



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



PAPEL DO ESTRESSE REDUTOR E DA PROTEÍNA NRF2 NOS MECANISMOS
CARDIOPROTETIVOS INDUZIDOS POR EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E
CONSUMO DE ERVA MATE

Tese de Doutorado

Fábio Luiz Candido Cahuê

Fevereiro, 2019

Fábio Luiz Candido Cahuê

PAPEL DO ESTRESSE REDUTOR E DA PROTEÍNA NRF2 NOS MECANISMOS
CARDIOPROTETIVOS INDUZIDOS POR EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E
CONSUMO DE ERVA MATE

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

Cahuê, Fábio Luiz Candido.

Papel do estresse redutor e da proteína NRF2 nos mecanismos cardioprotetivos induzidos por exercício físico aeróbico e consumo de erva-mate. / Fábio Luiz Candido Cahuê. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, 2019.

xx, 75 f.: il.; 30 cm.

Orientadores: José Hamilton Matheus Nascimento; Verônica Salerno Pinto e Luciane Claudia Barcellos.

Tese (doutorado) -- UFRJ, / CCS, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (cardiologia), 2019.

Referências: f. 48-58.

1.Fator 2 Relacionado a NF-E2-fisiologia 2.Doenças Cardiovasculares-epidemiologia. 3.Exercício. 4. Ilex paraguariensis. 5.Espécies Reativas de Oxigênio. 6.Infarto do Miocárdio-metabolismo. 7.Cardiolgia - tese. I. Nascimento, José Hamilton Matheus. II.Pinto, Verônica Salerno. III.Barcellos, Luciane Claudia. IV. UFRJ, CCS, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (cardiologia). V. Título.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Medicina / Instituto do Coração Edson Saad
Programa de Pós-Graduação em Medicina - Cardiologia



Ata de Defesa de Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia) da Faculdade de Medicina da UFRJ

Aluno: FÁBIO LUIZ CANDIDO CAHUÊ

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

Orientadores:

- Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento
- Prof^a. Dra. Verônica Salerno Pinto
- Prof^a. Dra. Luciane Claudia Barcellos

Banca Examinadora:

- Prof^a. Dra. Gláucia Maria Moraes de Oliveira
- Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa
- Prof^a. Dra. Paula Guedes Cocate
- Prof^a. Dra. Andrea Claudia Freitas Ferreira
- Prof. Dr. Rodrigo Soares Fortunato

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, reuniu-se no auditório Leopoldo de Meis, localizado no Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, a Banca Examinadora supracitada sob a Presidência da Prof^a. Gláucia Maria Moraes de Oliveira. Na abertura da Sessão, a Prof^a. Gláucia Maria Moraes de Oliveira apresentou os membros da Comissão Examinadora, agradeceu sua participação nesta importante atividade do Programa e lembrou ao candidato as regras utilizadas pela Faculdade de Medicina da UFRJ para Defesa de Tese Doutorado. Em seguida, passou a palavra ao candidato para a apresentação de sua Tese. Após a exposição do trabalho o aluno foi arguido individualmente por cada um dos examinadores, tendo respondido também em separado a cada um deles. Finalmente, a Banca Examinadora, reunida secretamente, sugeriu que o aluno alterasse o título da Tese para o seguinte: "PAPEL DO ESTRESSE REDUTOR E DA PROTEÍNA NRF2 NOS MECANISMOS CARDIOPROTECTIVOS INDUZIDOS POR EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E CONSUMO DE ERVA MATE" e que, se realizada alteração sugerida, a Tese será aprovada, recomendando à UFRJ a concessão do Grau de Doutor em Ciências – Área de Concentração Cardiologia a Fábio Luiz Candido Cahuê, recomendando ainda a posterior publicação do trabalho.

Fábio Luiz Candido Cahuê CPF: 098.861.697-10

Fábio Luiz Candido Cahuê

Gláucia Maria Moraes de Oliveira CPF: 821.041.157-87

Gláucia Maria Moraes de Oliveira

Roberto Coury Pedrosa CPF: 219.578.516-00

Roberto Coury Pedrosa

Paula Guedes Cocate CPF: 014.984.736-01

Paula Guedes Cocate

Andrea Claudia Freitas Ferreira CPF: 037.682.277-58

Andrea C.F. Ferreira

Rodrigo Soares Fortunato CPF: 085.923.157-78

Rodrigo Soares Fortunato

José Hamilton Matheus Nascimento CPF: 732.102.938-72

José Hamilton Matheus Nascimento

Verônica Salerno Pinto CPF: 012.920.767-55

Verônica Salerno Pinto

Luciane Claudia Barcellos CPF: 013.582.027-88

Luciane Claudia Barcellos

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 a 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!

O caminho está só no começo. O fim? Desconheço.

RESUMO

Luiz Candido Cahuê, Fábio. “**Papel do Estresse Redutor e da Proteína Nrf2 nos Mecanismos Cardioprotetivos Induzidos por Exercício Físico Aeróbico e Consumo de Erva Mate**”. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Cardiologia). Faculdade de Medicina e Instituto do Coração Edson Saad da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

INTRODUÇÃO - As doenças cardiovasculares (DCVs) são as principais causa de morte no mundo. O principal evento associado à morte em consequência das DCVs é o infarto agudo do miocárdio (IAM). A capacidade do miocárdio de sobreviver ao estresse promovido pela isquemia/reperfusão (I/R) decorrente de um IAM chama-se cardioproteção. Existem estratégias que promovem cardioproteção e atenuam os efeitos deletérios do RC, por exemplo o exercício físico e o consumo de produtos naturais. O *Ilex paraguariensis* (MATE) teve seu efeito cardioprotetor avaliado e dados do nosso grupo sugerem que o consumo de MATE por 7 dias, assim como o exercício aeróbico (EA), promovem cardioproteção. Foi visto também que a associação do consumo de MATE com EA não foi capaz de promover cardioproteção. No entanto, vias de sinalização relacionadas à cardioproteção não foram investigadas neste modelo. **OBJETIVO** - Investigar os mecanismos moleculares associados à cardioproteção induzida pelo consumo de MATE, com ou sem associação com o exercício físico aeróbico. **MATERIAIS E MÉTODOS** – Para investigar a relação entre os dados sem inferências estatísticas foram elaborados gráficos através da ferramenta RawGraphs, reinterpretação as variáveis de dano redox (TBARS e Proteína Carbonilada), razão GSH/GSSG e atividade da SOD. Para a verificação das vias de sinalização associadas às respostas vistas anteriormente, foram utilizados ratos Wistar machos (60 dias, 250 ± 50 g peso corporal), distribuídos em quatro grupos: sedentário (C), sedentário + MATE (M), exercício (E) e exercício + MATE (E+M). Após adaptação ao meio aquático (3 dias) foi realizado o protocolo experimental. Os grupos E e E+M fizeram treinamento aeróbico por natação (30 min., 7 x semana, 5% sobrecarga), os grupos C e E receberam 1mL H₂O enquanto os grupos M e E+M receberam a dose de 1 g/kg de MATE, diluídos em 1mL de H₂O, por gavagem, antes da intervenção anterior. Os animais foram eutanasiados 24 horas após a última intervenção, os corações foram retirados e armazenados em freezer -80°C. Para análise das vias de sinalização associadas à cardioproteção induzida pelo MATE, foram quantificadas as proteínas Nrf2 e Keap1 pelo método de Western Blot e a expressão de mRNA dos genes Nfe2l2 (Nrf2), Keap1, Sod1, Sod2, Catalase, Hmox1, Gpx1, Gpx3 e

Nox2 pelo método de Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

RESULTADOS - De acordo com a análise gráfica o tratamento com MATE mostrou maior impacto na carbonilação de proteínas e na peroxidação lipídica que, por consequência, apresenta associação com maiores valores de razão GSH/GSSG. Por outro lado o EA mostrou maior associação com os maiores valores de atividade da SOD, influenciando nos menores valores encontrados nos marcadores de dano redox. A quantidade de Nrf2 na fração citoplasmática foi significativamente reduzida nos grupos M, E e E+M ($p < 0,05$), sem alteração no conteúdo nuclear. A expressão de RNAm de Sod1 foi aumentada em 93% em comparação ao grupo controle e não houve diferença significativa entre os grupos quando verificada a expressão de RNAm de SOD2. Quando verificada a expressão de RNAm dos genes Hmox1, Sod2 e Keap1 não houve diferença significativa entre os grupos, porém, em relação aos genes Nfe2l2, Gpx1 e Gpx3, houve diferença significativa quando comparado o grupo M ao grupo controle. Foi verificado uma diminuição significativa da expressão de RNAm de Nox2 no grupo E comparado ao C.

CONCLUSÕES - O presente estudo sugere que o mecanismo molecular associado ao efeito adaptativo do consumo de MATE parece ser explicado, pelo menos em parte, a um aumento da expressão de RNAm dos genes Sod1, Gpx1, Gpx3 e Nfe2l2, que é compatível com um ambiente de estresse redutor sugerido nas análises de *Data Science*, o que também explicaria a inibição da cardioproteção quando MATE e EA são tratados de maneira conjunta. A cardioproteção induzida pelo exercício parece estar associada a um aumento da atividade da SOD, sem nenhuma relação com expressão gênica associada à sinalização promovida por Nrf2.

ABSTRACT

Luiz Candido Cahuê, Fábio. “**The Rule of Reductive Stress and Nrf2 Protein in Physical Exercise and Yerba Mate Consumption-Induced Cardioprotective Mechanisms**”. Rio de Janeiro, 2019. PhD Thesis (Cardiology). Faculty of Medicine and Edson Saad Heart Institute of Federal University of Rio de Janeiro.

INTRODUCTION – Cardiovascular Diseases (CVDs) are the main cause of death worldwide. The main event associated to death caused by CVDs is myocardium infarction (MI). The capacity of survival after a MI is called cardioprotection. There is various cardioprotection strategies, ie. physical exercise and natural products consumption. *Ilex paraguariensis* (MATE) had evaluated its cardioprotective effect and our group suggested that short-term treatment, as well as aerobic exercise, can promote cardioprotection. The association between MATE consumption and aerobic exercise was unable to promote cardioprotection. However, signaling pathways related to cardioprotection have not been investigated in this model. **OBJECTIVE - OBJECTIVE** - To investigate the therapeutic potential of MATE, with or without association with aerobic exercise, in an experimental model of myocardial infarction. **MATERIALS AND METHODS** - To investigate the relationship between the data without statistical inferences, graphs were elaborated using RawGraphs tool, reinterpreting the variables of redox damage (TBARS and Protein Carbonyls), GSH/GSSG ratio and SOD activity. For the verification of the signaling pathways associated with the previous data, male Wistar rats (60 days, 250 ± 50 g body weight) were divided into four groups: sedentary (C), sedentary + MATE (M), exercise (E) and exercise + MATE (E + M). After adaptation to the aquatic environment (3 days) the experimental protocol was performed. Groups E and E + M underwent aerobic training by swimming (30 min, 7 x week, 5% overload), groups C and E received 1mL H₂O while groups M and E + M received the dose of 1 g / kg of MATE, diluted in 1 mL of H₂O, by gavage, prior to the previous intervention. The animals were euthanized 24 hours after the last intervention, the hearts were removed and stored in a -80 ° C freezer. For the analysis of the signaling pathways associated with the MATE-induced cardioprotection, Nrf2 and Keap1 proteins were quantified by Western Blot method and the mRNA expression of Nfe2l2 (Nrf2), Keap1, Sod1, Sod2, Catalase, Hmox1, Gpx1, Gpx3 and Nox2 by the Real-Time Chain Polymerase Reaction (qPCR) method. **RESULTS** - According to the graphical analysis the treatment with MATE showed a greater impact on protein carbonylation and lipid peroxidation, which, consequently, is associated with higher GSH/GSSG ratio values. On the other hand, aerobic exercise showed greater association with the higher values of

SOD activity, influencing the lower values found in the markers of redox damage. The amount of Nrf2 in the cytoplasmic fraction was significantly reduced in the M, E and E + M groups ($p < 0.05$), with no change in nuclear content. Expression of Sod1 mRNA was increased by 93% compared to the control group and there was no significant difference between groups when expression of SOD2 mRNA was verified. When the mRNA expression of the Hmox1, Sod2 and Keap1 genes was verified, there was no significant difference between the groups, however, in relation to the Nfe2l2, Gpx1 and Gpx3 genes, there was a significant difference when comparing the M group to the control group. A significant decrease in Nox2 mRNA expression was observed in group E compared to C.

CONCLUSIONS - The present study suggests that the molecular mechanism associated with the adaptive effect of MATE consumption seems to be explained, at least in part, to an increase in mRNA expression of Sod1, Gpx1, Gpx3 and Nfe2l2 genes, which is compatible with a suggested reductive stress environment in the Data Science analyzes, and which would also explain the inhibition of cardioprotection when MATE and aerobic exercise are treated together. Exercise-induced cardioprotection appears to be associated with increased SOD activity, with no relation to gene expression associated with Nrf2-promoted signaling.

