícios 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 regular promovem uma melhora do equilíbrio redox, gerando uma proteção contra o aumento exacerbado ocasional de EROs (Davison *et al.*, 2012).

1.3.4. Estresse Redutor

A produção de EROs, a nível fisiológico, é responsável por manter a sinalização para processos celulares importantes, como a produção de enzimas antioxidantes (Malaguti *et al.*, 2009), autofagia (Filomeni *et al.*, 2015) e manutenção do metabolismo energético (Apel e Hirt, 2004). Em situações onde o ambiente celular se encontra demasiadamente redutor, pode-se observar um fenômeno chamado estresse redutor. Perez-Torres *et al.* (2017) descreve o estresse redutor como um fenômeno associado à um aumento da concentração de agentes redutores (NADH+H⁺, GSH, polifenóis, entre outros) que desencadeia um processo adaptativo que promove a redução de expressão de enzimas antioxidantes, aumentando a produção de EROs e potencializando a ação pró-oxidante de antioxidantes de característica varredora. A manutenção desse estresse redutor, a longo prazo, pode levar a adaptações negativas como hipertensão arterial, dano ao DNA e apoptose em tecido cardíaco (Hodnick *et al.*, 1986), disfunção mitocondrial e morte de células endoteliais (Posadino *et al.*, 2013; Posadino *et al.*, 2015). O aumento da capacidade redutora da célula pode ser desencadeada tanto por processos adaptativos gerados por estresse (por exemplo exercício físico) (Margaritelis *et al.*, 2014) ou por suplementação de antioxidantes (Hodnick *et al.*, 1986).

1.4. Infarto Agudo do Miocárdio: Mecanismos Moleculares

1.4.1. Alterações Metabólicas

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocorre quando uma região definida do miocárdio, ou todo ele, entra em isquemia prolongada, gerando sofrimento da área isquêmica e, conseqüentemente, morte celular. A privação de oxigênio leva a uma mudança no padrão do metabolismo energético, aumentando a ação da via glicolítica (Vogt *et al.*, 2002) e diminuindo a oxidação de ácidos graxos (Solaini e Harris, 2005). O aumento da hidrólise de ATP aumenta a concentração de fosfato inorgânico (Pi), que, em conjunto com o aumento da produção de lactato, aumenta a atividade da enzima Glicealdeído Fosfato Desidrogenase (GAPDH) (Mochizuki e Neely, 1979). A concentração de adenosina monofosfato (AMP) também aumenta, o que potencializa a atividade da enzima Fosfofrutoquinase (PFK), resultando em um aumento da produção de ATP pela via glicolítica. No entanto, este aumento na produção de ATP, na ausência de O₂, gera acúmulo de NADH+H⁺ e, conseqüentemente, diminuição significativa do pH causando inibição da enzima GAPDH, interrompendo a produção de ATP pelo metabolismo glicolítico.

A carga energética do cardiomiócito, quando em isquemia, sofre reduções drásticas, desde a quantidade de creatina fosfato (CP), que cai para aproximadamente 4% dos valores pré-isquemia até a concentração de ATP, que diminui na ordem de 60% após 30 minutos de reperfusão (Ambrosio *et al.*, 1993). A diminuição na produção de ATP, levando a níveis críticos (menor que 100 µmol/L) leva a uma redução da atividade das bombas de Na⁺/K⁺ ATPase sarcolemal e Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), o que leva a um aumento da [Na⁺] e [Ca²⁺] citoplasmático (Solaini e Harris, 2005; Garcia-Dorado *et al.*, 2012). Além disso, a alta quantidade de H⁺ leva a uma redução da atividade dos trocadores Na⁺/H⁺ (Vaughan-Jones e Wu, 1990) que leva a um aumento da concentração de Na⁺ e ao conseqüente aumento da atividade reversa do trocador Na⁺/Ca²⁺, aumentando ainda mais a [Ca²⁺] citoplasmático. O aumento da [Ca²⁺] citoplasmático na fase inicial da isquemia leva a um aumento da [Ca²⁺] mitocondrial, em resposta a sua alta capacidade de armazenar Ca²⁺ (Ruiz-Meana *et al.*, 2006). Contudo esse aumento associado a diminuição da oxidação mitocondrial e conseqüente diminuição do seu potencial de membrana leva a uma diminuição da atividade do canal de Ca²⁺ mitocondrial, o que culmina em uma

atividade reversa da ATP sintase, o que promove a hidrólise de ATP por essa enzima, ao invés da síntese. Este último evento leva a uma diminuição de 35-50% da concentração de ATP, sendo o principal causador da redução de oferta energética durante a isquemia (Jennings *et al.*, 1991). Em última instância o aumento da $[Ca^{2+}]$ leva a ativação da protease Calpaína, que leva à processos de apoptose e morte celular (Powers *et al.*, 2014) (Fig. 2).

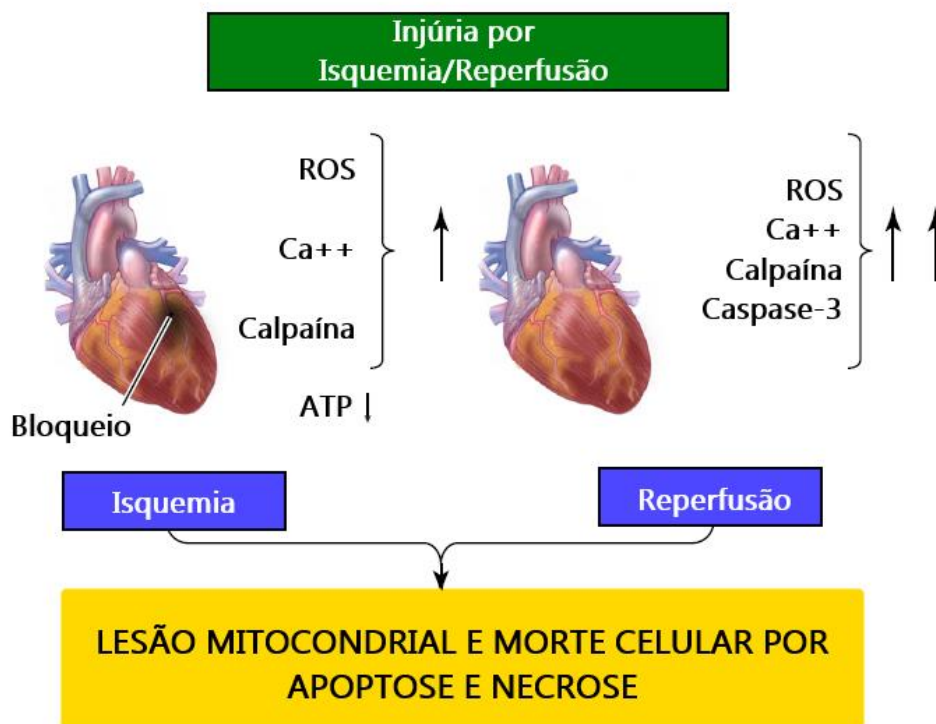


Figura 2 - Esquema ilustrativo dos mecanismos que levam à lesão por isquemia/reperusão no miocárdio. Adaptado de Powers *et al.* (2013).

1.4.2. Alterações Metabólicas e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

Durante o processo de produção de ATP pela mitocôndria, cerca de 5% de todo o oxigênio utilizado recebe um elétron na sua última camada, resultando na produção de ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) (Becker, 2004). Na isquemia a produção de $\bullet O_2^-$ se torna crítica em função do aumento do fluxo de elétrons da matriz mitocondrial por conta do acúmulo de succinato, causado pela atividade reversa do complexo II (Chouchani *et al.*, 2014). O $\bullet O_2^-$ é altamente reativo com outras moléculas, sendo rapidamente convertido em radicais hidroxila ($HO\bullet$) quando interage com o H^+ e em

peroxinitrito (ONOO•) quando interage com outro radical livre, o óxido nítrico (NO•). O aumento da produção de radicais livres na mitocôndria é o principal responsável pela promoção do desequilíbrio redox na isquemia (Zweier e Talukder, 2006). 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 $\bullet\text{O}_2^-$ em H_2O_2 e da catalase, responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 .

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 $\bullet\text{O}_2^-$ 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).

Todas essas cascatas de eventos se agravam 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 por conta do aumento do potencial de membrana mitocondrial, que leva a um transporte reverso de elétrons do complexo III para o complexo I (Chouchani *et al.*, 2014), 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 e Talukder, 2006).

1.5. Cardioproteção: Definição e Principais Estratégias

A capacidade do músculo cardíaco de reestabelecer os parâmetros de contratilidade, sobrevivendo a agressão causada pela injúria de isquemia/reperfusão (I/R) pode ser chamada de cardioproteção (Kubler e Haass, 1996). As principais variáveis associadas à cardioproteção são a área de infarto (AI) e a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE). A AI pode ser considerada como a área do miocárdio não viável e a PVDE é a subtração entre a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica.

Vários estudos têm investigado os mecanismos envolvidos no processo de I/R, 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).

1.5.1. Vias de Sinalização Relacionados à Cardioproteção

As estratégias utilizadas para promoção de cardioproteção modulam diversas vias de sinalização. De fato, existem inúmeros trabalhos que sugerem a participação de vias de sinalização relacionadas a modulação do metabolismo energético, de síntese de proteínas, de regulação da expressão gênica de proteínas relacionadas a capacidade antioxidante e de regulação da resposta imune a respostas cardioprotetoras.

Uma das principais vias relacionadas à cardioproteção é a de ativação de vias associadas a uma maior expressão de mRNA de enzimas antioxidantes. Um dessas vias trata-se do Ativador 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). 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 associado a uma maior ativação de Nrf2 no coração, sugerindo que o pré-condicionamento através do aumento de um

ambiente pró-oxidativo promove cardioproteção e que este mecanismo levaria a uma maior ativação da Nrf2. Zeng *et al.* (2015) mostraram que a administração oral de 50 mg/kg de curcumina é capaz de promover cardioproteção em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica pela ativação da Nrf2 e inibição do Fator Nuclear kappa-B (NF-κB), um fator de transcrição relacionado à resposta imune. Esse fenômeno também foi observado no mesmo trabalho em experimentos *in vitro*, com células cardíacas H9C2 tratadas com palmitato.

Outra via de sinalização relacionada a cardioproteção é a promovida pela ação da insulina. Ji *et al.* (2010) verificaram a influência da perfusão intravenosa de insulina (4 ml/kg/h por 3 horas, começando 5 minutos antes da reperfusão) em um protocolo de I/R *in vivo* (30 minutos de isquemia seguidos de 3 horas de reperfusão), através de oclusão da artéria coronária e verificou uma redução significativa na área de infarto e na ativação da apoptose, mensurada pela atividade da caspase-3. Segundo os autores esta adaptação está relacionada a uma menor ativação da Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), inibindo a formação de ONOO[•]. Além disso os autores verificaram um aumento na fosforilação da forma endotelial da NOS (eNOS), que estaria relacionada a uma maior fosforilação da Akt. Esta ativação, que é desencadeada pela ação da insulina além de estimular as vias de síntese de proteínas e, com isso, estar diretamente relacionada a cardioproteção, também é responsável pela diminuição da abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), pela inibição das vias de apoptose, pela inibição da autofagia (Matsui e Rosenzweig, 2005) e pela ativação do Nrf2 (Tan *et al.*, 2011). Estas respostas também podem ser moduladas independentemente da ação da Akt, sendo então vias de sinalização que podem ser estudadas de maneira independente.

1.6. Exercício Físico

A prática regular de exercícios físicos é, uma das principais formas de manutenção da saúde e qualidade de vida, bem como é recomendada como tratamento não medicamentoso para doenças como hipertensão arterial, diabetes, câncer, dentre outras (Oms, 2010). Esta prática leva a adaptações positivas no metabolismo energético tanto a nível sistêmico quanto a nível tecidual, na função do sistema musculoesquelético e cardiovascular, dentre outras (Garber *et al.*, 2011; Warburton e Bredin, 2017).

A prática do exercício físico visa trabalhar as diferentes valências físicas (força, flexibilidade, agilidade, resistência aeróbia, coordenação motora, velocidade, mobilidade e equilíbrio), e as modalidades de exercícios físicos são escolhidas para treinar valências específicas. São elas o treinamento de força, o treinamento aeróbio, o treinamento anaeróbio e o treinamento de flexibilidade (Garber *et al.*, 2011).

O treinamento aeróbio consiste em atividades prolongadas, realizadas em uma intensidade média de até 65% VO_2 Máximo, onde, metabolicamente, se tem a predominância do metabolismo aeróbio. O treinamento anaeróbio consiste em atividades que podem variar entre estímulos de potência, força ou cíclicos realizados em alta intensidade, onde a predominância metabólica é das vias ATP-CP e Glicolítica. O treinamento de flexibilidade visa aumentar ou preservar a amplitude de movimento de determinada articulação e se utiliza de movimentos passivos, ativos balísticos ou com facilitação neuroproprioceptiva.

As últimas recomendações do Colégio Americano de Ciências do Esporte (Garber *et al.*, 2011) sugerem, para pessoas sedentárias, a prática de atividades aeróbias em intensidade leve a moderada (30-60% VO_2 Reserva), com frequência semanal mínima de 150 minutos/semana para melhorar o condicionamento cardiorrespiratório. Além disso são recomendados o mínimo de 2 séries de 8-12 repetições com intensidade de 40-70% de 1 repetição máxima e no mínimo 2-3 vezes por semana para cada grupamento muscular. Já para promover melhoras na flexibilidade, é sugerido o trabalho estático em um tempo 10-30 segundos em uma amplitude que leve a um leve desconforto musculartoarticular.

1.6.1. Exercício Físico e Cardioproteção

O exercício físico, na medida em que é praticado de maneira regular, 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. Evidências experimentais sugerem que o exercício físico é capaz de ativar diversos mecanismos que induzem a esse benefício. Rodrigues *et al.* (2014) mostraram, em modelo animal de infarto cicatrizado, que o treinamento aeróbio de intensidade leve a moderada (50-70% da velocidade máxima) em esteira por oito semanas antes da indução cirúrgica ao infarto foi capaz de promover cardioproteção pela melhora das funções autonômicas e melhora da capacidade cardiorrespiratória. Além disso, a mortalidade pós-infarto foi reduzida a zero no grupo que foi submetido ao treinamento, enquanto o grupo sedentário teve 25% de mortalidade. Seguindo nesta linha, Sloan *et al.* (2009) compararam, em um estudo clínico randomizado, o efeito do treinamento de força (3 séries de 10 repetições para cada grupamento muscular, aumentando 5 libras a cada 2 semanas, 3-4 vezes por semana) e do treinamento aeróbio (70% Frequência Cardíaca Máxima, 20-60 min, 3-4 vezes por semana) por 12 semanas no condicionamento aeróbio e na modulação autonômica e sugeriram que somente o treinamento aeróbio foi capaz de melhorar as duas variáveis, que estão intimamente associadas à cardioproteção. Hamilton *et al.* (2003) verificaram a capacidade cardioprotetora do exercício aeróbio em curto período de tempo em modelo animal de injúria por I/R *in vivo* e sugeriram que a prática de exercício físico aeróbio de intensidade moderada (60-70% VO₂ Máximo) em esteira por cinco dias foi 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 (Kesaraju *et al.*, 2014). Soufi *et al.* (2011) sugeriram que doze semanas de treinamento de força 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 exercício 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 sensíveis à ATP, responsável pelo ajuste da excitabilidade da membrana da célula cardíaca, 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.

1.7. Antioxidantes e Cardioproteção

O uso de antioxidantes é uma das estratégias usadas na promoção de cardioproteção, no sentido de diminuir os efeitos deletérios do aumento da produção de EROs durante a isquemia e, principalmente, durante a fase inicial da reperfusão (Hamilton, 2007). Embora alguns dos efeitos associados à ação dos antioxidantes possam ser associados à sua ação pró-oxidante (Linnane e Eastwood, 2006), a literatura é bem clara no que diz respeito à ação dos antioxidantes enquanto promotores de cardioproteção. Qin *et al.* (2006) mostraram que, mesmo começando o tratamento com vitaminas C e E uma semana depois do procedimento de infarto cicatrizado em coelhos, há diminuição do estresse oxidativo com consequente redução da sinalização para apoptose (redução da Bax, aumento da Bcl-2 e diminuição da clivagem da caspase-9) e manutenção da regulação da bomba de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, proteína importante para a manutenção do transiente de Ca^{2+} na célula, contribuindo para a manutenção da função cardíaca.

