

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Fernanda Borges de Araújo Paula

**ATIVIDADE DO EXTRATO DE FRUTOS DE *Pterodon emarginatus* (SUCUPIRA
BRANCA) CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO INDUZIDO POR
EXERCÍCIO AGUDO EM RATOS**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e Molecular
na área de Bioquímica.**

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Campinas-SP

2004

Data da Defesa: 08/Julho/2004

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ione Salgado _____
(Depto. Bioquímica/ Instituto de Biologia /UNICAMP- Orientadora)

Prof. Dr. Stephen Hyslop _____
(Depto. Farmacologia/ Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP)

Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira _____
(Depto. Bioquímica/ Instituto de Biologia /UNICAMP)

Prof. Dr. Ronilson Aginaldo Moreno _____
(Curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica da Faculdade de Americana)

Profa. Dra. Celene Fernandes Bernardes _____
(Faculdade de Ciências Biológicas/Pontifícia Universidade Católica de Campinas)

SUPLENTE

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha _____
(Depto. Bioquímica/ Instituto de Biologia /UNICAMP)

Profa. Dra. Márcia Regina Braga _____
(Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas/Instituto de Botânica, São Paulo)

Aos meus pais, Victor e Adélia, que
sempre se dedicaram à minha formação
pessoal e profissional, o meu profundo
reconhecimento e eterna gratidão.

Ao meu esposo, Alexandre pelo incentivo,
compreensão, companheirismo e
principalmente, por cuidar do
nosso filho durante minha ausência.

Ao meu filho Bruno, razão da minha luta
e fonte inesgotável de alegria
e luz em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

-À Deus, pela sua presença maravilhosa em todos os momentos.

-À Prof^a Dra. Ione Salgado pela excelente orientação, pela dedicação e competência, sempre presentes. Obrigada pela disponibilidade e confiança no meu trabalho.

-À Prof^a Dra Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa pela valiosa co-orientação, tanto na condução dos experimentos, como também, junto à versão escrita desta tese. Obrigada por acreditar na realização deste trabalho.

-À estudante de iniciação científica, Patrícia Pereira Alfredo, pela dedicada contribuição junto aos experimentos, pela disponibilidade e pela amizade. Obrigada pelo compartilhamento de momentos sérios e também de descontração durante a realização deste trabalho, a qualquer hora do dia ou da noite

-À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal (EFOA/Ceufe), pela oportunidade de afastamento para a realização deste trabalho e pelo empenho para conseguir a bolsa PICDT.

-À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes) pela concessão da bolsa.

-Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, que gentilmente forneceu o extrato hexânico bruto de frutos de *Pterodon emarginatus*.

-À Prof^a Dra. Maria Júlia Alves Manso (Instituto de Química/USP) que gentilmente forneceu o material para a realização das análises de *Western blotting*.

-A todos os profissionais dos laboratórios da EFOA/Ceufe, onde os experimentos foram realizados, que gentilmente disponibilizaram o uso de equipamentos essenciais à realização deste trabalho.

-À todos os colegas do Laboratório de Bioquímica de Plantas, pela calorosa acolhida, e pela amizade que tornaram mais agradável minha estadia em Campinas.

-À Profa. Dra. Elzira Elisabeth Saviani pelo suporte técnico durante a realização dos experimentos e também pela disponibilidade e ajuda com todo o cotidiano do laboratório.

-Aos colegas e professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da EFOA/Ceufe pela colaboração.

-À funcionária Eliane Batista Rocha, pela dedicada contribuição, seja no preparo dos materiais usados nos experimentos ou no cuidado com os animais.

-Às secretárias do Instituto de Biologia/UNICAMP, Andréa e Marina, e à funcionária da pró-diretoria de pesquisa da EFOA/Ceufe, Marylucia Prado dos Reis Soares pela constante atenção, disponibilidade e ajuda nos processos burocráticos.

-Aos amigos Stella Maris, Maria Rita e Selmo, pela harmoniosa convivência e incentivo ao longo de todos estes anos em que trabalhamos juntos.

-Aos professores Elizângela Pereira Monteiro, Maria Rita Rodrigues, Josyclécio Megda e Antonio José de Figueiredo, que me substituíram com empenho e competência na disciplina de Bioquímica Clínica, para que eu pudesse me dedicar à realização deste trabalho.

-A todos aqueles que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho.

-A você, por prestigiar este trabalho com o seu interesse e leitura.

**“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o *dom* de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.**

**O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá;
Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos;
Mas quando vier o *que é* perfeito, então o que o é em parte será aniquilado”.**

Cor.13, 1-10

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO	
ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO.....	1
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	12
ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	15
EXERCÍCIO E LESÃO MUSCULAR.....	19
COMPOSTOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	27
ESTUDO DE PLANTAS DO GÊNERO <i>Pterodon</i>	29
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Lista de Abreviaturas

ADV – Ácido 6 α , 7 β -dihidroxiouacapânico-17- β óico

AMG – Aminoguanidina

ATP – Adenosina 5' trifosfato

BHT – Hidroxitolueno butilado

BSA – Albumina sérica bovina

CK – Creatina Quinase

cDNA - Ácido deoxirribonucléico de fita complementar

cGMP – Guanosina monofosfato cíclica

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido deoxirribonucléico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético

EHB – Extrato hexânico bruto

EHB.Exer - Grupo experimental que recebeu o EHB de *Pterodon emarginatus* antes do exercício intenso

EPR – Ressonância eletrônica paramagnética

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécie reativa de oxigênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Exer – Grupo experimental submetido ao exercício intenso

Exer.EHB - Grupo experimental que recebeu o EHB de *Pterodon emarginatus* após o exercício intenso

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FES – Eletroestimulação funcional

FMN – Flavina mononucleotídeo

GSH – Glutationa na forma reduzida

GSSG – Glutationa na forma oxidada

γ IFN – Interferon γ

IL- β - Interleucina beta

IL-1- β - Interleucina 1-beta

L-Arg – L-arginina

LD – Lactato desidrogenase

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina metil éster

LPS - Lipopolissacarídeo

MDA – Dialdeído malônico

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

mitNOS – Isoforma mitocondrial da óxido nítrico sintase

NADP⁺ - Nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato na forma reduzida

NADPH – Nicotinamida adenina nucleotídeo na forma reduzida

NF κ B – Fator nuclear kappa B

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – Óxido nítrico

NOH-Arg – N^w-hidroxi-L-arginina

NOS – Óxido nítrico sintase

cNOS – Isoforma constitutiva da óxido nítrico sintase (isoformas neuronal e endotelial, dependentes de cálcio)

eNOS ou NOS III - Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase

iNOS ou NOS II - Isoforma indutiva da óxido nítrico sintase

nNOS ou NOS I – Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS μ - Splicing alternativo μ da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS α - Splicing alternativo α da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS β - Splicing alternativo β da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS γ - Splicing alternativo γ da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

NO $_x$ – Derivados do óxido nítrico de baixo peso molecular

RNA – Ácido ribonucleico

RYR - Rianodina

PMSF – Fenil-metilfluoridosulfóxido

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SERCA – ATPase dependente de cálcio do retículo sarcoplasmático

SOD – Superóxido dismutase

TA – Tibial anterior

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS-TT – Tampão tris-HCl contendo tween e triton

α TNF – Fator de necrose tumoral α

Tris-HCl – Tris-[Hidroximetil]aminometano

Resumo

O exercício intenso pode levar à lesão muscular. Várias evidências apontam uma associação entre a lesão muscular induzida por exercício e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN). Estudos com animais têm demonstrado que o uso de antioxidantes, principalmente os obtidos de extratos vegetais como terpenos e fenóis, são capazes de remover os radicais livres ou modular a geração destas espécies oxidantes. A análise prévia do extrato hexânico bruto (EHB) de frutos de *Pterodon emarginatus* demonstrou a presença do ácido 6 α , 7 β -dihidroxiouacapânico (diterpenóide), β -cariofileno, α -pineno, mirceno, eugenol e geraniol. O objetivo do presente trabalho foi analisar os possíveis efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato hexânico bruto (EHB) de frutos de *P. emarginatus* sobre o estresse oxidativo e nitrosativo induzido por exercício intenso em cérebro, fígado e músculo tibial anterior de rato. Ratos Wistar machos adultos foram submetidos ao exercício intenso através de contrações padronizadas do músculo tibial anterior induzidas por eletroestimulação funcional (FES) a 50 Hz, durante 15 minutos. Os animais receberam uma (30 minutos antes ou 30 minutos após o exercício) ou três doses (24h, 12h e 30 min antes do exercício) de 498 mg/kg de EHB. A atividade de creatina quinase (CK) foi determinada por método cinético. A peroxidação lipídica foi estimada através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de nitrito foi avaliada através do método de Griess e a nitração de proteínas foi verificada através de ensaios de western blot. Os estudos *in vitro* demonstraram que o EHB inibiu a oxidação do guaiacol e a peroxidação lipídica em homogeneizados de cérebro e músculo tibial anterior de maneira dose-dependente. A IC₅₀ observada no teste de inibição da oxidação do guaiacol foi de 19,8 μ g/mL e nos testes de inibição da peroxidação lipídica foi de 16,2 μ g/mL para o cérebro e 26,7 μ g/mL para o músculo. A produção de nitrito em homogeneizados destes

tecidos foi inibida pelo EHB (IC₅₀ de 49 µg/mL e 42,3 µg/mL para o cérebro e músculo, respectivamente) e por L-NAME, AMG e EGTA. O efeito dos inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) foi potencializado na presença de EHB. Os ensaios *in vivo* mostraram que o exercício aumentou a atividade sérica de CK (111U/L no controle e 443U/L 1 h após o exercício), a peroxidação lipídica no cérebro (108,9%), fígado (55,5%) e músculo tibial anterior (967%) e também a concentração de nitrito (90,5%, 30,7%, 60%, respectivamente). A nitração de tirosina induzida por exercício foi observada em todos os tecidos analisados. A administração do EHB foi capaz de prevenir a lipoperoxidação, a produção de nitrito e a nitração de tirosina. Estes efeitos podem ser explicados pela presença dos compostos químicos presentes neste extrato tais como fenóis e terpenos, que têm demonstrado uma capacidade de sequestrar EROs e neste trabalho foi também demonstrada uma ação inibitória deste extrato sobre a enzima NOS.

Abstract

High-intensity exercise can cause muscle damage. Evidences point to a strong association between physical exercise-induced muscle damage and reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. Animal studies have shown that phytochemical antioxidants, such as terpenes and phenols are capable of removing free radicals. Previous chemical analysis of the hexane crude extract (HCE) of *Peterodon emarginatus* showed the presence of the acid 6 α , 7 β -dihydroxyvouacapane-17 β -oic (diterpenoid), β -cariophyllene, α -pinene, myrcene, eugenol and geraniol. The aim of the present work was to evaluate the effect of HCE in oxidative and nitrosative stress induced by intense exercise in brain, liver and tibialis anterior muscle of rats. Adult male Wistar rats were submitted to standardized contractions by functional electrical stimulation (FES) of the anterior tibialis muscles (50 Hz, 15 min). Animals were subjected to one dose (30 min before or 30 min after exercise) or three doses (24h, 12h and 30 min before exercise) of 498 mg/kg HCE oral administration. Serum creatine kinase (CK) activities were measured by kinetic method. Lipoperoxidation was estimated by measuring of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). NO production was evaluated by measuring nitrite formation, using Griess reagent and tyrosine nitration was assessed by western blot analysis. *In vitro* studies demonstrated that HCE inhibited guaiacol oxidation (IC₅₀=19,8 μ g/mL) as well as brain and muscle lipid peroxidation with IC₅₀ of 16,2 μ g/mL and 26,7 μ g/mL, respectively. The extract affected nitric oxide synthase (NOS) activity in brain (IC₅₀=49 μ g/mL) and muscle (IC₅₀=42,3 μ g/mL) homogenates of adult Wistar rats. Nitrite production in brain and muscle tissue homogenates decreased in the presence of NOS inhibitors (N^G-nitro-L-arginine methyl ester and aminoguanidine) and was even lower in the presence of HCE. The *in vivo* studies demonstrated that serum CK activities in the controls (111U/L) increased after 1h FES (443U/L). Intense exercise also increased the lipid

peroxidation in the brain (108,9%), liver (55,5%) and tibialis anterior muscle (967%), and also nitrite levels in 90,5%, 30,7%, 60%, respectively. The tyrosine nitration induced by exercise was identified in these tissues. Previous treatment with HCE decreased the lipoperoxidation, nitrite production and also the tyrosine nitration leading to the levels of controls. This effect could be explained by the chemical composition of this extract, that has phenols and terpens, which exhibit free radical scavenging activity and the present results also indicate that EHB has also NOS inhibitory properties.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

O termo espécies reativas de nitrogênio (ERN) se refere ao estado de oxidação de produtos nitrogenados tais como, óxido nítrico (NO) e outras espécies resultantes de reações de oxidação, redução ou formação de adutos a partir deste composto, como o dióxido de nitrogênio (NO₂), nitrito (NO₂⁻), trióxido dinitrogênio, (N₂O₃), nitrotióis, peroxinitrito (OONO[•]) e ácido peroxinitroso (OONO[•]H) que podem ocorrer fisiologicamente (EISERICH et al., 1998).

Nos sistemas biológicos a principal fonte de ERN é o NO. Desde 1987, quando a importância fisiológica desta molécula foi determinada, os estudos sobre seu papel na patofisiologia de doenças, uso terapêutico, assim como seus efeitos deletérios em animais e seres humanos passaram a ser alvo de muitos pesquisadores (FREDSTROM, 2002; MONCADA et al., 1991). Em 1992, o NO foi eleito pela revista Science como “A Molécula do Ano”. Em 1998, Ferid Murad, Louis Ignarro e Robert Furchgott receberam o prêmio Nobel de Medicina por demonstrarem que o NO produzido a partir da oxidação da L-arginina à L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) atua como um sinalizador fundamental em células animais (HOWLETT, 1998). O crescente interesse e rápido progresso no estudo da enzima NOS revelou que o NO é uma potente molécula, capaz de controlar e influenciar uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos em mamíferos.

Quando presente em concentrações fisiológicas, o NO atua como molécula sinalizadora em processos diversos, como regulação do fluxo sanguíneo, relaxamento da musculatura lisa, neurotransmissão, inibição da aglutinação de plaquetas, adesão celular, regulação da contratilidade da musculatura esquelética (MONCADA et al., 1991; STAMLER

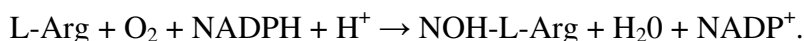
& MEISSNER, 2001). Nestes processos o NO atua se ligando ao grupamento hêmico da guanilil ciclase ou provocando a S-nitrosilação de fatores de transcrição e canais iônicos.

No sistema nervoso, o NO interfere na sinaptogênese, na modulação da liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica e morte celular, sugerindo que esta molécula desempenha papéis importantes no desenvolvimento, na manutenção e nas modificações funcionais do circuito cerebral (DAWSON & SNYDER, 1994; HOLSCHER, 1997; SCHUMAN & MADISON, 1994). Ainda, está envolvido no processo de aprendizagem e memória (LAW et al., 2002) e também no efeito analgésico da acetilcolina (MONCADA et al., 1991).

Na musculatura esquelética, o NO atua na regulação do fluxo sanguíneo, da contratilidade, na produção de energia e no metabolismo da glicose (REID, 1998; STAMLER & MEISSNER, 2001). Nas fibras musculares estriadas, o NO interage diretamente com várias classes de proteínas, tais como, guanilil ciclase solúvel, ATPase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e também com complexos da cadeia respiratória mitocondrial e espécies reativas de oxigênio. Além disso, o NO produzido e liberado por fibras musculares em contração se difunde próximo às arteríolas onde atua inibindo a vasoconstrição (REID, 1998; STAMLER & MEISSNER, 2001).

1.1.1 Óxido Nítrico Sintase

O óxido nítrico é formado através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), onde a L-arginina é primeiramente oxidada ao intermediário estável, N^W-hidroxi-L-arginina (NOH-Arg):



Posteriormente, através da oxidação do NOH-L-Arg, são produzidos o NO e a L-citrulina, numa reação com a seguinte estequiometria:

$$\text{NOH-L-Arg} + \text{O}_2 + \frac{1}{2} (\text{NADPH} + \text{H}^+) \rightarrow \text{L-citrulina} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{NADP}^+$$

(EISERICH et al., 1998).

A NOS funciona como um dímero com dois monômeros idênticos que podem ser divididos em dois domínios principais: um domínio C-terminal redutase e um domínio N-terminal oxigenase. O domínio N-terminal oxigenase contém o sítio de ligação com a L-arginina, enquanto que o domínio C-terminal redutase, transfere elétrons para o domínio N-terminal, tendo sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH, em homologia com a enzima citocromo P450 redutase (ANDREW & MAYER, 1999).

Nos mamíferos, 3 isoformas distintas da enzima NOS, com diferentes estruturas e funções, já foram indentificadas. As isoformas endotelial (eNOS, 134 KDa) e neuronal (nNOS, 160 KDa) são referidas normalmente como NOS constitutivas e são Ca^{2+} -dependentes, embora possam também ser ativadas de uma forma independente de cálcio. A NOS induzida (iNOS, 130KDa) é expressa em altos níveis somente após sua indução por citocinas e outros agentes inflamatórios e sua atividade é independente do aumento da concentração de cálcio. As 3 isoformas são caracterizadas por alta homologia nos domínios oxigenase e redutase, mas ao mesmo tempo cada uma exibe características distintas que refletem suas funções específicas *in vivo* (ANDREW & MAYER, 1999).

1.1.1.1 Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS)

Foi primeiramente caracterizada e purificada a partir de cerebelo de ratos e suínos, sendo também denominada NOS I. A nNOS está amplamente distribuída em neurônios do sistema nervoso central e periférico onde o NO produzido atua como neurotransmissor ou

neuromodulador (PARK et al., 2000; FÖRSTERMANN et al., 1998). Embora a nNOS tenha sido primeiramente descrita no tecido nervoso, sua expressão em células não neuronais foi posteriormente demonstrada em diversas espécies. A presença de nNOS tem sido evidenciada no músculo esquelético, pulmões, rins, testículo, pênis, uretra, glândula adrenal, pâncreas e intestino (PARK et al., 2000; FÖRSTERMANN et al., 1998; ANDREW & MAYER, 1999).

mRNA para nNOS foi primeiramente observado em músculo esquelético humano em 1993 (NAKANE et al., 1993). Esta proteína é expressa pelas fibras musculares e por axônios de neurônios que passam através do tecido muscular. No músculo de ratos e outros mamíferos pequenos a nNOS é mais evidente nas fibras de contração rápida e está localizada próximo ao sarcolema, concentrada na placa motora e associa-se ao complexo distrofina (BRENMAN et al., 1996). No músculo esta isoforma é induzida por treinamento físico (BALON & NADLER, 1997).

O estudo da expressão e localização sub-celular da nNOs é bastante complicado devido a ocorrência de quatro *splicings* alternativos no mRNA da nNOS que determinam a síntese de quatro peptídeos diferentes (WANG et al., 1999). A expressão da nNOS μ foi principalmente demonstrada ligada ao sarcolema (SILVAGNO et al., 1996). A nNOS α foi localizada em mitocôndrias e portanto também é denominada de mtMOS (ELFERING et al., 2002). Dois outros *splicings* são expressos no citoplasma, a nNOS β e a nNOS γ (MUNGRUE et al., 2003).

Embora a nNOS seja normalmente expressa de maneira constitutiva, várias condições fisiológicas e patológicas podem alterar sua expressão, conferindo-lhe um importante papel no desenvolvimento de várias doenças.