Lista de Ilustrações

- Figura 1** - Gráfico ilustrativo dos eventos cardiovasculares durante uma isquemia prolongada. Adaptado de Powers et al. (2014).22
- Figura 2** - Esquema ilustrativo da forma "dobradiça e trava" de desacoplamento da Nrf2 e da Keap1, e seus caminhos possíveis em condição basal ou sob condições induzidas. Adaptado de Abed et al. (2015).26
- Figura 3** - Esquema ilustrativo dos mecanismos que levam à lesão por isquemia/reperfusão no miocárdio. Adaptado de Powers *et al.* (2013).29
- Figura 4** - Figura ilustrativa dos principais compostos do MATE. Adaptado de Bracesco *et al.* (2011).37
- Figura 5** - Demonstrativo gráfico da linha experimental.43
- Figura 6** - Gráfico de Paralelas Coordenadas exibindo os dados de Peroxidação Lipídica (TBARS), Proteína Carbonilada, Razão GSH/GSSG e Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).49
- Figura 7** - Painel de Diagramas Aluviais. A - Carbonilação de Proteínas; B - TBARS; C - Razão GSH/GSSG; D - Atividade da SOD.50
- Figura 8** - Painel de Gráficos "Convex Hull". A - PC x Razão GSH/GSSG; B - TBARS x Razão GSH/GSSG; C - PC x Atividade da SOD; D - TBARS x Atividade da SOD.51
- Figura 9** - 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.52
- Figura 10** - 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.....53
- Figura 11** - 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.54
- Figura 12** - 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.....55

Figura 13 - 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.56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Desenho, senso e reverso, dos primers utilizados neste estudo.....	47
--	----

Lista de Abreviações

DCVs – Doenças Cardiovasculares

DCIs – Doenças Cardíacas Isquêmicas

ATP – Adenosina Trifosfato

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

RLs – Radicais Livres

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

NOX – NADPH Oxidase

SOD – Superóxido Dismutase

GPx – Glutaciona Peroxidase

GR – Glutaciona Redutase

GSH – Glutaciona Reduzida

GSSG – Glutaciona 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 - Glicealdeído 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	20
1.1. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares	20
1.2. Doença Cardíaca Isquêmica	21
1.3. Balanço Redox: Radicais Livres e Capacidade Antioxidante	22
1.3.1. Radicais Livres	22
1.3.2. Sítios de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	22
1.3.3. Balanço Redox: Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo	23
1.3.4. Estresse Redutor	24
1.4. Infarto Agudo do Miocárdio: Mecanismos Moleculares	27
1.4.1. Alterações Metabólicas.....	27
1.4.2. Alterações Metabólicas e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio.....	29
1.5. Cardioproteção: Definição e Principais Estratégias	30
1.5.1. Vias de Sinalização Relacionados à Cardioproteção	31
1.6. Exercício Físico.....	33
1.6.1. Exercício Físico e Cardioproteção	34
1.7. Antioxidantes e Cardioproteção	35
1.7.1. Erva Mate	36
1.7.1.1. Erva Mate e Cardioproteção.....	38
2. Problema do Estudo.....	40

3.	Objetivos	41
3.1.	Objetivo Geral	41
3.2.	Objetivos Específicos	41
4.	Materiais e Métodos	42
4.1.	Análise de Dados por Ferramenta de <i>Data Science</i>	42
4.2.	Animais	42
4.3.	Protocolo Experimental	43
4.4.	Homogenização do Tecido Cardíaco	44
4.5.	Western Blotting	44
4.6.	Quantificação da Expressão de RNAm	46
4.6.1.	Extração de RNA e Transcrição Reversa	46
4.6.2.	Desenho dos Primers	46
4.6.3.	Teste de Eficiência dos Primers	46
4.6.4.	Ensaio de qRT-PCR	47
4.7.	Atividade da Glutathiona Peroxidase	48
4.8.	Dosagem de Proteína	48
4.9.	Análise Estatística	48
5.	Resultados	49
5.1.	Estresse Redutor: Provável Mecanismo Associado ao Efeito Cardioprotetor do Consumo de MATE	49
5.2.	O Consumo de MATE e o Exercício Aeróbio de Baixa Intensidade em Curto Período Diminui a Concentração Citoplasmática de Nrf2	51

5.3. O Consumo de MATE Aumenta a Expressão de Nfe2l2 e Keap1	52
5.4. O Consumo de MATE Aumenta a Expressão de Genes Associados à Ativação da Nrf2	53
5.5. O Exercício Físico Reduz a Expressão de Nox2	55
5.6. A Atividade da Glutathiona Peroxidase é Reduzida Pelo Exercício Físico e Consumo de MATE	55
6. Discussão.....	57
6.1. Mate, Cardioproteção e Estresse Redutor	57
6.2. 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.....	59
7. Limitações do Estudo	63
8. Conclusões	64
9. Considerações Finais.....	65
10. Referências	66
ANEXO I - 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.	
	77
ANEXO II – GRÁFICOS DO ARTIGO 1 EM ALTA RESOLUÇÃO	82
ANEXO III – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CCS - UFRJ.....	92

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 contratatura 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).

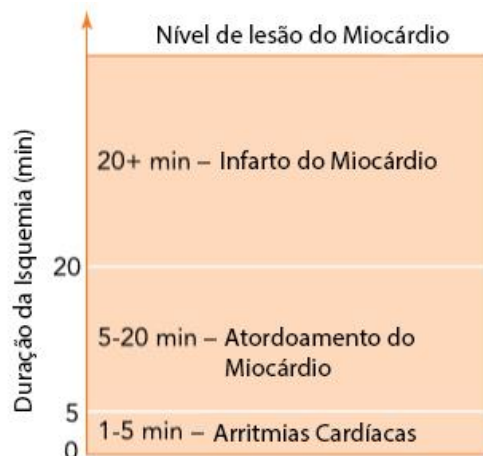


Figura 1 - Gráfico ilustrativo dos eventos cardiovasculares durante uma isquemia prolongada. Adaptado de Powers *et al.* (2014).

1.3. Balanço Redox: Radicais Livres e Capacidade Antioxidante

1.3.1. Radicais Livres

Radicaís livres (RLs) são moléculas que contém 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.

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

($\cdot\text{O}_2^-$) 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 $\cdot\text{O}_2^-$ (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 $\cdot\text{O}_2^-$ 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 $\cdot\text{O}_2^-$ 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 ($\cdot\text{O}_2^-$) 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 H_2O pela Glutathiona Peroxidase (GPx), oxidando uma molécula de glutathiona reduzida (GSH). A enzima Glutathiona Redutase (GR) é responsável pela redução da glutathiona 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).

1.3.5. O Complexo Nrf2-Keap1: Seu Funcionamento e sua Participação nas Adaptações Promovidas por Estresse Oxidativo e Estresse Redutor

O Ativador do Fator 2 Relacionado a NF-E2 (Nrf2) é um fator de transcrição associado à manutenção da homeostase, responsável pela regulação da expressão de RNAm associada as enzimas antioxidantes (principalmente as de segunda fase) como hemeoxigenase 1 (HO-1), glutamato cisteína ligase (GCL), cobre-zinco superóxido dismutase (SOD1, a isoforma citoplasmática dessa enzima), NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO-1), dentre outras enzimas (Li *et al.*, 2012).

O mecanismo principal de regulação da atividade da Nrf2 se dá através da ligação desta proteína a Keap1. A interação da Nrf2 à Keap1 se dá através da ligação entre o domínio Neh2 (mais especificamente por 2 sub-regiões, DLG e ETGE) da Nrf2 e a região Kelch da Keap1. Em estado basal estas duas proteínas estão ligadas e, permanecendo nesta forma, elas sofrem ubiquitinação via Cul3-E3-ligase, uma ubiquitina-ligase que se integra a Keap1, e seguem para degradação pelos proteassomas em um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 20 minutos. (Zhang *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006). Contudo, quando há alguma perturbação (oxidativa ou eletrofilica), esta ligação se desfaz. A literatura diverge em dois modelos: o modelo de dissociação do complexo Keap1-Cul3 e o modelo “dobradiça e trava” (Abed *et al.*, 2015).

No modelo de dissociação do complexo Keap1-Cul3, a interação entre Nrf2 e Keap1 se desacopla através da interação de agentes oxidantes ou eletrofílicos com o terminal Cys151 da Cul3-E3-ligase, liberando e estabilizando a Nrf2 (que passa a ter $t_{1/2} > 200$ minutos). Já no modelo de “dobradiça e trava”, como pode ser visto na figura 2, a região ETGE, que possui alta afinidade com a Keap1 – por isso seria a “dobradiça”, mantém a Nrf2 “presa”, enquanto a região DLG funcionaria como uma “trava” mantendo a Nrf2 na posição ideal para a degradação via ubiquitinação (McMahon *et al.*, 2006; Stepkowski e Kruszewski, 2011). Em situação de alta concentração de EROs, o resíduo cisteína da Keap1 é oxidado, fazendo com que se “destrave” a região DLG, não permitindo que a Nrf2 se encaminhe para degradação e, por consequência, aumentando a sua estabilidade. Por fim, a Nrf2 se desacopla da Keap1, permitindo seu movimento para o núcleo (Tong, Katoh, *et al.*, 2006; Tong, Kobayashi, *et al.*, 2006).

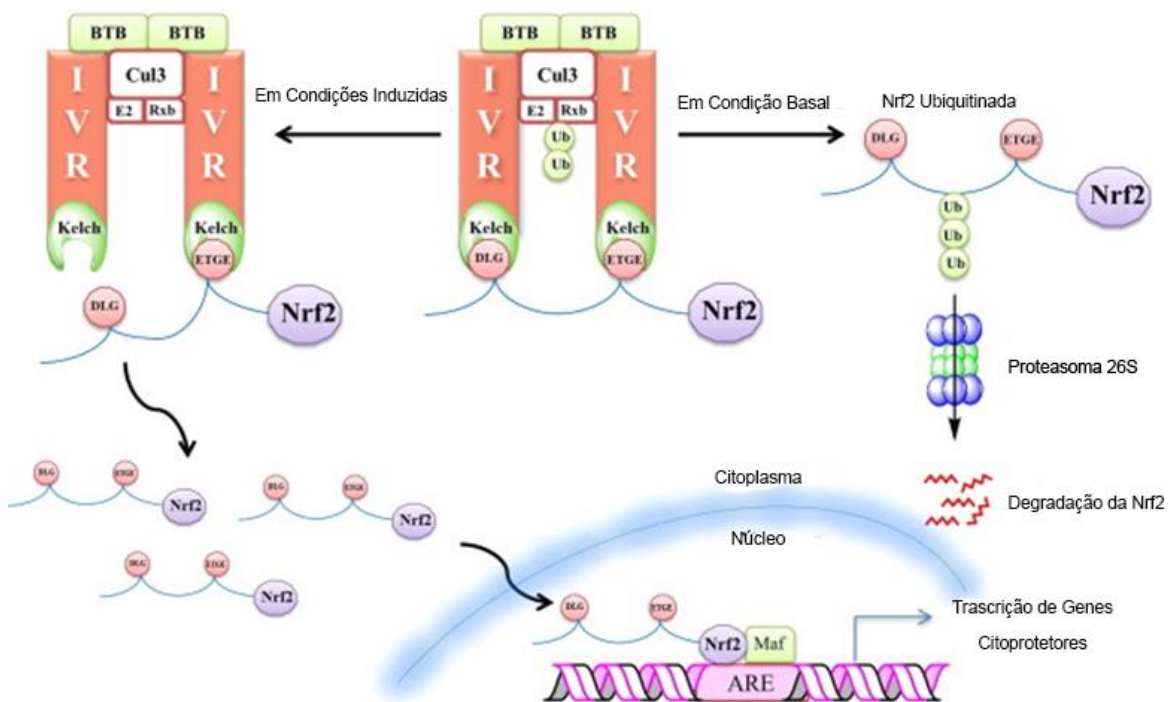


Figura 2 - Esquema ilustrativo da forma "dobradiça e trava" de desacoplamento da Nrf2 e da Keap1, e seus caminhos possíveis em condição basal ou sob condições induzidas. Adaptado de Abed et al. (2015).

Ao migrar para o núcleo, a Nrf2 se liga a Maf, formando um heterodímero que, mais tarde, se ligará à área de resposta antioxidante (ARE), uma região no DNA que é responsável pela promover a codificação de enzimas citoprotetoras, dentre elas as enzimas antioxidantes de segunda fase (Lee e Johnson, 2004; Zhang *et al.*, 2005;

Kobayashi *et al.*, 2006). Como mecanismo regulador, em situação fisiológica normal, a proteína Maf se liga à outra, de nome Bach1, que funciona como um inibidor da ligação da Maf na ARE. Sob condições de estresse, a Bach1 se encaminha para fora do núcleo e segue para degradação proteossomal (Katsuoka *et al.*, 2005).