A literatura também mostra o efeito de antioxidantes advindos de ervas e plantas na cardioproteção. Um exemplo disso é o trabalho desenvolvido por Li *et al.* (2017), onde cardiomiócitos foram tratados com ginsenosida Rg1, um importante composto bioativo do *Panax ginseng* antes de submetê-los ao protocolo de hipóxia-reoxigenação. O estudo sugeriu uma diminuição dose-dependente dos biomarcadores de apoptose, com diminuição da produção de EROs, manutenção da atividade das enzimas antioxidante SOD, GPx e da concentração de GSH. Estes efeitos estariam associados a um aumento da ativação da proteína Nrf-2, já anteriormente explicada como uma via promotora do aumento da expressão de RNAm associados a enzimas antioxidantes como HO-1 e GPx. O estudo clínico conduzido por Xing *et al.* (2015) verificou a ação cardioprotetora da Anisodamina, um composto derivado da raiz da *Scopolia tangutica*, usada na medicina chinesa para tratamento de distúrbios circulatórios em humanos, após infarto do miocárdio. O estudo sugere que a Anisodamina é capaz de diminuir a área de infarto no miocárdio pela inibição dos mecanismos apoptóticos. Magyar *et al.* (2012) sugeriram que 10 mg de resveratrol, principal composto bioativo da uva em um tratamento de 3 meses de duração, foi

capaz de diminuir os níveis sanguíneos de LDL, prevenir a sua oxidação e melhorar a função ventricular esquerda de pacientes com Doença Arterial Coronariana. Portanto, fica claro que compostos derivados de ervas e plantas podem apresentar um papel importante na cardioproteção.

1.7.1. Erva Mate

A erva mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill) 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). A erva mate (MATE) é conhecida por possuir ação antioxidante, sendo rica 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 realizado por Actis-Goretta *et al.* (2002), mostrando que o MATE, assim como as outras bebidas testadas, tem efeito antioxidante dose-dependente.

O MATE também possui compostos bioativos que podem levar à efeitos adaptógenos, e alguns 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).

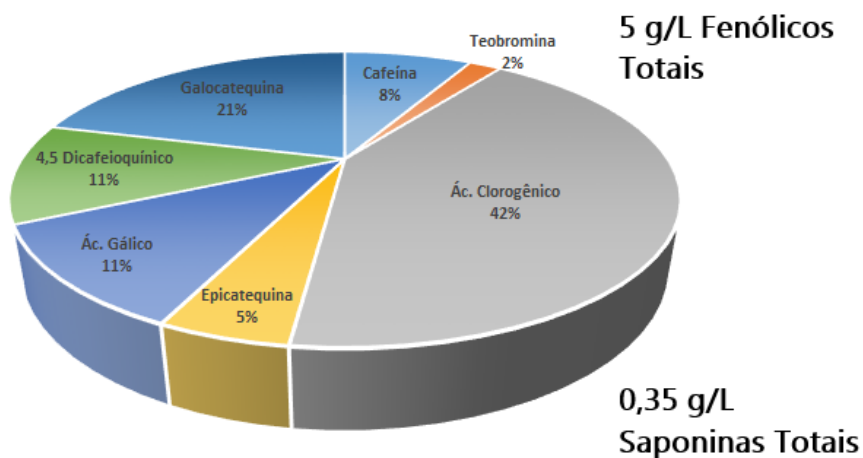


Figura 3 - Figura ilustrativa dos principais compostos do MATE. Adaptado de Bracesco *et al.* (2011).

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. 3). 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 em estudo *in vivo* do mesmo grupo, porém a dose de MATE administrada oralmente não foi divulgada (Gugliucci, 1996). Bracesco *et al.* (2003) verificou que o MATE foi 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 50 g/L e 200 g/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 50 g/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 10 µg/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 150 mg/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 500 mg/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 5 g 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 em leucócitos de mulheres saudáveis. Recentemente, Schinella *et al.* (2014) demonstrou que o MATE, na dose de 250 mg/kg, promoveu efeito anti-inflamatório sistêmico e

tópico, pela redução da inflamação induzida em orelhas e patas de camundongos. O mecanismo proposto 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).

1.7.1.1. Erva Mate e Cardioproteção

O efeito cardioprotetor do MATE foi primeiramente relatado por Schinella, *et al.* (2005), que perfundiram corações isolados de ratos *Wistar* com solução contendo ou não MATE. O grupo de corações perfundidos com solução contendo MATE (30 µg/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 corações a perfusão com solução contendo MATE e MATE + L-NAME, um inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS). Os corações perfundidos com L-NAME + MATE tiveram a performance cardíaca diminuída e a área de infarto aumentada em comparação aos corações perfundidos somente com MATE. Os autores sugeriram que o mecanismo responsável pela cardioproteção induzida pelo MATE está associado ao aumento da atividade da NOS.

O mesmo grupo (Gonzalez Arbelaez *et al.*, 2016) avaliou, no modelo do trabalho anterior, os mecanismos moleculares modulados pelo tratamento local com MATE. O tratamento levou a uma preservação parcial da quantidade de GSH, associada a uma menor peroxidação lipídica. Os autores também acharam um aumento da fosforilação de Akt e eNOS, duas vias associadas com a produção de NO, além de uma diminuição da abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), sugerindo que o tratamento local com MATE promoveu cardioproteção pela regulação positiva da eNOS, que aumentaria a produção de NO que, conseqüentemente, promoveria o aumento da fosforilação da Akt e também modularia negativamente a abertura dos mPTP.

Nesse contexto, em um trabalho recente, nosso grupo demonstrou que ratos pré-tratados com MATE por 7 dias apresentam maior resistência miocárdica contra injúrias de isquemia e reperfusão (Cahuê *et al.*, 2017). Em paralelo, avaliamos também se o consumo do MATE poderia potencializar o efeito cardioprotetor da

atividade física. Nossos resultados mostraram que, isoladamente, treinamento aeróbio leve (exercício de natação) e consumo de MATE (1 g/kg), por 7 dias, induzem cardioproteção contra injúrias de isquemia e reperfusão miocárdica, como pode ser observado na figura 4. Os grupos treinado (E) e tratado com MATE (M) apresentaram maior recuperação pós-isquêmica da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo e menor área de infarto. Contudo, a associação do treinamento aeróbio com a consumo de MATE (E+M) reverteu os efeitos benéficos observados nos tratamentos realizados separadamente.

Uma possível explicação para a melhora dessas variáveis cardíacas nos corações dos ratos dos grupos M e E seria a redução do estresse oxidativo. Contudo, na avaliação do estado redox cardíaco, foi observada alteração significativa na peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas no grupo M em relação a todos os outros grupos experimentais. Este resultado poderia sugerir que o consumo de MATE aumenta o estresse oxidativo em corações de animais sedentários e o treinamento aeróbio se contrapõem a este efeito do MATE. Entretanto, a razão GSH/GSSG, utilizada como padrão de equilíbrio redox, teve aumento significativo no grupo M, sugerindo que o consumo de MATE por sete dias promoveu uma melhora do equilíbrio redox do músculo cardíaco. Não foi observada alterações significativas na atividade da catalase, enquanto a atividade da SOD foi aumentada no grupo E. O consumo do MATE inibiu o aumento da atividade da SOD induzida pelo exercício, sugerindo que a inibição da cardioproteção promovida pelo exercício aeróbio pode estar associada à inibição da atividade da SOD.

2. Problema do Estudo

O tratamento do IAM utiliza terapias de reperfusão e revascularização, tais como fibrinólise, cateterismo coronariano percutâneo e cirurgias de revascularização, com a função de salvar cardiomiócitos da área de risco isquêmico que apresentam danos reversíveis e reduzir a extensão da necrose. Essas intervenções reduzem a mortalidade por IAM (Ferdinandy *et al.*, 2007), entretanto, de forma paradoxal, também causam danos e morte celular, contribuindo para a extensão da área de infarto. Assim, o aumento da capacidade do miocárdio responder às injúrias de isquemia e reperfusão pelo 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 *et al.*, 2014). Em paralelo a atividade física, a suplementação dietética, como por exemplo a ingestão de vitamina C, também vem sendo associada a proteção antioxidante (Rodrigo *et al.*, 2013). 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 avaliaram o uso do MATE através de perfusão de corações isolados. Tendo em vista que a administração oral poderia alterar a estrutura e a biodisponibilidade das moléculas que compõem esta bebida, seria de extrema importância avaliar se os efeitos cardioprotetores sugeridos por Schinella *et al.* (2005) poderiam ser observados também após o consumo do mate.

Os nossos dados anteriores sugerem que o aumento do dano redox promovido pelo consumo de MATE está, em nosso modelo, diretamente associado à cardioproteção e pode ser mediada por vias de sinalização ora relatadas à expressão de RNAm de enzimas antioxidantes. A partir deste cenário, a investigação dos mecanismos moleculares torna-se fundamental para compreender o papel do MATE nos mecanismos de cardioproteção induzida pelo seu consumo e elucidar os mecanismos da inibição da cardioproteção quando há a associação da ingestão de MATE com exercício aeróbio.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é investigar o potencial terapêutico do consumo de MATE, com ou sem associação com exercício aeróbico, em modelo experimental de infarto do miocárdio.

3.2. Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- Selecionar, através de análises dos dados anteriores baseadas em ferramentas de *Data Science*, os possíveis mecanismos associados à cardioproteção induzida pelo consumo de MATE e à inibição da cardioproteção gerada pela interação entre consumo de MATE e prática de exercício aeróbico de baixa intensidade.
- Avaliar o papel do MATE nos mecanismos de cardioproteção induzida pela sua ingesta;
- Investigar os mecanismos da inibição da cardioproteção quando há a associação da ingesta de MATE com exercício aeróbico;

4. Artigo 1

Date: Dec 05, 2018
To: "Verônica P Salerno" vpsalerno@yahoo.com.br
From: Wallace Yokoyama eesserver@eesmail.elsevier.com
Reply To: Wallace Yokoyama wally.yokoyama@ars.usda.gov
Subject: Your Submission

Final acceptance letter
Ms. Ref. No.: JFF-D-18-02577
Title: ILEX PARAGUARIENSIS, EXERCISE AND CARDIOPROTECTION: A retrospective analysis
Journal of Functional Foods

Dear Dr. Verônica P Salerno,

I am pleased to confirm that your paper has been accepted for publication in Journal of Functional Foods. Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

It is very important you now work to inform scientific community about your manuscript as we all want to make sure it gets the attention it deserves. Present the work to conferences and use your personal network to achieve its maximum visibility.

When your paper is published on ScienceDirect, to help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal and I hope you will keep in contact both sending me future valuable manuscripts and also reviewing those of your colleagues in the functional food field.

With kind regards,

Wallace Yokoyama

Associate Editor

Journal of Functional Foods

For further assistance, please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Artigo aceito na revista Journal of Functional Foods (Fator de Impacto 3,47, Qualis Capes A2 nas áreas Medicina I e II) no dia 05/12/2018.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Short communications

Ilex paraguariensis, exercise and cardioprotection: A retrospective analysisFábio Cahue^{a,d}, José Hamilton Matheus Nascimento^c, Luciane Barcellos^b, Veronica P. Salerno^{a,*}^a Laboratório de Bioquímica do Exercício e Motores Moleculares, Escola de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil^b Laboratório de Biologia do Exercício, Escola de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil^c Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Pires de Carvalho, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil^d Programa de Pós-Graduação Strictu-Sensu em Medicina (Cardiologia), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Ilex paraguariensis
Exercise
Cardioprotection
Data science
Oxidative stress
Reductive stress

ABSTRACT

Studies on strategies to generate cardioprotection have been on the rise. Previous work by our group with an *ex vivo* model of ischemia/reperfusion has shown that both short-term consumption of yerba mate (YM) and exercise can each preserve cardiac function independently. Surprising, the two strategies together do not, with apparent loss of their respective cardioprotection activity. To improve our understanding of mechanisms involved without reperforming the experiments, we have conducted a retrospective data science-analysis that have produced new insights. The analysis shows that YM generated reductive stress (RS). RS increased redox damage in heart that appears to have led to a protective conditioning. In combination with exercise, the effects of YM inhibited the intermittent ROS generation promoted by exercise, which diminished the adaptive response in heart. These results suggest that an understanding of molecular mechanisms involved with YM-promoted RS in cardiac tissue could lead to improved strategies to induce cardioprotection.

1. Introduction

Cardioprotective strategies are an important approach to prevent morbidity and death from myocardial infarctions (heart attacks). This is reflected in the increased number of studies on methods to provide protection against ischemia/reperfusion injuries in the heart. A recent search of PubMed, performed 09/05/2018, with “cardioprotection” as the keyword returned 3801 articles since 01/01/2010. This represents a 49% increase over the previous, equivalent period (2536 articles from 2000 to 2009).

Our recent work described the cardioprotective effect of short-term consumption of *Ilex paraguariensis* (St. Hill) (Cahue et al., 2017). The results showed that the daily ingestion of *I. paraguariensis* (1 g/kg) for seven days could promote a protection of cardiac function against a global ischemia/reperfusion (I/R) injury. The measured increases in protein carbonyls and lipid peroxidation in the cardiac tissue of animals provided *I. paraguariensis* suggested a possible oxidative preconditioning mechanism. However, the combination of *I. paraguariensis* consumption with low-intensity aerobic exercise, which is cardioprotective, attenuated the benefits of each. This counteractive effect was proposed to be related to the antioxidant effect of *I. paraguariensis* attenuating the oxidative burst associated with exercise, which inhibited the normally observed increase in superoxide dismutase (SOD) activity that is promoted by exercise.

A slight, but significant increase in the GSH/GSSG ratio in cardiac tissue of rats that consumed *I. paraguariensis* suggested that a pro-oxidative preconditioning could be promoted by its short-term consumption. Here, we have reanalyzed the original data set (Cahue et al., 2017) using data science (DS) methods, which some authors describe as the science that learns from data (Donoho, 2017). The results help clarify possible mechanisms underlying *I. paraguariensis* and exercise induced cardioprotection and the inhibition caused by the interaction between the herb and exercise.

2. Interpreting graphical analysis

Graphics were generated through an online tool, RAWGraphs (<http://app.rawgraphs.io/>), that can utilize raw data. The data from our previous work (Cahue et al., 2017) was extracted, organized and saved in an .csv file to be compatible with RAWGraphs. To preserve the balance in the analyses, which can be influenced by the number of samples per group, a sample size of five was used per group for all. The variables used in all graphical analyses were TBARS (lipid peroxidation), PC (protein carbonyls), SOD (Superoxide Dismutase activity) and GSH/GSSG ratio based on their significance to the results of our previous work.

Three types of graphic representations were built to analyze the data graphically. Parallel Coordinates plots provided an equalized

* Corresponding author.