A transcrição aumentada do mRNA da nNOS parece representar uma resposta geral de células neuronais ao estresse induzido por uma grande quantidade de agentes físicos, químicos e biológicos, tais como calor, estimulação elétrica, exposição à luz,

colchicina, formalina, fenobarbital e substâncias alérgicas (ANDREW & MAYER, 1999). O estresse celular é conhecido como iniciador da expressão de um número de genes resultando em lesão celular e apoptose (ANDREW & MAYER, 1999). Alguns autores têm demonstrado um aumento na atividade de nNOS no músculo tibial anterior de ratos após exercícios crônicos, sugerindo que a expressão desta isoforma nestes animais pode ser modulada pela atividade muscular (REISER et al., 1997). Por outro lado, a ausência de nNOS no sarcolema tem sido observada na distrofia muscular de Duchenne e na distrofia muscular de Becker (STAMLER & MEISSNER, 2001).

1.1.1.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS)

Também denominada NOS III, foi primeiramente identificada nas células endoteliais de vasos sangüíneos, sendo considerada como a principal fonte de NO endotelial. Posteriormente, foi demonstrado que a eNOS é expressa também no cérebro, músculo esquelético, fígado, coração, rins, plaquetas e ovário (PARK et al., 2000; FÖRSTERMANN et al., 1998). O NO produzido pela eNOS é responsável pelo relaxamento vascular, pela modulação da agregação plaquetária e proliferação de células da musculatura lisa (MONCADA et al., 1991).

Esta isoforma está presente na fibra muscular esquelética (KOBZIK et al., 1994) e sua expressão não difere entre as fibras de contração rápida e lenta. Distribui-se heterogeneamente por toda fibra e através de imunocitoquímica aparece co-localizada com a succinato desidrogenase, uma enzima marcadora de mitocôndria (KOBZIK et al., 1995).

Embora a eNOS seja freqüentemente referida como constitutiva, uma série de fatores como hipóxia, estrógeno, citocinas, lipoproteína de baixa densidade oxidada, além do exercício, podem alterar sua expressão (FÖRSTERMANN et al., 1998; ANDREW &

MAYER, 1999), sendo que, sua ativação pode ser induzida por catecolaminas, vasopressina, bradicinina, histamina e serotonina, via ativação de receptores de proteína G (ANDREW e MAYER, 1999). A ativação da eNOS por forças mecânicas, também é mediada por ativação de proteína G (ANDREW & MAYER, 1999). À semelhança da nNOS, a eNOS também pode ser regulada por exercício físico (BALON & NADLER, 1997; EISERICH et al., 1998).

1.1.1.3 Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS)

Denominada também NOS II, ao contrário das outras 2 isoformas, a iNOS não contém um alvo específico na membrana, sendo encontrada tanto na membrana de neutrófilos humanos, quanto de macrófagos de camundongos. Além disso, a proporção de enzima ligada à membrana varia conforme a espécie e o tipo de célula.

A iNOS pode ser induzida por mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral- α (α TNF), interleucina- β , (IL- β), interferon- γ (γ IFN), na maioria das células vasculares, incluindo células endoteliais, miócitos cardíacos, células da musculatura lisa, hepatócitos, cérebro e macrófagos, o que resulta em aumento da produção de NO (ANDREW & MAYER, 1999). Sob condições normais, tem pouca ou nenhuma expressão na maioria dos tecidos, mas alguns autores têm demonstrado a expressão constitutiva de mRNA para iNOS em alguns tecidos, sendo sugerido que a expressão espontânea da iNOS possa ocorrer em células que estejam passando por um processo de multiplicação e desenvolvimento ativo (PARK et al., 2000).

O principal regulador da atividade da iNOS parece ocorrer ao nível da transcrição, sendo que o fator nuclear kB (NFkB) parece desempenhar o papel principal regulando a transcrição da iNOS (ANDREW & MAYER, 1999). Tem sido demonstrado níveis aumentados de mRNA para iNOS em leucócitos humanos e também de citocinas, capazes de

estimular a expressão da iNOS, após atividades físicas (NIESS et al.,1999; VITI et al.,1985; CANNON et al., 1989).

A iNOS não é expressa continuamente no músculo esquelético, mas pode ser induzida por inflamação. Estudos com células C2C12 (WILLIAMS et al., 1994) demonstraram que a linhagem de células miogênicas é capaz de expressar a iNOS, quando expostas a citocinas exógenas, como interferon e α TNF ou interferon e IL-1. O seqüenciamento de cDNA demonstrou exata homologia entre a iNOS de miócitos e de macrófagos de camundongo. As fibras musculares diferenciadas de ratos são capazes de expressar a iNOS *in vivo* (THOMPSON et al., 1996). Esses autores demonstraram que a injeção intravenosa de endotoxinas induziu aumento de mRNA de iNOS e esta aumentou no diafragma e músculo dos membros no período de 4 h. Após 8 h a atividade da NOS independente de cálcio permaneceu aumentada em homogeneizados de músculo.

1.1.2 Produção de NO pela fibra muscular

As isoformas da NOS são expressas pela fibra muscular *in vivo*. O ensaio de redução do citocromo c tem sido utilizado para demonstrar que os feixes de fibras do diafragma liberam NO e derivados para o espaço extracelular. (ANDRADE et al., 1998; KOBZIK et al., 1994). Dados obtidos utilizando quimioluminescência também demonstraram a liberação de NO no extensor longo dos dedos de rato em repouso (BALON & NADLER, 1994). A distribuição de NO não é restrita ao espaço extracelular, mas ocorre também no sarcoplasma (ANDRADE et al., 1998). As fibras musculares em repouso podem gerar oxidantes intracelulares em nível basal, baixo (REID et al., 1992a). Esta produção pode ser parcialmente inibida na presença de inibidores da NOS.

Como outros processos cálcio-dependentes, a atividade da cNOS pode ser induzida por atividade muscular. A liberação de NO aumentou de 50-200% durante os períodos de contração isométrica repetitiva (BALON & NADLER, 1994). Assim, o NO pode atuar como um sinalizador extracelular dependente da atividade muscular, que pode mediar a sinalização célula-célula durante o exercício, como a promoção da vasodilatação.

A produção e distribuição do NO no músculo esquelético é similar à observada para as espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são detectadas no sarcoplasma (REID et al., 1992a) e no espaço extracelular (REID et al., 1992b) de fibras em repouso. As contrações musculares repetitivas, além de estimularem o aumento de derivados do NO estimularam também o aumento de EROs (REID et al., 1992; DIAZ et al., 1993) A sinalização do NO na fibra muscular parece ser influenciada pelas EROs, porque o NO sofre prontamente reações de trocas de elétrons com as EROs e ainda o NO compete com as EROs por alvos moleculares redox-sensíveis (REID, 1998).

1.1.3 Reatividade do Óxido Nítrico em Sistemas Biológicos

O NO é uma molécula sem carga, com sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, apresentando, portanto um elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio, o que o torna instável e altamente reativo (MATEO & ARTIÑANO, 2000). Além disso, a natureza altamente lipofílica deste radical permite sua fácil difusão através de membranas celulares em poucos segundos, o que o torna potencialmente tóxico (MURPHY, 1999).

Alvos potenciais da ação do NO incluem proteínas que contêm metais de transição seja como grupo heme ou complexos não-hêmicos, principalmente as que apresentam centros ferro-enxofre (Fe-S), onde adutos NO-Fe-S são formados (MURPHY, 1999).

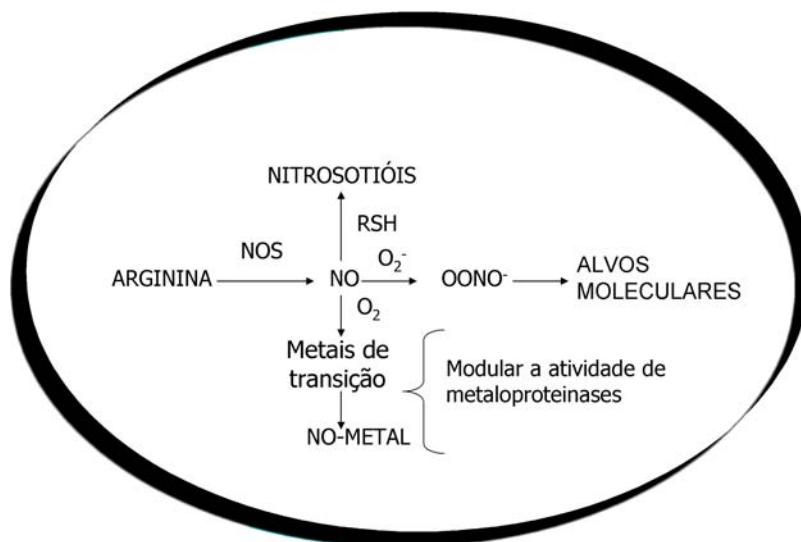
O NO produzido em outros compartimentos se difunde facilmente para as mitocôndrias e além disso, a síntese de NO também pode ocorrer nestas organelas. Na mitocôndria, o NO se liga reversivelmente ao grupo heme a_3 na citocromo-c oxidase inibindo o transporte de elétrons em níveis fisiológicos de oxigênio. Desta forma, o NO pode regular a função mitocondrial *in vivo* por bloquear a respiração e a síntese de ATP, e por causar a liberação de cálcio mitocondrial. Em baixas concentrações, o NO se liga ao sítio ligante de oxigênio na citocromo c oxidase, competindo com o mesmo e inibindo reversivelmente a respiração mitocondrial. Em concentrações mais elevadas, o NO pode inibir diferentes complexos da cadeia respiratória, provavelmente por nitrosilar ou oxidar proteínas contendo tióis ou remover íons ferro de centros ferro-enxofre (MURPHY et al., 1999).

No músculo os alvos moleculares do NO enquadram-se em três categorias (esquema 1). Primeiramente, o NO reage com o oxigênio molecular e ânion superóxido, gerando uma gama de derivados do NO de baixo peso molecular (NO_x), que mantem a atividade redox e podem participar de reações de transferência de elétrons (STAMLER et al., 1992). A reação entre o NO e ânion superóxido gera peroxinitrito, um dos radicais livres mais reativos do sistema biológico e um mediador da injúria oxidativa (REID, 2001a). O músculo esquelético produz ambos, NO e ânion superóxido. Portanto, o peroxinitrito pode ser formado no músculo, por uma via importante nos estados patológicos que aumentam os níveis de NO. Apesar de sua natureza não-radicalar, o peroxinitrito é a molécula mais reativa dentre as ERNs, sendo um agente fortemente oxidante de moléculas aromáticas e compostos organosulfurados que apresentam resíduos de aminoácidos ou peptídeos: a cisteína e a glutathiona, que são antioxidantes importantes, são convertidos a dissulfitos; a metionina é convertida a sulfóxido ou fragmentada a etileno ou dimetildissulfito; o dimetil sulfóxido é oxidado a formaldeído; a tirosina e o triptofano passam por oxidações unieletrônicas formando radicais catiônicos, que são hidroxilados, nitrados e dimerizados. O peroxinitrito

pode reagir com lipídios e pela abstração de um átomo de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados resultar na formação de derivados nitrados. Este pode ser o passo inicial da peroxidação lipídica podendo levar à formação de vários compostos tais, como, dienos conjugados, malondialdeído, peróxidos e hidroperóxidos lipídicos (PATEL et al., 1999). A interação do peroxinitrito com ácidos nucleicos leva à formação de 8-hidroxidesoxiguanosina ou 8-nitroguanina. A quebra da dupla fita de DNA induzida pelo peroxinitrito pode ativar a poli-(ADP-ribose) polimerase, com conseqüente depleção de ATP, o que contribui para a necrose celular (VIRAG et al., 2003; SZABÓ, 2003).

Os derivados do NO reagem com metais de transição como o ferro hêmico ou centros contendo enxofre, formando os adutos NO-metal. Este mecanismo representa o mecanismo primário do tamponamento de NO pela mioglobina e hemoglobina. É um mecanismo, no qual o NO pode também modular a atividade de metaloproteinases. No músculo, o NO-heme aumenta a atividade de guanilil ciclase, aumentando o nível de GMPc (KOBZIK et al., 1994).

O NO interage com tióis reduzidos, sendo estes seus alvos primários. O NO reage com tióis (RSH, RS⁻) de proteínas, via S-nitrosilação, formando grupos RS-NO. Esta reação é rapidamente revertida pela transferência do NO para outros centros contendo enxofre. A S-nitrosilação da glutatona e outros tióis de proteínas não-regulatórias representam outro mecanismo do tamponamento do NO. Esta reação também pode regular a função de proteínas por alteração da conformação, acelerando a formação de pontes dissulfeto ou influenciando a reatividade do centro contendo o metal. Os produtos finais do metabolismo do NO são nitrato e nitrito, sendo este o mais estável (STAMLER, 1994).



Esquema 1: reatividade do NO na fibra muscular

A formação de nitrotirosina é particularmente favorável, e a sua presença pode conduzir à disfunção de várias proteínas, tais como, superóxido dismutase, actina do citoesqueleto, tirosina hidroxilase neuronal, citocromo P450, prostaciclina sintase e creatina quinase. A detecção de 3-nitrotirosina por técnicas analíticas e imunológicas tem demonstrado que a nitração de tirosina ocorre em uma variedade de doenças. Já foi demonstrado que a nitrosilação de creatina quinase miofibrilar induzida por peroxinitrito pode conduzir à disfunção contrátil e neurotoxicidade devido à lesão de DNA e/ou apoptose (VIRAG et al., 2003; MIHM et al., 2000). Evidências recentes sugerem que a nitração de proteínas tais como β -enolase, α -frutose aldolase e creatina quinase pode ser em parte, responsável pelo declínio da função motora muscular induzida pelo aumento exacerbado da produção de NO (KANSAKI et al., 2003).

O NO é uma molécula pequena, eletricamente neutra e difunde-se livremente pelo tecido muscular. Assim, o NO pode exercer efeito autócrino, parácrino ou ambos. Os fatores que limitam a disponibilidade de NO no tecido muscular tendem a favorecer o efeito autócrino desta molécula (LANCASTER, 1994). Estes fatores incluem: taxa baixa de síntese de NO ou em padrão intermitente; alta reatividade das moléculas-alvo com a célula produtora

de NO e a localização de seqüestrantes, como a mioglobina e glutathiona na fibra muscular. Em condições basais, a taxa de síntese de NO na fibra muscular é baixa e a fibra contém muitos alvos que reagem avidamente com o NO. Assim, o NO parece exercer efeito autócrino na fibra muscular em repouso. Condições que estimulam a síntese do NO, como o exercício e a sepse, podem fazer o NO se difundir por grandes distâncias, aumentando a probabilidade de atuação parácrina (REID, 1998).

1.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

In vivo, o oxigênio é reduzido à água, via quatro elétrons, na cadeia respiratória. Porém, o oxigênio pode sofrer uma redução parcial com formação de produtos intermediários altamente reativos, sendo sua toxicidade decorrente da formação de seus derivados parcialmente reduzidos (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila), denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) (FRIDOVICH, 1998).

Na maioria das células que utilizam o oxigênio, este é reduzido pela citocromo c oxidase que, em virtude de seus dois grupamentos heme e dois grupos prostéticos Cu(II), controla a redução do oxigênio à água, via quatro elétrons, evitando a formação de tais produtos intermediários. No entanto, existem nas células, outras enzimas capazes de reduzir o oxigênio a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), assim como processos enzimáticos e espontâneos que produzem ânion radical superóxido (O₂⁻) (FRIDOVICH, 1998). Estima-se que em situações normais, apenas uma pequena fração do oxigênio total seja reduzida à O₂⁻, no entanto, nas células em que a velocidade de utilização do oxigênio é alta, esta fração poderia corresponder a uma produção O₂⁻ intracelular de 5 μmol.L⁻¹/S (GARDNER & BOVERIS, 1990; IMLAY & FRIDOVICH, 1991).

O ânion radical superóxido pode se difundir a uma distância considerável e atingir alvos críticos. Em solução aquosa o ânion superóxido e sua base conjugada, o radical hidroperóxil (HO_2^\cdot), sofrem dismutação espontânea, resultando na formação de H_2O_2 (BIELSKI, 1978). Embora, o O_2^\cdot seja instável em meio aquoso, o aumento de pH favorece sua estabilidade, de maneira que em pH neutro este radical é capaz de oxidar compostos tais como polifenóis, tióis, ascorbato, catecolaminas, leucoflavinas, tetraidropteridinas e sulfito (FRIDOVICH, 1998). Além disso, pode inativar a aconitase e desidratases contendo grupos [4Fe 4S] (GARDNER et al., 1995; FRIDOVICH, 1998).

O peróxido de hidrogênio é uma substância não-radicalar sendo sua reatividade em meio aquoso limitada, no entanto, pode atravessar membranas biológicas (YU, 1994) e por interação com o ânion superóxido, na presença e íon metálico (ferro ou cobre), gerar EROs mais oxidantes e citotóxicas como o radical hidroxila (OH^\cdot), altamente reativo. Devido à sua extrema reatividade acredita-se que o OH^\cdot seja a principal ERO responsável por modificações de macromoléculas e dano celular (FRIDOVICH, 1998). Outras espécies oxidantes que podem ser formadas são o ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Além de ser um potente agente microbicida, o ácido hipocloroso está envolvido na sinalização da apoptose de células do sistema imune (WINTERBOURN et al., 2000) e o $^1\text{O}_2$ pode exercer um importante papel como molécula sinalizadora na expressão gênica em eucariotos, participando da ativação do fator de transcrição NF-kB (MATROULE et al., 2000), assim como ativação de quinases e outras enzimas (KLOTZ et al., 2003).

1.2.1 Formação EROs em sistemas biológicos

O radical superóxido pode ser formado por reações de auto-oxidação e oxidações enzimáticas em organelas subcelulares através de diferentes vias. Dentre as substâncias de

interesse biológico que podem se autooxidar gerando superóxido incluem-se: hemoglobina (GIULIVI et al., 1994; NAGABABU & RIFKIND, 2000), mioglobina (GUNTHER et al., 1999), flavinas (FANG et al., 2000), catecolaminas (FANG et al., 2000) e quinonas (WATANABE & FORMAN, 2003). Estas reações são geralmente em cadeia, nas quais o superóxido pode atuar como iniciador e propagador. Várias enzimas tais como, xantina oxidase, aldeído oxidase, NADPH oxidase e uma série de flavinas desidrogenases geram superóxido. Outras fontes geradoras de superóxido incluem a oxidação de compostos reduzidos (nicotinamida e flavina dinucleotídeos) via transporte de elétrons mitocondrial e redução unieletrônica do oxigênio pela citocromo P-450 ou pela NOS quando a arginina ou a tetraidropteridina estão deficientes (FANG et al., 2002; FRIDOVICH, 1998).

A enzima superóxido dismutase converte o O_2^- em peróxido de hidrogênio que é formado, portanto, nos processos que geram superóxido. O H_2O_2 pode também ser formado através da redução bieletrônica do oxigênio catalisada por enzimas tais como, citocromo P-450, d-aminoácido oxidase, acetil coenzima A oxidase ou ácido úrico oxidase. A oxidação de sarcosina, na via metabólica da glicina, também gera H_2O_2 . (FANG et al., 2002; FRIDOVICH, 1998).

O radical hidroxila é altamente reativo para aminoácidos e outras moléculas, como, por exemplo, metalotioneínas, hemoglobina, deoxirribose, ribose e bases nitrogenadas purínicas e pirimídicas encontradas no DNA e RNA. Esta alta reatividade implica que esta espécie, quando gerada *in vivo*, reagirá *in situ*. Na maioria dos sistemas envolvendo ERO, o radical hidroxila parece ser o agente oxidante iniciador das lesões (STOHS & BAGCHI, 1995).

A interação entre peróxido de hidrogênio e ânions cloreto, pode levar à formação do ácido hipocloroso (HOCl), através de uma reação catalisada pela enzima

mieloperoxidase, principalmente em células fagocíticas imunologicamente ativadas (FANG et al., 2002).