O ambiente redox é fundamental para promover ativação ou inibição da Nrf. Situações promotoras de aumento de concentração de EROs como o exercício físico, alterações metabólicas, hipóxia e câncer podem promover ativação ou inibição da Nrf2 que pode estar associadas a efeitos adaptativos positivos ou negativos. O aumento da atividade da Nrf2 associado ao exercício físico promove aumento da capacidade antioxidante enzimática, contribuindo para a melhora do balanço redox e permitindo que os tecidos suportem maior produção de EROs em decorrência de sobrecarga (Done e Traustadottir, 2016). A diminuição da expressão de Nrf2 em indivíduos diabéticos ou pré-diabéticos está associada ao aumento do estresse oxidativo promovido pelo acúmulo de glicose na corrente sanguínea (Jimenez-Osorio *et al.*, 2014). Já a hipóxia pode levar ao aumento da expressão de Nrf2 por um mecanismo de pré-condicionamento, preparando o ambiente celular para uma maior produção de EROs (Kolamunne *et al.*, 2013). Células cancerígenas podem ter aumento da expressão da Nrf2, gerando um estresse redutor que pode levar à citoproteção dessas células, promovendo, resistência dessas células à quimioterapia (Hayes e McMahon, 2009). O aumento exacerbado da expressão da Nrf2, associado a estresse redutor, também pode levar a cardiomiopatia hipertrófica (Kannan *et al.*, 2013). A ativação da Nrf2, portanto, pode não significar uma situação positiva para o desfecho associado a alguma intervenção ou doença e entender os mecanismos associados à ativação da Nrf2 pode elucidar processos adaptativos.

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 Gliceraldeído 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 (Mochizuki e Neely, 1979).

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 [Ca²⁺] leva a ativação da protease Calpaína, que leva à processos de apoptose e morte celular (Powers *et al.*, 2014) (Fig. 3).

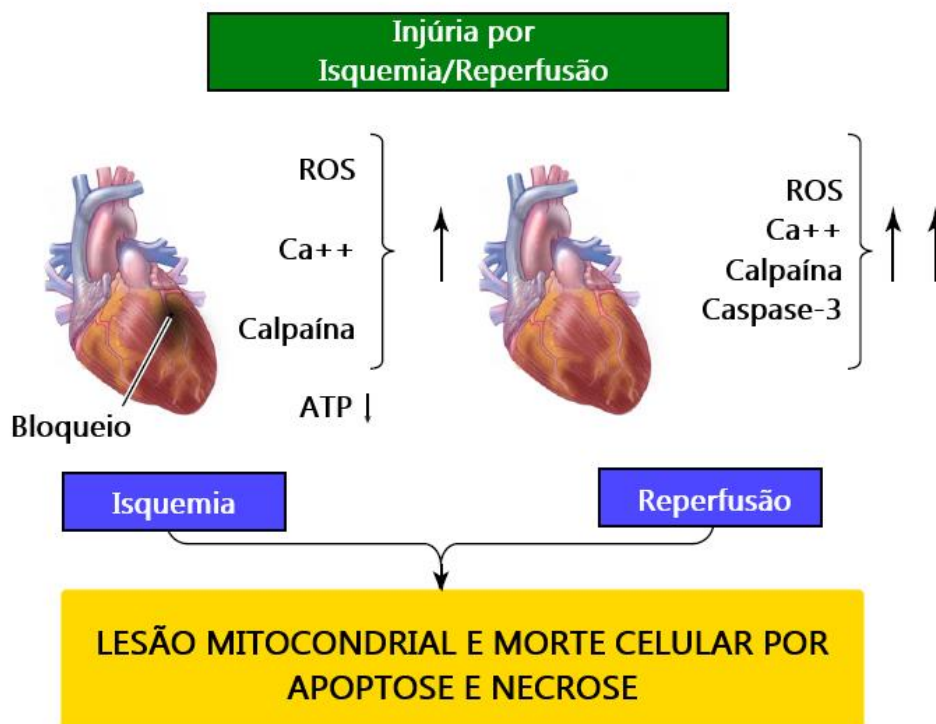


Figura 3 - Esquema ilustrativo dos mecanismos que levam à lesão por isquemia/reperusão no miocárdio. Adaptado de Powers *et al.* (2013).

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 ($\bullet\text{O}_2^-$) (Becker, 2004). Na isquemia a produção de $\bullet\text{O}_2^-$ 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 $\bullet\text{O}_2^-$ é altamente reativo com outras moléculas, sendo rapidamente convertido em radicais hidroxila ($\text{HO}\bullet$) quando interage com o H^+ e em peroxinitrito ($\text{ONOO}\bullet$) quando interage com outro radical livre, o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$). 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 $\cdot\text{O}_2^-$ em H_2O_2 e da Glutathiona Peroxidase, responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O .

No citosol também há o aumento da produção de EROs e NROs. Durante a isquemia a atividade das NADPH Oxidases (NOXs – principalmente a NOX2, mais presente no tecido cardíaco) é aumentada em resposta a hipóxia (Bedard e Krause, 2007). O $\cdot\text{O}_2^-$ produzido pelas NOXs reage com o $\text{NO}\cdot$ oriundo da maior ativação da Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), resultando na produção de $\text{ONOO}\cdot$ (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 RNAm de enzimas antioxidantes, que são mediadas pelo fator de transcrição Nrf2. Com isso, há uma diminuição das vias promotoras de lesão mitocondrial e apoptose relacionado a injúria por I/R (Stein *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). 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).

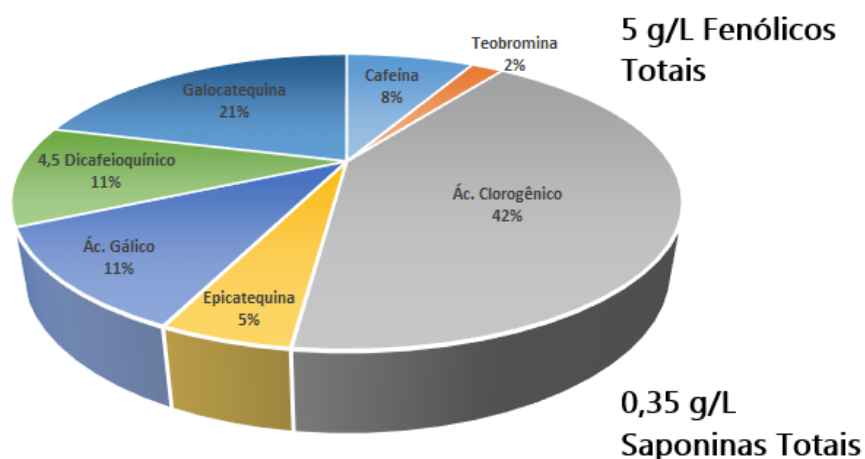


Figura 4 - Figura ilustrativa dos principais compostos do MATE. Adaptado de Bracesco *et al.* (2011).

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. 4). 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) demonstraram 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. 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

Investigar os mecanismos moleculares associados à cardioproteção induzida pelo consumo de MATE, com ou sem associação com o exercício físico aeróbio.

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 aeróbio 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 aeróbio.

4. Materiais e Métodos

4.1. Análise de Dados por Ferramenta de *Data Science*

Os gráficos foram gerados através de uma ferramenta *online* chamada RAWGraphs (<http://app.rawgraphs.io/>), que utiliza dados brutos para confeccionar gráficos diversos. Os dados do trabalho anterior (Cahue *et al.*, 2017) foram extraídos, organizados e salvos em um arquivo de extensão .csv para serem compatíveis com a ferramenta RAWGraphs. Para preservar o equilíbrio nas análises, que poderiam ser influenciadas pelo número de amostras por grupo (no trabalho anterior o número de amostras variou entre 6 e 7), foi utilizado $n=5$ para todos os grupos experimentais. As variáveis utilizadas em todas as análises gráficas foram TBARS (peroxidação lipídica), PC (proteína carbonilada), SOD (atividade da enzima Superóxido Dismutase) e razão GSH/GSSG, dada a sua relevância para os resultados do trabalho anterior. Foram contruídos três tipos de representações gráficas para analisar os dados. O gráfico “Paralelas Coordenadas” fornece um gráfico escalonado e multivariado equalizado para permitir a visualização de padrões nos dados. Os “Diagramas Aluviais” mostram o nível de contribuição de uma variável dentro de cada grupo, atribuindo um “peso” baseado em uma variável principal. Este gráfico exibe linhas que são ordenadas de valores mais altos (linhas mais espessas) para inferiores (linhas mais finas) convergindo em um impacto de valores em cada grupo. Finalmente, o gráfico *Convex Hull* mostra, em um gráfico de dispersão, uma análise agrupada baseada em polígonos que ajuda a entender o comportamento de cada grupo ao correlacionar duas variáveis. Todos os três gráficos, juntos, foram usados para mostrar padrões que podem ser usados para revelar quais variáveis estão relacionadas com o resultado correspondente (no caso do presente trabalho, cardioproteção).

4.2. 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 de protocolo 01200.001568/2013-87.

4.3. 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.

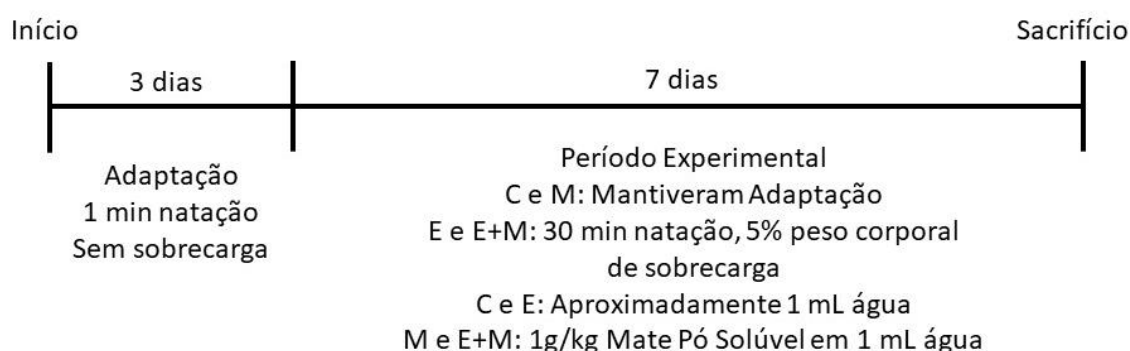


Figura 5 - Demonstrativo gráfico da linha experimental.

Como mostrado na Figura 5, 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.

4.4. Homogenização 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 a eutanásia o coração foi retirado e lavado com solução salina 0,9%. Após a lavagem os átrios foram desprezados e os ventrículos alíquotados 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.

4.5. 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).

4.6. 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).

4.6.1. 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.

4.6.2. 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.

4.6.3. 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 µL *Go Taq® PCR*

Master Mix (Promega, EUA), 0,6 µL da mistura de primers senso e reverso a 10 µM e 0,9 µL 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.

4.6.4. Ensaio de qRT-PCR

Para realizar a análise da expressão relativa o cDNA das amostras foi diluído a 5 ng/µL e 1 µL foi utilizado na reação de amplificação juntamente com 7,5 µL de Go Taq® PCR Master Mix, 0,6 µL da mistura de *primers* senso e reverso na concentração de 10 µM e 4,9 µL 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 1 - Desenho, senso e reverso, dos primers utilizados neste estudo.

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

4.7. Atividade da Glutathione Peroxidase

A atividade da enzima Glutathione Peroxidase foi verificada através de uma adaptação do protocolo descrito por Flohe 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.

4.8. Dosagem de Proteína

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

4.9. 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 $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Estresse Redutor: Provável Mecanismo Associado ao Efeito Cardioprotetor do Consumo de MATE

As análises gráficas baseada em *Data Science* permitiu um entendimento, para além das inferências estatísticas, do fenômeno associado à cardioproteção induzida pelo consumo de MATE e também pelo exercício físico. A figura 6 mostra um gráfico de coordenadas paralelas usando biomarcadores de danos redox, peroxidação lipídica (TBARS) e nível de carbonilação de proteínas, um biomarcador de equilíbrio redox, relação de glutathiona reduzida / oxidada (GSH/GSSG) e atividade de superóxido dismutase (SOD). Focamos nossa análise no grupo somente consumo de MATE (M; linha preta) e no grupo somente treinamento de exercício (E; linha vermelha). A análise do comportamento das linhas de dados mostra que as amostras do grupo M apresentaram valores mais altos de PC, TBARS e razão GSH/GSSG, sem um padrão na atividade SOD. Nas amostras do grupo E, os valores da atividade da SOD foram maiores que os observados no grupo M, com valores mais baixos para PC e TBARS. Estas observações sugerem que a cardioproteção induzida por MATE, no modelo deste trabalho, deve estar relacionada com maior dano redox e um balanço redox levemente maior.