E-mail address: vpsalermo@yahoo.com.br (V.P. Salerno).<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.008>

Received 9 November 2018; Accepted 5 December 2018

1756-4646/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

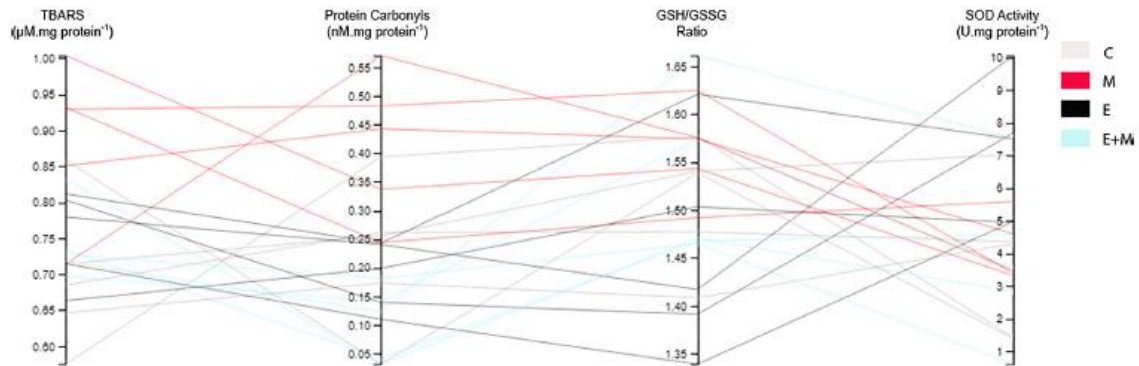


Fig. 1. Parallel Coordinates composed by TBARS, PC, GSH/GSSG Ratio and SOD activity. Black lines – Mate group. Red lines – Exercise Group. Light Blue lines – Exercise + Mate group. Light Grey lines – Control group. For each group n = 5.

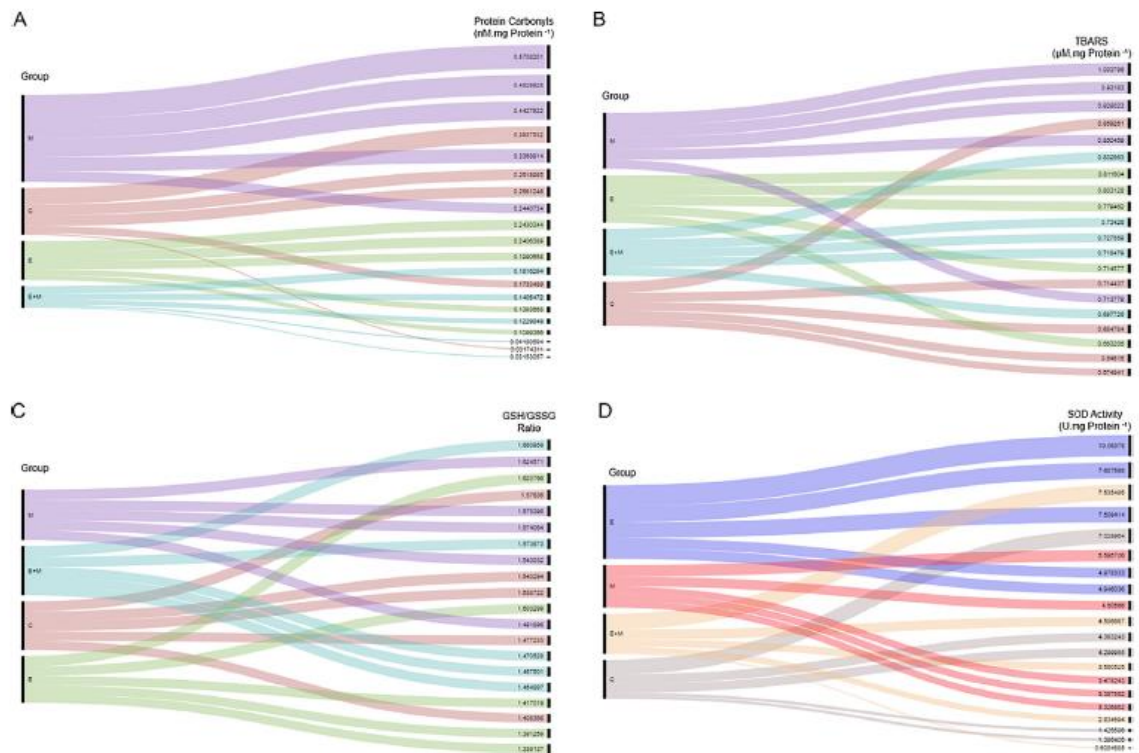


Fig. 2. Alluvial Diagram showing the impact of PC (A), TBARS (B), GSH/GSSG Ratio (C) and SOD activity (D) in each group. The order of group, from top to bottom, reflects the impact of individual values in the respective group. For all graphics, n = 5 for each group.

scaled, multivariable graphic to allow the visualization of patterns in the data. Alluvial Diagrams shows the contribution level of a variable within each group, attributing a “weight” based on a main variable. This graphic displays lines that are ordered from higher (thicker) to lower (thinner) values converging on an impact of values in each group. Finally, a Convex Hull shows, in a dispersion graphic, a polygon-based grouped analysis that helps to understand the behavior of each group when correlating two variables. All three graphics, together, can show patterns that can be used to predict which variables are related with the correspondent outcome (in our case, cardioprotection).

Fig. 1 shows a Parallel Coordinates graphic using redox damage biomarkers, lipid peroxidation (TBARS) and protein carbonylation

level, a redox balance biomarker, reduced/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG), and superoxide dismutase (SOD) activity. We focused our analysis on the mate consumption only group (M; black line) and the exercise training only group (E; red line). An examination of the characteristics of the data lines shows that the samples of the M group displayed higher values of PC, TBARS and GSH/GSSG ratio without a pattern in SOD activity. In samples from the E group, values of SOD activity were higher than those observed in M group, with lower values for PC and TBARS. These observations suggest that *I. paraguariensis*-induced cardioprotection, in our model, must be related with higher redox damage and a slightly higher redox balance.

Panel 2 shows how much impact these variables exerted in each

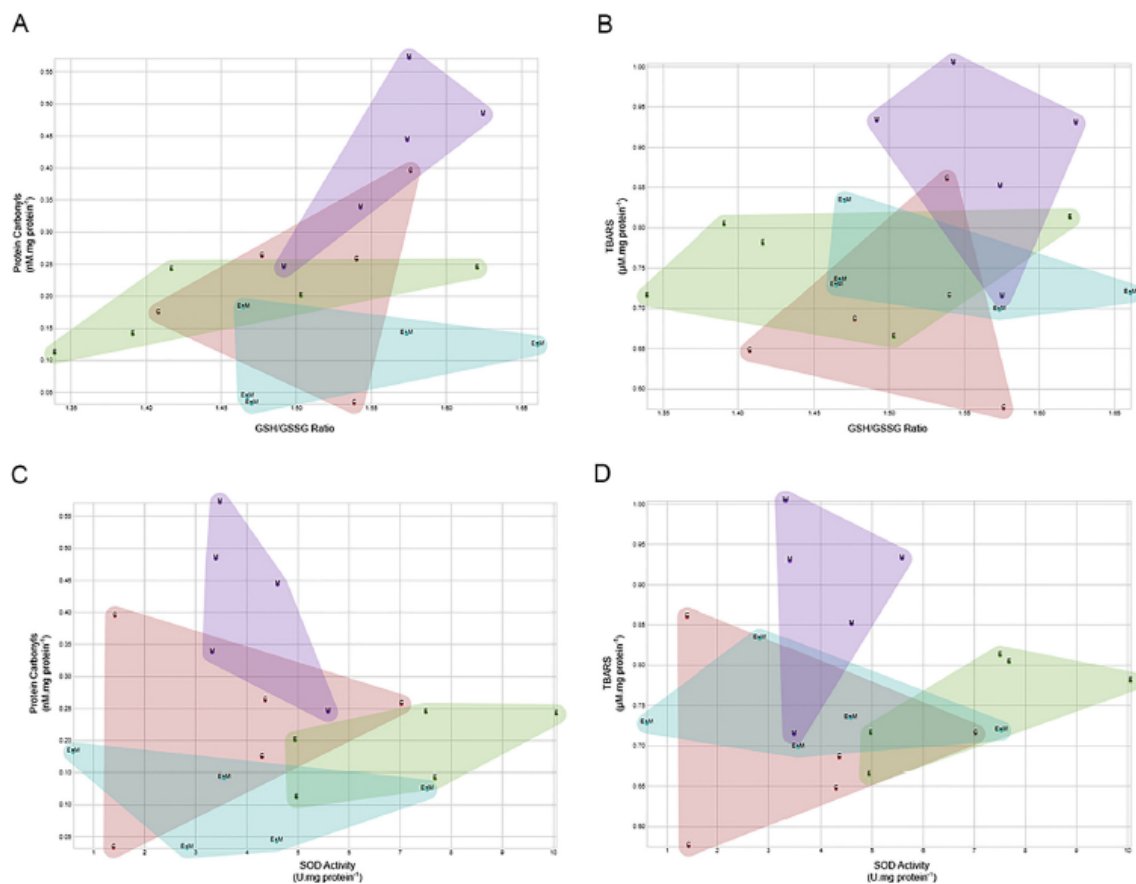


Fig. 3. Convex Hull graphics, correlating PC and TBARS with GSH/GSSG Ratio (3A and 3B), and with SOD activity (3C and 3D). For all graphics, $n = 5$ for each group.

group. Both redox damage biomarkers (PC in Fig. 2A and TBARS in Fig. 2B) and GSH/GSSG ratio (Fig. 2C) had a higher impact in the M group. TBARS had a moderate impact in the E and E + M group, while PC showed a lower impact in E and E + M. In contrast, SOD activity can be observed as a main effect of exercise intervention (Fig. 2D).

In Fig. 3A and B, there can be observed within the M group a pattern with the samples being positioned in the up-right corner representing higher levels of PC (3A), TBARS (3B) and GSH/GSSG ratio, which is consistent with the behavior observed previously (Figs. 1 and 2A and B). To verify the impact of SOD activity in PC and TBARS, we correlated these variables and E group samples showed higher values of SOD activity, accompanied with lower values of PC (Fig. 3C) and TBARS (3D). Group E + M showed lower and intermediate values of SOD activity with lower levels of PC and TBARS, suggesting the antioxidant and inhibitory effect of *I. paraguariensis* consumption on the adaptations from exercise training.

3. A new approach for *Ilex paraguariensis*-mediated cardioprotection

In our previous work, the mechanism we proposed for the cardioprotection qualities of *I. paraguariensis* consumption was through the pro-oxidative effects expected at the concentration provided (Miranda et al., 2008), which could induce a preconditioning adaptation. Another possible explanation to explain the effects observed in our study is reductive stress (RS). The phenomenon of RS was initially associated with

the effects from the large amount of antioxidant, either endogenous or exogenous, which modulated signaling pathways that diminished the antioxidant capacity or mitochondrial function (Passi, Picardo, & Nazzaro-Porro, 1987). Recently, RS has been described to coincide with an increase in the reductive capacity due to a huge increase in ratios of GSH to GSSG, $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ to NAD or NADPH^+ to NADP ratios (Perez-Torres, Guamer-Lans, & Rubio-Ruiz, 2017). It also can occur when an antioxidant compound interacts with other molecules that generates free radicals or improves the production of superoxide.

A prolonged exposure to RS can induce hypertension, DNA damage, apoptosis (Hodnick, Kung, Roettger, Bohmont, & Pardini, 1986), mitochondrial dysfunction and endothelial cell death (Posadino et al., 2013; Posadino et al., 2015). *I. paraguariensis* contains high concentration of phenolic compounds (Bracesco, Sanchez, Contreras, Menini, & Gugliucci, 2011) that can induce to ROS production when they interact with transition metal ions (i.e. copper and iron) or when they are converted into phenoxyl radicals in a high reductive environment (Passi et al., 1987; Decker, 1997). This effect can be related with others already explained in literature. Du, Xiao, Yao, Hao, and Zhao (2017) showed an increase in peroxide production following an increase in NOX4 and p22^{Phox} protein expression in rat mesenteric venules after a single injection of 7 mg/kg chlorogenic acid, a phenolic acid and a major constituent of *I. paraguariensis* (Bracesco et al., 2011). This dose corresponds to a 5-fold increase in the dose indicated by Chinese herbal medicine injection protocols. Murakami et al. (2013) quantified the concentration of phenolic acid in 30 mg/mL of dried

leaves of *I. paraguariensis* and showed a concentration of about 1.99 mg/mL of chlorogenic acid. de Oliveira, Sampaio, Pinto, Catharino, and Bastos (2017) showed an increase of dihydrophenylpropionic acid and hippuric acid (phenolic acids derived from chlorogenic acid metabolism) concentration in liver and plasma 8 h after a single treatment with 2 g/kg of *I. paraguariensis*. In our experimental model we used a dose of 1 g/kg of a commercially prepared lyophilized extract of *I. paraguariensis* (Matte Leão, Curitiba, Brasil). Each animal consumed about 200–300 mg/mL of this extract which represent a phenolic acid concentration between 13–20 mg/mL, which correspond to 9–14-fold the dose indicated in Chinese herbal medicine injection protocols. Thus, it is expected that this higher concentration of yerba mate, for 7 days, could potentiate the reductive environment, inducing to the reductive stress.

The potential of short-term *I. paraguariensis* consumption to induce RS can explain the observed inhibition of cardioprotection when combined with low-intensity aerobic exercise. Several studies have shown similar inhibitory effects from the combination of exercise training and antioxidants supplementation. Gomez-Cabrera et al. (2008) found a negative interaction of vitamin C (500 mg/kg bw/day) and exercise training (5 days per week, 25–25 min per day) for 3 weeks in running capacity and Cytochrome C expression. A combination of 12-week endurance training with vitamins C and E supplementation in humans increased plasma protein carbonyls (Yfanti, Fischer, Nielsen, Akerstrom, Nielsen, Veskokuis, & Pedersen, 2012), which represents a negative effect from their interactions. Our data showed an inhibition of SOD activity in the exercise training group that also consumed *I. paraguariensis*, which resulted in an inhibition of recovery during the reperfusion period. Therefore, our results converge with previous observations in the literature that were exposed by the data science approach. It suggests that there is a negative interaction between antioxidant supplementation and exercise training that impacts myocardial tissue. Further studies are warranted to better understand this phenomenon.

4. Conclusion and a new perspective

The retrospective analysis of data by a data science approach suggests that *I. paraguariensis*-mediated cardioprotection can be explained by a reductive stress. This condition can be responsible for the increased levels of lipid peroxidation and protein carbonyls as well as the inhibition of exercise-mediated cardioprotection. This effect can be mainly attributed to the high concentration of polyphenols contained in yerba mate consumed during the experimental period. Our group continues to concentrate our efforts to understand the molecular mechanisms underlying these effects with a focus on the interaction between the redox damage and the regulation of mRNA expression of genes related to antioxidants and the activity of antioxidant enzymes to clarify how *I. paraguariensis* promotes cardioprotection and inhibits exercise-related protection against I-R injury.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

We would like to thanks to Dr. D. William Provence Jr., that gave a

careful attention to English during revision of the manuscript.