O $^1\text{O}_2$ pode ser formado pela reação do HOCl com H_2O_2 , sendo que a formação intracelular deste composto tem sido demonstrada durante processos inflamatórios (TATSUZAWA et al., 1999). Outros processos capazes de gerar oxigênio singlete são a peroxidação lipídica e transições redox de quinonas, ou ainda a partir da dismutação do superóxido em meio aquoso (KHAN, 1981, MONTHILAL et al., 2004).

Em condições fisiológicas, aproximadamente 1 a 3% do oxigênio consumido pelo organismo é convertido em superóxido e outras EROs, onde tais espécies podem atuar na regulação de uma variedade de mecanismos moleculares relacionados a importantes processos, tais como, resposta imune, adesão e proliferação celular, inflamação, metabolismo e morte celular. Várias moléculas que são criticamente importantes na sinalização celular e na regulação da expressão gênica são sensíveis às ERO quando produzidas em concentrações ideais (SEN, 2001).

Por outro lado, a produção exacerbada destas espécies pode determinar uma lesão mitocondrial, que leva à morte celular e lesões do DNA por quebra ou formação de adutos, ou ainda pela sua interação com lipídios, proteínas, carboidratos, provocar modificações nestas macromoléculas (ZWART et al., 1999). Portanto, apesar de serem moléculas essenciais para os organismos aeróbios, as ERO podem em certas condições se tornar potencialmente tóxicas.

1.3 Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante

Os organismos aeróbios são protegidos por um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas e substâncias protetoras não enzimáticas (ZWART et al., 1999). Alguns atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radicalares, suprimindo a

geração de radicais livres, ou eliminando-os. Algumas enzimas, tais como glutathione peroxidase e catalase, decompõem hidroperóxidos lipídicos e o peróxido de hidrogênio sem gerar radicais livres. Proteínas transportadoras de íons ferro e cobre, como a transferrina e a ceruloplasmina, atuam impedindo que estes metais catalisem reações oxidativas, já os carotenóides e a enzima superóxido dismutase atuam suprimindo o oxigênio singlete e catalisando a dismutação do ânion radical superóxido, respectivamente (FRIDOVICH, 1998; FANG et al., 2000).

Os antioxidantes seqüestradores captam os radicais rapidamente, inibindo a iniciação da cadeia radicalar e/ou interrompendo a propagação da mesma, doando um átomo de hidrogênio para formar um composto estável e um radical derivado do antioxidante. Esses antioxidantes podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os compostos tais como ascorbato, urato, bilirrubina, albumina e componentes contendo grupamento tiol agem como antioxidantes hidrossolúveis, sendo capazes de seqüestrar radicais livres somente no meio aquoso, não podendo seqüestrar radicais lipofílicos localizados nas membranas celulares. Já o alfa-tocoferol, é conhecido como o mais importante antioxidante seqüestrador de radicais lipossolúveis, protegendo as membranas celulares contra radicais lipofílicos (HALLIWELL, 1994).

Os componentes do sistema de reparo são enzimas capazes de destruir proteínas danificadas por radicais livres, remover ácidos graxos oxidados presentes nas membranas e reparar lesões no DNA induzidas por radicais livres (HALLIWELL, 1994; SLUPPHAUG et al., 2003).

Estes antioxidantes agem cooperativamente protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. No entanto, em condições de exaustão, é criado um estado de estresse oxidativo e nitrosativo, levando a danos nestes sistemas. Sendo assim, muitos trabalhos visam a obtenção de compostos com atividade

antioxidante, com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios destas espécies (HALLIWELL, 1994; FREDSTROM, 2002).

Em situação de estresse oxidativo e nitrosativo, há um desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e os pró-oxidantes, com a predominância destes últimos. Os mecanismos de defesa do organismo nesta situação podem não ser suficiente para conter tais espécies, havendo a necessidade de intervenção terapêutica a fim de se evitar a lesão oxidativa de moléculas biologicamente importantes (FANG et al., 2002; FREDSTROM, 2002).

Vários fatores podem aumentar o risco de estresse oxidativo. Dentre os quais, destaca-se o consumo aumentado de oxigênio e a indução da óxido nítrico sintase, comumente observado durante competições esportivas devido à intensa atividade física (SACHECK & BLUMBERG, 2001; REISER, 1997); a ativação auto-imune das células do sistema imunológico, através do *burst* respiratório de células polimorfonucleares e mononucleares e fatores ambientais, como por exemplo, exposição à poluentes contendo NO, NO₂ e OH[•] (FANG et al., 2002). A exposição prolongada aos radicais livres, mesmo que em baixas concentrações, pode resultar na lesão de moléculas biologicamente importantes e lesão tissular (FANG et al., 2002).

O estresse oxidativo tem sido também relacionado a uma variedade de doenças tais como, aterosclerose (NIGRIS et al., 2003), câncer (ABDI & ALI, 1999; GATTI et al., 2004), envelhecimento precoce (CAMPISI, 2000; LANE, 2003; ZHANG et al., 2004), doenças neurológicas (HAYASHI et al., 2002; ESPOSITO et al., 2002) e também lesão muscular induzida por exercício físico intenso (SACHECK & BLUMBERG, 2001).

A oxidação de lipoproteínas tem um importante papel na patogênese da aterosclerose. Espécies oxidantes liberadas pelas células endoteliais, células do músculo liso, monócitos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas podem promover modificações oxidativas das

lipoproteínas. Estas moléculas podem participar do processo aterogênico por diferentes mecanismos, incluindo a modulação de eventos bioquímicos relacionados às vias de sinalização celular que regulam expressão de fatores de crescimento e citocinas, os quais estão envolvidos no processo de formação das células espumosas presentes na lesão aterosclerótica (Nigris et al., 2003). Tem sido demonstrado que as EROs e ERNs desempenham um importante papel na iniciação e progressão da carcinogênese (ABDI & ALI, 1999; GATTI et al., 2004). Dentre os vários alvos destas espécies, o DNA parece ser o mais importante para o desenvolvimento do tumor, cuja interação com radical hidroxila (OH[•]) pode induzir mudança conformacional, incluindo quebra da dupla fita, modificações de bases, assim como lesão no gene supressor de tumor e aumento da expressão de protooncogenes (ABDI & ALI, 1999).

Proteínas oxidadas e nitrosiladas podem estar elevadas com o envelhecimento, através de mecanismos ainda não esclarecidos. O aumento dessas proteínas dependente da idade tem sido demonstrado em diferentes modelos experimentais (KANSKI et al., 2003; BEAL, 2002). Várias evidências sugerem que o estresse oxidativo poderia ser a causa primária deste processo. O aumento na formação de EROs (ZHANG et al., 2004) e ERNs (EISERICH et al., 1998) pode mediar lesão de biomoléculas tais como, ácido nucléico, proteínas e lipídios. Além disso, tem sido sugerido que estas espécies podem atuar como segundo mensageiros, ativando moléculas da via de sinalização celular e alterando a expressão gênica (ZHANG et al., 2004).

A ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) aumenta a produção de NO e de espécies reativas de oxigênio (HAYASHI et al., 2002; Kitamura et al., 2003; LEE et al., 2002), sendo esta ação associada ao estresse oxidativo observado em diversas doenças neurológicas tais como, epilepsia (HAYASHI et al., 2002), doença de Alzheimer e mal de Parkinson (ESPOSITO et al., 2002).

Várias evidências têm demonstrado o envolvimento de EROs na lesão muscular induzida por atividade física intensa (SACHECK & BLUMBERG, 2001; REID, 2001a; RADÁK, 1999). Nesta situação, geralmente observa-se uma dificuldade no treinamento, ausência de motivação, desordens relacionadas ao sono e alta sensibilidade à infecções, com conseqüente diminuição na performance física (LAC e MASO, 2004). No entanto o mecanismo exato pelo qual estas espécies oxidantes atuariam como mediadoras da lesão ainda não está totalmente esclarecido (SACHECK & BLUMBERG, 2001; RADÁK, 1999; REID, 2001a).

1.4 Exercício físico e lesão muscular

O exercício físico induz uma série de adaptações metabólicas específicas, que podem variar de acordo com a duração e a intensidade do estímulo. Durante a contração muscular ocorre aumento do metabolismo no músculo esquelético que resulta na produção de espécies oxidantes, levando a adaptação da capacidade antioxidante, para proteger os miócitos contra os efeitos deletérios de tais espécies e evitar a lesão celular (HESS et al., 1984; BOOTH & THOMASON, 1991).

Embora o treinamento físico induza adaptações benéficas, sabe-se que a realização de exercícios que envolvem ações excêntricas acima da intensidade habitual de esforço, geralmente resulta em lesão muscular (APPLE et al., 1988).

O treinamento esportivo consiste numa seqüência de cargas de esforço repetitivas e crescentes com o objetivo de aumentar a performance de um atleta (WEINECK et al., 1989). No início há uma predominância de atividades aeróbias, de menor intensidade e maior duração (treinamento contínuo), e à medida que se aproxima o período de competição este perfil se altera, contendo atividades de maior intensidade e menor duração. A porcentagem de

sessões de treinamento contínuo e intermitente varia de acordo com o tipo de esporte praticado. Quando se chega ao final de um ciclo de treinamento supõe-se que o atleta tenha atingido o pico de sua forma física, podendo render seu máximo na competição. Porém, devido à falta de dados disponíveis em relação à quantidade ideal de treinamento, normalmente os atletas são submetidos a cargas de esforço muito altas (DENADAI, 1995, KUIPERS, 1998). Nesta situação, quando uma nova carga de treinamento é executada, sem prévia restauração da homeostase celular o atleta entra num processo de *overtraining* e, à medida que este processo se repete por meses ou anos, a consequência final é a diminuição do rendimento até o desencadeamento de lesões graves e muitas vezes irrecuperáveis (KUIPERS, 1998). A lesão muscular pode ser evidenciada por: lesão ultra-estrutural; ruptura do sarcolema (ARMSTRONG et al., 1983; MATSUURA et al., 2001) e aumento da atividade sérica de enzimas musculares como a creatina quinase (CK; EC 2.7.3.2; Adenosina trifosfato: creatina N-fosfotransferase) e a lactato desidrogenase (LD; EC 1.1.1.27; L-Lactato: NAD⁺ oxidoreductase) (CLARKSON & TREMBLAY, 1988; LAC & MASO, 2004); aumento de macrófagos, monócitos e neutrófilos também tem sido observado em resposta ao exercício intenso (ARMSTRONG et al., 1983; MATSUURA et al., 2001).

A atividade das enzimas CK e LD no músculo esquelético é relativamente elevada em relação à outros tecidos. Dependendo do tipo e duração do exercício, estas podem ser liberadas das fibras musculares para a circulação sanguínea, devido à alteração na permeabilidade da membrana e/ou lesão celular induzida pela atividade contrátil aumentada (STANSBIE et al., 1983). A atividade elevada de LD pode ser observada no plasma após atividade física, no entanto, esta enzima tem pouco valor como marcador bioquímico de lesão muscular uma vez que é amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em quantidades praticamente iguais no fígado, coração e músculo esquelético. A CK também está presente em quantidades apreciáveis em outros órgãos, além do músculo esquelético, como

por exemplo, no cérebro e coração, no entanto, a sua atividade é cerca de cinco vezes maior no músculo esquelético quando comparada a outros órgãos. Esta diferença na distribuição destas enzimas entre os tecidos, torna a CK mais apropriada para avaliação da lesão muscular em relação à LD (BURTIS & ASHWOOD,1999).

Apple e Rhoders (1988) observaram atividade elevada de CK em humanos, 24 a 60 h após uma maratona, enquanto que Schwane et al. (1983), encontraram os valores de CK elevados entre 24 e 48 h após o exercício. Por outro lado, Manfredi et al. (1991) encontraram aumento de quatro vezes no número de fibras musculares com lesão ultraestrutural após a realização de atividades físicas excêntricas, sem observar nenhuma diferença significativa na atividade sérica da CK. Segundo alguns autores, o estresse causado pelo exercício aumentaria a permeabilidade da membrana celular permitindo o extravasamento destas proteínas, que se encontram especificamente dentro dos músculos, para o plasma. Dessa forma, o ciclo contração-relaxamento executado pelas miofibrilas que leva ao contínuo alongamento e encurtamento do sarcômero, seria suficiente para alterar a estrutura da membrana (CLARKSON & TREMBLAY, 1988). Por outro lado, tem sido proposto que esta perda de integridade se deve principalmente ao estresse metabólico, conseqüente ao ataque de EROs ao sarcolema ocasionando um processo de lesão oxidativa na membrana (FRANKIEWICZ-JOZKO et al., 1996).

Embora existam controvérsias a respeito da origem da lesão resultante do exercício, vários dados da literatura têm sugerindo que o estresse oxidativo e nitrosativo poderia estar envolvido não somente no processo de lesão muscular induzida por contrações musculares intensas, como também na diminuição da força máxima de contração observada após exercícios de alta intensidade (SACHECK & BLUMBERG, 2001; REID, 2001a).

Durante o exercício, ocorre aumento do fluxo de oxigênio na mitocôndria, dos quais 2 a 5% não são completamente reduzidos à água, resultando na formação de EROs, como o

ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (SACHECK & BLUMBERG, 2001). Além disso, o exercício estimula a redistribuição do fluxo sanguíneo, provocando hipóxia e reoxigenação em vários tecidos, o que também pode aumentar a produção destas espécies oxidantes pela xantina oxidase no músculo (ALESSIO, 1993; SACHECK & BLUMBERG, 2001; REID et al., 2001a).

O envolvimento de exercícios de alta intensidade no estresse oxidativo, tem sido demonstrado seja através da detecção direta de radicais livres, através da demonstração de aumento na peroxidação lipídica ou ainda pela diminuição dos níveis de antioxidantes em diversos órgãos após atividade física intensa (DAVIES et al., 1982, ALESSIO, 1993).

Davies et al. (1982) detectaram, por ressonância eletrônica paramagnética (EPR), aumento de duas a quatro vezes na concentração de radicais livres no músculo e fígado de ratos após exercício exaustivo. Estudos utilizando citocromo C para detectar O_2^- , demonstraram que a eletroestimulação do diafragma de ratos, gastrocnêmio de camundongos e de células musculares em cultura induziu um aumento na produção deste ânion radical (REID et al., 1992; MCARDLE et al., 2001). A formação de radical hidroxila após atividade contrátil induzida por fenilalanina foi observada em músculo esquelético de cachorros (O'NEILL et al., 1996). Além disso, aumento significativo na formação de peróxido de hidrogênio em cultura de células musculares após eletroestimulação foi demonstrado por Silveira et al. (2003). Estas espécies oxidantes geradas em grande quantidade, podem interagir com ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular, conduzindo a peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica parece ser um importante mecanismo pelo qual o exercício induz lesão e pode ser monitorada através da determinação da concentração de marcadores bioquímicos tais como, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e dienos conjugados (URSO & CLARKSON, 2003). Contudo, há ainda

divergências sobre o papel da peroxidação lipídica na lesão muscular induzida por exercício intenso.

Tem sido relatado aumento na peroxidação lipídica, detectado através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), após exercícios de intensidades alta e moderada (ALESSIO,1993). Kanter et al. (1988) observaram aumento de 77% na concentração de TBARS no plasma de humanos após corrida exaustiva e no músculo e fígado de ratos após exercício intenso (DAVIES et al., 1982; LIU et al., 2000). Tem sido também demonstrado acúmulo de TBARS no cérebro de ratos após a atividade física (SUZUKI et al., 1983). Por outro lado, alguns trabalhos não relataram diferença significativa na peroxidação lipídica após o exercício (SACHECK & BLUMBERG, 2001). Selman et al. (2002) analisaram a concentração de TBARS em músculo de roedores submetidos à corrida voluntária nos períodos de 1 e 7 h após o exercício, não sendo evidenciado aumento na concentração de TBARS muscular. Nenhuma diferença significativa na concentração de TBARS foi observada no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à natação, quando comparados ao grupo de animais sedentários (RADÁK et al., 1999b). A concentração de dialdeído malônico no plasma de indivíduos submetidos à atividade física moderada não apresentou alterações significativas em relação ao estado de repouso (SACHECK & BLUMBERG, 2001, URSO & CLARKSON, 2003).

Além de TBARS, tem sido verificado aumento na concentração de hidroperóxidos lipídicos no sangue de humanos após a realização de exercício excêntrico (CHILDS et al., 2001) e após atividade física isométrica repetitiva (ALESSIO et al., 2000). ALESSIO et al. (2000) observaram que exercício aeróbico não foi capaz de induzir diferença significativa na concentração de hidroperóxidos lipídicos.

O conteúdo de dienos conjugados aumentou no plasma de atletas após uma maratona (MARZATICO et al., 1997) e em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) isoladas do plasma

de atletas, imediatamente e 4 h após uma maratona (LIU et al.,1999). Contudo, alguns estudos demonstraram que a concentração de dienos conjugados no plasma não aumentou em resposta ao exercício (DUTHIE et al., 1990).

Portanto, o estresse oxidativo parece estar relacionado à intensidade do exercício. A energia para a demanda metabólica aumentada devido ao exercício de alta intensidade é produzida pelo metabolismo oxidativo e isto poderia aumentar o risco de estresse oxidativo (ALESSIO, 1993). Uma proporcionalidade entre a concentração de malonaldeído muscular e a intensidade do esforço executado, tem sido relatada. ALESSIO et al. (1988) observaram aumento de 120% e 68% na concentração de TBARS no músculo esquelético de ratos após atividade física de intensidade alta e moderada, respectivamente. Chiaradia et al. (1998) demonstraram que, o exercício induziu um aumento na concentração de dialdeído malônico no plasma, que foi diretamente proporcional à intensidade da atividade física realizada. Além disso, uma correlação positiva entre a concentração de TBARS no músculo esquelético e a atividade da enzima CK sérica, já foi evidenciada (SACHECK & BLUMBERG, 2001).

Além das EROs, tem sido demonstrado aumento na produção de óxido nítrico e de seus derivados (ERNs), após atividade contrátil do músculo esquelético, sugerindo que estas espécies também possam estar envolvidas no processo de lesão muscular. Balon & Nadler (1994) observaram aumento significativo na produção de óxido nítrico muscular em ratos após serem submetidos à eletroestimulação. A eletroestimulação, em alta intensidade, de células da musculatura esquelética de ratos em cultura foi capaz de induzir um aumento na formação de óxido nítrico, enquanto que nenhuma alteração significativa foi observada com estímulos de intensidade moderada (SILVEIRA et al., 2003). Ainda, aumento na produção de óxido nítrico associado à diminuição da força máxima de produção no músculo foi observado em humanos 24 h após a realização de atividade física (RADÁK et al., 1999a).

Alguns autores têm demonstrado indução na expressão de nNOS no músculo tibial anterior de ratos após exercícios crônicos (REISER et al., 1997), sugerindo que a expressão desta isoforma nestes animais pode ser modulada pela atividade muscular. Embora, ainda existam controvérsias quanto à expressão da eNOS no músculo esquelético após exercícios físicos, alguns trabalhos têm demonstrado aumento na expressão de eNOS, na artéria coronária e aorta de cães, após treinamento físico (SESSA et al., 1993), no músculo esquelético após exercício intenso (ROBERTS et al., 1999) e em aorta de ratos (HUSAIN, 2004).

Níveis aumentados de RNAm da iNOS em leucócitos humanos após exercícios contínuos foram relatados por Niess et al. (1999). Além disso, outros autores têm demonstrado níveis aumentados de citocinas, tais como interleucina, interferon, entre outras capazes de estimular a expressão de iNOS (VITI et al., 1985; CANNON et al., 1989; DESCHENES et al., 2000).