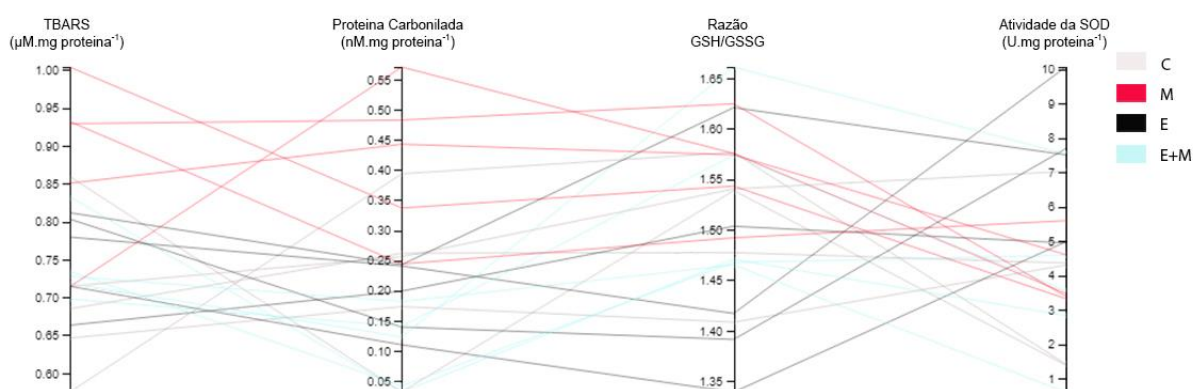


Figura 6 - Gráfico de Paralelas Coordenadas exibindo os dados de Peroxidação Lipídica (TBARS), Proteína Carbonilada, Razão GSH/GSSG e Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).

A figura 6 mostra quanto impacto essas variáveis exerceram em cada grupo. Ambos os biomarcadores de dano redox (PC na figura 7A e TBARS na figura 7B) e a razão GSH/GSSG (Fig. 7C) tiveram um impacto maior no grupo M, sugerindo que o MATE estaria aumentando o balanço redox, configuração compatível com ambiente

sujeito a estresse redutor. TBARS teve um impacto moderado no grupo E e E + M, enquanto o PC mostrou um impacto menor em E e E + M. Em contraste, a atividade da SOD pode ser observada como um dos principais efeitos da intervenção com exercícios (figura 7D).

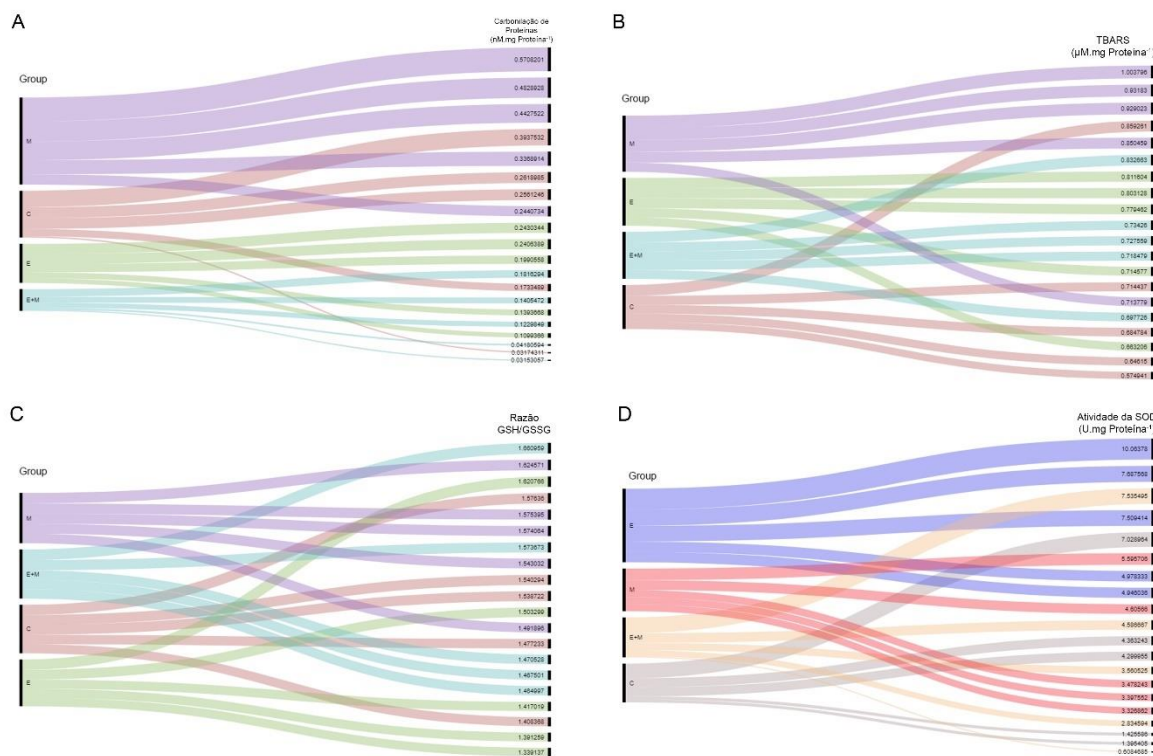


Figura 7 - Painel de Diagramas Aluviais. A - Carbonilação de Proteínas; B - TBARS; C - Razão GSH/GSSG; D - Atividade da SOD.

Na figura 8A e 8B pode-se observar, dentro do grupo M, um padrão com as amostras posicionadas no canto superior direito, representando níveis mais elevados de razão PC (8A), TBARS (8B) e GSH/GSSG, o que é consistente com o comportamento observado anteriormente (figuras 6, 7A e 7B) e compatível com um ambiente sob estresse redutor. Para verificar o impacto da atividade da SOD em PC e TBARS, correlacionamos essas variáveis e as amostras do grupo E apresentaram valores mais altos de atividade da SOD, acompanhadas de menores valores de PC (figura 8C) e TBARS (figura 8D). O grupo E + M apresentou valores menores e intermediários de atividade da SOD com menores níveis de PC e TBARS, sugerindo o efeito antioxidante e inibitório do consumo de MATE nas adaptações do treinamento físico.

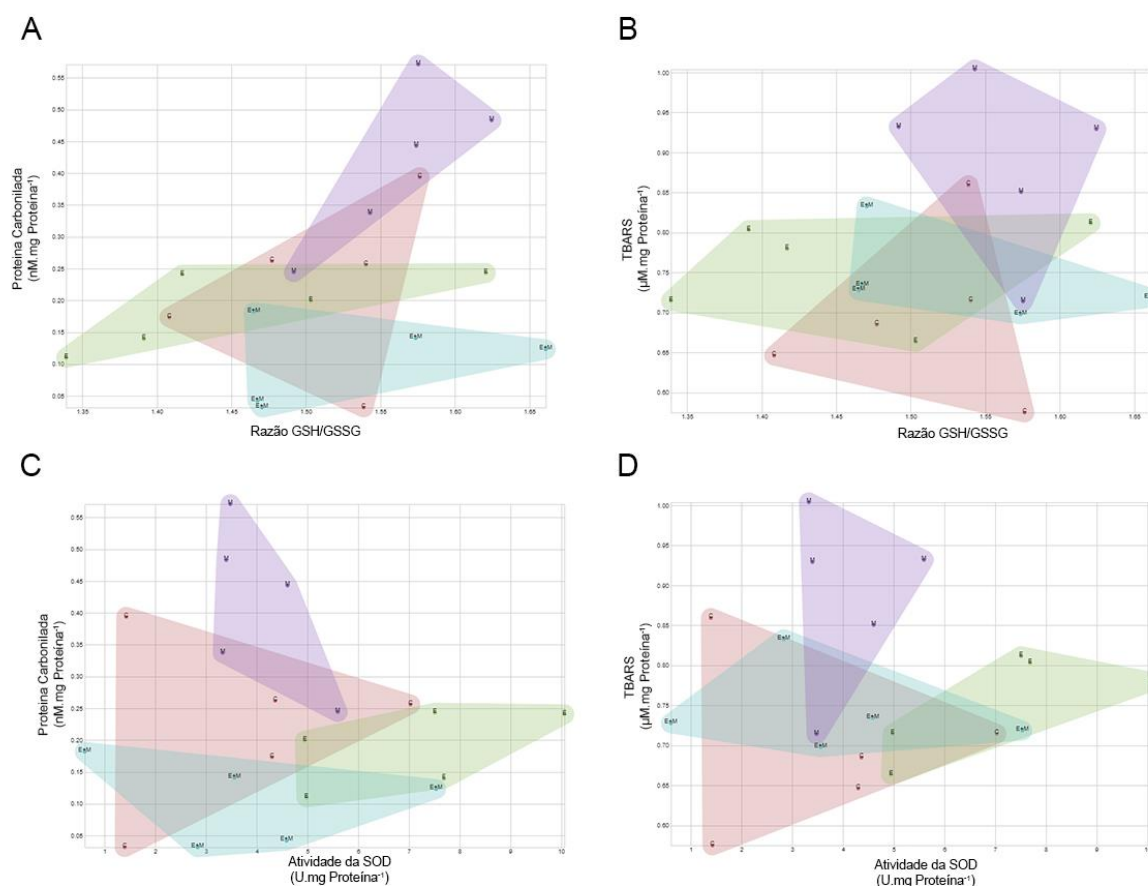


Figura 8 - Painel de Graficos "Convex Hull". A - PC x Razão GSH/GSSG; B - TBARS x Razão GSH/GSSG; C - PC x Atividade da SOD; D - TBARS x Atividade da SOD.

5.2. O Consumo de MATE e o Exercício Aeróbio de Baixa Intensidade em Curto Período Diminui a Concentração Citoplasmática de Nrf2

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 anteriormente, este aumento pode ser causado por um aumento do ambiente redutor. 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 ubiquitinação. Como mostra a figura 9, todas as intervenções diminuíram significativamente a quantidade da fração citoplasmática de Nrf2 em relação ao grupo controle (9A), sem alterações na fração nuclear (9B) ou na quantidade citoplasmática de Keap1 (9C).

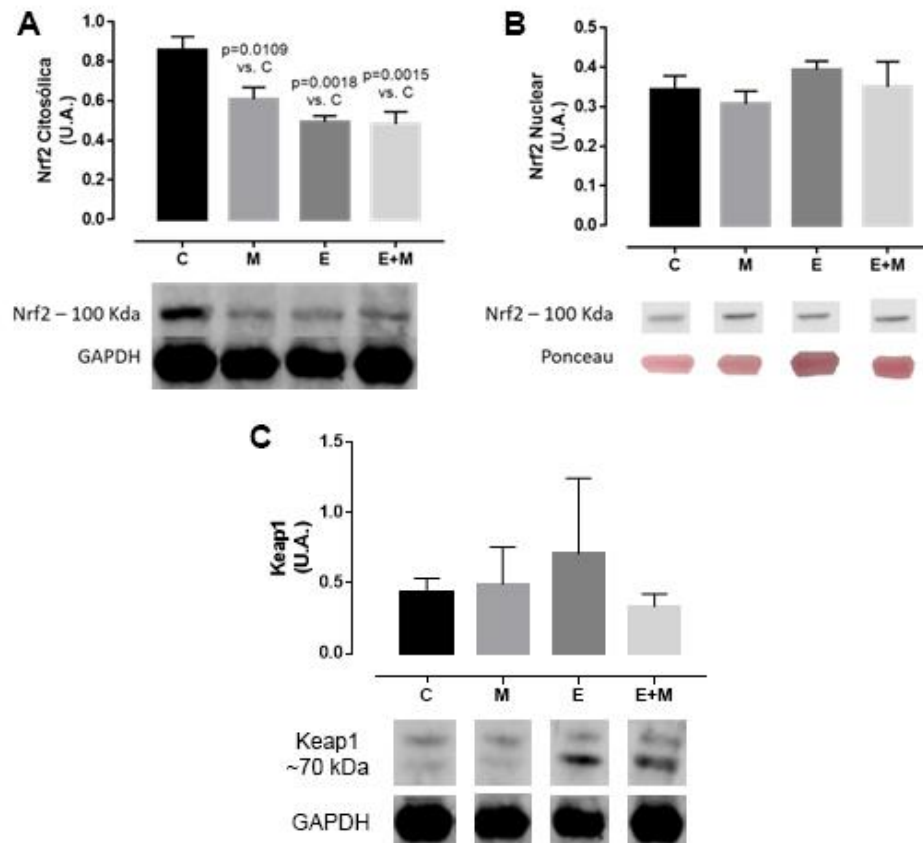


Figura 9 - Quantificação das proteínas Nrf2 e Keap1 por Western Blotting. (A) Quantificação de Nrf2 na fração citoplasmática. (B), Quantificação de Nrf2 em fração nuclear. (C) Quantificação de Keap1 em fração citoplasmática. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

5.3. 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 10A) com uma tendência a aumento do gene Keap1 (figura 10B, $p=0,0893$ vs. C), sugerindo que, apesar de as intervenções diminuïrem a quantidade citoplasmática de Nfr2 (o que pode sugerir sua translocação para o núcleo), somente o consumo de MATE foi capaz de modular a expressão gênica associada a Nrf2 e Keap1.