Funding sources

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Bracoco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>.
- Cahue, F., Souza, S., Dos Santos, C. F. M., Machado, V., Nascimento, J. H. M., Barcellos, L., & Salerno, V. P. (2017). Short-term consumption of *Ilex paraguariensis* extracts protects isolated hearts from ischemia/reperfusion injury and contradicts exercise-mediated cardioprotection. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 42(11), 1149–1157. <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0213>.
- de Oliveira, D. M., Sampaio, G. R., Pinto, C. B., Catharino, R. R., & Bastos, D. H. M. (2017). Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of mate tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid. *European Journal of Nutrition*, 56(8), 2541–2556. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1290-1>.
- Decker, E. A. (1997). Phenolics Prooxidants or antioxidants? Retrieved from *Nutrition Reviews*, 55(11 Pt 1), 396–398. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9420450>.
- Donoho, D. (2017). 50 years of data science. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 26(4), 745–766. <https://doi.org/10.1080/10618600.2017.1384734>.
- Du, W. Y., Xiao, Y., Yao, J. J., Hao, Z., & Zhao, Y. B. (2017). Involvement of NADPH oxidase in high-dose phenolic acid-induced pro-oxidant activity on rat mesenteric venules. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(1), 17–22. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3923>.
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F. V., ... Vina, J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 142–149. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.1.142>.
- Hodnick, W. F., Kung, F. S., Roettger, W. J., Bohmont, C. W., & Pardini, R. S. (1986). Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure-activity study. Retrieved from *Biochemical Pharmacology*, 35(14), 2345–2357. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3729991>.
- Mimada, D. D., Arcañ, D. P., Pedrazzoli, J., Jr., Carvalho Pde, O., Cerutti, S. M., Bastos, D. H., & Ribeiro, M. L. (2008). Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*, 23(4), 261–265. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen011>.
- Murakami, A. N., Amboni, R. D., Prudencio, E. S., Amante, E. R., Fritzen-Freire, C. B., Boaventura, B. C., ... Maraschin, M. (2013). Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. *Food Chemistry*, 141(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.119>.
- Passi, S., Picardo, M., & Nazzaro-Porro, M. (1987). Comparative cytotoxicity of phenols in vitro. Retrieved from *The Biochemical Journal*, 245(2), 537–542. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822025>.
- Perez-Torres, I., Guarnier-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), <https://doi.org/10.3390/ijms18102098>.
- Posadino, A. M., Cossu, A., Giordo, R., Zinellu, A., Sotgia, S., Vardeu, A., ... Pintus, G. (2013). Coumaric acid induces mitochondrial damage and oxidative-mediated cell death of human endothelial cells. *Cardiovascular Toxicology*, 13(3), 301–306. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9205-3>.
- Posadino, A. M., Cossu, A., Giordo, R., Zinellu, A., Sotgia, S., Vardeu, A., ... Pintus, G. (2015). Resveratrol alters human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.01.017>.
- Yfanti, C., Fischer, C. P., Nielsen, S., Akerstrom, T., Nielsen, A. R., Veskokuis, A. S., ... Pedersen, B. K. (1985). Role of vitamin C and E supplementation on IL-6 in response to training. *Journal of Applied Physiology*, 112(6), 990–1000. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01027.2010>.

5. Materiais e Métodos

5.1. Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, saudáveis, com dois meses de idade, pesando 250 ± 50 gramas, mantidos em ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C) com ciclo claro/escuro de 12 horas invertido. A ração e a água foram mantidas *ad libitum* durante todo o período de experimentação. 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.

5.2. Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: sedentário controle (C), sedentário + suplementação com MATE (M), treinamento controle (E) e treinamento + suplementação com MATE (E+M) (n=5 para cada grupo). Os animais dos grupos C e E foram tratados oralmente via gavagem com veículo (água, 1 mL), enquanto os animais dos grupos M e E+M receberam a dose de 1 g/kg do peso corporal de MATE, diluídos em 1 mL de água. 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). A forma de treinamento escolhida para este experimento foi a natação.

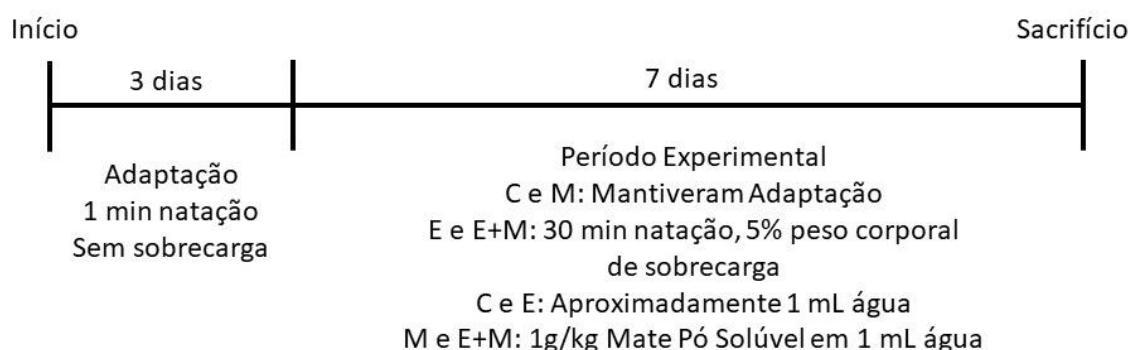


Figura 4 - Demonstrativo gráfico da linha experimental.

Como mostrado na Figura 4, antes do treinamento todos os animais foram adaptados ao exercício de natação durante 3 dias consecutivos, 1 min por dia. Os

animais dos grupos C e M foram submetidos ao protocolo 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. Após 24 horas do último dia da linha experimental os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação.

5.3. Homogeneização do Tecido Cardíaco

Para a coleta e armazenamento 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.

O método descrito por Dahlman e Guttredge (2011) foi utilizado para a preparação do tecido cardíaco para as análises de proteínas pelo método de Western Blotting. Foi homogeneizado, em gelo, 20mg de tecido em 180µL de tampão de baixo sal (10 mM HEPES pH 7,6, 10mM KCl, 1,5mM MgCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 1mM DTT, 0,5mM PMSF, 50uL Cocktail de Inibidores de Protease (Roche, EUA) e 0,5mg/mL benzamidina). O homogenato foi incubado em gelo por 5 minutos e então submetido a incubações seriadas, por 3 vezes, em freezer -80 °C por 5 minutos e em banho maria a 37 °C por 1 minuto. Após cada ciclo de incubação as amostras foram vortexadas em velocidade média por 5 segundos. Após este ciclo de incubação as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 3 minutos, 4 °C) e o sobrenadante, com o conteúdo citoplasmático, foi retirado e armazenado em freezer -80 °C para as análises posteriores. O *pellet*, com o conteúdo nuclear, foi ressuspenso em tampão de alto sal (20mM HEPES pH 7,6, 420mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 25% glicerol, 1mM DTT, 5uL Cocktail de inibidores de proteases (Roche, EUA)) na razão de 1 mg de tecido originalmente homogeneizado para 4µL de tampão e uma nova incubação de 30 minutos foi realizada, com leve agitação a cada 10 minutos. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas (13000 rpm, 5 minutos, 4 °C). O sobrenadante com o conteúdo nuclear foi transferido para tubos previamente resfriados e armazenados em freezer -80 °C para análises posteriores.

5.4. Western Blotting

O homogenato de tecido cardíaco foi diluído em tampão de solubilização Laemmli (BioRad, EUA) para uma concentração final de 10 µg de proteína, o qual foi aplicado em gel gradiente de poliacrilamida (10 a 12%, p/v). A eletroforese foi realizada a 4 °C por 60 minutos, em uma voltagem fixa de 100V e amperagem mínima de 20mA em solução de corrida SDS-PAGE (190mM Glicina, 25mM Tris, 0,1% SDS). Todos os géis continham uma linha onde foi aplicado o padrão de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (BioRad, EUA). Após a eletroforese os géis foram direcionados para coloração em solução de azul de Coomassie (1,25g azul de Coomassie, 225mL metanol, 50mL ácido acético e 225 mL H₂O ultrapura) ou para transferência, utilizando membranas de PVDF, previamente hidratadas em solução de transferência (80% de solução contendo 25mM Tris-Base e 190mM Glicina para 20% etanol). A transferência foi realizada a 4 °C, em voltagem mínima de 100V e amperagem fixa de 200mA por 2 horas.

Após a transferência, as membranas foram coradas em solução Ponceau (ATX Ponceau S *red staining solution*, Fluka Analytical, EUA), diluída em água ultrapura conforme recomendação do fabricante, para a confirmação das transferências, descoloradas por solução TBS (20 mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl) e submetidas ao bloqueio com solução contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA) diluídos em TBS. As membranas permaneceram em solução de bloqueio por, pelo menos, 12 horas. Após esta etapa as membranas foram lavadas por 3 vezes com solução TBS-T (20 mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) e encubadas por 24 horas em anticorpo primário das proteínas de interesse (Nrf2 - sc-722 – Santa Cruz Biotechnologies, EUA; Keap1 - sc-15246 – Santa Cruz Biotechnologies, EUA), na diluição de 1:2000 em solução TBS contendo 3% BSA. Após mais 3 lavagens com TBS-T, as membranas foram encubadas por 2 horas com anticorpos secundários *anti-rabbit* (cat # 925-68071; LI-COR, EUA), *anti-goat* (cat # 925-32219; LI-COR, EUA) e *anti-mouse* (cat # 925-32210; LI-COR, EUA) diluídas na proporção 1:10000 (v/v). As membranas, finalmente, foram lavadas novamente por 3 vezes com solução TBS-T e uma vez com solução TBS para, então, serem escaneadas pelo *scanner* de infravermelho Odyssey (LI-COR, EUA). As proteínas foram quantificadas através do *software* ImageJ (Nacional Institute of Health, EUA, versão 1.48), tendo como controle de carregamento citoplasmático a proteína GAPDH (sc-47724 - Santa Cruz

Biotechnologies, EUA) e como controle de carregamento nuclear a banda mais densa verificada na coloração por solução de Ponceau (~37-45 KDa).

5.5. Quantificação da Expressão de RNAm

Para verificar se o exercício associado ou não ao consumo de MATE modula a expressão de RNAm relacionados à cardioproteção foi utilizado o método quantitativo (qRT-PCR).

5.5.1. Extração de RNA e Transcrição Reversa

Para extração do RNA, foi utilizado 30mg de tecido cardíaco que foi homogeneizado em tampão de lise com kit comercial (ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System, Promega, EUA), seguindo as instruções determinadas pelo fabricante.

A transcrição reversa do RNA (0.5 µg) em cDNA foi feita através do kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems, Thermo Fisher, EUA) seguindo as especificações do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado para amplificação dos genes dos RNAm de interesse.

5.5.2. Desenho dos Primers

Os primers foram obtidos através de ferramenta *online* disponível no sítio eletrônico da empresa IDT – Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR>). Primeiramente foi verificado o código do gene de interesse no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Após esta etapa os códigos foram inseridos na ferramenta citada anteriormente para se obter o desenho, senso e reverso, de cada gene de interesse. Para confirmar se o desenho estava de acordo com gene de interesse foi utilizada a ferramenta *online* Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), inserindo os desenhos, senso e reverso.

5.5.3. Teste de Eficiência dos Primers

Para avaliar a eficiência dos primers desenhados para os alvos de interesse, uma curva de diluição seriada (1:5) da amostra foi realizada, com o gradiente de concentração variando de 25 ng/µL a 0,2 ng/µL. As diferentes concentrações de

amostra foram amplificadas por qRT-PCR em um mix contendo 7,5 μ L *Go Taq® PCR Master Mix* (Promega, EUA), 0,6 μ L da mistura de primers senso e reverso a 10 μ M e 0,9 μ L de amostra diluída em água livre de RNAses.

A ciclagem de temperaturas foi: uma etapa inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto para todos os primers, no equipamento *Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR System*. A análise da curva padrão foi usada no cálculo da eficiência: $E=10(-1/\text{slope})-1$. Primers com eficiências de amplificação entre 90 e 100% foram consideradas ideais para o ensaio com as amostras controle e experimentais.

5.5.4. Ensaio de qRT-PCR

Para realizar a análise da expressão relativa o cDNA das amostras foi diluído a 5 ng/ μ L e 1 μ L foi utilizado na reação de amplificação juntamente com 7,5 μ L de *Go Taq® PCR Master Mix*, 0,6 μ L da mistura de *primers* senso e reverso na concentração de 10 μ M e 4,9 μ L de água. As amostras foram amplificadas em duplicata nas temperaturas validadas no experimento de eficiência. Para o cálculo da expressão relativa o controle endógeno utilizado foi o gene *Gapdh* e o método de análise utilizado foi o $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A lista com as sequências dos primers pode ser vista na tabela 2.

Tabela 2 - Desenho, senso e reverso, dos primers utilizados neste estudo.

Gene	Senso	Reverso
<i>Nfe2l2</i>	GCTATTTTCCATTCCCGAGTTAC	ATTGCTGTCCATCTCTGTCAG
<i>Keap1</i>	AATGCTATGACCCAGACACTG	CAGGTAGTCCAAGTGCTTCAG
<i>Hmox1</i>	CTTTCAGAAGGGTCAGGTGTC	TGCTTGTTTCGCTCTATCTCC
<i>Catalase</i>	CAAGCTGGTTAATGCGAATGG	TTGAAAAGATCTCGGAGGCC
<i>Sod1</i>	TGTGTCCATTGAAGATCGTGTG	CTTCCAGCATTTCAGTCTTTG
<i>Sod2</i>	GGACAAACCTGAGCCCTAAG	CAAAGACCCAAAGTCACGC
<i>Gpx1</i>	AATCAGTTCGGACATCAGGAG	GAAGGTAAAGAGCGGGTGAG
<i>Gpx3</i>	CAGCTACTGAGGTCTGACAG	ACTAGGCAGGATCTCCGAG
<i>Nox2</i>	CCATTCACACCATTGCACATC	CGAGTCACAGCCACATACAG
<i>Gapdh</i>	CCATCAACGACCCCTTCATT	GACCAGCTTCCCATTCTCAG

5.6. Atividade da Glutathione Peroxidase

A atividade da enzima Glutathione Peroxidase foi verificada através de uma adaptação do protocolo descrito por Flohé e Gunzler (1984). Foram pipetadas em uma cubeta de quartzo de 1 mL 833 μ L de tampão KPE (0,1M tampão fosfato + 1mM EDTA, pH 7,0), 10 μ L de amostra, 50 μ L de solução de Glutathione Redutase contendo 0,24 U diluído em tampão fosfato pH 7,0, 50 μ L de 10 mM GSH e 15 μ L 1,5mM NADPH. A reação foi iniciada após a inclusão de 2 μ L de 12 mM t-butil hidroperóxido e a leitura foi executada por 2 minutos em um comprimento de onda de 340 nm com a cubeta encubada a 37°C. Para quantificar o resultado foram utilizados os *slopes* de decaimento da absorbância usando o coeficiente de extinção molar do NADPH.

5.7. Dosagem de Proteína

A dosagem de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976).

5.8. Análise Estatística

Para a realização da análise estatística foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) em duas vias. Quando conveniente, foi utilizado o pós-teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta para comparações com o grupo controle (C). A taxa de falsa descoberta determinada foi de $Q=0,05$ e a comparação foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. O Consumo de MATE e o Exercício Aeróbio de Baixa Intensidade em Curto Período Modula a Interação Nrf2-Keap1

Como foi verificado anteriormente (Cahuê et al, 2017), o consumo de MATE por sete dias, na dose de 1g/kg peso corporal aumentou o dano redox no tecido cardíaco. Como foi discutido no artigo 1, este aumento pode ser causado por um aumento do ambiente redutor, pela alta capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos (principalmente os ácidos clorogênicos). Uma hipótese levantada é que este dano redox poderia estar associado à um aumento da ativação da proteína Nrf2. O exercício físico, já é descrito como um promotor de ativação da Nrf2 pelo aumento da produção de EROs de forma intermitente.

Para verificar se estas intervenções estão associadas ao aumento da ativação desta proteína realizamos a dosagem em frações citoplasmática e nuclear, além da dosagem citoplasmática da proteína Keap1, responsável pelo direcionamento da Nrf2 para a poliubiquitinação. Como mostra a figura 5, todas as intervenções diminuíram significativamente a quantidade da fração citoplasmática de Nrf2 em relação ao grupo controle (A), sem alterações na fração nuclear (B) ou na quantidade citoplasmática de Keap1 (C).