Acredita-se que o NO[•] seja o mediador primário dos eventos intracelulares que diminuem a força de contração muscular observada durante o exercício físico exaustivo (REID, 2001a). Nestes processos o NO pode atuar, através de diferentes mecanismos, se ligando ao grupamento heme da guanilil ciclase, levando a diminuição do cálcio intracelular através da ativação da via guanilil ciclase/guanosina monofosfato cíclica (GCs/GMPc) e também interagindo com resíduos de cisteínas dos receptores rianodina (RyR) ativando assim, a abertura dos canais de cálcio (GROZDANOVIC, 2001). A inibição da atividade de actomiosina de fibras musculares tratadas com doadores de NO também parece estar relacionada a redução da força de contração do músculo esquelético (PERKINS et al., 1997). Outro mecanismo proposto para explicar a ação do NO na redução da força de contração muscular seria através da inibição da ATPase dependente de cálcio no retículo sarcoplasmático (SERCA), sendo que a nitrosilação de tirosinas mediada por peroxinitrito poderia contribuir

para tal inativação. Ainda, o tratamento de músculo esquelético de coelhos com peroxinitrito induziu mudanças oxidativas e nitrosativas de grupamentos cisteínas, os quais também poderiam estar envolvidos na inativação da enzima (STAMLER & MEISSNER, 2001).

Aumento na produção de EROs e de ERNs pode ocorrer em resposta ao exercício intenso, aumentando, assim, a formação de peroxinitrito (LAWLER & HU, 2000; KOBZIK et al., 1994). Além de atuar na inibição da contração muscular, estas espécies podem também induzir nitração e oxidação de proteínas musculares, aumento na peroxidação lipídica e lesão oxidativa no DNA levando a alterações na integridade e metabolismo das fibras musculares (URSO & CLARKSON, 2003; SZABÓ, 2003). A perda da homeostase celular pode levar a situações comumente observadas em decorrência de exercícios severos tais como, fadiga muscular, diminuição da força de contração e lesão muscular com conseqüente diminuição do desempenho físico (REID, 2001b; SACHECK & BLUMBERG, 2001; REID, 2001a; ZERBA et al., 1990).

Sabe-se que muitas células, inclusive miócitos, são capazes de responder ao aumento na formação de EROs, induzindo mecanismos de reparo e proteção, através do sistema de defesa antioxidante. No entanto, esta resposta é altamente dependente de diversos fatores tais como: o tipo, duração e intensidade do exercício; idade e estado nutricional dos indivíduos e tipo de tecido analisado, já que os níveis de antioxidantes endógenos podem variar entre os diferentes órgãos (LIU et al., 2000). Desta forma, em determinadas situações, o aumento na defesa antioxidante pode não ser fisiologicamente proporcional à necessidade gerada pelos eventos pró-oxidantes (estresse oxidativo), sendo necessário a intervenção com terapia antioxidante. Sendo assim, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar os efeitos de suplementos antioxidantes no desempenho físico e/ou nas alterações induzidas pelo estresse oxidativo causado por exercícios de alta intensidade (SACHECK & BLUMBERG, 2001).

1.5 Compostos vegetais com atividade antioxidante

As plantas medicinais podem ser utilizadas para o cuidado com a saúde, principalmente nos países em desenvolvimento, tendo em vista seu baixo custo, quando comparados ao desenvolvimento de formulações industriais.

Possuidor de imensa flora e de uma grande diversidade cultural, o Brasil constitui-se em grande fonte de recursos naturais (ELISABETSKY & WANNMACHER, 1993).

Várias plantas utilizadas na medicina popular, ainda não foram estudadas sistemática e clinicamente para confirmar suas ações terapêuticas, o que tem despertado o interesse das indústrias farmacêuticas que visam descobrir novos compostos com atividade terapêutica (HIRSCHMANN & ARIAS, 1990).

O efeito de compostos antioxidantes, especialmente, os extraídos de plantas e seus benefícios para a saúde têm sido alvo de intensa pesquisas. Este interesse não tem sido somente na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas para uso farmacêutico, mas também para a utilização de extratos vegetais, como as infusões, para o uso como medicamento. Assim, diversos autores têm relatado a presença de compostos com atividade antioxidante obtidos de plantas medicinais (NG et al., 2000).

A capacidade antioxidante de compostos terpênicos tem sido demonstrada por diversos pesquisadores, que buscam a descoberta de novas moléculas antioxidantes em algumas famílias vegetais, dentre elas, a família Lamiaceae (CHANG et al., 1977; ECONOMOU et al., 1991) e Apiaceae (LAMAISON et al., 1990). Efeitos de compostos terpênicos e fenólicos sobre a inibição da peroxidação lipídica têm sido relatados (NG et al., 2000; NOGUCHI & NIKI, 2000). A maioria dos componentes químicos com atividade antioxidante encontra-se entre os compostos fenólicos de origem vegetal (LARSON, 1988), como o alfa-tocoferol (vitamina E), cujo mecanismo de ação tem sido exaustivamente

pesquisado desde o início da década de 70. Estes compostos fenólicos têm alta reatividade com o radical lipídico peroxil, podendo assim interagir com estas espécies, interrompendo a propagação da peroxidação lipídica (NOGUKI & NIKI, 2000), apresentando efeito protetor sobre as membranas celulares (URSO & CLARKSON, 2003). Os flavonóides ocupam lugar de destaque nas pesquisas mais recentes de compostos vegetais com atividade antioxidante. Estes compostos podem atuar inibindo enzimas responsáveis pela produção de EROs, podem quelar metais de transição importantes no metabolismo do oxigênio ou ainda, interagir com radicais livres, reduzindo-os (PIETTA, 2000).

Além de interagir com EROs, os compostos terpênicos e fenólicos podem inibir também a produção de óxido nítrico, sendo demonstrado que carotenóides e vitamina E são capazes de inibir a expressão da óxido nítrico sintase indutiva (iNOS) em células fagocíticas ativadas (Fang et al., 2002; BEHARKA et al., 2000). Estudos realizados com o objetivo de avaliar o efeito de diterpenos do tipo kaurano têm demonstrado que estes compostos também atuam inibindo a expressão da iNOS em cultura de macrófagos ativados com LPS (CASTRILLO et al., 2001; HWANG, 2001). Castrillo et al. (2001), demonstraram que tal ação está relacionada à inibição da ativação do fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$). Além disso, foi sugerido recentemente, que a nNOS é capaz de acomodar em seu sítio ativo, compostos fenólicos substituídos sendo portanto, capazes de atuarem como inibidores da nNOS e também como antioxidantes (AUVIN et al., 2003).

Os fenilpropanóides constituem um grupo importante de antioxidantes. Dentro desta categoria estão incluídos diversos ácidos fenólicos já estudados quanto à sua capacidade de inibir processos de oxidação (TAIRA et al., 1992) como o ácido cinâmico, o ácido cumárico (TODA et al., 1991), o ácido cafeíco, o ácido clorogênico, o ácido ferúlico (GRAF, 1992; SCOTT et al., 1993), o ácido sináptico e seus derivados (YANISHLIEVA & MARINO, 1995).

1.6 Estudos de plantas do gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies nativas do Brasil: *P. abruptus* Benth; *P. apparicioi* Pedersoli; *P. emarginatus* Vog., *P. pubescens* Benth e *P. polygalaeflorus* Benth. *Pterodon emarginatus* Vogel (Leguminosae, Fabaceae), conhecida como sucupira branca é uma árvore (5-10 m de altura) distribuída por toda a região central do Brasil, incluindo os estados de Minas Gerais, Goiás, Tocantins e São Paulo. É também conhecida popularmente como faveiro, fava-de-santo-inácio, fava-de-sucupira, sucupira e sucupira-lisa. Seu uso medicinal deve-se a propriedades analgésicas, antiinflamatórias, e anti-reumáticas. As partes utilizadas são os frutos, a casca, sementes e tubérculos da raiz na forma de infusão ou decocção (CORREA, 1978; BRITO e BRITO,1993).

A investigação das espécies de *Pterodon* foi motivada pela descoberta da ação anticercária do óleo do fruto de *P. pubescens* Benth. (MORS et al., 1967; PEDERSOLI, 1970; FASCIO et al., 1976). Desde então vários compostos foram identificados. Do óleo essencial dos frutos de *P. pubescens* foi identificado o 14,15-epoxigeraniol, que demonstrou ser eficaz como agente quimioprolático na esquistossomose (MORS et al.,1967). Em 1970, novos diterpenóides presentes no extrato de frutos de *P. emarginatus* foram identificados por Mahjan e Monteiro, sendo demonstrada a presença grupamentos vouacapânicos nestes compostos, dentre os quais destaca-se o ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapano17 β -óico (ADV) (MAHJAN & MONTEIRO, 1972), com atividade analgésica e anti-inflamatória (DUARTE, 1996; NUNAN et al., 1982).

Além de diterpenóides, outros compostos também têm sido identificados em plantas do gênero *Pterodon*. Bras Filho et al. (1971) demonstraram a presença de isoflavonas em extratos de frutos de *P. pubescens* e Leite de Almeida e Gottlieb (1975) em *P. apparicioi*. A

presença de β -cariofileno também foi evidenciada em estudos com extratos obtidos de frutos de *P. emarginatus* (MAHJAN & MONTEIRO, 1972).

Em 1982, Nunan et al. demonstraram que o ADV, isolado a partir do extrato hexânico de *P. poligalaeiflorus* foi capaz de inibir o edema de pata de rato induzido por carragenina (NUNAN et al., 1982). A partir de então, novos trabalhos foram realizados com o objetivo de complementar os estudos sobre a atividade biológica de extratos obtidos de frutos do gênero *Pterodon*. Estes extratos foram testados em ratos quanto à atividade antinociceptiva, sendo observado que a administração por via oral, do ADV isolado de frutos de *P. poligalaeiflorus*, foi capaz de inibir as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em até 20,6%, sendo demonstrada, portanto, a atividade analgésica deste diterpeno (DUARTE et al., 1996). Ainda, o extrato hidroalcoólico de frutos de *P. poligalaeiflorus* apresentou efeito inibitório sobre o edema em pata de rato induzido por carragenina e contorções induzidas por ácido acético, confirmando a atividade antiinflamatória e analgésica de frutos desta espécie vegetal (LEAL et al., 2000). O extrato hexânico bruto (EHB) de *P. emarginatus* demonstrou ação inibitória sobre o edema desencadeado por carragenina e sobre a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos (CARVALHO et al., 1999). Embora o principal componente responsável pela atividade anti-inflamatória seja o ADV, através da análise do óleo essencial, foram identificados os seguintes compostos: β -cariofileno, α -pineno, mirceno, etil-eugenol, eugenol, geraniol e metil-eugenol (CARVALHO, 1998).

O ADV e alguns diterpenos derivados deste ácido foram capazes de interagir com o oxigênio no estado singlete, sugerindo um papel para o anel furânico como seqüestrante de radicais livres nos processos inflamatórios, o que poderia minimizar as lesões tissulares decorrentes da inflamação. No entanto, nenhum efeito foi observado sobre a peroxidação lipídica microsomal quando os diterpenos derivados do ADV foram testados *in vitro* (DiMASCIO et al., 1997).

Estas observações parecem explicar o uso popular de frutos de *P. poligalaeflorus* e de *P. emarginatus* como agentes antiinflamatórios e analgésicos. Contudo, o mecanismo de ação não está totalmente esclarecido e não há relatos sobre a possível atividade antioxidante de *P. emarginatus*, nem mesmo se o extrato desta planta é capaz de modular a atividade da óxido nítrico sintase. Portanto, pesquisas que buscam a compreensão dos mecanismos responsáveis por tal ação podem contribuir para o estabelecimento do uso racional destes compostos como agentes terapêuticos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar os possíveis efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato hexânico bruto (EHB) de frutos de *P. emarginatus* sobre processos indutores de estresse oxidativo e nitrosativo em ratos. Para atingir tais objetivos, as seguintes metas foram propostas:

- Estudar o efeito *in vitro* do EHB de frutos de *P. emarginatus* sobre a oxidação do guaiacol mediada pela peroxidase e sobre a peroxidação lipídica e produção de nitrito em homogeneizados de cérebro e músculo tibial anterior de ratos.
- Quantificar a peroxidação lipídica, a produção de óxido nítrico e a nitração de proteínas no músculo tibial anterior, fígado e cérebro de ratos, induzidos por exercício agudo. Em seguida, verificar o efeito do EHB de frutos de *P. emarginatus* sobre a peroxidação lipídica, a produção de óxido nítrico e a nitração nestes tecidos, induzidos pelo exercício agudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 270 ± 20 g, obtidos no Biotério da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal (Efoa/Ceufe). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, receberam água e ração comercial *ad libitum* e foram divididos em grupos experimentais contendo 6 animais.

3.2 Identificação do material botânico

Os frutos de *Pterodon emarginatus* foram coletados e as exsiccatas do material vegetal foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, a qual recebeu o seguinte registro: UEC, 14995.

3.3 Obtenção do extrato hexânico bruto (EHB) de frutos de *Pterodon emarginatus*

Os frutos de *Pterodon emarginatus* Vog. foram colocados ao ar livre, à temperatura ambiente, por 15 dias para retirada da umidade. Em seguida foram triturados (5Kg) em liquidificador industrial na presença de hexano e colocados em percoladores à temperatura ambiente, sendo esgotados sucessivamente com hexano. O líquido extrator foi recolhido separadamente, filtrado e concentrado com auxílio de evaporador rotatório sob pressão reduzida, conforme descrito por Carvalho (1998), sendo obtido um extrato com característica oleosa e densidade igual 0,98 mg/mL. O extrato vegetal foi preparado no Laboratório de

Fitofármacos da Universidade de Alfenas e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Carlos Tavares de Carvalho.

3.4 Protocolo do exercício intenso

O exercício intenso foi realizado, induzindo-se o mesmo número e tempo de contrações excêntricas, em todos os animais, utilizando-se eletroestimulação do músculo tibial anterior, um músculo de contração rápida, com predomínio de fibras tipo II. Os ratos foram colocados em gaiola de contenção, permitindo o livre manuseio dos membros posteriores, sem anestesia. Após tricotomia, foram acoplados dois eletrodos auto-adesivos à pele do animal, sendo um na inserção proximal e outro na distal do músculo tibial anterior (TA) do membro posterior direito.

A eletroestimulação foi realizada por meio do aparelho Eletro Kinesis Clínico (KW Indústria Nacional de Tecnologia Eletrônica Ltda.) com pulso bifásico assimétrico, em aplicação única. As estimulações foram realizadas utilizando-se frequência de onda de 50 Hz e ciclo On-Off na proporção de 1:1 (10 segundos de contração e 10 segundos de repouso), durante 15 minutos.

3.5 Grupos experimentais

Os ratos foram submetidos ao exercício físico intenso e à administração de EHB por via oral, na concentração de 498mg/Kg (CARVALHO et al, 1999). Diferentes grupos com combinações de exercício e tratamento com EHB foram utilizados conforme descrito a seguir:

Controle: grupo controle de animais que não foram submetidos ao exercício intenso nem ao tratamento com o extrato vegetal.

Exerc: animais submetidos a exercício intenso.

EHB: animais tratados com EHB e não submetidos a exercício intenso.

EHB.Exerc: animais tratados com EHB, antes do exercício.

Exerc.EHB: animais tratados com EHB, após o exercício.

Os animais de todos os grupos experimentais foram analisados em diferentes tempos após os tratamentos. Acresceu-se o tempo após a abreviatura do grupo experimental (p. ex. Exerc1h – animais submetidos a exercício intenso e analisados 1 h após o exercício).

3.6 Determinação da atividade de creatina quinase (CK) sérica

A atividade da CK foi determinada no soro de animais antes e após o exercício intenso. Os animais foram anestesiados e em seguida, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e centrifugadas a 1500g por 10 min. O soro obtido foi utilizado para determinar a atividade de creatina quinase, pelo método cinético otimizado, utilizando-se o kit CK-NAC (Bayer) (BURTIS & ASHWOOD, 1999).

3.7 Análise morfométrica

O músculo TA do membro posterior direito dos animais dos diferentes grupos experimentais foi removido, fixado em formol a 4% (v/v). A seguir foi processado por técnica histológica de rotina e corado com hematoxilina-eosina. A análise morfométrica foi realizada com auxílio de uma câmara acoplada ao microscópio e monitor de vídeo e determinou-se a densidade de células inflamatórias, através da contagem de células em, 10 campos aleatórios de 0,0625 mm², por grupo.

3.8 Determinação do efeito do EHB sobre a atividade de peroxidase *in vitro*

Princípio do método: a peroxidase é uma enzima, que tem como substrato o peróxido de hidrogênio. Na reação peroxidativa esta enzima oxida um composto doador de íons H⁺, transformando o peróxido de hidrogênio em água e formando um composto oxidado. Vários compostos podem ser doadores de H⁺ para formação de água. Um deles é o guaiacol, que reduzido é incolor e oxidado apresenta coloração castanha, que pode ser quantificada por espectrofotometria. Assim, para a avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, estes são adicionados ao meio de reação. Se a oxidação do guaiacol for inibida, significa que o composto tem atividade antioxidante (MAKINEN & TENOVUO, 1982).

Sendo assim, a oxidação do guaiacol foi determinada a 37°C, em um meio de reação contendo ácido succínico 0,1 M, pH 5,0, guaiacol 1 mM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1 mM e dimetilsulfóxido (DMSO) 1% (v/v) no sistema controle ou diferentes concentrações de EHB (dissolvido em DMSO 1%) nos testes. A reação foi iniciada pela adição de peroxidase (horshadish peroxidase, Sigma). Sistemas incubados sem adição de peroxidase foram

utilizados como branco. O aumento da absorvância em 450 nm foi monitorado a 37°C e a oxidação do guaiacol foi estimada pela diferença entre os valores de absorvância obtidos entre o primeiro e segundo minuto de reação e foi considerada como 100% no sistema controle. A inibição da oxidação do guaiacol (%) pelo EHB foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(C - B_C) - (T - B)}{(C - B_C)} \times 100$$

onde: C = absorvância do controle; B_C = absorvância do branco sem adição de EHB; T = absorvância do teste com diferentes concentrações de EHB; B = absorvância do branco com diferentes concentrações de EHB.

3.9 Obtenção de homogeneizado de cérebro, fígado e de músculo tibial anterior (TA)

Os animais foram submetidos à eutanásia e em seguida o cérebro, fígado e músculo tibial anterior foram retirados e preparados separadamente. Para análise da peroxidação lipídica, os tecidos foram homogeneizados a 4°C em homogeneizador de tecidos (potter) contendo volume de PBS 0,1 M, fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL; benzamidina 100 µM e antipaína 50 µM, leupeptina 50µM equivalente a 4 vezes o peso fresco de cada tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 3000g, por 10 min a 4°C, sendo utilizado o sobrenadante (JONES et al., 1995). Para a determinação de nitrito, os tecidos foram homogeneizados separadamente a 4°C, em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; contendo KCl 30 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5mM, β-mercaptoetanol 2% (v/v), sacarose 250mM; fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL; benzamidina 100 µM, antipaína 50 µM e leupetina 50µM, com auxílio de um homogeneizador de tecidos (potter).

As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios.

3.10 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.11 Determinação da peroxidação lipídica

Para a análise *in vitro* do efeito do EHB sobre a peroxidação lipídica de cérebro e músculo TA, foram adicionadas diversas concentrações do EHB (diluído em acetona) ou de BHT (hidroxitolueno butilado, diluído em etanol) aos homogeneizados teciduais (contendo 1 mg de proteínas). O branco foi preparado com os mesmos reagentes adicionados ao PBS, sem o homogeneizado de tecido. O controle foi preparado apenas com homogeneizado e acetona (JONES et al., 1995). As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e a seguir utilizadas para determinação de TBARS.

Para avaliação do efeito *in vivo* do EHB sobre a peroxidação lipídica de cérebro, fígado e músculo TA foram preparados homogeneizados de tecido dos animais dos diferentes grupos experimentais e a seguir foi determinada a concentração de TBARS.

A peroxidação lipídica *in vitro* e *in vivo* foi determinada pela medida dos produtos de oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por WINTERBOURN et al. (1981).

Princípio do Método: os produtos da peroxidação de lipídeos (peróxidos lipídicos, dialdeído malônico e outros aldeídos de baixo peso molecular) reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo bases de Schiff. Esses compostos são coloridos e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 532 nm.