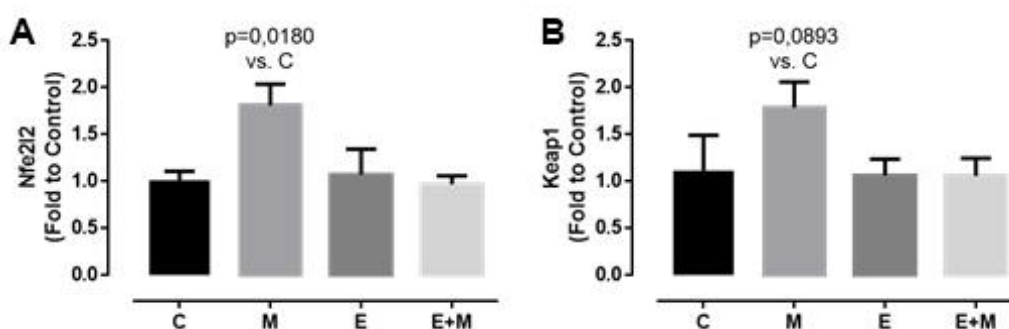


Figura 10 - Quantificação de RNAm dos genes Nfe2l2 (Nrf2) e Keap1 dos grupos experimentais. (A) Expressão de RNAm do gene Nfe2l2 (Nrf2). (B) Expressão de RNAm do gene Keap1. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

5.4. 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. 11A), Gpx1 (Fig. 11) e Gpx3 (Fig. 11F), 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. 10A). 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. 11B), Catalase (Fig. 11C) e Hmox1 (Fig. 11D).

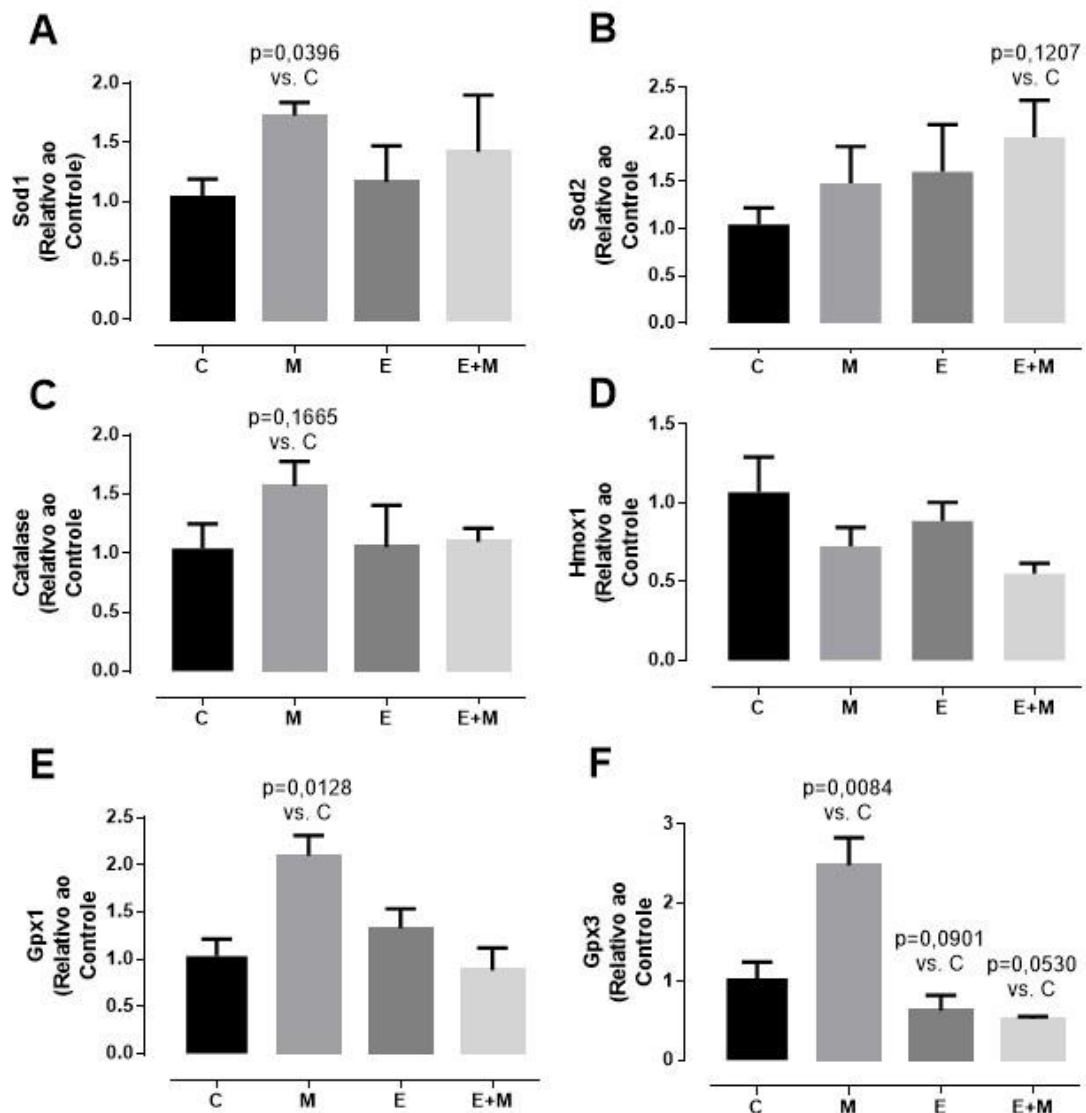


Figura 11 - Expressão de RNAm associadas a enzimas antioxidantes. (A) Sod1, (B) Sod2, (C) Catalase, (D) Hmox1, (E) Gpx1 e (F) Gpx3. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

5.5. 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 12, o grupo E teve redução significativa da expressão de Nox2 comparado ao grupo controle.

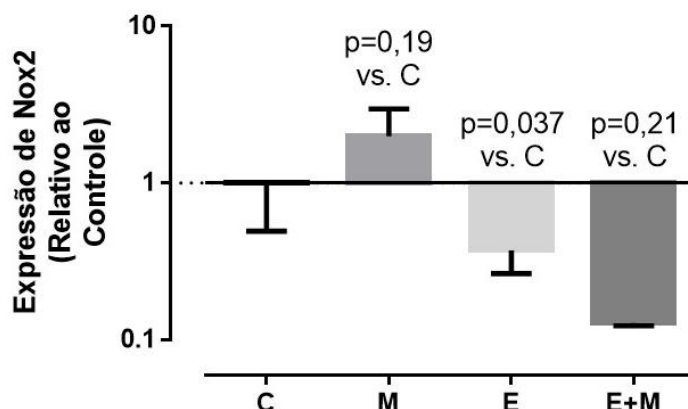


Figura 12 - Expressão de RNAm de Nox2. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

5.6. A Atividade da Glutaciona Peroxidase é Reduzida Pelo Exercício Físico e Consumo de MATE

Ao encontrar um aumento significativo da expressão de RNAm de Gpx1 e Gpx3, a avaliação da atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx) se fez necessária para verificar uma possível associação entre atividade enzimática e expressão gênica. No entanto, como pode ser visto na figura 13, todos os tratamentos experimentais reduziram significativamente a atividade da GPx em relação ao grupo controle.

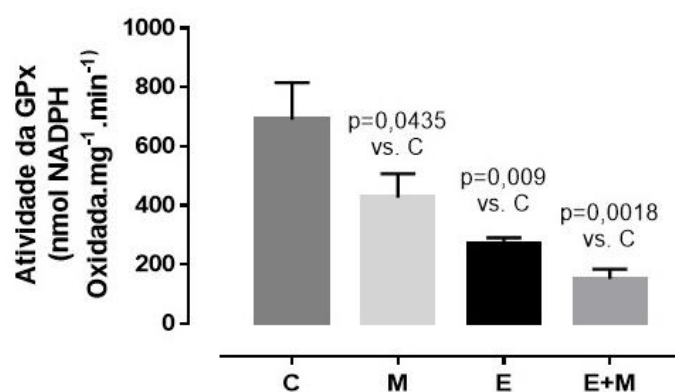


Figura 13 - Atividade da enzima Glutathiona Peroxidase. A comparação foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com pós teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli, com taxa de falsa descoberta $Q=0,05$. $n=5$ para cada grupo.

6. Discussão

Nosso trabalho anterior (Cahue *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.

6.1. 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. 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 Glutathione 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 conseqüente 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.

6.2. 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 Nfe2I2 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 Nfe2I2.

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 mantém 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 a 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.

7. Limitações do Estudo

O presente trabalho possui algumas limitações que devem ser superadas por outros estudos. Não houve a investigação de outras vias que podem estar associadas à cardioproteção e que são conhecidamente potencializadas pelo exercício físico e pelo consumo de MATE, como por exemplo a ativação da AMPK ou a regulação da expressão de RNAm de genes associados a enzimas que regulam a captação de glicose. Apesar deste estudo ter inferido, através da análise de dados feita com a ajuda das ferramentas de *Data Science*, que o estresse redutor estaria associado aos efeitos aqui observados, este trabalho não verificou o potencial redutor do tecido cardíaco após a intervenção com o consumo de MATE para confirmar a sugestão de que os mecanismos aqui investigados estariam sendo modulados por conta do estresse redutor. O presente trabalho também não trouxe à luz a quantidade de proteína associada as enzimas antioxidantes, o que poderia explicar, em parte as modulações de atividade vistas aqui e no primeiro trabalho. Finalmente, não houve a verificação da atividade da enzima NAD(P)H Oxidase, que poderia ter associação com o estresse redutor promovido pelo consumo de MATE sugerido por este estudo.

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.

9. Considerações Finais

O presente estudo mostra, na minha opinião, um limiar no que tange à adaptação positiva promovida pelo estresse redutor. A cardioproteção induzida pelo consumo de MATE, no modelo experimental deste trabalho, pode ter ocorrido em um tempo limite de tratamento, o que deve ser confirmado por trabalhos posteriores.

O exercício físico se mostra, mais uma vez, como uma possibilidade real de gerar adaptações positivas na proteção contra injúria promovida por isquemia e reperfusão. Os efeitos observados neste trabalho corroboram os resultados de alguns estudos anteriores, incluindo o meu trabalho anterior (Cahuê et al., 2017). Numa escala maior, o exercício físico pode ser considerado uma intervenção fundamental para a promoção de saúde e os efeitos encontrados pelo presente trabalho contribuem para esta afirmação. Cabe comentar que a inibição dos efeitos associados ao exercício físico através do consumo de MATE também corrobora outros estudos que sugerem que o estresse oxidativo intermitente gerado pelo aumento da necessidade energética durante atividades físicas é fundamental para que se potencialize os mecanismos adaptativos.

Finalmente, 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.

10. Referências

ABED, D. A. et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. **Acta Pharm Sin B**, v. 5, n. 4, p. 285-99, Jul 2015.

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.

CAHUE, F. et al. Short-term consumption of *Ilex paraguariensis* extracts protects isolated hearts from ischemia/reperfusion injury and contradicts exercise-mediated cardioprotection. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 42, n. 11, p. 1149-1157, Nov 2017.

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.

DONE, A. J.; TRAUSTADOTTIR, T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. **Redox Biol**, v. 10, p. 191-199, Dec 2016.

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.

FILIP, R. et al. Effect of Ilex extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 4, p. 649-55, Apr 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.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984.

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.

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 4, p. 176-88, Apr 2009.

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.

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

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 peroxynitrite decomposition catalyst, protects the heart against reperfusion injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 328, n. 3, p. 777-84, Mar 2009.

JIMENEZ-OSORIO, A. S. et al. Nrf2 and redox status in prediabetic and diabetic patients. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 11, p. 20290-305, Nov 6 2014.

KANNAN, S. et al. Nrf2 deficiency prevents reductive stress-induced hypertrophic cardiomyopathy. **Cardiovasc Res**, v. 100, n. 1, p. 63-73, Oct 1 2013.

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.

KATSUOKA, F. et al. Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 18, p. 8044-51, Sep 2005.

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.

KOBAYASHI, A. et al. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 1, p. 221-9, Jan 2006.

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.

KOLAMUNNE, R. T. et al. Nrf2 activation supports cell survival during hypoxia and hypoxia/reoxygenation in cardiomyoblasts; the roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Redox Biol**, v. 1, p. 418-26, 2013.

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

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375-81, Apr 2008.

LEE, J. M.; JOHNSON, J. A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **J Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 2, p. 139-43, Mar 31 2004.

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.

LI, Y.; PAONESSA, J. D.; ZHANG, Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35122, 2012.

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.

MAGYAR, K. et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 50, n. 3, p. 179-87, 2012.

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.

MCMAHON, M. et al. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. **J Biol Chem**, v. 281, n. 34, p. 24756-68, Aug 25 2006.

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.

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

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.

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.

SLOAN, R. P. et al. The effect of aerobic training and cardiac autonomic regulation in young adults. **Am J Public Health**, v. 99, n. 5, p. 921-8, May 2009.

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.

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

STEPKOWSKI, T. M.; KRUSZEWSKI, M. K. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 9, p. 1186-95, May 1 2011.

TAN, Y. et al. Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo. **Diabetes**, v. 60, n. 2, p. 625-33, Feb 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.