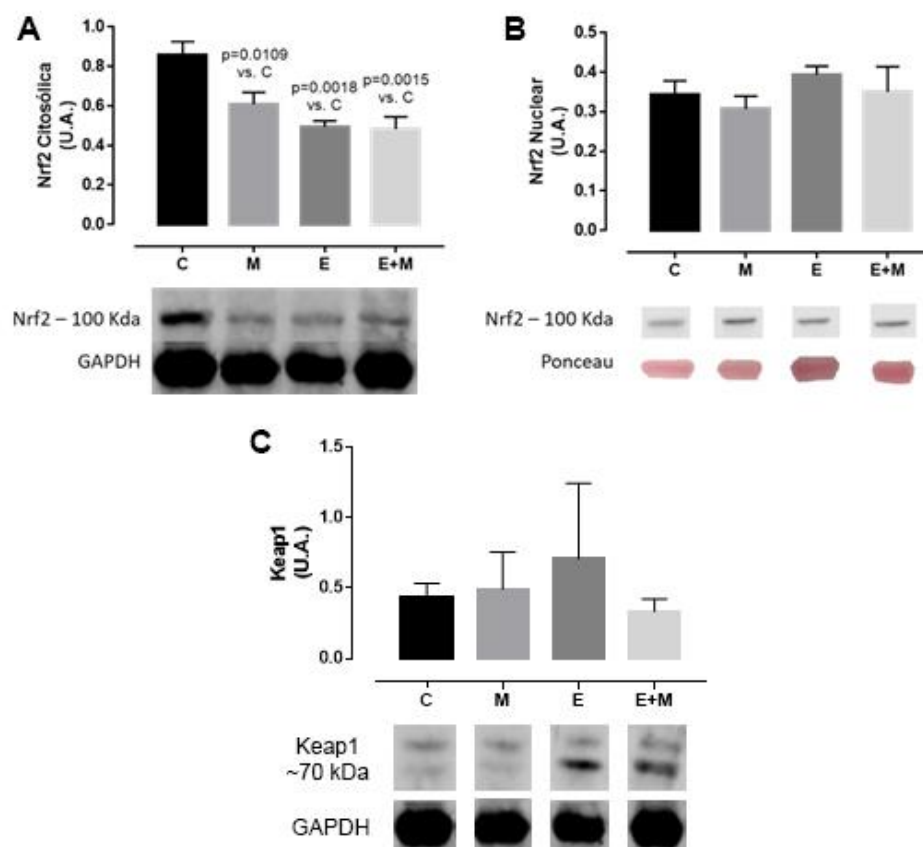


Figura 5 - Quantificação das proteínas Nrf2 e Keap1 por Western Blotting. (A) Quantificação de Nrf2 na fração citoplasmática. (B), Quantificação de Nrf2 em fração nuclear. (C) Quantificação de Keap1 em fração citoplasmática. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

6.2. O Consumo de MATE Aumenta a Expressão de Nfe2l2 e Keap1

A ativação da Nrf2 modula positivamente a expressão do seu gene correspondente (Nfe2l2) e também do gene associado à sua proteína inibidora, Keap1 (Sharath Babu *et al.*, 2017). Para verificar se a diminuição da fração citoplasmática de Nrf2 avaliada nos grupos experimentais estaria associada a regulação de seu gene correspondente, avaliamos a expressão de RNAm de Nfe2l2 e Keap1. Houve um aumento estatisticamente significativo na expressão gênica de Nfe2l2 (figura 6A) com uma tendência a aumento do gene Keap1 (figura 6B, $p=0,0893$ vs. C), sugerindo que, apesar de as intervenções diminuírem a quantidade citoplasmática de Nrf2 (o que

pode sugerir sua translocação para o núcleo), somente o consumo de MATE foi capaz de modular a expressão gênica dos seus genes

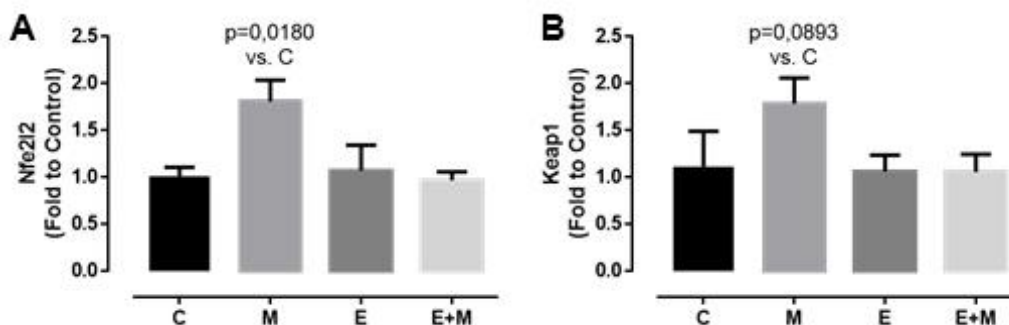


Figura 6 - Quantificação de RNAm dos genes Nfe2l2 (Nrf2) e Keap1 dos grupos experimentais. (A) Expressão de RNAm do gene Nfe2l2 (Nrf2). (B) Expressão de RNAm do gene Keap1. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

6.3. O Consumo de MATE Aumenta a Expressão de Genes Associados à Ativação da Nrf2

O aumento da expressão do gene Nfe2l2 está associado ao aumento de expressão de enzimas antioxidantes de segunda fase, como HO-1, GPx, dentre outras. Para avaliar esta relação no modelo utilizados neste trabalho, a expressão de RNAm de genes associado a enzimas antioxidantes, que podem estar relacionados à ativação de Nrf2, foram avaliadas.

Os RNAm dos genes Sod1 (Fig. 7A), Gpx1 (Fig. 7E) e Gpx3 (Fig. 7F), os quais estão associados a ativação da Nrf2, sofreram um aumento estatisticamente significativo no grupo M quando comparados ao grupo controle. Este dado sugere que há aumento na ativação da Nrf2, corroborando com o aumento da expressão de RNAm do gene Nfe2l2 (Fig. 6). O aumento na expressão dos genes associados a síntese de enzimas antioxidantes, pode ser responsável pela cardioproteção observada no estudo anterior (Cahuê *et al*, 2017). Houve uma tendência ($p=0,053$) à redução da expressão do gene Gpx3 no grupo E+M quando comparado com o grupo controle, sugerindo que esta pode ser uma resposta associada à inibição da cardioproteção verificada quando as intervenções (consumo de MATE e exercício aeróbio de baixa intensidade) são associadas. Não foram observadas diferenças

estatisticamente significativas quando analisados os genes Sod2 (Fig. 7B), Hmox1 (Fig. 7D) e Catalase (Fig. 7C).

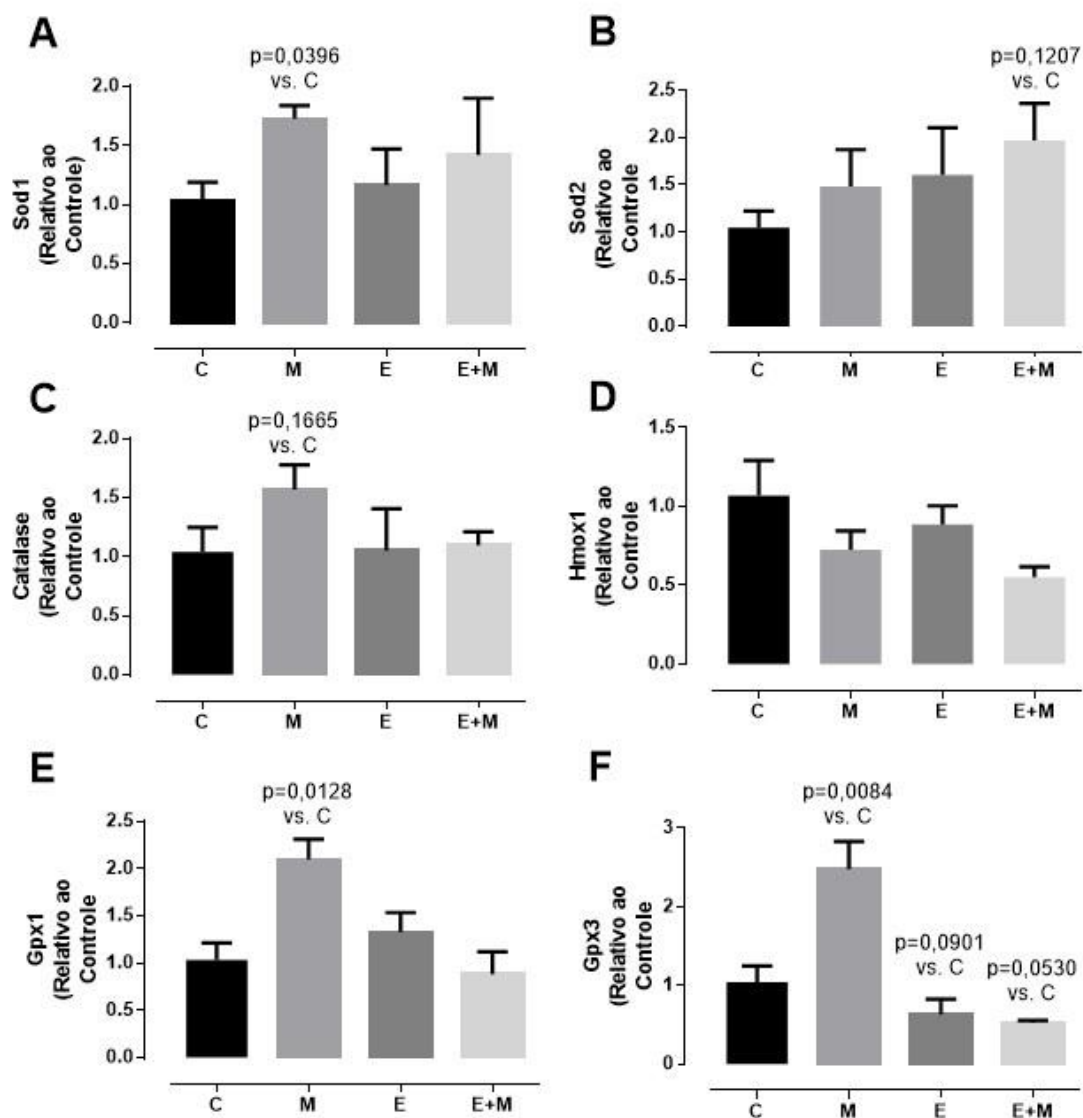


Figura 7 - Expressão de RNAm associadas a enzimas antioxidantes. (A) Sod1, (B) Sod2, (C) Catalase, (D) Hmox1, (E) Gpx1 e (F) Gpx3. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

6.4. O Exercício Físico Reduz a Expressão de Nox2

Em situações onde há o aumento de estresse oxidativo ou redutor, uma das causas associadas ao aumento da expressão de RNAm de Nfe2l2 é o aumento da

expressão de RNAm de Nox2 e Nox4. Para verificar se os tratamentos estariam associados a regulação deste gene, avaliamos a expressão de RNAm de Nox2 e, como pode ser visto na figura 8, o grupo E teve redução significativa da expressão de Nox2 comparado ao grupo controle.

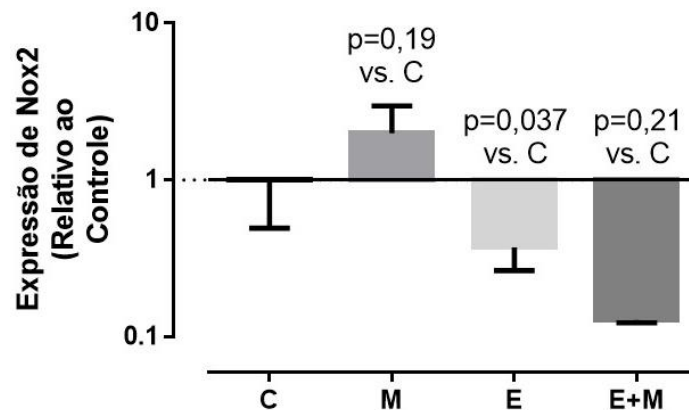


Figura 8 - Expressão de RNAm de Nox2. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

6.5. A Atividade da Glutathiona Peroxidase é Reduzida Pelos Tratamentos Experimentais

Ao encontrar um aumento significativo da expressão de RNAm de Gpx1 e Gpx3, a avaliação da atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx) se fez necessária para verificar uma possível associação entre atividade enzimática e expressão gênica. No entanto, como pode ser visto na figura 9, todos os tratamentos experimentais reduziram significativamente a atividade da GPx em relação ao grupo controle.

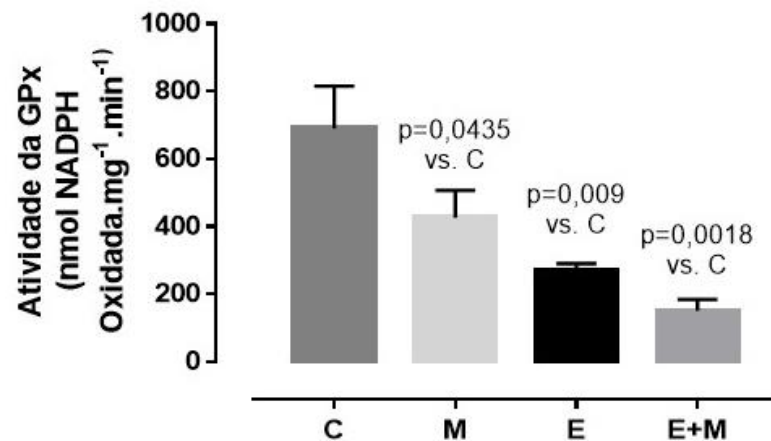


Figura 9 - Atividade da enzima Glutationa Peroxidase. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

7. Discussão

Nosso trabalho anterior (Cahuê *et al.*, 2017) foi o primeiro a sugerir que o consumo de MATE, na dose de 1g, por curto período de tempo (7 dias), é capaz de promover cardioproteção e que a associação desta erva com a prática de exercícios aeróbios de baixa intensidade pelo mesmo período atenua a cardioproteção induzida pelo exercício físico. Um dos objetivos do presente trabalho é o de elencar um mecanismo molecular associado aos efeitos observados. Discutiremos estes efeitos separadamente.

7.1. Mate, Cardioproteção e Estresse Redutor

Depois de uma revisita aos dados obtidos no primeiro experimento pudemos observar um comportamento associando maiores níveis de dano redox (peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas) com valores levemente maiores da razão GSH/GSSH e menores valores associados à atividade da superóxido dismutase (SOD) no grupo tratado com MATE (Artigo 1). Uma situação, pouco explorada na literatura, que poderia explicar pelo menos em parte este conjunto de associações é o chamado estresse redutor que pode estar associado a alta quantidade de antioxidantes no meio celular.

O MATE contém alta concentração de ácido clorogênico, um ácido fenólico que possui alta capacidade antioxidante (Bracesco *et al.*, 2011). Estes compostos podem, quando em alta concentração em um meio biológico, interagir com metais de transição como cobre e ferro e serem então convertidos à radical fenoxil (Passi *et al.*, 1987; Decker, 1997). Este fenômeno pode explicar alguns achados na literatura. Du *et al.* (2017) verificaram um aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com um aumento na expressão proteica de NOX4 e p22^{phox} em artéria mesentérica de ratos após uma única injeção com 7 mg/mL de ácido clorogênico, o que equivale a cinco vezes o recomendado pelo Protocolo de Injeção de Remédios à Base de Ervas Chinesas. Murakami *et al.* (2013) acharam uma concentração de 1,99 mg/mL de ácido clorogênico em um preparado de folhas secas de MATE na concentração de 30mg/mL. De Oliveira *et al.* (2017) mostraram, em ratos, um aumento da concentração hepática e sérica dos ácidos hipúrico e dihidrofenilpropionico, metabólitos finais do ácido clorogênico, 8 horas após a ingestão de 2g/kg peso corporal de MATE. Em nosso primeiro experimento utilizamos a dose de 1g/kg peso corporal, o que é equivalente à 1,5L de uma solução caseira (Miranda *et al.*, 2008) e que, se correlacionado com os estudos citados anteriormente, pode ser associado a uma alta dose.