Alíquotas dos homogeneizados obtidos *in vitro* e *in vivo* (500µL) foram misturadas a 500µL de HCl 25% (v/v), 500µL de TBA 1% (p/v; em NaOH 0,05 M) e 45µL de BHT 2% (v/v, em etanol). A seguir as amostras foram aquecidas em banho de água fervente, durante 10 min. Após o resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 1,5 mL de butanol e as amostra foram agitadas vigorosamente em vórtex. A fase contendo butanol (superior) foi separada por centrifugação a 800g por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada em 532 nm. A concentração de TBARS foi calculada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3 tetraetoxipropano). Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/ g de proteína.

A inibição da peroxidação lipídica após a adição de diferentes concentrações do extrato foi considerada como atividade antioxidante, sendo calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídios, por comparação ao controle:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \frac{H - (T - B)}{H} \times 100$$

H

onde: H = absorbância do homogeneizado; T = absorbância do teste com diferentes concentrações de EHB; B = absorbância do branco com diferentes concentrações de EHB.

3.12 Avaliação do efeito do EHB sobre a atividade da óxido nítrico sintase (NOS)

Para verificar o efeito *in vitro* do EHB sobre a atividade da NOS em cérebro e músculo TA, alíquotas do homogeneizado contendo 2,5 mg de proteínas foram incubadas com: N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 3 mM; aminoguanidina (AMG) 3 mM; ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) 2 mM; DMSO 1% (v/v) e com o extrato vegetal (2000 µg/ml, dissolvido em DMSO 1%), separadamente, por 45 min a 4°C. Decorrido o tempo, foram adicionados Tris-HCl 1 M pH 7,0, arginina 3 mM e CaCl₂ 2 mM, sendo o volume final das amostras completado para 1mL com água destilada. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 min e, em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de Hepes 50 mM, pH 5,5 contendo EDTA 10 mM, a 4°C (VIRGILI et al., 1999). As proteínas das amostras foram precipitadas pela adição de acetona e foram separadas por centrifugação a 10000g, a 4°C, durante 5 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de nitrito, pelo método de Griess. A concentração de nitrito é uma medida indireta da atividade da NOS (GREEN et al., 1982).

Para determinar a concentração de nitrito das amostras, alíquotas de 500 µL foram misturadas a 500 µL do reagente de Griess (125 µL de sulfanilamida 2% (p/v) dissolvida em ácido fosfórico 5% (v/v), 125 µL de α-naftil-etilenodiamina 0,5% (p/v), 125 µL de água e 125 µL de ácido fosfórico) e a absorbância foi determinada em 540 nm, utilizando-se como branco uma amostra contendo 500 µL de acetona e 500 µL do reagente de Griess. Neste método o nitrito reage com o ácido sulfossalicílico formando um sal de diazônio que reage com amina levando à formação de um composto de coloração rósea, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra (GREEN et al., 1982). A concentração de nitrito nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão de NaNO₂. Os

resultados foram expressos como nmoles de nitrito/mg proteína presente no homogeneizado antes da precipitação com acetona.

Para evitar a interferência da coloração do EHB, na absorbância dos testes (*in vitro*), utilizou-se um Branco-EHB, contendo EHB em cada concentração testada. Os valores de absorbância foram subtraídos daqueles obtidos das amostras contendo EHB. Verificou-se também a possível interferência do DMSO na absorbância dos testes. Contudo, não houve interferência.

3.13 Avaliação do efeito do EHB sobre a produção de nitrito estimulada por exercício intenso

Para avaliar o efeito do EHB sobre a produção de nitrito estimulada por exercício intenso utilizou-se homogeneizado de cérebro, fígado e músculo TA de todos os grupos experimentais, analisados em tempos diversos após o exercício. Após a precipitação das proteínas dos homogeneizados com acetona, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de nitrito, pelo método de Griess (GREEN et al., 1982).

3.14 Detecção de nitrotirosina

A detecção de nitrotirosina em cérebro, fígado e músculo TA foi realizada através de Western blotting. Alíquotas de 30 µg de proteínas obtidas dos homogeneizados de tecidos dos animais de todos os grupos experimentais foram aplicadas em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE). Após a corrida eletroferética (a 30 mA), as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 20 V, 4°C, por 12 h, utilizando-se tampão Tris/glicina 20 mM,

pH 9 e metanol a 20% (v/v). A membrana foi incubada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH7,6 contendo Tween a 30% (v/v), Triton X100 a 50% (v/v) (TBS-TT) e BSA 1% (albumina sérica bovina), por 1 h em temperatura ambiente, para bloquear sítios de ligações inespecíficas do anticorpo. Após a lavagem com TBS-TT, a membrana foi incubada por 2 h, a 4°C, com anticorpo policlonal de carneiro anti-nitrotirosina (1:1000 diluído em TBS-TT com BSA1%), em TBS-TT com BSA1%. Decorrido o tempo, a membrana foi lavada com TBS-TT e incubada por 1 h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de carneiro conjugado à peroxidase (1:2.500 diluído em TBS-TT com BSA1%). Após a lavagem da membrana com TBS-TT, as bandas foram visualizadas utilizando-se o método de quimiluminescência ampliada para identificar proteínas imunoreativas para nitrotirosina, sendo as imagens captadas em filme de raio-X.

3.15 Cálculo da IC₅₀

A partir dos dados e curvas obtidas nos ensaios realizados *in vitro* foram calculados os valores de IC₅₀ que indicam a concentração de EHB capaz de induzir 50% do efeito medido, sobre a oxidação do guaiacol, assim como da peroxidação lipídica e da atividade da NOS, sendo as curvas de regressão linear calculadas através do programa Origin 5.0.

3.16 Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados por análise de variância pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey-Kramer, quando $p < 0,05$ e expressos como média e erro-padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade de creatina quinase (CK) sérica

Observou-se aumento na atividade da CK no soro dos animais submetidos a exercício intenso, com pico máximo de atividade 1 h após exercício. A atividade da CK permaneceu elevada por 48 h após o exercício (Figura 1).

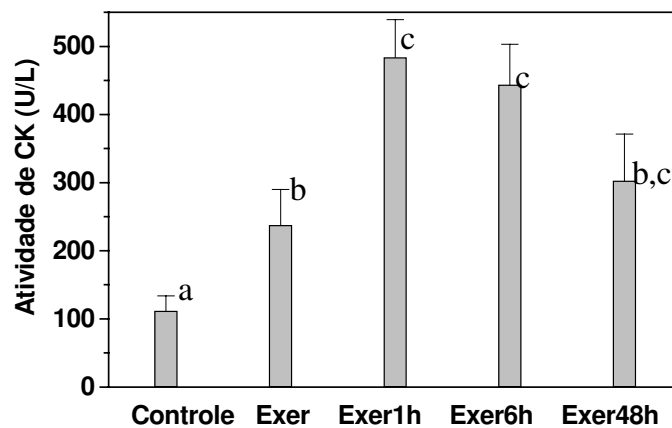


Figura 1: Efeito do exercício intenso sobre a atividade da enzima creatina quinase (CK) sérica. As análises foram realizadas imediatamente (Exer), 1 h (Exer1h), 6 h (Exer6h) e 48 h (Exer48h) após o exercício intenso. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5-6 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

4.2 Análise morfométrica

Observou-se aumento na densidade de macrófagos no músculo TA a partir de 6 h após o exercício intenso. Após 48 h, estes valores ainda permaneceram elevados, quando comparados ao controle. Nos grupos EHB.Exer e Exer. EHB observou-se queda significativa ($P < 0,05$) na densidade celular. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na densidade de macrófagos entre os grupos Controle e EHB (Figura 2).

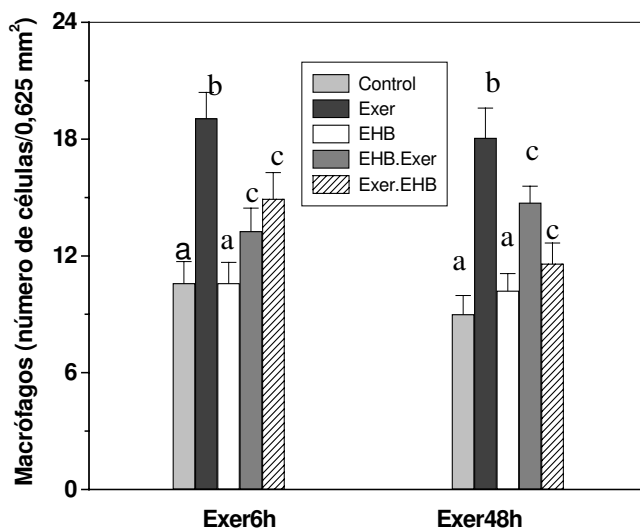


Figura 2: Efeito do EHB sobre a densidade de macrófagos no músculo tibial anterior (TA). O número de células por 0,625 mm² foi determinado 6 h (Exer6h) e 48 h (Exer48h) após o exercício intenso. Os resultados expressam a média ± erro padrão de 15 campos aleatórios para cada grupo experimental. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

4.3 Efeito do EHB sobre a oxidação do guaiacol

O EHB inibiu de maneira concentração-dependente a oxidação do guaiacol mediada pela peroxidase, sendo observada inibição máxima de 86% quando o EHB foi adicionado na concentração final de 125 $\mu\text{g/mL}$. A IC_{50} foi obtida com a concentração de 19,8 $\mu\text{g/mL}$ de EHB (Figura 3).

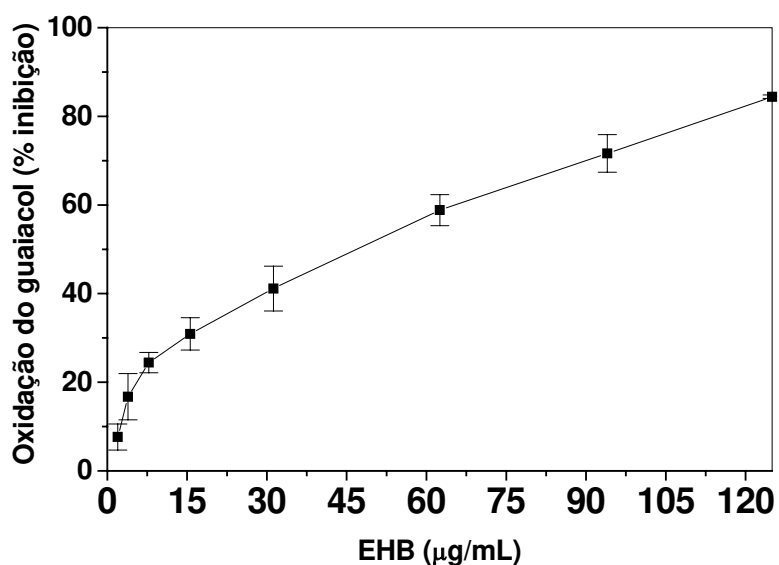


Figura 3: Inibição da oxidação do guaiacol pelo EHB de frutos de *Pterodon emarginatus*.

Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento.

4.4 Efeito do EHB sobre a peroxidação lipídica

4.4.1 Análise *in vitro*

Avaliou-se o efeito *in vitro* do EHB sobre a peroxidação lipídica em homogeneizados de cérebro e de músculo TA. Como pode ser observado na Figura 4, o EHB inibiu de maneira concentração-dependente a peroxidação lipídica em homogeneizado de cérebro até 125 $\mu\text{g/mL}$, sendo observada uma inibição máxima de 68%. A IC_{50} foi de 16,2 $\mu\text{g/mL}$. O valor máximo de inibição da peroxidação lipídica pelo EHB foi próximo ao obtido para o BHT (70%), indicando que o EHB é um potente inibidor da peroxidação lipídica em cérebro.

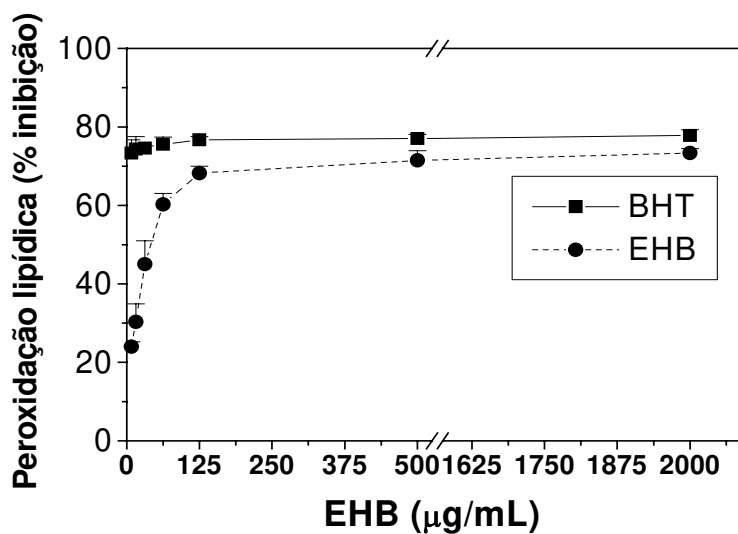


Figura 4: Efeito do EHB sobre a peroxidação lipídica em homogeneizado de cérebro.

Homogeneizado incubado com diferentes concentrações de BHT ou de EHB diluído em acetona. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento.

O extrato também foi capaz de inibir a peroxidação lipídica no homogeneizado de músculo TA, com inibição máxima de 45%, na concentração final de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5). A IC_{50} para músculo foi de 26,7 $\mu\text{g/mL}$. No homogeneizado de músculo TA, a inibição máxima do BHT foi de 55%.

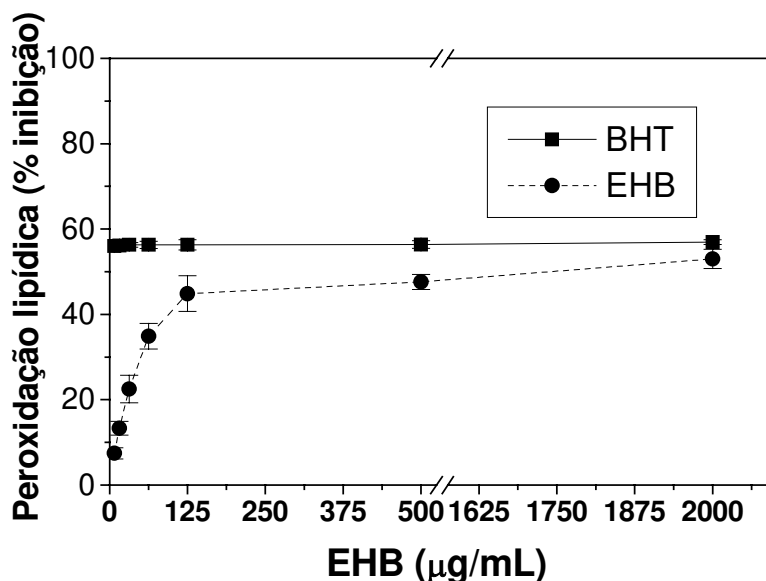


Figura 5: Efeito do EHB sobre a peroxidação lipídica em homogeneizado de músculo tibial anterior (TA). Homogeneizado incubado com diferentes concentrações de BHT e de EHB diluído em acetona. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento.

4.4.2 Análise *in vivo*

Primeiramente verificou-se o efeito do exercício intenso sobre a peroxidação lipídica em cérebro, fígado e músculo TA.

Como pode ser observado na Figura 6, houve aumento na lipoperoxidação no cérebro, nos grupos Exer1h, Exer6h e Exer48h, com pico máximo 48h após o exercício. Os valores obtidos para o aumento da peroxidação lipídica foram de: 15,7%, 30,2% e 108,9%,

respectivamente. A peroxidação lipídica no fígado, nos grupos Exer1h, Exer6h e Exer48h, quando comparados ao controle, aumentou 1 h após o exercício (15,5%). O valor máximo de peroxidação lipídica foi de 55,5% após 6 h e após 48 h, estes valores diminuíram para 27,4%. No músculo TA pode ser observado aumento na peroxidação lipídica (59,7%) 1 h após o exercício intenso. A produção máxima de TBARS ocorreu no período de 6 h (967%) após o exercício. Após 48 h a peroxidação lipídica permaneceu elevada (856%) (Figura 6).

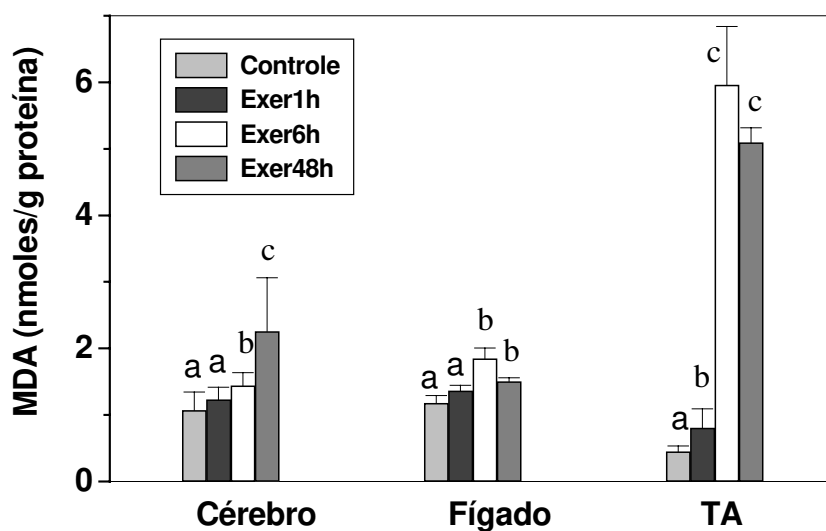


Figura 6: Efeito do exercício intenso sobre a peroxidação lipídica no cérebro, fígado e músculo tibial anterior (TA). As TBARS (MDA) foram determinadas em homogeneizados de tecidos 1h (Exer1h), 6h (Exer6h) e 48h (Exer48h) após exercício intenso. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 6 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

A eficiência do EHB na inibição da peroxidação lipídica induzida por exercício intenso foi analisada no cérebro, fígado e músculo TA após 6 h e 48 h (Figura 7). No cérebro obteve-se aumento de 185% na concentração de TBARS no grupo Exer, 48h após o exercício. No grupo EHB.Exer observou-se uma diminuição de 96% na peroxidação lipídica, enquanto que no grupo Exer.EHB a diminuição foi de 63,0%, em relação aos animais submetidos ao exercício. Assim, O EHB inibiu a peroxidação induzida por exercício intenso, sendo os valores obtidos próximos aos valores dos grupos EHB e Controle. Obteve-se no fígado um aumento de 89% na peroxidação lipídica, com pico máximo após 6 h após o exercício. Nos grupos EHB.Exer e Exer.EHB houve diminuição da peroxidação em 53,6% e 54,1%, respectivamente quando comparados ao grupo Exer. Observou-se no músculo TA, que o exercício induziu a peroxidação lipídica, tanto após 6 h (1.260%) como 48 h (1.049%) em relação ao grupo controle. Nos grupos analisados 48 h após o exercício, a administração do EHB levou a diminuição significativa na peroxidação lipídica no músculo TA tanto no grupo EHB.Exer (96%) como no grupo Exer.EHB (94%) quando comparados ao grupo submetido ao exercício intenso, demonstrando que o extrato foi igualmente eficiente tanto administrado antes, como depois do exercício, na prevenção da peroxidação lipídica no cérebro, fígado e músculo. Contudo, no músculo TA não houve diminuição significativa no tempo de 6h.