TONG, K. I. et al. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 8, p. 2887-900, Apr 2006.

TONG, K. I. et al. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. **Biol Chem**, v. 387, n. 10-11, p. 1311-20, Oct-Nov 2006.

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.

XING, K. et al. Cardioprotective Effect of Anisodamine Against Myocardial Ischemia Injury and its Influence on Cardiomyocytes Apoptosis. **Cell Biochem Biophys**, v. 73, n. 3, p. 707-16, Dec 2015.

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, D. D. et al. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. **J Biol Chem**, v. 280, n. 34, p. 30091-9, Aug 26 2005.

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 I - 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. Surprisingly, 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.

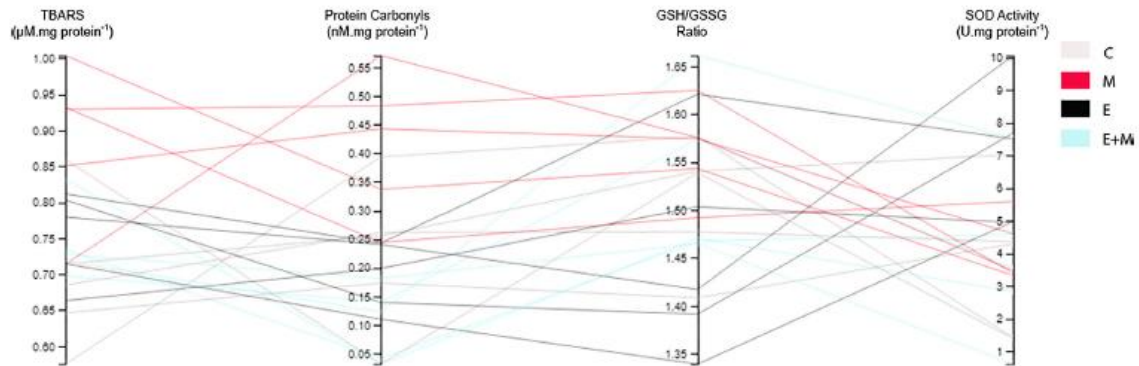


Fig. 1. Parallel Coordinates composed by TBARS, PC, GSH/GSSG Ratio and SOD activity. Black lines – Mate group. Red lines – Exercise Group. Light Blue lines – Exercise + Mate group. Light Grey lines – Control group. For each group n = 5.

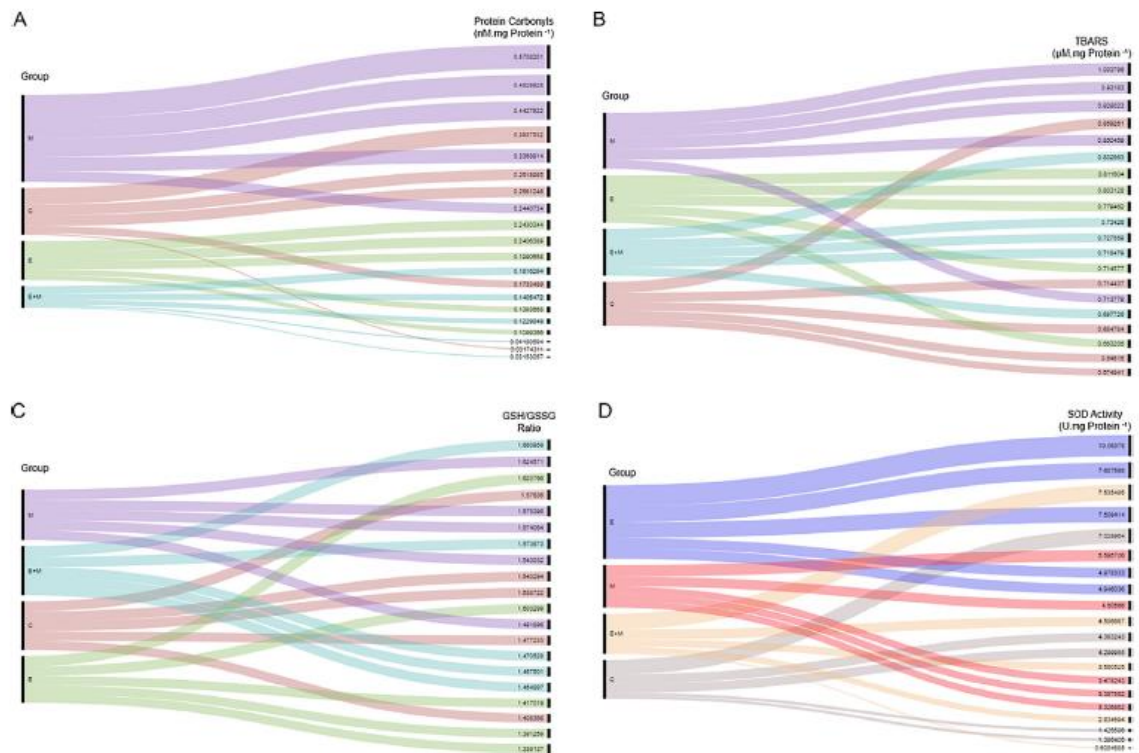


Fig. 2. Alluvial Diagram showing the impact of PC (A), TBARS (B), GSH/GSSG Ratio (C) and SOD activity (D) in each group. The order of group, from top to bottom, reflects the impact of individual values in the respective group. For all graphics, n = 5 for each group.

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. paraguayensis*-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

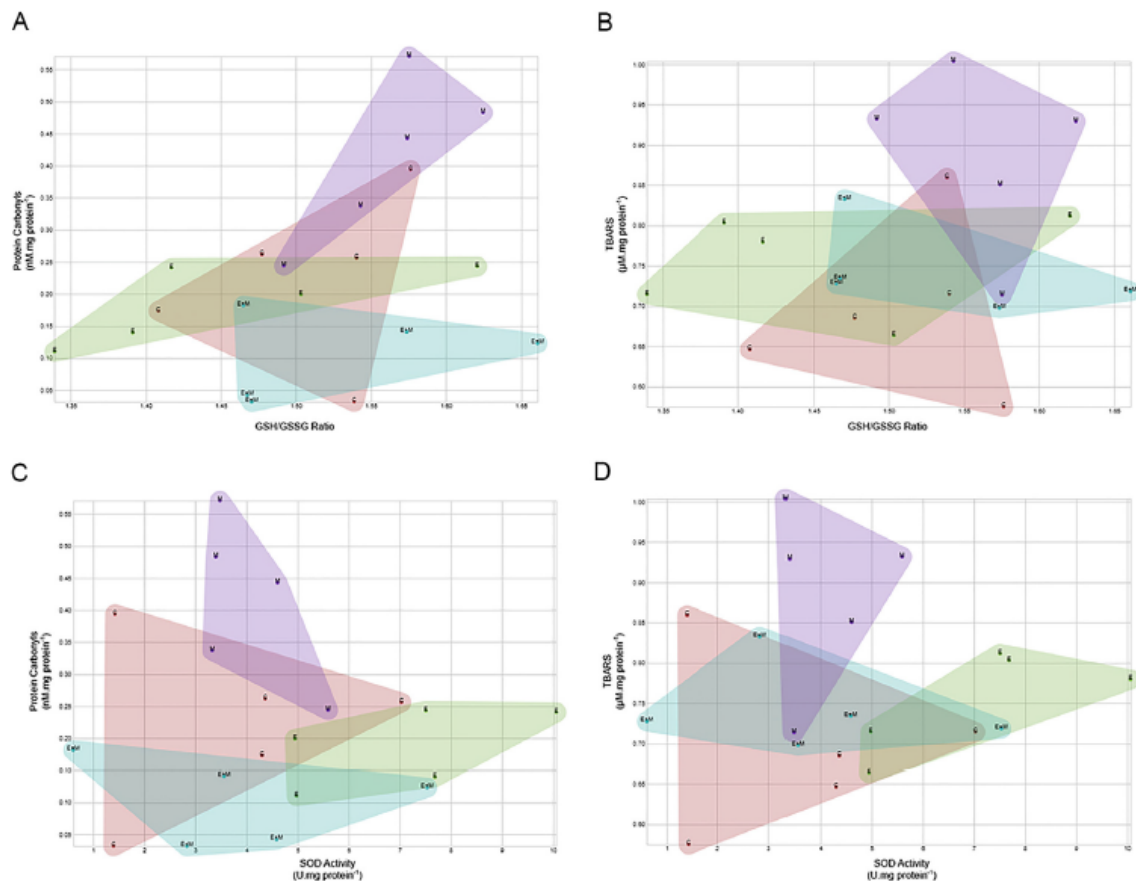


Fig. 3. Convex Hull graphics, correlating PC and TBARS with GSH/GSSG Ratio (3A and 3B), and with SOD activity (3C and 3D). For all graphics, $n = 5$ for each group.

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>.