Sabendo que o dano redox promovido pelo MATE pode estar associado a ativação da proteína Nrf2, verificamos, em frações citosólica e nuclear, a quantidade desta proteína e, de fato, houve uma diminuição significativa da Nrf2 em fração citosólica no grupo M em relação ao grupo controle, sem modificação significativa na fração nuclear. Quanto à proteína Keap1, não houve alterações associadas aos tratamentos quanto ao conteúdo citoplasmático. Esta manutenção do conteúdo nuclear de Nrf2 não necessariamente está associada com sua ativação, já que trabalhos anteriores observaram que Keap1 pode regular a quantidade de Nrf2 nuclear e, para que esta proteína tenha sua quantificação nuclear aumentada também deve-se haver síntese protéica *de novo* (Itoh *et al.*, 2003). Além disso, a Nrf2, em ambiente nuclear, ainda está suscetível à degradação, contudo a velocidade desta degradação pode ser menor quando comparada a velocidade da degradação do complexo Nrf2-Keap1 por poli-ubiquitinação. Com isso verificamos a expressão de RNAm de Nfe2l2 e Keap1, os genes associados à síntese de Nrf2 e Keap1, e houve um aumento estatisticamente significativo da expressão de Nfe2l2, com uma

tendência à aumento da expressão de Keap1. Diversos trabalhos associam o aumento da expressão de Nfe2l2 (Nrf2) com cardioproteção em experimentos de injúria por IR (Cominacini *et al.*, 2015; Handy e Loscalzo, 2017; Nishida *et al.*, 2017), com isso podemos sugerir que o consumo de MATE, em nosso modelo experimental, induz à cardioproteção pela ativação da Nrf2.

Alguns trabalhos sugerem que o aumento da ativação da Nrf2 no miocárdio por estresse redutor estaria associado ao aumento da expressão das isoformas da NADPH Oxidase (NOXs) Nox2 e Nox4. A hiper-expressão de Nox4 em cardiomiócitos de camundongos leva ao aumento da ativação da Nrf2 e aumento da expressão de seus genes alvo e a geração de EROs pelas NOXs leva à ativação da ERK-1, que potencializa a ativação da Nrf2 (Brewer *et al.*, 2013). Neste trabalho a expressão da Nox2 não sofreu alteração estatisticamente significativa ($p=0,19$) no grupo M, contudo vale ressaltar o comportamento de aumento da expressão deste gene, que pode ter relação com a ativação da Nrf2 vista também neste trabalho.

O aumento da expressão de Nfe2l2 (Nrf2) leva a um aumento da expressão de RNAm associado a enzimas antioxidantes de segunda fase, como Hmox (HO-1), Sod1, Gpx e Gcl. Ao avaliarmos a expressão de RNAm de alguns destes genes, o grupo M demonstrou um aumento na expressão dos genes Sod1, Gpx1 e Gpx3, sem mudanças na expressão gênica de Hmox e Catalase. Em nosso primeiro trabalho foi observado um pequeno aumento no balanço redox, pela razão GSH/GSSG, no grupo M em comparação ao grupo E. O genes Gpx1 e Gpx3, associados às isoformas intracelular e extracelular da enzima Glutathiona Peroxidase, respondem positivamente ao aumento da produção de H₂O₂ (Forgione *et al.*, 2002) e estariam, em particular a Gpx1, associados à cardioproteção contra insultos por I/R (Maulik *et al.*, 1999). Apesar de haver diminuição da atividade da GPx em nosso desenho experimental, o aumento da expressão de RNAm de Gpx1 e Gpx3 pode sugerir uma adaptação ao estresse redutor. Babu *et al.* (2006) não viram alteração na atividade da GPx em coração de animais saudáveis tratados com chá-verde por 6 semanas. Rajasekaran *et al.* (2007) mostraram que uma mutação na α B-Cristalina em humanos leva ao estresse redutor e uma das situações associadas é o aumento da expressão de Gpx3. Yeh *et al.* (2009) encontrou, após 14 dias de tratamento com ácidos fenólicos em ratos Sprague-Dawley, aumento na expressão de Nrf2, com consequente aumento na quantidade

proteica de GPx, CuZnSOD (SOD1) e Catalase no tecido cardíaco. Os autores também observaram um aumento no balanço redox destes animais, sugerindo que o tratamento com ácidos fenólicos pode ativar esta via, potencializando o ambiente redutor celular em tecido cardíaco, o que resultaria em cardioproteção após insulto por I/R.

7.2. A Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e a Diminuição da Expressão de Nox2 Explicam a Cardioproteção Induzida pelo Exercício e o Uso de MATE Associado ao Exercício Inibe as Adaptações Associadas às Intervenções

A cardioproteção promovida pela prática regular de exercícios físicos é bem descrita na literatura (Hamilton *et al.*, 2003; Soufi *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2014). Hamilton *et al.* (2003) sugeriram que 5 dias de exercícios aeróbios de baixa intensidade promove cardioproteção pelo aumento da atividade da SOD, sem aumento de atividade da Catalase ou da GPx, em tecido cardíaco. O mesmo achado foi visto em nosso trabalho, que observou a cardioproteção após injúria por I/R depois de 7 dias de exercícios aeróbios em intensidade semelhante a utilizada por Hamilton em 2003. A associação do uso de antioxidantes com a prática regular de atividades físicas pode gerar inibição dos efeitos associados ao exercício físico. Gomez-Cabrera *et al.* (2008) sugeriram um efeito negativo da associação da Vitamina C (500 mg/kg peso corporal/dia) com o exercício aeróbio (5 dias/semana, 25-25 minutos/dia) por 3 semanas na capacidade aeróbia e na expressão de citocromo C. Nosso trabalho anterior verificou uma tendência à diminuição ($p=0,053$ na comparação do grupo E+M com o grupo controle) da atividade da SOD, o que poderia estar associado a soma das intervenções. Neste trabalho investigamos a atividade da GPx e observamos uma redução em todos os grupos experimentais quando comparado com o grupo controle. A literatura é inconclusiva a respeito da resposta desta enzima após o período de treinamento. Gul *et al.* (2006) analisaram a resposta das enzimas antioxidantes em corações de ratos machos Sprague-Dawley submetidos a treinamento aeróbio (até 2,1 km/h, 90 minutos por dia, 5 vezes por semana, por 8 semanas) ou a exercício aeróbio exaustivo (até 2,1 km/h até a exaustão) e ambas as condições levaram a uma diminuição da atividade da GPx. Powers *et al.* (1998) não verificaram nenhuma alteração na atividade da GPx após 10 semanas de atividade aeróbia (30-90 minutos

em esteira, 25-30 m/min, 0-18% inclinação, 4 vezes por semana) em ratos fêmeas Sprague-Dawley. Outro estudo, do mesmo grupo (Lennon *et al.*, 2004), não encontraram qualquer alteração na atividade enzimática de GPx em corações de ratos Sprague-Dawley machos após 5 dias de exercícios aeróbios, independente da intensidade (55% ou 75% VO₂ máximo). Corroborando esses resultados, um trabalho mais antigo mostrou aumento na atividade desta enzima em coração de ratos Fisher-366 após 10 semanas de treinamento aeróbio (15-30 minutos, periodizado, aumentando velocidade entre 8,2 e 30,3 m/min, 6° de inclinação). Estes dados sugerem que o resultado pode estar associado à espécie utilizada no experimento, ao sexo do animal, ao modelo de exercício aeróbio escolhido ou à intensidade escolhida para o desenho experimental de cada estudo.

Para verificar se esta resposta também estaria associada à ativação da Nrf2 comparamos a quantificação proteica desta proteína em frações citoplasmática e nuclear de tecido cardíaco e, assim como visto com o grupo M, também houve diminuição da Nrf2 em fração citosólica nos grupos E e E+M quando comparada com o grupo controle. Contudo, quando analisadas as expressões de RNAm dos genes associados a essas proteínas, não houve diferença estatística entre os grupos E e E+M e o grupo controle. Este padrão se manteve quando comparamos as expressões de RNAm dos genes Hmox, Catalase, Sod1, Sod2 e Gpx1, contudo, quando analisada a expressão do gene Gpx3, verificou-se uma tendência ($p=0,053$) à queda quando comparados os grupos E+M e C. Com relação à manutenção da expressão de Nfe2l2 nos grupos que realizaram exercício aeróbio, trabalhos sugerem que o aumento da expressão deste gene seria em resposta a cada sessão de exercício, e que este aumento poderia ser visto até 2 horas após a sessão (Malaguti *et al.*, 2009; Gounder *et al.*, 2012; Merry e Ristow, 2016), o que também explicaria, ao menos em parte, a manutenção da expressão dos genes modulados pela expressão de Nfe2l2.

A aparente diminuição da expressão de Gpx3 e da atividade enzimática de GPx no grupo E+M pode estar associado à ação antioxidante do MATE, haja visto que o consumo do preparado da erva era induzido 30 minutos antes, tempo suficiente para que haja biodisponibilidade de grande parte dos ácidos fenólicos compostos na erva (De Oliveira *et al.*, 2017). Este aumento da disponibilidade de antioxidantes momentos antes da prática de atividade aeróbia de baixa intensidade poderia tamponar a

produção de EROs, que é aumentada durante a atividade, e considerada de extrema importância para adaptação do sistema antioxidante. Esta inibição poderia ser mantida por um longo período de tempo, visto que a concentração de compostos bioativos do mate se mantem por até 8 horas, como mostrado por De Oliveira *et al.* (2017).

Outra resposta associada à prática de exercícios aeróbios é a diminuição da expressão e atividade das NOXs, principalmente a isoforma Nox2. Este fenômeno é comumente associado à diminuição da produção de EROs, principalmente durante os primeiros minutos de reperfusão pela facilitação da entrada de neutrófilos, dada a alta produção de ânion superóxido pelas mitocôndrias (Zhou *et al.*, 2015). Lee *et al.* (2015) verificou uma diminuição da atividade da NOX2, somada a diminuição da quantidade das proteínas reguladoras p47^{phox} e gp91^{phox} após 12 semanas de treinamento aeróbio (45 minutos por dia, 5 dias por semana) em ratos idosos. Neste trabalho o grupo que realizou exercícios aeróbios por 7 dias teve uma diminuição significativa da expressão do gene Nox2 comparado ao grupo controle, corroborando com os achados da literatura. Quando o exercício físico foi associado ao consumo de MATE a significância estatística deixou de existir, contudo o comportamento da variável foi o mesmo. Este achado, que sugere uma diminuição da produção de EROs, somado ao aumento da atividade da SOD, parecem ser fenômenos associados ao efeito cardioprotetor visto pelo nosso trabalho anterior (Cahuê *et al.*, 2017)

Em resumo, nossos dados sugerem que a cardioproteção induzida pelo consumo de MATE se dá, pelo menos em parte, pela ativação da proteína Nrf2, que potencializa o aumento da expressão de genes associados a enzimas antioxidantes. Os nossos achados sugerem que o aumento do ambiente redutor promovido pela alta dose de consumo de MATE leva à um aumento do dano redox, que aumentaria ativação da Nrf2 e que, em última instância, aumenta a expressão de RNAm dos genes Gpx1 e Gpx3. Nossos dados ainda apontam para uma tendência à inibição da expressão de Gpx3 quando as intervenções são conjugadas, o que, somada à inibição da atividade da SOD, levaria a uma inibição da cardioproteção nesta situação experimental.

8. Conclusões

O presente estudo sugere, a partir dos dados apresentados, que a cardioproteção promovida pelo consumo de MATE está associada ao aumento do estresse redutor causado pela alta quantidade de ácidos fenólicos, que promovem dano redox aumentando a ativação da proteína Nrf2, que, por fim, aumenta a expressão de RNAm dos genes Sod1, Gpx1 e Gpx3, associados à enzimas antioxidantes já descritas como potencializadoras de cardioproteção.

O exercício físico aeróbio de baixa intensidade realizado por 7 dias levou à uma diminuição da expressão de RNAm do gene Nox2, que, associado ao aumento da atividade da SOD vista anteriormente, pode explicar, pelo menos em parte, a cardioproteção induzida pelo exercício. A associação do consumo de MATE com a prática de exercício aeróbio de baixa intensidade inibe a expressão gênica de Gpx3 que, somada a inibição da atividade da SOD vista em nosso primeiro trabalho, atenua o efeito cardioprotetor associado à esta prática.

Novos estudos estão sendo desenvolvidos afim de verificar a influência destas intervenções em outras vias de sinalização, bem como a associação do exercício aeróbio com doses mais baixas de MATE, com a intenção de investigar a relação dose-dependente do consumo de mate com a cardioproteção promovida pelas duas intervenções.

9. 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. 279-83, May 2002.

AMBROSIO, G. et al. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. **J Biol Chem**, v. 268, n. 25, p. 18532-41, Sep 5 1993.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 373-99, 2004.

BABU, P. V.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. **Chem Biol Interact**, v. 162, n. 2, p. 114-20, Aug 25 2006.

BECKER, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. **Cardiovasc Res**, v. 61, n. 3, p. 461-70, Feb 15 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. 345-58, Jun 3 2005.

BOLLI, R.; MARBAN, E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. **Physiol Rev**, v. 79, n. 2, p. 609-34, Apr 1999.

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. 379-87, Jun 2003.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 3, p. 378-84, Jul 14 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.

BREWER, A. C. et al. Reductive stress linked to small HSPs, G6PD, and Nrf2 pathways in heart disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 9, p. 1114-27, Mar 20 2013.

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. 65-8, Mar 14 1994.

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.

CHOUCHANI, E. T. et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 431-435, Nov 20 2014.

COMINACINI, L. et al. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. **Free Radic Biol Med**, v. 88, n. Pt B, p. 233-242, Nov 2015.

DAHLMAN, J. M.; GUTTRIDGE, D. C. Detection of NF-kappaB activity in skeletal muscle cells by electrophoretic mobility shift analysis. **Methods Mol Biol**, v. 798, p. 505-16, 2012.

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, Feb 2012.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Bioavailability of chlorogenic acids in rats after acute ingestion of mate tea (*Ilex paraguariensis*) or 5-caffeoylquinic acid. **Eur J Nutr**, v. 56, n. 8, p. 2541-2556, Dec 2017.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutr Rev**, v. 55, n. 11 Pt 1, p. 396-8, Nov 1997.

DOMEJ, W.; OETTL, K.; RENNERT, W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 9, p. 1207-24, 2014.

DU, W. Y. et al. Involvement of NADPH oxidase in high-dose phenolic acid-induced pro-oxidant activity on rat mesenteric venules. **Exp Ther Med**, v. 13, n. 1, p. 17-22, Jan 2017.

FERDINANDY, P.; SCHULZ, R.; BAXTER, G. F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. **Pharmacol Rev**, v. 59, n. 4, p. 418-58, Dec 2007.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 3, p. 377-88, Mar 2015.

FORGIONE, M. A. et al. Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. **Circulation**, v. 106, n. 9, p. 1154-8, Aug 27 2002.

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. 1334-59, Jul 2011.

GARCIA-DORADO, D. et al. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. **Cardiovasc Res**, v. 94, n. 2, p. 168-80, May 1 2012.

GOMEZ-CABRERA, M. C. et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 1, p. 142-9, Jan 2008.

GONZALEZ ARBELAEZ, L. F. et al. Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: the mechanisms involved. **Food Funct**, v. 7, n. 2, p. 816-24, Feb 2016.

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. 156-61, Jun 2012.

GOUNDER, S. S. et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45697, 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. 338-44, Jul 16 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.

GUL, M. et al. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 143, n. 2, p. 239-45, Feb 2006.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006.

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

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.

HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Responses to reductive stress in the cardiovascular system. **Free Radic Biol Med**, v. 109, p. 114-124, Aug 2017.

HARRISON, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 6, p. 774-97, Sep 15 2002.

HODNICK, W. F. et al. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure-activity study. **Biochem Pharmacol**, v. 35, n. 14, p. 2345-57, Jul 15 1986.

ITOH, K. et al. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes Cells**, v. 8, n. 4, p. 379-91, Apr 2003.

JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A.; STEENBERGEN, C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. **J Mol Cell Cardiol**, v. 23, n. 12, p. 1383-95, Dec 1991.

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 peroxyxynitrite decomposition catalyst, protects the heart against reperfusion injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 328, n. 3, p. 777-84, 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.

KESARAJU, S. et al. Upregulation of Hsp72 mediates anoxia/reoxygenation neuroprotection in the freshwater turtle via modulation of ROS. **Brain Res**, v. 1582, p. 247-56, Sep 25 2014.

KOHCHI, C. et al. ROS and innate immunity. **Anticancer Res**, v. 29, n. 3, p. 817-21, 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. 620-50, Nov-Dec 2002.