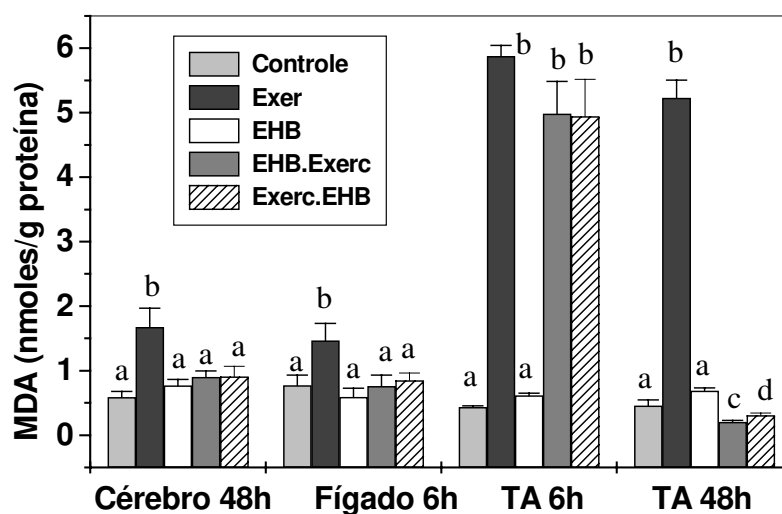


Figura 7: Efeito do EHB sobre a peroxidação lipídica induzida por exercício intenso no cérebro, fígado e músculo tibial anterior (TA). As TBARS (MDA) foram determinadas em homogeneizado tecidual 6 h e 48 h após o exercício. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

Tendo em vista que o EHB diminuiu a peroxidação lipídica no músculo TA apenas quando analisado 48 horas após o exercício, realizou-se um experimento, no qual foram administradas 498mg/Kg de EHB, três vezes ao dia: 24 h, 12 h e 30 min antes exercício (Figura 8). Verificou-se que a concentração de TBARS no cérebro (48 h após o exercício) e no fígado (6 h após o exercício) diminuiu significativamente com a administração de três doses do EHB. Contudo, os resultados foram semelhantes aos obtidos nos experimentos em que os animais foram tratados com dose única de EHB, não havendo diferença significativa estatisticamente. Observou-se que a administração de três doses do EHB foi mais efetiva na prevenção da lipoperoxidação no músculo TA, reduzindo a concentração de TBARS neste órgão a valores próximos dos observados no grupo controle.

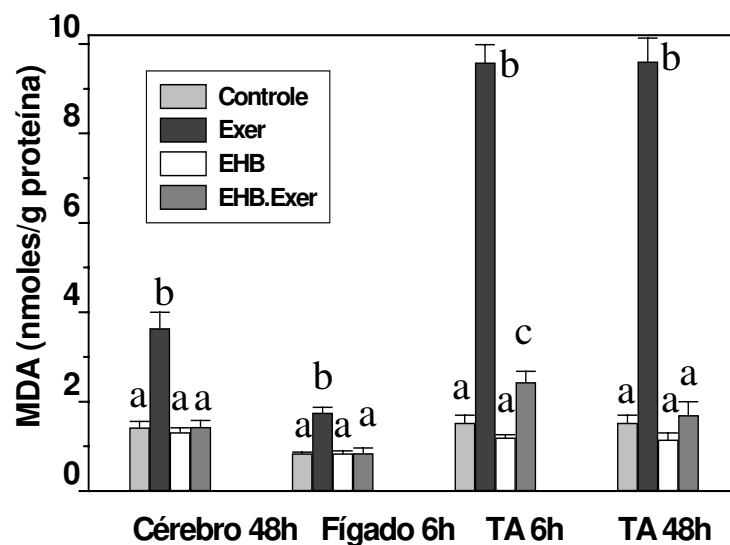


Figura 8: Efeito do EHB sobre a peroxidação lipídica em cérebro, fígado e músculo tibial anterior (TA). O EHB foi administrado 24 h, 12 h e 30 min antes do exercício. As TBARS foram determinadas nos homogeneizados 6 h e 48 h após o exercício. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5-6 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

4.5 Efeito do EHB sobre a atividade da óxido nítrico sintase (NOS)

4.5.1 Análise *in vitro*

Com o objetivo de verificar se o efeito do EHB sobre a concentração de nitrito é mediado pela NOS, foram realizados experimentos com homogeneizados obtidos de cérebro e de músculo TA de ratos incubados com arginina e cálcio, na presença e na ausência do EHB. O EHB inibiu a produção de nitrito nestes sistemas de maneira dose dependente. A IC₅₀ calculada para o EHB foi 49 µg/mL para o sistema contendo homogeneizado de cérebro e 42,3 µg/mL para o sistema contendo homogeneizado de músculo (Figura 9).

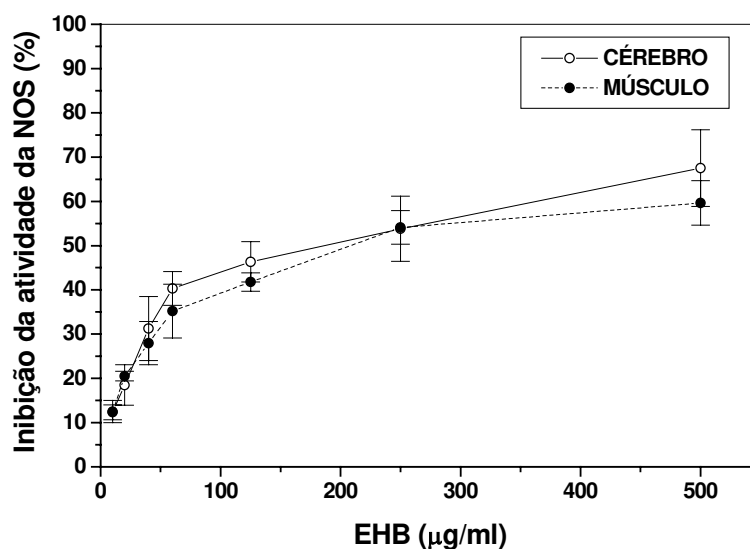


Figura 9: Inibição da atividade NOS em homogeneizado de cérebro e músculo TA de ratos pelo EHB de frutos de *Pterodon emarginatus*. Os homogeneizados foram incubados com diferentes concentrações de EHB. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

Para avaliar o efeito deste extrato vegetal sobre as diferentes isoformas de NOS, inibidores específicos da enzima foram utilizados. Observou-se que a adição de arginina e cálcio ao homogeneizado de cérebro (controle) induziu aumento de 21% na concentração de nitrito quando comparado ao sistema que continha apenas o homogeneizado de cérebro (basal). A presença de L-NAME ou aminoguanidina (AMG) levou a diminuição na concentração de nitrito em relação ao controle. O sistema de reação sem cálcio (EGTA) também demonstrou diminuição na concentração de nitrito. A atividade da NOS calculada pela diferença entre os valores do controle e na presença dos inibidores foi de 0,78 nmol/g proteína/minuto (L-NAME), 0,66 nmol/g proteína/minuto (AMG), e 0,82 nmol/g proteína/minuto (EGTA). A pré-incubação do homogeneizado com EHB (2000µg/mL) na presença de arginina, cálcio e inibidores de NOS, conduziu a uma diminuição na produção de nitrito em todos os sistemas estudados, 40,47% na presença de L-NAME e EHB, 29,52% na presença aminoguanidina e EHB e 35,63% na presença EGTA e EHB. A presença de L-NAME ou aminoguanidina (AMG) e EGTA nos sistemas contendo homogeneizado de músculo tibial anterior também levou a uma diminuição na concentração de nitrito em relação ao controle. A atividade NOS calculada pela diferença entre os valores do controle e na presença dos inibidores foi de 0,68 nmol/g proteína/minuto (L-NAME), 0,47 nmol/g proteína/minuto (AMG), e 0,69 nmol/g proteína/minuto (EGTA). A incubação do homogeneizado com EHB na presença de arginina, cálcio e inibidores de NOS, levou a diminuição na produção de nitrito em todos os sistemas estudados, sendo de 42,89% na presença de L-NAME e EHB, 36,97% na presença aminoguanidina e EHB e 40,34 % na presença EGTA e EHB (Figura 10).

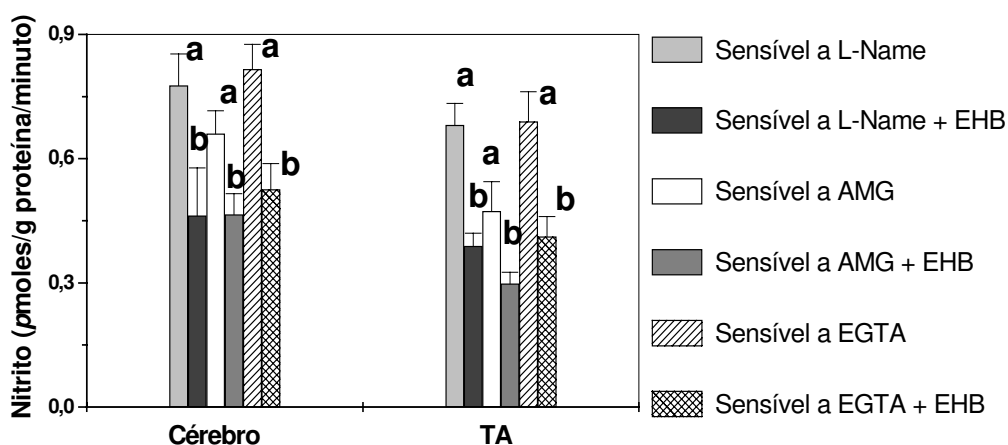


Figura 10: Efeito do EHB de frutos de *Pterodon emarginatus* sobre a inibição da atividade da NOS em homogeneizados de cérebro e músculo tibial anterior (TA) de ratos. Os homogeneizados foram incubados com diferentes inibidores de NOS na ausência ou presença de EHB. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

4.5.2 Análise *in vivo*

Considerando o fato de que o NO está envolvido tanto na regulação da contração do músculo esquelético como também na sinalização neuronal, foi realizado um experimento com o objetivo de analisar a cinética de produção de nitrito pelo cérebro, fígado e músculo tibial anterior após o exercício agudo (Figura 11). No cérebro, foi observado um ligeiro aumento na produção de nitrito 6 h após o exercício (12,8%), atingindo 60% após 48 h, quando comparados ao grupo controle.

A produção de nitrito aumentou significativamente no fígado dos animais, 6 h após o exercício. Após este período observou-se uma queda na concentração de nitrito, cujos valores foram observados próximos aos obtidos no grupo controle.

Um aumento significativo de 90,5% na produção de nitrito muscular foi observado 1 h após o exercício, em relação ao grupo controle, sendo verificado que após este período houve uma queda na produção de nitrito com valores próximos aos do grupo controle.

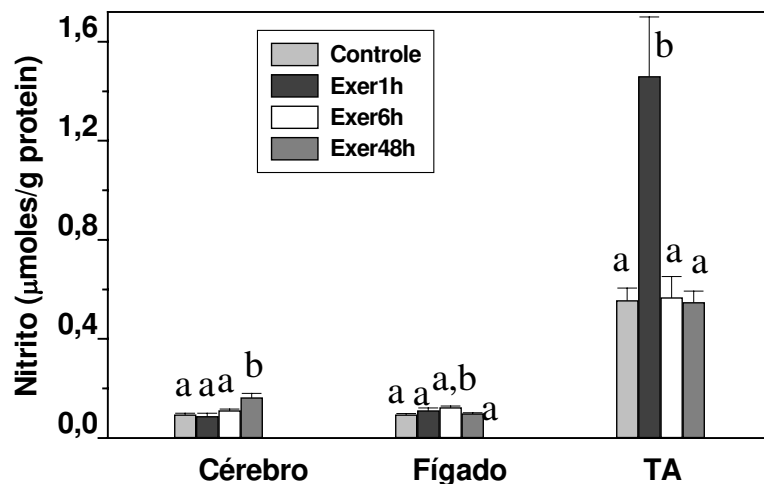


Figura 11: Efeito do exercício intenso sobre a produção de nitrito no cérebro, fígado e músculo tibial anterior (TA). A concentração de nitrito foi determinada em homogeneizados de tecidos 1h (Exer1h), 6h (Exer6h) e 48h (Exer48h) após exercício intenso. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 6 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

Com o objetivo de se avaliar o efeito do EHB de *Pterodon emarginatus* na produção de nitrito pelo músculo tibial anterior, cérebro e fígado de ratos submetidos a exercício intenso, um experimento foi realizado com animais submetidos ao exercício e tratamento prévio ou posterior com o extrato vegetal estudado, seguindo os mesmos protocolos utilizados nos ensaios anteriores (Figura 12). O grupo Exer apresentou níveis de nitrito significativamente maiores, em relação aos grupos controle e EHB, no músculo TA, quando

analisados 1 h após o exercício intenso. Os grupos Exer.EHB e EHB.Exer apresentaram valores de nitrito próximos àqueles observados nos grupos controle e EHB.

No fígado, a produção de nitrito aumentou significativamente no grupo Exer, sendo que nos grupos submetidos ao tratamento com o extrato (EHB.Exerc e Exerc.EHB) observou-se diminuição significativa na produção de nitrito com valores próximos àqueles observados no grupo controle.

Em relação à produção de nitrito no cérebro, foi observado aumento significativo na concentração de nitrito, 48 h após o exercício, quando comparados ao grupo controle. O tratamento apenas com EHB não alterou o nível de nitrito em relação ao controle, mas diminuiu nos grupos EHB.Exerc e Exerc.EHB quando comparados com o grupo Exerc.

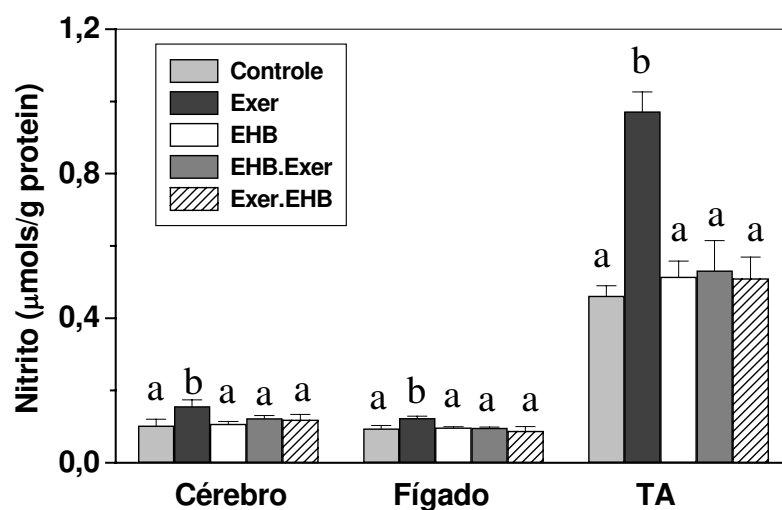


Figura 12: Efeito do EHB de frutos de *Pterodon emarginatus* sobre produção de nitrito induzida por exercício intenso no cérebro, fígado e músculo tibial anterior (TA). O EHB foi administrado 30 minutos antes ou após o exercício agudo. A concentração de nitrito foi determinada em homogeneizado tecidual 1h, 6 h e 48 h após o exercício. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

A produção de nitrito nos animais que receberam uma dose EHB tre vezes, durante 24 horas, foi semelhante ao tratamento com dose única, em todos os tecidos estudados (Figura 13).

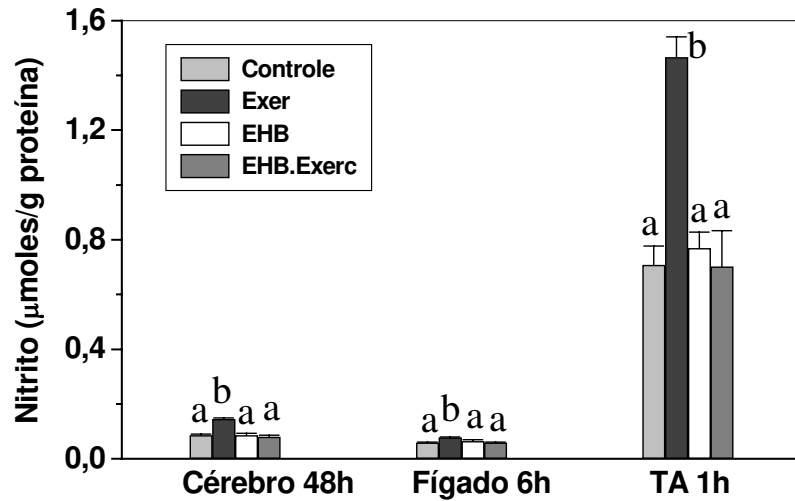


Figura 13: Efeito do EHB sobre produção de nitrito induzida por exercício intenso no cérebro, fígado e músculo tibial anterior (TA). O EHB foi administrado 24 h, 12 h e 30 min antes do exercício. A concentração de nitrito foi determinada em homogeneizado tecidual 1h, 6 h e 48 h após o exercício. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 5 determinações por tratamento. A significância foi determinada pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

4.6- Efeito do EHB sobre a produção de nitrotirosina

Com o objetivo de se avaliar o efeito do EHB de *Pterodon emarginatus* sobre a nitração de tirosina no músculo tibial anterior, cérebro e fígado de ratos submetidos ao exercício intenso, amostras obtidas de cérebro, fígado e músculo TA de animais submetidos ao tratamento com EHB 30 min, 12 e 24 h antes do exercício, foram analisadas por *western blotting*, utilizando-se anticorpo específico para nitrotirosina.

A Figura 14 mostra diferentes padrões para o cérebro, fígado e músculo tibial anterior, consistentes com a nitração de um ou mais resíduos de tirosina. No cérebro, o exercício agudo induziu o aparecimento de bandas protéicas na região de 66 kDa. O tratamento prévio com EHB inibiu o aparecimento desta banda.

No fígado, nenhuma banda foi observada nos animais controle e nem naqueles tratados apenas com EHB, no entanto, o exercício foi capaz de induzir o aparecimento de bandas imunorreativas com 66 e 45 kDa no grupo Exerc e EHB.Exerc.

No músculo tibial anterior, observou-se um padrão triplete e uma banda protéica imunorreativa para nitrotirosina com 66 kDa, no grupo controle. O grupo submetido ao exercício apresentou uma intensa banda de 97 kDa além da banda de 66Kda e do padrão triplete. O tratamento dos animais com EHB, antes do exercício, preveniu o aparecimento da banda de 97 kDa e diminuiu a intensidade do padrão triplete. Estes resultados demonstraram que o exercício induziu o aparecimento de proteínas nitradas nos diferentes tecidos analisados, e que o tratamento prévio com EHB foi capaz de prevenir o aparecimento da maioria delas.

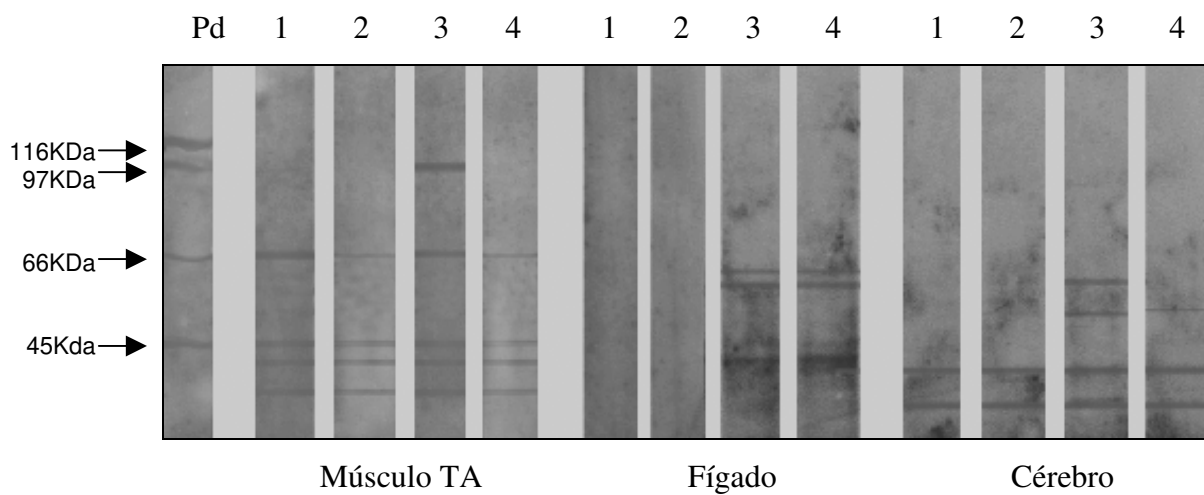


Figura 14: Western blotting para nitrotirosina em homogeneizados de músculo tibial anterior (TA), fígado e cérebro de ratos. Três doses de EHB foram administradas 24 h, 12 h e 30 min antes do exercício. Pd, padrão de peso molecular. (1): grupo controle, (2) grupo EHB (3):grupo Exer, (4):grupo EHB. Exer.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar os possíveis efeitos do extrato hexânico bruto (EHB) de frutos de *Pterodon emarginatus* sobre o estresse oxidativo e nitrosativo induzido por exercício intenso. Assim, foi comparada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) entre ratos submetidos ao exercício intenso e tratamento com EHB com a produção de EROs e ERNs naqueles submetidos apenas ao exercício intenso.