ANEXO II – GRÁFICOS DO ARTIGO 1 EM ALTA RESOLUÇÃO

Figure 1

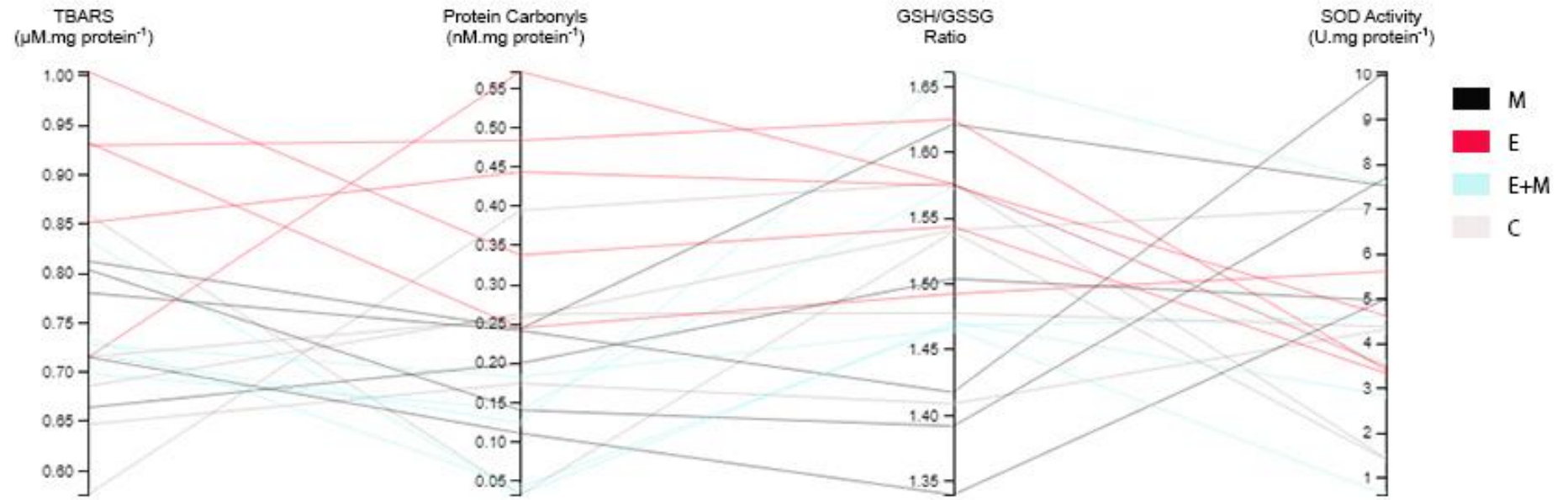


Figure 2A

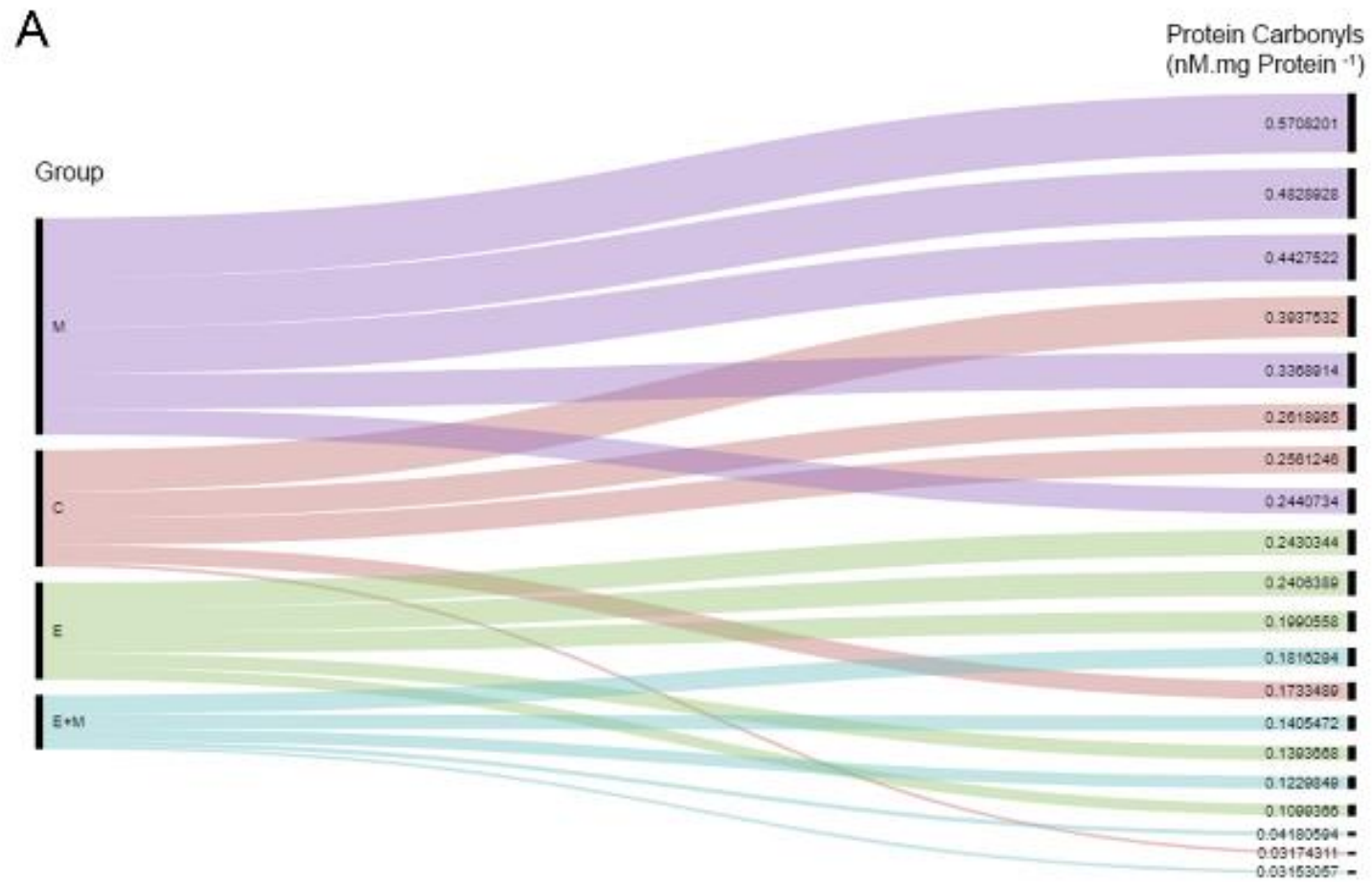


Figure 2B

B

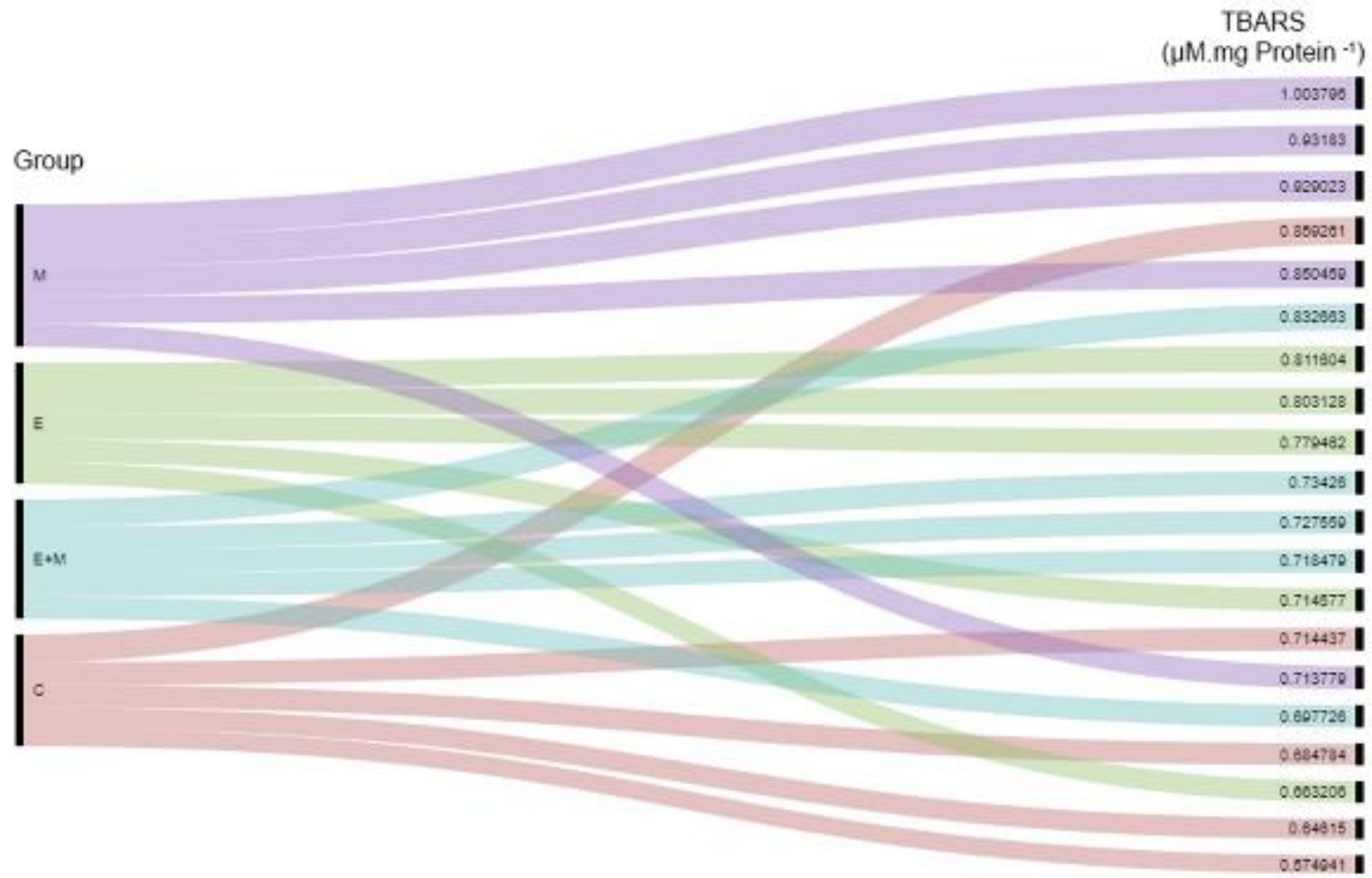


Figure 2C

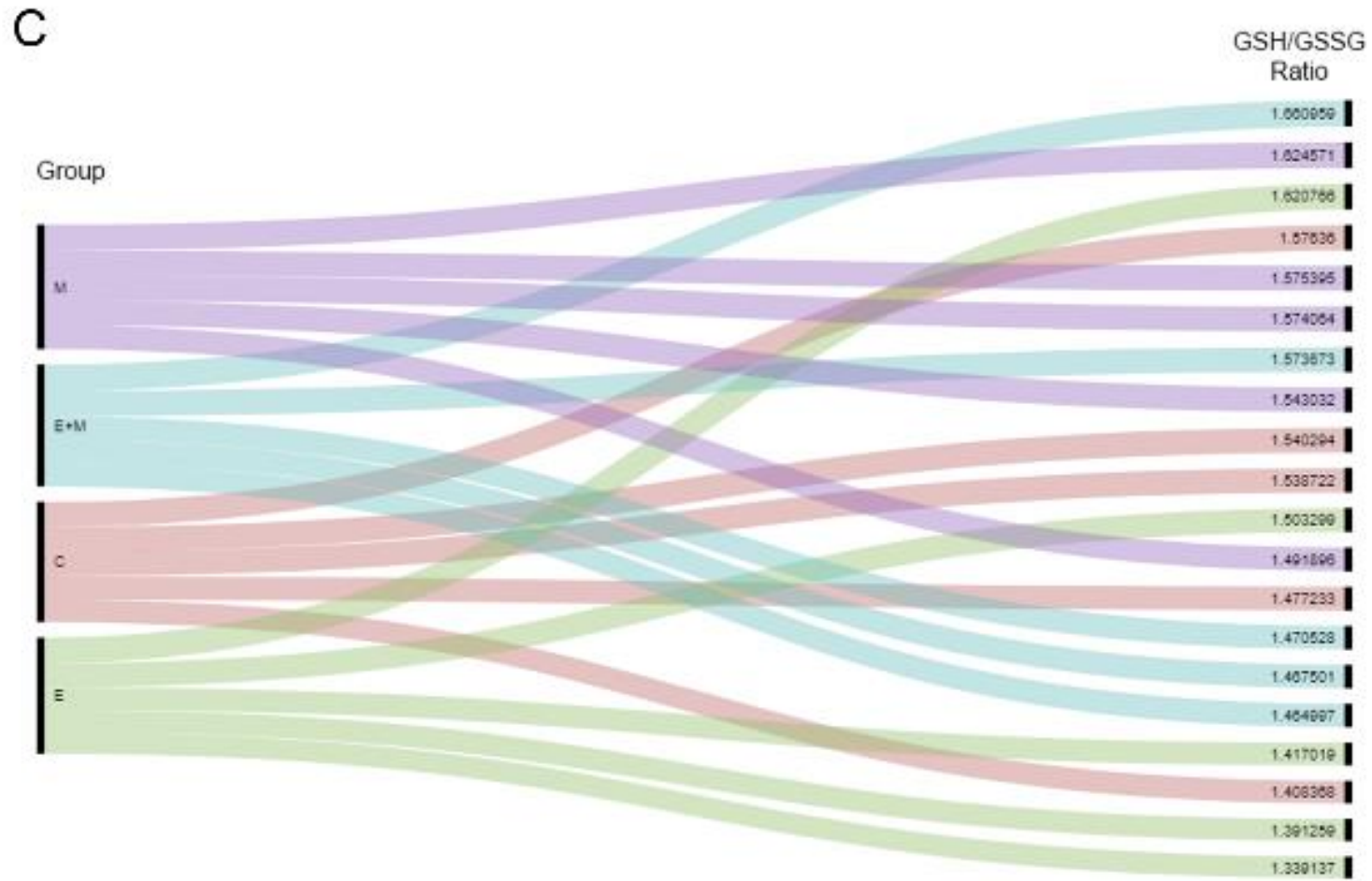


Figure 2D

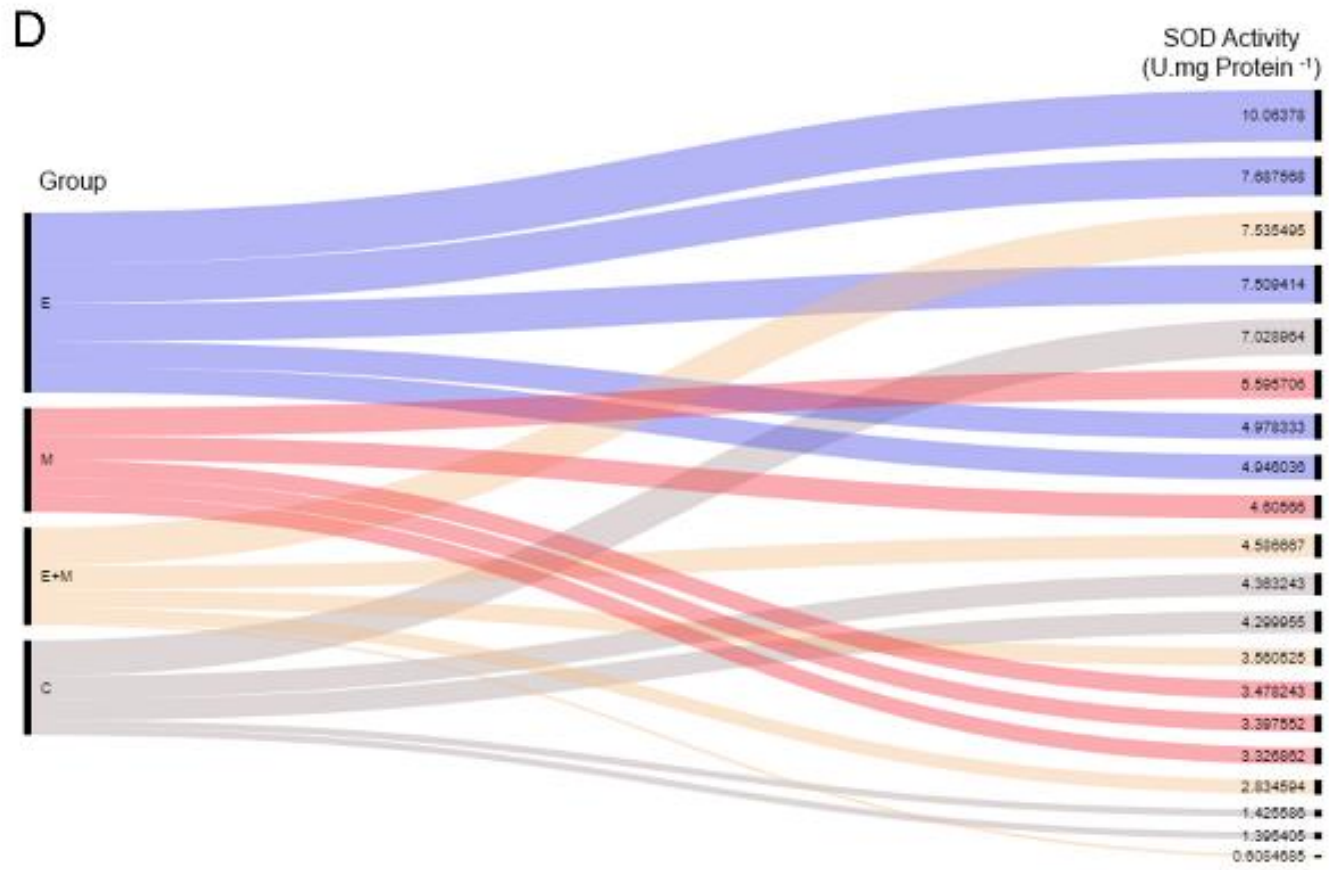


Figure 3A

A

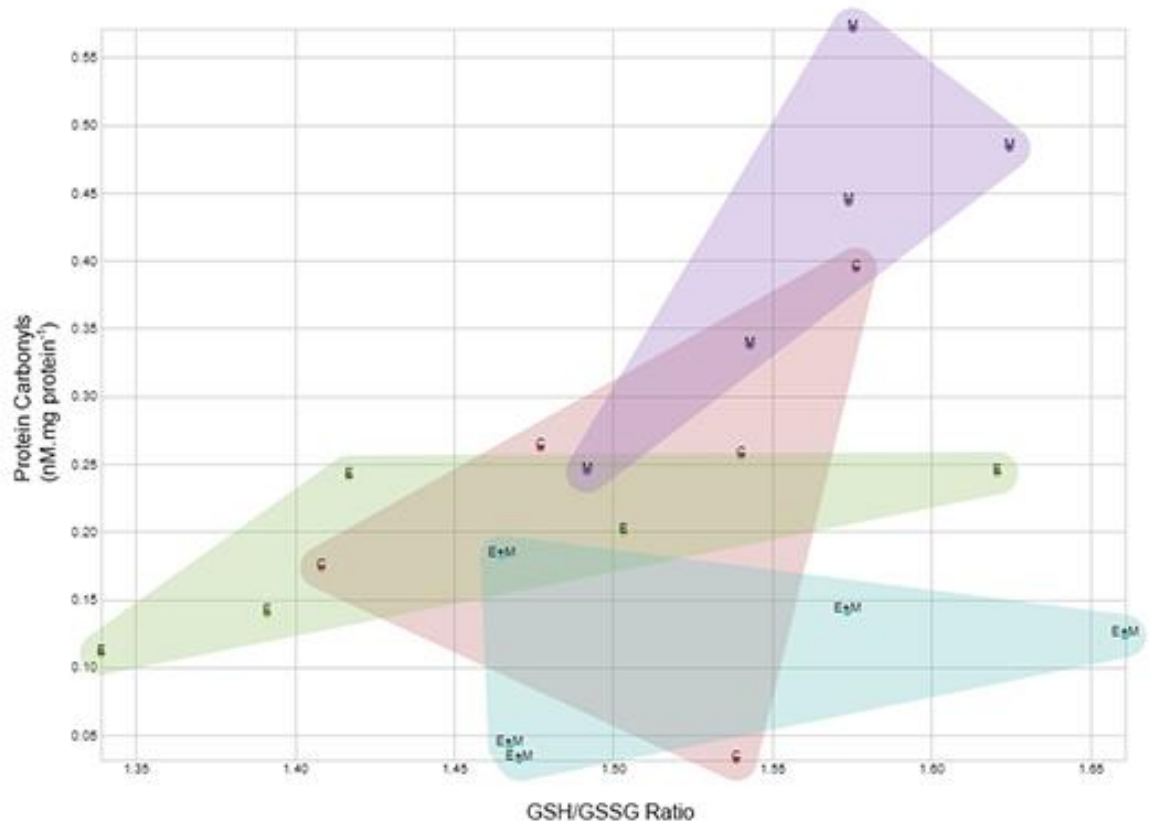


Figure 3B

B

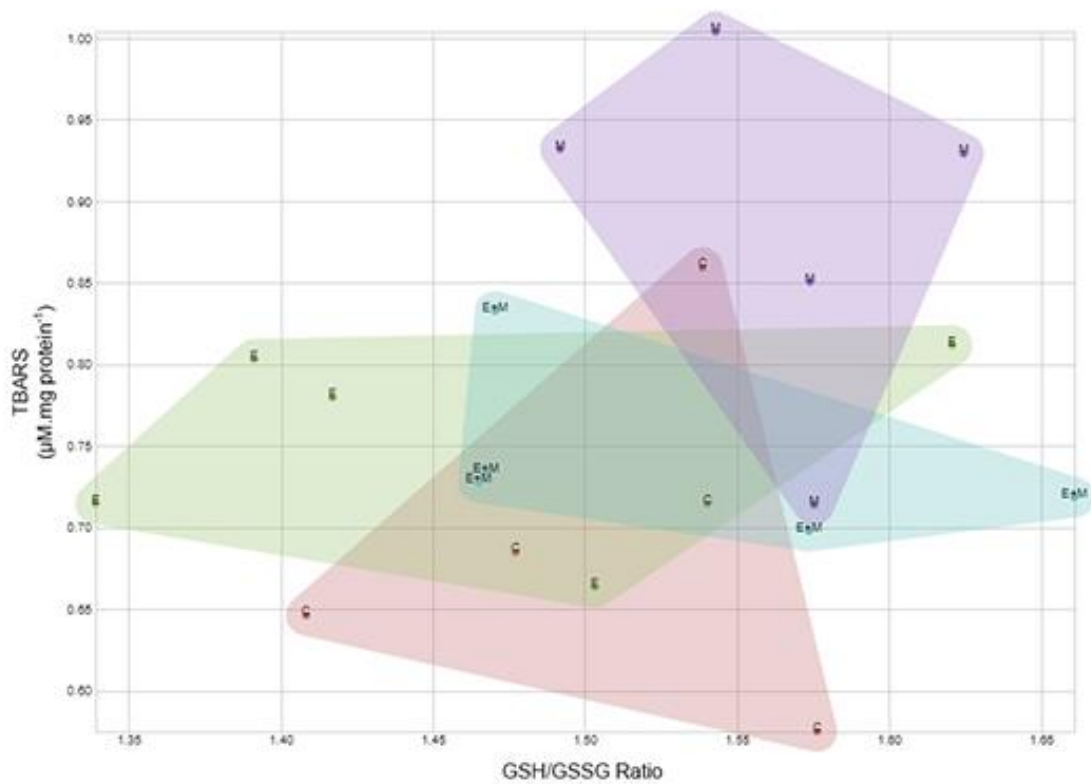


Figure 3C

C

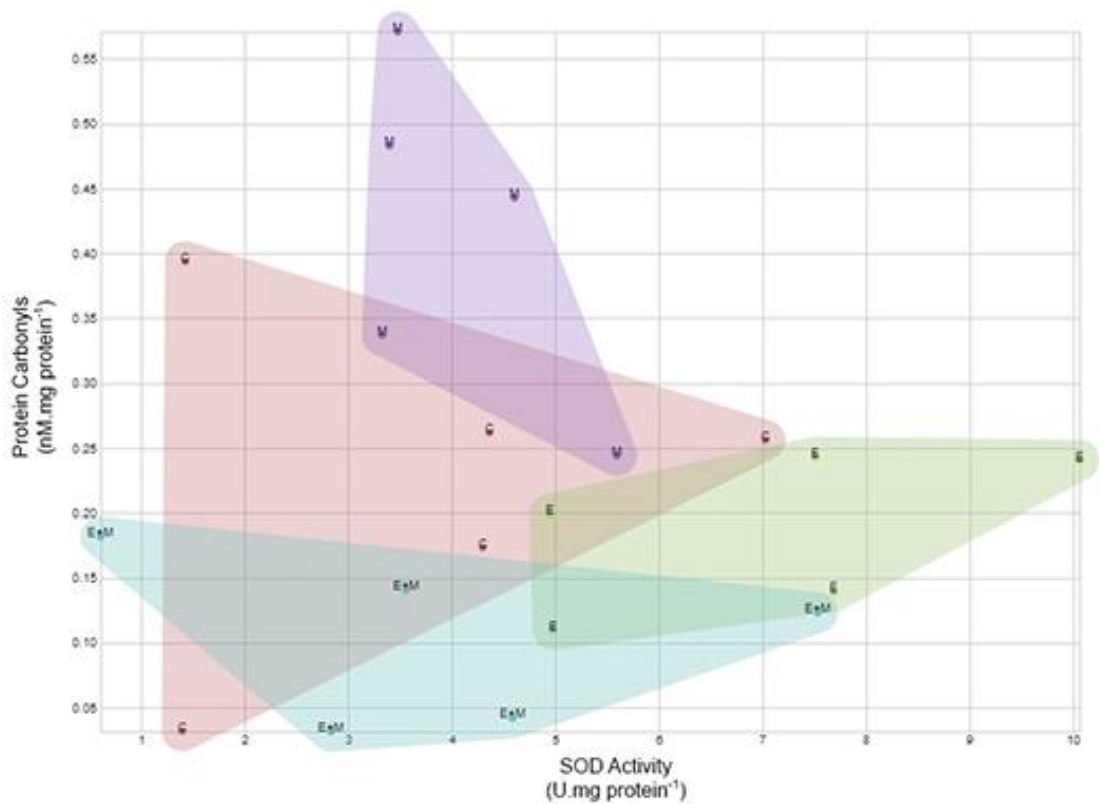
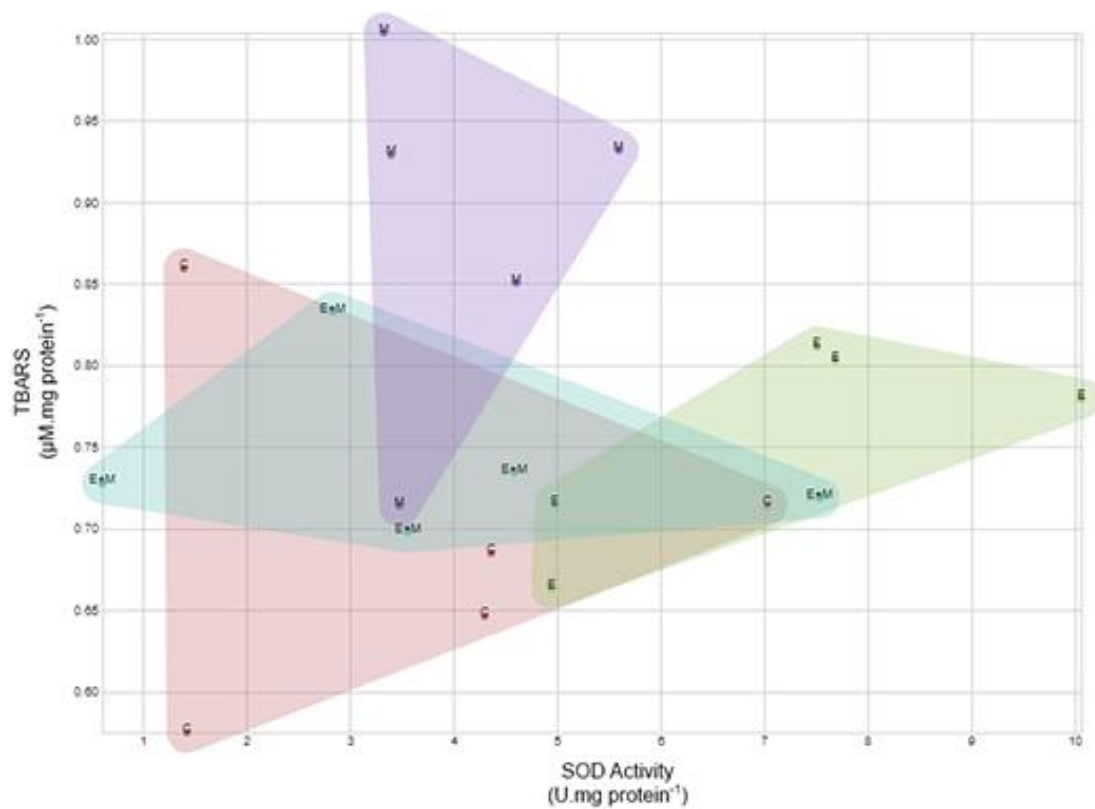


Figure 3D

D



ANEXO III – FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CCS - UFRJ



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 04 de maio de 2017

Prezada Professora Luciane Claudia Barcellos

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Exercício Físico Aeróbico e Consumo de Erva Mate: Estudo dos Efeitos Relacionados às Adaptações Promovidas por Infarto do Miocárdio.”**, protocolo nº **040/17**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **25/04/2017**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 04/12/2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	186 animais
Peso/idade	200-300g / 2-3 meses
Sexo	machos
Origem	Biotério Fernando Pompeu - EEFD UFRJ Biotério do IBCCF - CCS, bloco G 2º andar - UFRJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -
Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufjf.br