KUBLER, W.; HAASS, M. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. **Heart**, v. 75, n. 4, p. 330-3, Apr 1996.

LEE, Y. et al. Exercise training attenuates age-dependent elevation of angiotensin II type 1 receptor and Nox2 signaling in the rat heart. **Exp Gerontol**, v. 70, p. 163-73, Oct 2015.

LENNON, S. L. et al. Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. **Acta Physiol Scand**, v. 182, n. 2, p. 161-9, Oct 2004.

LI, J. M.; SHAH, A. M. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S221-6, Aug 2003.

LI, Q. et al. Ginsenoside Rg1 Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia/Reoxygenation Injury via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling and Inhibition of JNK. **Cell Physiol Biochem**, v. 44, n. 1, p. 21-37, 2017.

LINNANE, A. W.; EASTWOOD, H. Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems: a new perspective on the free radical theory of aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1067, p. 47-55, May 2006.

MALAGUTI, M. et al. Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 4, p. 1028-36, Oct 2009.

MARGARITELIS, N. V. et al. Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. **Redox Biol**, v. 2, p. 520-8, 2014.

MATSUI, M. et al. Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 339, n. 2, p. 485-9, Jan 13 2006.

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. 1775-80, Mar 11 2009.

MAULIK, N.; YOSHIDA, T.; DAS, D. K. Regulation of cardiomyocyte apoptosis in ischemic reperfused mouse heart by glutathione peroxidase. **Mol Cell Biochem**, v. 196, n. 1-2, p. 13-21, Jun 1999.

MERRY, T. L.; RISTOW, M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. **J Physiol**, v. 594, n. 18, p. 5195-207, Sep 15 2016.

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. 771-6, Aug 2007.

MOCHIZUKI, S.; NEELY, J. R. Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. **J Mol Cell Cardiol**, v. 11, n. 3, p. 221-36, Mar 1979.

MURAKAMI, A. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chem**, v. 141, n. 1, p. 60-5, Nov 1 2013.

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

NISHIDA, M. et al. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. **Free Radic Biol Med**, v. 109, p. 132-140, Aug 2017.

OLIVEIRA, M. S., J.P. Oxidative Stress Action in Cellular Aging. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

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. 1308-18, Jun 2012.

OMS. Global Recommendations on Physical Activity for Health. In: (Ed.). **Global Recommendations on Physical Activity for Health**. Geneva, 2010. (WHO)

Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). ISBN 978 92 4 159 997 9.

OPIE, L. H. Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 4 Suppl 4, p. 777-90, Aug 1990.

PASSI, S.; PICARDO, M.; NAZZARO-PORRO, M. Comparative cytotoxicity of phenols in vitro. **Biochem J**, v. 245, n. 2, p. 537-42, Jul 15 1987.

PEREZ-TORRES, I.; GUARNER-LANS, V.; RUBIO-RUIZ, M. E. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 10, Oct 5 2017.

POSADINO, A. M. et al. Coumaric acid induces mitochondrial damage and oxidative-mediated cell death of human endothelial cells. **Cardiovasc Toxicol**, v. 13, n. 3, p. 301-6, Sep 2013.

POSADINO, A. M. et al. Resveratrol alters human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. **Food Chem Toxicol**, v. 78, p. 10-6, Apr 2015.

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

QIN, F. et al. Vitamins C and E attenuate apoptosis, beta-adrenergic receptor desensitization, and sarcoplasmic reticular Ca²⁺ ATPase downregulation after myocardial infarction. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 10, p. 1827-42, May 15 2006.

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. 1208-46, Apr 1 2013.

RAJASEKARAN, N. S. et al. Human alpha B-crystallin mutation causes oxidoreductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 427-39, Aug 10 2007.

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. 735-40, Dec 18 2012.

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, p. 84, Jul 14 2014.

RUIZ-MEANA, M. et al. Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. **Cardiovasc Res**, v. 71, n. 4, p. 715-24, Sep 1 2006.

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. 961-8, Aug 2014.

SHARATH BABU, G. R. et al. Pelargonidin Modulates Keap1/Nrf2 Pathway Gene Expression and Ameliorates Citrinin-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 868, 2017.

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. 818-26, Sep 2011.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 1, p. 39-46, Jul 2017.

SLUIJTER, J. P. et al. Novel therapeutic strategies for cardioprotection. **Pharmacol Ther**, v. 144, n. 1, p. 60-70, Oct 2014.

SOLAINI, G.; HARRIS, D. A. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. **Biochem J**, v. 390, n. Pt 2, p. 377-94, Sep 1 2005.

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. 140-5, 2011.

TERADA, L. S. et al. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 8, p. 3362-6, Apr 15 1992.

VAUGHAN-JONES, R. D.; WU, M. L. Extracellular H⁺ inactivation of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre. **J Physiol**, v. 428, p. 441-66, Sep 1990.

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. 24411-9, Jul 5 2002.

WARBURTON, D. E. R.; BREDIN, S. S. D. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. **Curr Opin Cardiol**, v. 32, n. 5, p. 541-556, Sep 2017.

YEH, C. T.; CHING, L. C.; YEN, G. C. Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. **J Nutr Biochem**, v. 20, n. 3, p. 163-71, Mar 2009.

ZENG, C. et al. Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by activating Nrf2 and inactivating NF-kappaB both in vitro and in vivo. **J Mol Cell Cardiol**, v. 79, p. 1-12, Feb 2015.

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.

ZHOU, T.; CHUANG, C. C.; ZUO, L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 864946, 2015.

ZWEIER, J. L.; TALUKDER, M. A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiovasc Res**, v. 70, n. 2, p. 181-90, May 1 2006.