Tem sido proposto que as EROs podem aumentar a lesão muscular causada por exercício intenso, bem como estão envolvidas no desenvolvimento de várias patologias. Entre as espécies oxidantes destacam-se as produzidas por neutrófilos e macrófagos ativados. Uma dessas espécies é o ácido hipocloroso produzido pela peroxidase de neutrófilos, na presença de peróxido de hidrogênio e íon cloreto, que é benéfico para o organismo, mas em excesso, pode causar lesão celular. Essa espécie reativa pode formar produtos como a 3-clorotirosina. A peroxidase de catalisa também a formação de radicais tirosil, os quais podem induzir a peroxidação lipídica, nitrosilação de lipoproteínas plasmáticas de alta densidade e ligação cruzada de proteínas (EISERICH et al, 1998). Assim, a inibição da ativação excessiva de peroxidase pode contribuir na prevenção da lesão tecidual.

Como primeira abordagem, para verificar se o EHB apresentava atividade antioxidante potencial, verificou-se o efeito deste sobre a atividade de peroxidase, *in vitro*. O EHB inibiu a atividade da peroxidase (tabela 1). Seu mecanismo de ação pode incluir a inibição enzimática, a doação de elétrons, atuando como antioxidante ou ainda seqüestrante de água oxigenada. Kato et al. (2003) verificaram que compostos fenólicos antioxidantes inibiram a atividade, *in vitro*, de peroxidase em neutrófilo humano. Os autores sugeriram uma inibição competitiva da enzima. Contudo, o mecanismo de ação dos compostos fenólicos não

foi elucidado. Tsuda et al. (2002) verificaram que compostos fenólicos atenuaram a lesão hepática por reperfusão em ratos, através da inibição da atividade de peroxidase.

Tabela 1 – Concentração de EHB capaz de induzir 50% do efeito medido sobre a oxidação do guaiacol, peroxidação lipídica e atividade da NOS.

	IC ₅₀	
Oxidação do guaiacol	19,8 µg/mL	
	Cérebro	Músculo
Peroxidação Lipídica	16,2 µg/mL	26,7 µg/mL
Atividade NOS	49,0 µg/mL	42,3 µg/mL

O exercício induziu aumento da atividade sérica de creatina quinase (CK) e da densidade de macrófagos, parâmetros não observados no grupo controle. Sacheck et al. (2003) observaram aumento da atividade de CK sérica em adultos jovens e idosos após exercício intenso. Vários trabalhos têm demonstrado aumento na atividade sérica de CK, assim como alterações histológicas no músculo esquelético, incluindo aumento de neutrófilos e macrófagos, após contrações intensas (PIZZA et al., 2002; STANSBIE et al., 1983; CLARKSON & TREMBLAY, 1988; MATSUURA et al., 2001; ZERBA et al., 1990). Entretanto, há ainda controvérsias em relação à cinética de aumento da atividade da CK e quanto ao período em que as alterações histológicas são mais evidentes. Acredita-se que o grau de lesão é proporcional à quantidade de trabalho realizado pelo músculo (ARMSTRONG et al., 1983). No presente trabalho observou-se pico máximo de atividade de CK 1 h após o exercício e a atividade desta enzima permaneceu aumentada por mais de 48 h. O aumento de células inflamatórias foi observado 6 h após o exercício e este aumento foi observado por

mais de 48 h. O tratamento com EHB preveniu a lesão muscular causada por exercício intenso, pois as densidades de macrófagos diminuíram nos grupos EHB.Exer e Exer.EHB.

Vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio na modulação do metabolismo e função contrátil no músculo esquelético (ALESSIO et al., 1988; BALON & NADLER, 1994; KOBZIK et al., 1994; LIU et al., 2000). O exercício induziu um aumento na peroxidação lipídica e na produção de nitrito em todos os tecidos analisados. Contudo, foram observadas diferenças na cinética de peroxidação entre esses tecidos. Diferenças na cinética de peroxidação lipídica têm sido descritas e esta diferença parece ser dependente de vários fatores, tais como o consumo de oxigênio, suscetibilidade aos oxidantes, ativação de enzimas antioxidantes, níveis de antioxidantes e outros sistemas de reparo (LIU et al., 2000). Além disso, tem sido sugerido que o exercício poderia modular a transferência de peróxidos lipídicos entre órgãos e tecidos de ratos (SUZUKI et al., 1983), uma vez que o fluxo sanguíneo no músculo exercitado pode aumentar aproximadamente quatro vezes em relação ao estado de repouso. Assim, a saída dos produtos finais de peroxidação lipídica pode aumentar devido a redistribuição do fluxo sanguíneo para outras regiões (SLATER et al., 1988). Neste trabalho observou-se que as TBARS aumentaram no músculo após o exercício intenso e retornaram aos níveis do controle após 48 h. Poucos estudos têm verificado o efeito do exercício intenso sobre a peroxidação lipídica. Tem sido observado aumento de peróxidos no sangue de atletas após corrida de curta duração (*sprint*) (MARZATICO et al., 1997) e também em músculo de rato após corrida de alta intensidade ($45 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$) por 1 min (ALESSIO et al., 1988). Kayatekin et al. (2002) observaram aumento de TBARS musculares aos 30 min e 3 h após exercício intenso e esses níveis retornaram aos níveis do controle após 24 h. Vários estudos demonstraram o aumento da peroxidação lipídica em músculo esquelético após exercício submáximo por tempo prolongado (CHILD et al., 1998; SEN, 1995). Contudo, o exercício intenso deve produzir mais EROs e, portanto, mais

danos teciduais. Essa observação pode ser fundamentada pelos trabalhos de Alessio e Goldfarb (1988) e Salminen e Vihko (1983), que observaram maior aumento de TBARS após exercício intenso do que após exercício moderado.

Além disso, o exercício foi capaz de induzir um aumento no número de macrófagos no músculo tibial anterior. Células fagocíticas ativadas podem gerar espécies reativas de oxigênio, as quais podem iniciar reações de peroxidação lipídica resultando em lesão celular. Zerba et al. (1990) demonstraram um aumento significativo no número de macrófagos muscular em camundongos, 3 dias após contrações induzidas por eletroestimulação funcional. Ainda, a administração de superóxido dismutase com polietilenoglicol (SOD-PEG), 10 minutos antes do protocolo de eletroestimulação foi capaz de diminuir a densidade celular no músculo extensor digital e prevenir a lesão muscular. No presente trabalho, o aumento na densidade de macrófagos foi observado no mesmo período em que a peroxidação lipídica tornou-se máxima no músculo tibial anterior, sugerindo uma possível contribuição de EROs produzidas por estas células neste processo.

Foi demonstrado também, neste trabalho, que houve aumento de TBARS no fígado. Uma das principais funções hepáticas é a desintoxicação e este órgão possui muitas enzimas antioxidantes ativas (PARKHOUSE et al., 1995; LIU et al., 2000). Contudo, há controvérsias sobre os efeitos do exercício intenso sobre a capacidade antioxidante hepática (ALESSIO e GOLDFARB 1988; JI, 1993; JI et al. 1988, 1990), provavelmente, devido as diferentes intensidades e duração dos protocolos de exercício. O aumento observado da peroxidação lipídica hepática após exercício intenso indica o aumento do estresse oxidativo neste órgão (ALESSIO & GOLDFARB 1988; DAVIES et al., 1982). Entretanto, Kayatekin et al. (2002) verificaram que o exercício intenso de curta duração (*sprint*) não modificou o nível de TBARS hepáticas.

No presente trabalho foi demonstrado que o cérebro também respondeu ao exercício intenso, mas a resposta ao estresse oxidativo foi diferente do fígado e músculo TA, indicando a presença de diferentes sistemas antioxidantes ou mesmo diferenças na atividade enzimática e seqüestradora de EROs. LIU et al. (2000) analisaram o conteúdo de antioxidantes no cérebro, fígado e músculo e demonstraram que o músculo apresenta o menor conteúdo de antioxidantes, tais como, ácido ascórbico, α -tocoferol, ubiquinol e cisteína entre os três tecidos, seguido pelo cérebro e fígado. O cérebro possui grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados, baixos níveis de glutathiona reduzida (GSH), GSSG (RAVINDRANNATH et al., 1990; LIU et al., 2000) e também baixos níveis de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (MEISTER et al., 1983), o que torna o cérebro suscetível a peroxidação lipídica. A administração de EHB reduziu a formação de TBARS em todos os tecidos analisados. Assim, o EHB mostrou ser um agente antioxidante.

O aumento na produção de óxido nítrico, assim como uma atividade aumentada da óxido nítrico sintase na musculatura esquelética após atividade contrátil tem sido demonstrado por vários autores (KOBZIK et al., 1994; SMITH et al., 2002; REISER et al., 1997; BALON & NADLER, 1994).

Sabe-se também que o exercício físico estimula a atividade neuronal e regula a expressão de vários genes, que podem participar na plasticidade ou sinalização celular neuronal (MOLTENI et al., 2002) e muscular (KOBZIK et al., 1994). Evidências recentes têm demonstrado que estas ações estão relacionadas à ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (KITAMURA et al., 2003). Vários autores têm estabelecido uma ligação entre ativação de receptores NMDA e produção de óxido nítrico (HAYASHI et al., 2002; KITAMURA et al., 2003; LEE et al., 2002), sendo demonstrado que a expressão destes receptores precede a ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal resultando em aumento na produção de óxido nítrico e também de radical hidroxila (HAYASHI et al., 2002).

A velocidade de produção de óxido nítrico em mitocôndria de fígado de ratos é similar a velocidade de produção do ânion superóxido (GIULIVI et al., 1998). Além disso, tem sido demonstrado que a óxido nítrico sintase hepática pode ser induzida por espécies reativas de oxigênio com atividade máxima em 6 h após a indução, voltando ao nível próximo ao controle após 18 h (JUNG et al., 2002; NECCHI et al., 2002; MONCADA et al., 1991; KNOWLES et al., 1990), sendo que a administração de antioxidantes é capaz de inibir a síntese de óxido nítrico em hepatócitos (LIANG e AKAIKI, 2000).

No músculo tibial anterior foi demonstrado que o aumento máximo na produção de nitrito coincidiu com um aumento inicial na peroxidação lipídica em 1 h após o exercício. Entretanto, no cérebro o aumento na produção de nitrito foi precedido por um ligeiro aumento na produção de TBARS que se tornaram máximos simultaneamente, e no fígado, o aumento de nitrito coincidiu com o aumento máximo na peroxidação lipídica, que foi observado 6 horas após o exercício.

A geração simultânea de óxido nítrico e superóxido favorecem a formação do ânion peroxinitrito com conseqüente diminuição na concentração de óxido nítrico (EISERICH et al., 1998). No entanto, o peroxinitrito é forte agente oxidante e sua interação com ácidos graxos poliinsaturados resulta na iniciação da peroxidação lipídica (HOGG e KALYANARAMAN, 1999).

Considerando que o músculo tibial anterior demonstrou ser mais responsivo ao exercício intenso em relação aos demais órgãos analisados e que tanto o fígado quanto o cérebro tiveram suas concentrações de TBARS e de nitrito aumentadas depois 6 horas, período em que a peroxidação lipídica no músculo tornou-se máxima, nossos resultados sugerem que o estresse oxidativo muscular induzido pelo exercício intenso seja o evento principal, desencadeado não somente pela produção aumentada de espécies reativas de

oxigênio, mas também pelo óxido nítrico, sugerindo uma possível formação de peroxinitrito, o qual atuaria aumentando a propagação da peroxidação lipídica no músculo.

Os experimentos realizados *in vitro* demonstraram que o extrato hexânico bruto (EHB) de *P. emarginatus* é capaz de atuar como antioxidante, inibindo a oxidação do guaiacol mediada pela peroxidase e também a peroxidação lipídica em homogeneizados de cérebro e de músculo tibial anterior (tabela 1). Quando administrado em dose única antes ou após o exercício, o EHB inibiu a peroxidação lipídica. Entretanto, no músculo tibial anterior, observou-se um efeito menos pronunciado em relação aos demais órgãos analisados. O tratamento prévio com maior número de doses do extrato levou a uma inibição total na peroxidação lipídica em todos os órgãos analisados.

Este efeito poderia ser explicado pelo fato de que o músculo demonstrou ser o órgão mais sensível a peroxidação lipídica induzida por exercício intenso quando comparado aos demais órgãos analisados. Além disso, os ensaios *in vitro* demonstraram que o EHB exerce um efeito dose dependente sobre a peroxidação lipídica e que o músculo tibial anterior é menos sensível à ação antioxidante deste extrato quando comparado ao cérebro, o que poderia ser atribuído à diferença no conteúdo de antioxidantes existente entre estes dois tecidos.

Muitos estudos sobre inibição da peroxidação lipídica por compostos terpênicos e fenólicos têm sido relatados atualmente (NOGUCHI & NIKI, 2000; NG et al., 2000). Sabe-se que os compostos fenólicos têm uma alta reatividade com o radical lipídico peroxil, podendo assim interagir com estas espécies, interrompendo a propagação da peroxidação lipídica (NOGUCHI & NIKI, 2000). Um diterpenóide isolado da planta *Salvia miltiorrhiza* Bunge, inibiu a peroxidação lipídica em homogeneizados de rins e cérebro de ratos, sendo tal atividade atribuída à presença do anel furânico presente em sua estrutura (NG et al., 2000). Di Mascio et al. (1997) demonstraram que compostos terpênicos isolados do extrato etanólico obtido de plantas do gênero *Pterodon* exibem uma alta capacidade para quelar oxigênio

singlete, mas não para inibir a peroxidação lipídica microsomal. Os terpenóides caveol palmitato e cafestrol palmitato, isolados do café verde, tem sido relatados capazes de aumentar a atividade da enzima glutaiona S-transferase em camundongos (LAM et al., 1982). Extratos vegetais ricos em polifenóis inibiram a peroxidação lipídica induzida por NMDA no cérebro e restauraram os níveis de glutathiona (LEE et al., 2002).

Sendo assim, os resultados obtidos sugerem uma possível ação antioxidante de quebra de cadeia, impedindo a propagação da reação peroxidação lipídica nos sistemas estudados *in vitro*. A observação de que o EHB inibiu a peroxidação lipídica quando administrado 30 minutos após o exercício intenso, reforça esta proposição.

Sabe-se que compostos polifenólicos podem ser transportados através da corrente sanguínea, exercendo seu efeito antioxidante, como seqüestradores de radicais livres, assim como também podem atuar ao nível celular, alterando a sinalização celular e/ou a expressão gênica, via elemento de resposta antioxidante (ARE) presente na região promotora de uma série de enzimas detoxificantes da fase 2 (AZZI et al., 2004).

Além disso, deve-se considerar a biotransformação, distribuição tissular e eliminação destes estes compostos após serem absorvidos. Assim, muitos compostos podem ter sua estrutura química modificada após serem metabolizados, formando metabólitos que também podem exercer efeitos importantes no organismo, atuando diretamente sobre as espécies oxidantes formadas ou então interferindo nas funções celulares (AZZI et al., 2004).

O EHB foi mais efetivo na inibição da peroxidação lipídica, quando administrado 3 vezes durante 24 horas. Assim, esta administração prévia do extrato sugere também uma possível indução do sistema de defesa antioxidante pelo EHB. Porém o efeito não poderia ser excluído o efeito de possíveis metabólitos, cuja concentração poderia estar aumentada devido à administração do extrato em maior número de doses do EHB.

A produção de nitrito mediada pela NOS foi inibida pelo EHB em homogeneizados de cérebro e de músculo tibial anterior *in vitro* (Tabela 1). A adição de inibidores de óxido nítrico sintase aos homogeneizados de cérebro e de músculo tibial anterior, demonstraram inibição na produção de nitrito. O L-NAME é um análogo estrutural da L-arginina, sendo um inibidor competitivo da isoforma induzida da NOS e um inibidor irreversível das isoformas constitutivas (BAYLIS et al., 1995). O AMG, apesar de não ser um análogo estrutural da L-arginina, é um inibidor irreversível tanto da NOS constitutiva quanto da induzida, sendo preferencial para esta última (WOLFF & LUBESKIE, 1995) O EGTA é um quelante específico para os íons cálcio e, portanto, inibidor da NOS constitutiva (MAYEUX et al., 1995). O efeito destes inibidores sobre a produção de nitrito foi potenciado quando o EHB foi adicionado aos sistemas de reação. Esta resposta sugeriu uma possível ação inibitória do EHB sobre as diferentes isoformas da NOS.

Foi demonstrado recentemente, que a nNOS é capaz de acomodar em seu sítio ativo, compostos fenólicos substituídos sendo portanto, capazes de atuarem como inibidores competitivos da nNOS e também como antioxidantes (AUVIN et al., 2003). Além disso, tem sido relatado que compostos terpênicos e fenólicos são capazes de inibir a expressão da óxido nítrico sintase independente de cálcio em macrófagos ativados com LPS (MATSUDA et al., 2002; BEHARKA et al., 2000).

Foi observado que o exercício induziu aumento de nitrito em todos os tecidos analisados. O nível de nitrito encontrado no músculo foi cinco vezes maior que o nível de nitrito do cérebro e fígado. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, devido à relativa atividade da NOS no músculo, que é mais alta do que nos outros tecidos estudados (SALTER et al., 1991). Jungersten et al. (1997) demonstraram que apenas uma sessão de exercício intenso induziu intenso aumento de NO. Roberts et al. (1999) demonstraram que o músculo esquelético possui uma atividade basal de cNOS e que o exercício aumenta a atividade dessas

isoformas. Uma possível explicação para o aumento de nitrito observado neste estudo, seria o aumento de cálcio na fibra muscular durante a contração. Como o músculo é ativado, o retículo sarcoplasmático libera cálcio, que pode ativar as isoformas constitutivas da NOS. O fato das isoformas eNOS e nNOS necessitarem de cálcio para ativação (Moncada e Higgs, 1993) e de evidências de que o cálcio extracelular também pode aumentar a ativação da NOS com o aumento de carga muscular (STULL & WEHLING, 1998), corroboram com nossos resultados.

Um número crescente de estudos sobre o efeito do exercício físico intenso sobre a produção espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio tem sido observado recentemente, no entanto, a maioria destas pesquisas é direcionada aos efeitos sobre o músculo esquelético. No presente trabalho observou-se também que o exercício induziu um aumento na produção de nitrito e de TBARS no cérebro e no fígado. Estes resultados são relevantes uma vez que várias evidências têm relacionado o envolvimento destas espécies tanto em doenças neurodegenerativas do cérebro, como também em doenças inflamatórias hepáticas (ESPOSITO et al., 2002; MONCADA et al., 1993).