ANEXO 1 – GRÁFICOS DO ARTIGO 1 EM ALTA RESOLUÇÃO

Figure 1

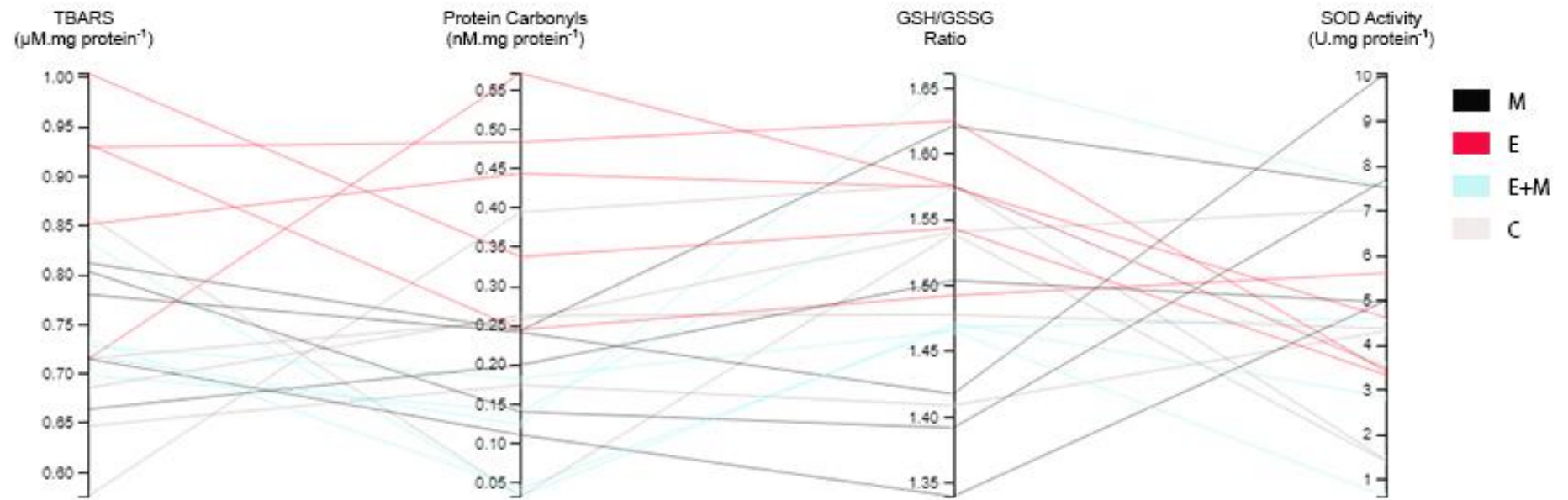


Figure 2A

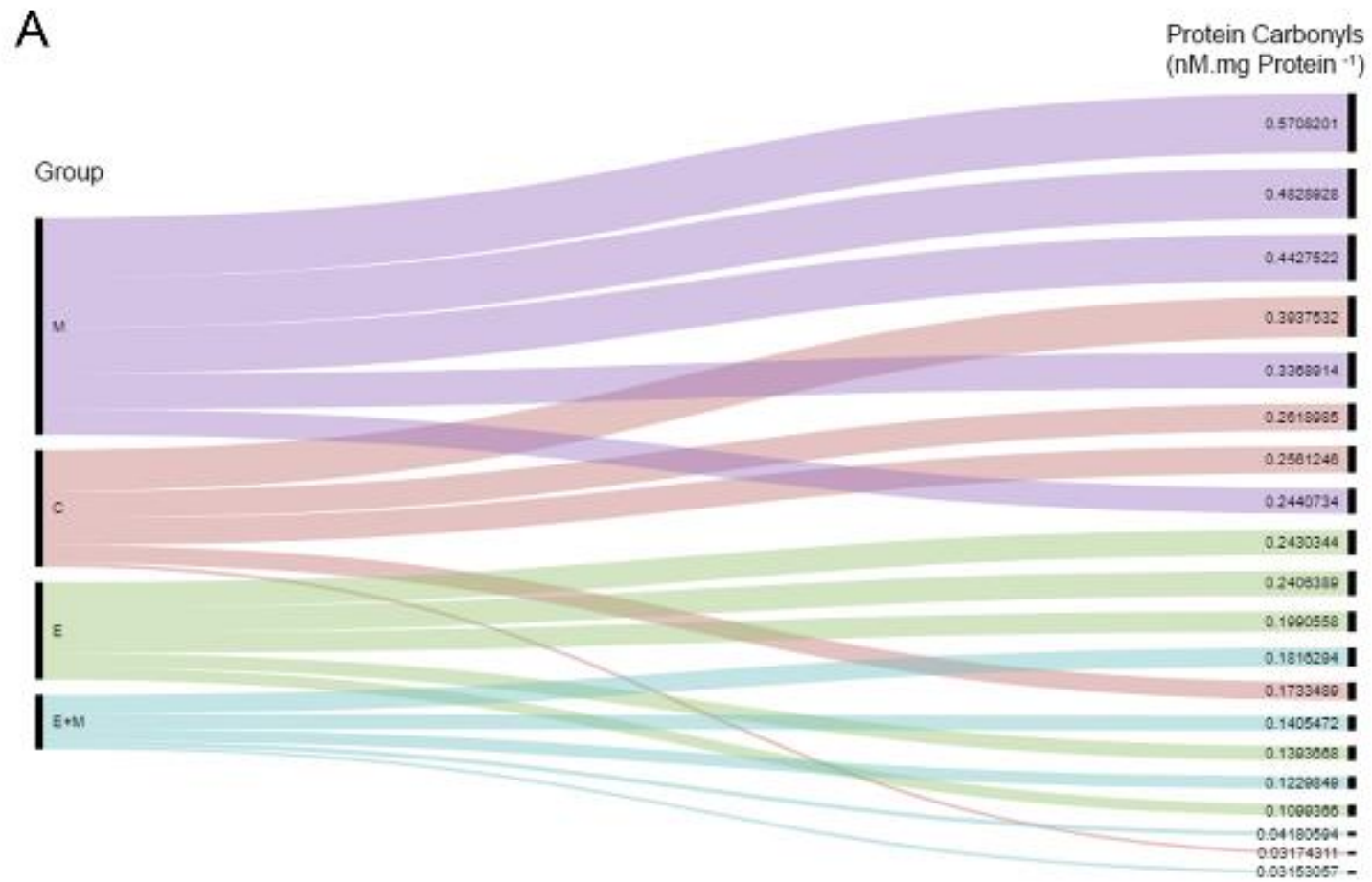


Figure 2B

B

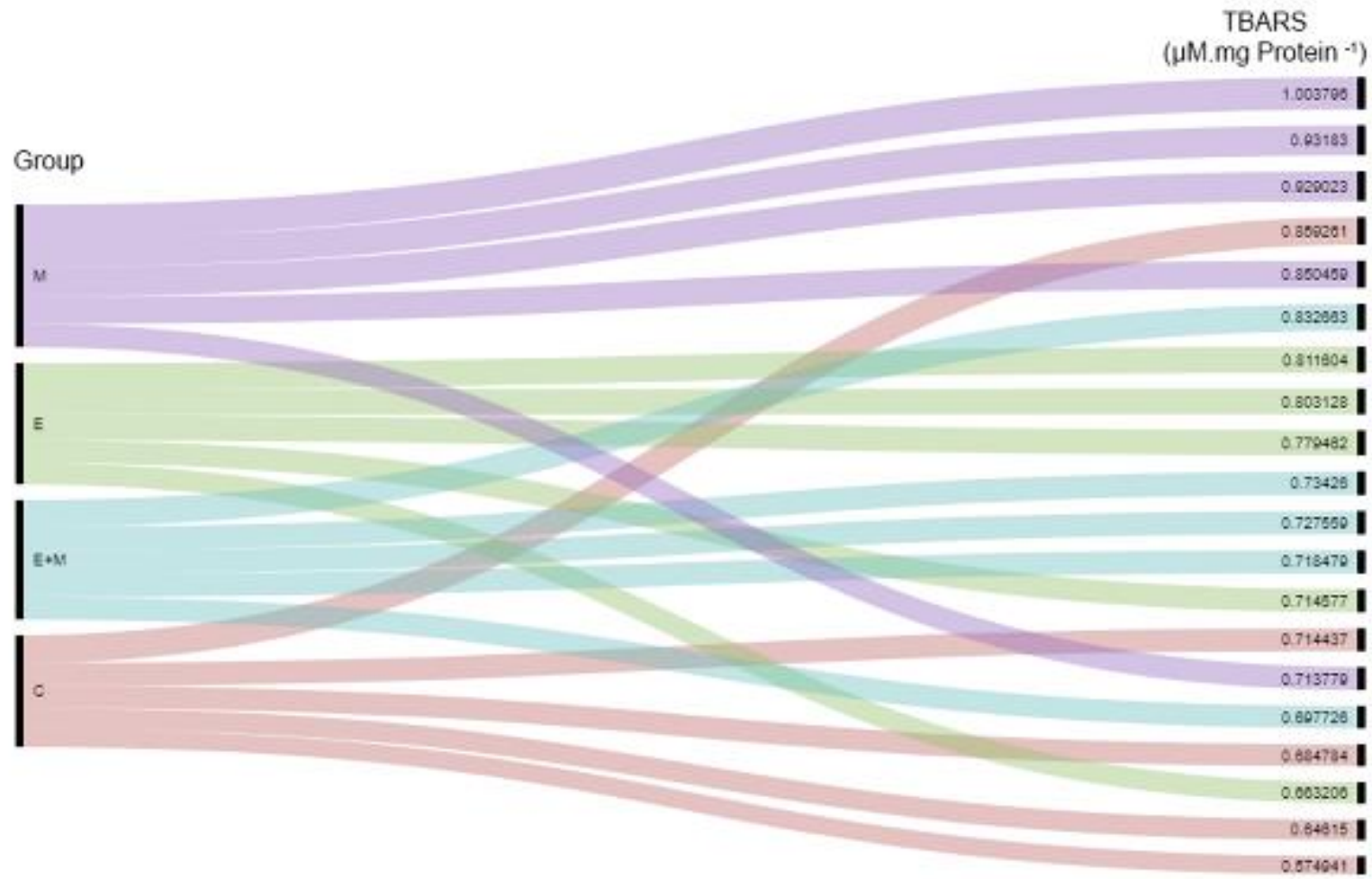


Figure 2C

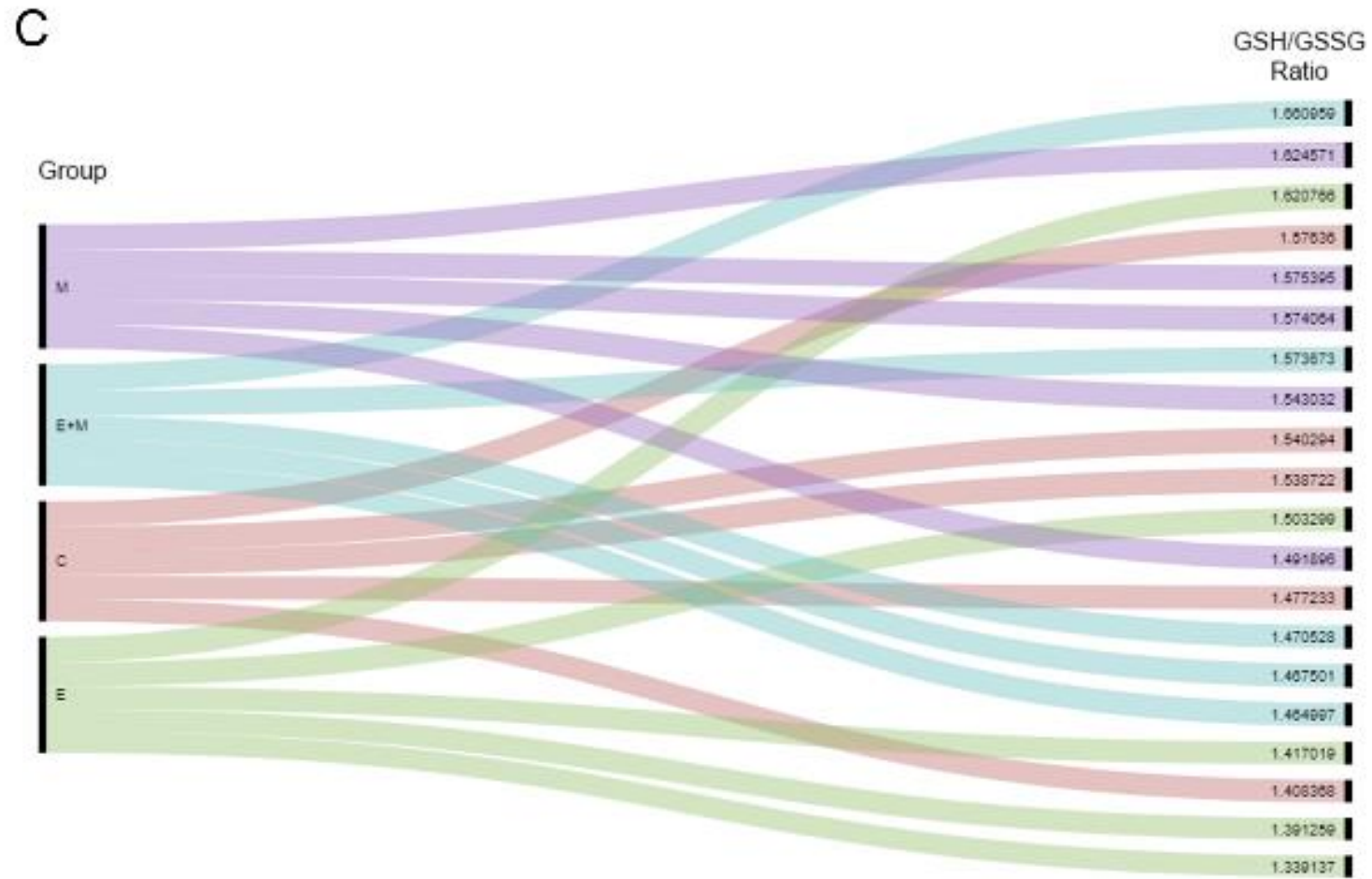


Figure 2D

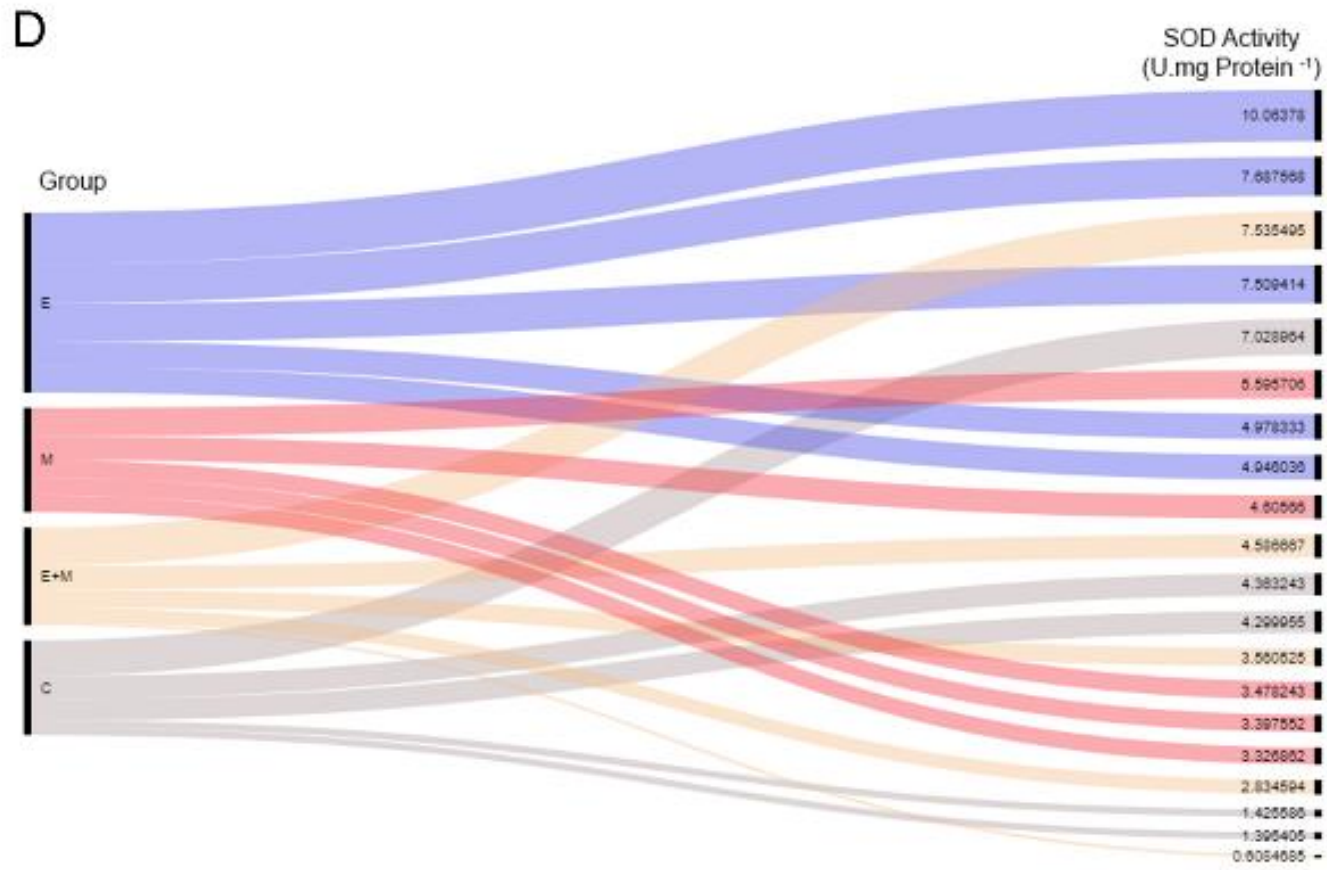


Figure 3A

A

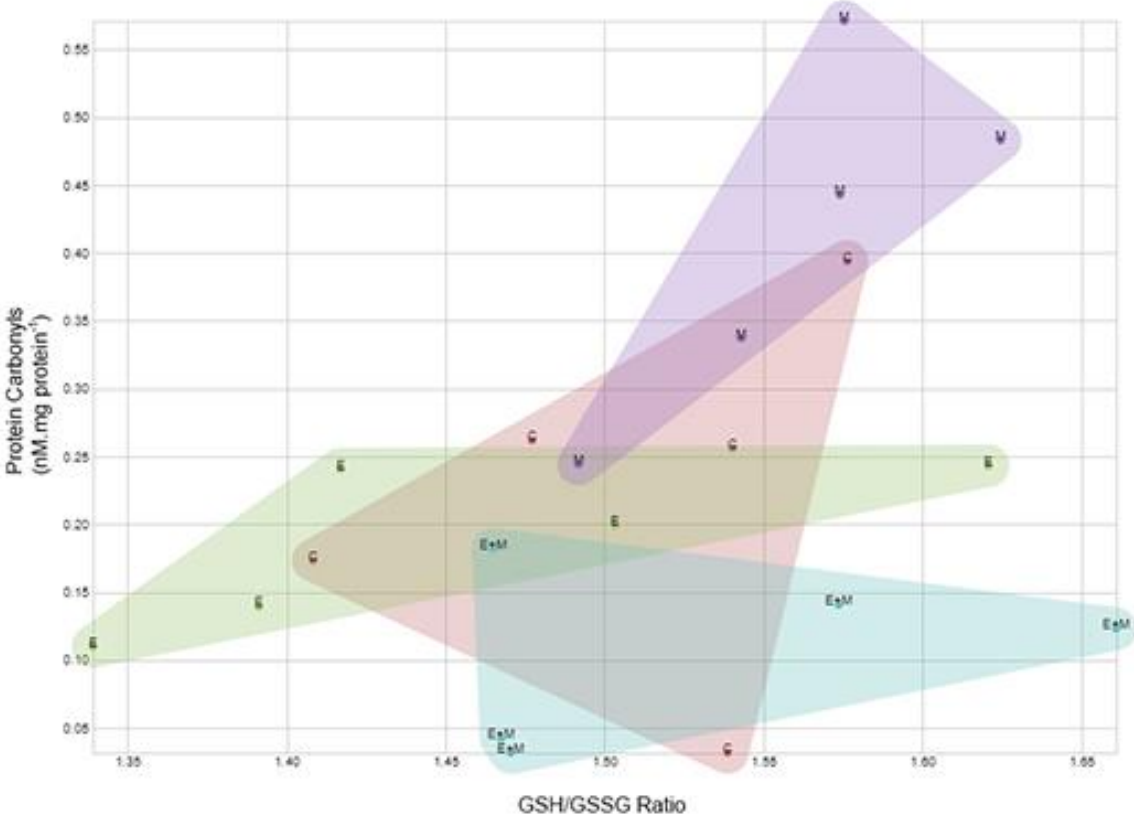


Figure 3B

B

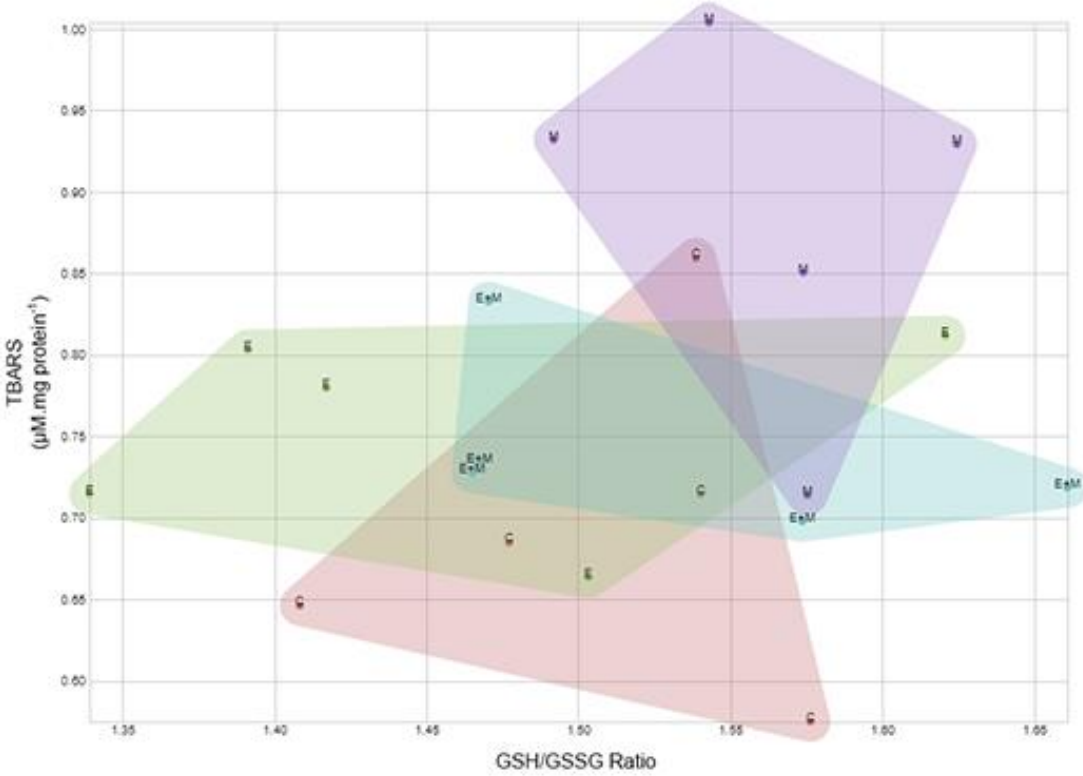


Figure 3C

C

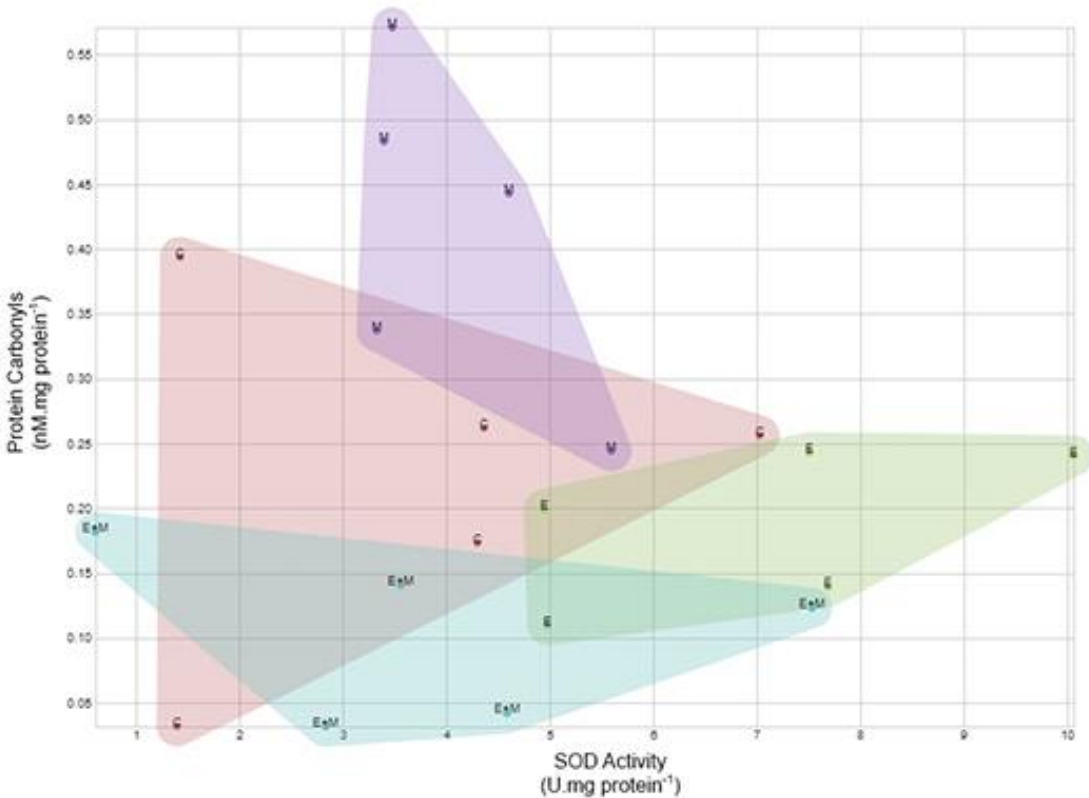


Figure 3D

D