Os radicais tirosil têm sido detectados em hemoproteínas que sofreram injúria oxidativa (GUNTHER et al., 1997). A determinação da nitração protéica é uma técnica freqüentemente utilizada para detecção de danos oxidativos aos tecidos. A nitração de proteínas parece ser o produto final da reação de intermediários do óxido nítrico, como o dióxido de nitrogênio, formado pela oxidação do nitrito mediada por peroxidases e nitrocarbonato, formado pela interação do peroxinitrito com dióxido de carbono (EISERICH et al., 1998). Tendo em vista que o NO é produzido por diferentes tipos celulares o radical tirosil pode ser formado em qualquer proteína, sendo este um mecanismo que leva a nitração de proteínas. Neste trabalho foi verificada a presença de bandas de nitrotirosina em todos os tecido analisados. Gunther et al. (1997) utilizando EPR e *Western blot* demonstraram que o

NO pode levar a formação de nitrotirosina e nitrosotirosina. Neste trabalho o número de bandas de proteínas nitrosiladas aumentou com o exercício intenso e a administração de EHB preveniu a nitrosilação no cérebro e no músculo e não apresentou efeito no fígado. A diminuição dos níveis de nitrito e nitrotirosina induzida pelo EHB indica que o extrato pode prevenir a formação de ERNs, geradas pelo aumento da atividade da NOS por exercício intenso.

Apesar de estar bem documentado o papel protetor dos antioxidantes, reduzindo a lesão oxidativa, a maioria dos estudos envolvendo fitoterápicos, tem sido realizados com uma única classe de compostos ou até mesmo com um composto químico isolado. Além disso, muitos destes estudos foram realizados apenas *in vitro*. No presente trabalho foi verificado que o extrato hexânico bruto de *P emarginatus* é capaz de reduzir a peroxidação lipídica e a produção de nitrito induzidas por eletroestimulação funcional no músculo tibial anterior, cérebro e fígado de ratos. Tal ação poderia ser atribuída à presença dos diferentes compostos químicos presentes neste extrato, como fenóis e terpenos (MAHJAN & MONTEIRO, 1970; MAHJAN & MONTEIRO, 1972; FASCIO et al., 1976), que atuam não somente como antioxidantes de quebra de cadeia, mas também induzindo outros compostos antioxidantes endógenos (AZZI et al., 2004), além de inibir a atividade das diferentes isoformas de NOS. Estes resultados fornecem contribuições relevantes para os estudos relacionados à não somente à medicina esportiva como também para as pesquisas relacionadas à busca de compostos antioxidantes com ação inibitória sobre as espécies reativas de nitrogênio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, S.; ALI, A. Role of ROS modified human DNA in the pathogenesis and etiology of cancer. **Cancer Letters**, v. 142, p. 1-9, 1999.
- ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H.; CUTLER, R. G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in rat. **American Journal Physiology**, v. 255, p. c874-c877, 1988.
- ALESSIO, H. M., GOLDFARB A.H.. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. **Journal of Applied Physiology** v. 64, p.1333–1336, 1988
- ALESSIO, H. M.. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 2, p. 218-224, 1993.
- ALESSIO, H. M. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine Science Sports & Exercise**, v. 32, n. 1, p. 576-1581, 2000.
- ALI, M.A. YASUI, F.; MATSUGO, S.; KONISHI, T. The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. **Free Radical Research**, v. 32, p. 429-438, 2000.
- ANDRADE, F.H. et al. Effect of nitric oxide on single skeletal muscle fibres from the mouse. **Journal of Physiology**, v. 509, p. 577–586, 1998.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 521-531, 1999.
- APPLE, F. S.; HELLSTEN, Y.; CLARKSON, P. M. Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 41-44, 1988
- APPLE, F. S. E; RHODES, M. Enzymatic estimation of skeletal muscle damage by analysis of changes in serum creatine kinase. **Journal of Applied Physiology**, v.65, p.2598, 1988.
- ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. Excentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.54, p.80-93, 1983.
- AUVIN, S. et al. Novel inhibitors of neuronal nitric oxide sythase with potent antioxidant properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 209-212, 2003.
- AZZI, A.; DAVIES, K.; KELLY, F. Free radical biology – terminology and critical thinking. **FEBS letters**, v. 558, p. 3-6, 2004.
- BALON, T. W.; NADLER, J. L.. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 6, p. 2519-2521, 1994.

BAYLIS, C. et al. Blood-pressure (BP) and renal vasoconstrictor responses to acute blockade of nitri-oxide-presistence of renal vasoconstriction despite normalization of bp with either verapamil or sodium-nitroprusside. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 3, p. 1135-1141, 1995.

BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical & Biology**, v. 32, p. 797-803, 2002.

BEHARKA, A. A. et al. Long-term dietary antioxidant supplementation reduces production of selected inflammatory mediators by murine macrophages. **Nutrition Research**, v. 20, n.2, p. 281-286, 2000.

BIELSKI, B. H. J. Reevaluation of the spectral and kinetic properties of HO_2^\bullet and O_2^- free radicals. **Photochemistry and Photobiology** v. 28, p. 645-649, 1978.

BOOTH, F. W.; THAMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. **Physiological Reviews** V. 71, p. 541-585, 1991.

BRAS FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Chemistry of Brazilian Leguminosae. XXXIV Isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, v.10, n.11, p.2835-2836, 1971.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENMAN, J.E. et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, v. 84, p. 757-767, 1996.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, 39, 53-67, 1993.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.662, 1999.

CAMPISI J. Aging, Chromatin, and food restriction-Connecting the dots. **Science**, v. 289, p. 2062-2063, 2000.

CANNON, J. G. et al. Increased interleukin 1 β in human skeletal muscle after exercise. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. R451-455, 1989.

CARVALHO, J. C. T. **Validação Química-Farmacológica da Espécie Vegetal *Pterodon emarginatus*** Vog. 1998. 184f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1998.

CARVALHO, J.C.T. et al. Anti-inflammatory activityof the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 127-133, 1999.

- CASTRILLO, A. et al. Inhibition of the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. **The Journal Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15854-15860, 2001.
- CLARKSON, P. M.; TREMBLAY, I. Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, n. 1, p. 1-6, 1988.
- CHANG, S. et al. Natural Antioxidants from rosemary and sage. **Journal of Food Science**, v. 4, n. 40, p. 1102-1106, 1977.
- CHIARADIA, E. et al. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.119, p. 853-836, 1998.
- CHILD, R. et al. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. **Medicine Science Sports & Exercise.**, v. 30, p. 603-1607; 1998.
- CHILDS, A. et al. Supplementation with vitamin C e N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute injury by eccentric exercise. **Free Radical Biology & Medicine** v. 15, n. 3, p. 745-753, 2001.
- CORREA, M.P.. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. vol III. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, p.129, 1984.
- CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, 6ed, Rio de Janeiro, p.173, 1978.
- DAVIES, K. J. A. et al. Free radicals and tissue produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 4, p. 11981205, 1982.
- DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H.. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **Journal of Neuroscience** v. 14, p. 5147-5159, 1994.
- DENADAI, B. S. Limiar anaeróbio: Considerações fisiológicas e metodológicas. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde** v. 1, p. 74-88, 1995.
- DESCHENES, M. R. et al. Neuromuscular disturbance outlasts other symptoms of exercise-induced muscle damage. **Journal of the Neurological Sciences** v. 174, p. 92-99, 2000.
- DIAZ, P.T.; SHE, Z.-W.; DAVIS, W.B.; CLANTON, T.L. Hydroxylation of salicylate by the *in vitro* diaphragm: evidence for hydroxyl radical production during fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 540-545, 1993.
- DIMASCIO, P. D. et al. Quenching of singlet molecular oxygen by natural furan diterpenes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 38, p. 169-173, 1997.
- DUARTE, I. D. G. et al. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 13-18, 1996.

DUTHIE, G. G. et al. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v. 282, n. 1, p. 78-83, 1990.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 68, p. 2, p. 109-113, 1991.

EFERING, S.L.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38079-38086, 2002.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molecular Aspects of Medicine**, V. 19, p. 221-357, 1998.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 137-143, 1993.

ESPOSITO, E. et al. Review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative process. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 719-735, 2002.

FASCIO, M. et al. Diterpenes furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 201-203, 1976.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G.. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition** v. 18, p. 872-879, 2002.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB Journal**, v. 12, p. 773-790, 1998.

FRANKIEWICZ-JOZKO, A.; FAFF, J.; SIEDZAN-GABELSKA, B. Changes in concentration of tissues free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 74, p. 470-474, 1996.

FREDSTROM, S.. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. **Nutrition**, v. 18, p. 537-539, 2002

FRIDOVICH, I. Oxygen Toxicity:: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

GATTI, G. et al. Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature. **The Breast**, v. 13, p. 1-6, 2004.

GARDNER, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADPH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal** v. 191, p. 421-427, 1990.

GARDNER, P. R. et al. Superoxide radical and iron modulate aconites activity in mammalian cells. **Journal of Biology Chemistry**, v. 270, n. 22, p. 13399-13405, 1995.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A.. Production of nitric oxide by mitochondria. **The Journal Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 11038-11043, 1998.

GIULIVI, C.; HOCHSTEIN, P.; DAVIES, K, J. A. Hydrogen peroxide production by red blood cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 16, 123-129, 1994.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, p. 13, p. 435-438, 1992.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GROSDANOVIC, Z. NO message from muscle. **Microscopy Research and Technique**, v. 55, p. 148-153, 2001.

GUNTHER, M.R.; SAMPATH, V.; CAUGHEY, W.S. Potential roles of myoglobin autoxidations in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**, p. 26, n.11/12, p. 1388-1395, 1999.

Gunther, M.R. et al. Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272 (27), p.17086-17090, 1997.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 3444, p. 721-724, 1994.

HAYASHI, Y. et al. H.. Nitric oxide and hydroxyl radicals initiate lipid peroxidation by NMDA receptor activation. **Brain Research**, v. 941, p. 107-112, 2002.

HESS, M. L.; MANSON, N. H. Molecular oxygen: Friend and foe. The role of oxygen free radical system in the calcium paradox and ischemia/reperfusion injury. **Journal Mol. Cell. Cardiol**, v.16, p. 969-985, 1984.

HIRSCHMANN. G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 159-172, 1990.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 378-384, 1999.

HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 298-303, 1997.

HOWLETT, R. Nobel award stirs up debate on nitric oxide breakthrough. **Nature**, v. 395, p. 625-626, 1998.

HUSAIN, K. Interaction of regular exercise and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure and rat aortic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease**, v.1688, n. 1, p. 18-25, 2004.

IMLAY, J. A.; FRIDOVICH, I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. **Journal of Biology Chemistry**, v. 266, p. 6957-6965, 1991.

HWANG, B. Y. et al. Kaurane diterpenes from *Isodon japonicus* inhibit nitric oxide and prostaglandin E₂ production and NF- κ B activation in LPS-stimulated macrophage RAW264.7 cells. **Planta Medica**, v. 67, p. 406-410, 2001.

Ji, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Medicine Science Sports & Exercise**, v. 25, p. 225-231, 1993.

Ji, L.L.; STRATMAN, F.W.; LARDY, H.A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, p.150-160, 1988.

Ji, L.L.; DILLON, D.; WU, E. Alteration of antioxidant enzymes withaging in rat skeletal muscle and liver. **American Journal of Physiology**, v. 258, p R918-R923, 1990.

JONES, L. H.. ABDALLA, D. S. P.; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic on croton oil - and arachidonic acid-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, v. 44, p. 372-375, 1995.

JUNG, M. et al. Effects of hepatocellular iron imbalance on nitric oxide and reactive oxygen intermediates production in a model of sepsis. **Journal of Hepatology**, v. 33, p. 387-394, 2000.

KAYATEKIN, B.M. et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver **European Journal of Applied Physiology**, v. 87, p. 141-144, 2002.

KANSKI, J.; ALTERMAN, M. A.; SCHÖNEICH, C. Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle. **Free Radical & Biology**, v. 35, n. 10, p. 1229-1239, 2003.

KANTER, M. M. et al. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. **European Journal of Applied Physiology**, v. 57, p. 60-83, 1988.

KATO, Y.; NAGAO, A.; TERAOKA, J.; OSAWA, T. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic compounds *in vitro*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1136-1139, 2003.

KHAN, A.U. Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen in the reaction of potassium superoxide with water. **Journal of the American Chemical Society**, v.103, p. 6516-6517, 1981.

KITAMURA, T.; MISHINA, M.; SUGIYAMA, H.. Enhancement of neurogenesis by running wheel exercise is suppressed in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. **Neuroscience Research**, v. 47, p. 55-63, 2003.

KLOTZ, L. O.; KRONCKE, K. D., SIES, H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 2, n. 2, p. 88-94, 2003.

KNOWLES, R. G. et al. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. **Biochemical Journal**, v. 270, p. 833-836, 1990.

KOBZIK, L. et al. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**, v. 372, p. 546-548, 1994

KOBZIK, L.; STRINGER, B.; BALLIGAND, J.-L.; REID, M.B.; STAMLER, J.S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationship. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 211, p. 375-381, 1995.

KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, p. 1137-1139, 1998.

LAC, G.; MASO, F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. **Pathologie Biologie**, v. 52, p. 43-49, 2004.

LAM, L.K.T.; SPARNINS, V.L.; WATTENBERG, L.W. Isolation and identification of kahweol and cafestrol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. **Cancer Research**, v. 42, p. 1193-1198, 1982.

LAMAISON, J. L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Rosmarinic acid, totalhydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae Borraginaceae and Lamiaceae medicinales. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 48, p. 103-108, 1990.

LANCASTER, J.J. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 8137-8141, 1994.

LANE, N. A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. **Journal of Theoretical Biology**, v. 225, p. 531-540, 2003.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LAW, A et al. R. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampus and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired long-evans rats. **Neuroscience**, v. 112, v. 2, p. 267-275, 2002.

LAWLER, J. M.; HU, A. Interaction of nitric oxide and reactive oxygen species on rat diaphragm contractility. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 169, p. 229-236, 2000.

LEAL, L.K.A.M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 151-159, 2000.

LEE, K. J. Protective effect of vegetable extracts on oxidative stress in brain of mice administered with NMDA. **Food Research International**, v. 35, p. 55-63, 2002.

LEITE DE ALMEIDA, M. E.; GOTTLIEB, O. R.. Further Isoflavones from *Pterodon apparicioi*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2716, 1975.

- LIANG, J. F.; AKAIKE, T. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by α -lipoic acid. **Chemico-Biological Interactions**, v. 124, p. 53-60, 2000.
- LIU, J. et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, p. 21-28, 2000.
- LIU, M. L. et al. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. E1083-1091, 1999.
- MAHJAN, J. R; MONTERIO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 42 (suplemento), p. 103-107, 1970.
- MAHJAN, J. R; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 44, n. 1, p. 51-53, 1972.
- MAKINEN, K. K.; TENOVUO, J.. Observations on the use of guaiacol and 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazolline-6-sulfonic) as peroxidase substrates. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 100-108, 1982.
- MANFREDI, T. et al. Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in older men. **Medicine and Sciences in Sports and Exercise**, v. 23, p. 1028, 1991.
- MARZATICO, F. et al. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid preoxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **The Journal Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 37, p. 235-239, 1997.
- MATEO, A. O.; ARTIÑANO, A. A. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. **Pharmacological Research**, v. 42, n.5, p. 421-427, 2000.
- MATROULE J. Y.; PIETTE J. Nuclear factor-kappa B activation by singlet oxygen produced during photosensitization. **Methods in Enzymology**; v. 319, p. 119-129, 2000.
- MATSUDA, H. et al. Labdane-type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide production from *Hedychium coronarium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2527-2534, 2002.
- MATSUURA, N. et al. Injury and repair of the soleus muscle after electrical stimulation of the sciatic nerve in the rat. **Archives of Histology and Cytology**, v. 4, p. 393-400, 2001.
- MAYEUX, P. R. et al. Effect of lipopolysaccharide on nitric oxide synthase activity in rat proximal tubules. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n.1, p. 115-118, 1995.
- MCARDLE, A. et al. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive response. **American Journal of Physiology** v. 280, p. C621-C627, 2001.
- MEISTER, A; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Reviews of Biochemistry** v. 52, p. 711-601, 1983.

MIHM, M.J. et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. **Circulation**, v. 104, p. 174-180, 2001

MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **European Journal Neuroscience**, v. 16, p. 1107-1116, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.J.; HOGGS, A.. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n.2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002–2012, 1993.

MONTHILAL et al. Photosensitisation with naphthoquinones and binaphthoquinones: EPR spin trapping and optical studies-formation of semiquinone radical and reactive oxygen species on photoillumination. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 163, p. 141-148, 2004.

MORS, W.B.; DOS SANTOS, M.F.; MONTEIRO, H.B. Chemoprophylactic agent in Schistosomiasis: 14, 15-epoxygeranylgeraniol. **Science**, 157, n. 3791, p. 950-951, 1967.

MUNGRUE, N. et al. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 179, p. 123-135, 2003.

MTSUDA, H. et al. Labdane-type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide production from *Hedychium coronarium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2528-2534, 2002.

MURPHY, M. P. Nitric oxide and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 401-414, 1999.

NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, p. 839-845, 2000.

NAKANE, M.; SCHMIDT, H.H.; POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Letters**, v. 316, p. 175–180, 1993.

NECCHI, D. et al. Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. **Brain Research**, v. 933, p. 31-41, 2002.

NG, T.B.; LIU, F.; WANG, Z.T. Antioxidant activity of natural products from plants. **Life Sciences**, v. 66, p. 709-723, 2000.

NIESS, A. M. et al. Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: responses to running exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 7, p. 1220-1225, 2000.

- NIGRIS, F.; R C. et al. Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 351-359, 2003.
- NOGUCHI, N.; NIKI, E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1538-1546, 2000.
- NUNAN, E. A; et. al. Furane diterpenes with anti- and pro-inflammatory activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.15, n.6, p. 450, 1982.
- O'NEILL, C. A. et al. Production of hydroxyl radicals in contraction skeletal muscle of cats. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, p.1197-1206, 1996.
- PARK, C. et. al. Differential a constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 4, n. 5, P. 459-471, 2000.
- PARKHOUSE, W.S.; WILLIS, P.E.; ZHANG, J. Hepatic lipid peroxidation and antioxidant enzyme responses to long-term voluntary physical activity and aging. **Age**, v. 18, p. 11-17, 1995.
- PATEL, R.P; et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 385-400, 1999.
- PEDERSOLI, J. L. Contribuição ao conhecimento do gênero *Pterodon* Benth. *Pterodon apparicioi*, n.sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciência** v. 42 (suplemento), p. 391-395, 1970.
- PERKINS, W. J.; HAN, Y.; SIECK, G. C. Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 4, p. 1326-1332, 1997.
- PIETA, P.. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PIZZA, F. X. et al. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1873-1878, 2002.
- RADÁK, Z. et al. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n.7/8, p. 1059-1063, 1999a.
- RADÁK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology & Medicine**, 27 (1/2), 69-74, 1999b.
- RAVINDRANATH, V.; REED, D. J. Glutathione depletion and formation of glutathione-protein mixed disulfide following exposure of brain mitochondria to oxidation stress. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, v. 169, p. 1075-1079, 1990.

- REID, M.B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle: I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 1797-1804, 1992a.
- REID, M.B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle: II. Extracellular release of free radicals. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, p. 1805-1809, 1992b.
- REID, M. B. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 724-731, 2001a.
- REID, M. B.. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 33, n. 3, p. 371-376, 2001b.
- REISER, P. J.; KLINE, W. O; VAGHY, P. L. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation *in vivo*. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 4, p. 1250-1255, 1997.
- ROBERTS, C. K. et al. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. E390–E394, 1999.
- SACHECK J. M.; BLUMBERG J. B. Role of vitamin and oxidative stress in exercise. **Nutrition**, v. 17, p. 809-814, 2001.
- SACHECK, J.M.; MILBURY, P.E.; CANNON, J.G.; ROUBENOFF, R.; BLUMBERG, J.B. Effect of vitamin e and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 1575–1588, 2003.
- SALMINEN, A.; VIHKO, V. Lipid peroxidation in exercise myopathy. **Experimental and Molecular Pathology**., v. 38, p. 380–388, 1983.
- SALTER, M.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S.. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(21)-dependent and Ca(21)-independent nitric oxide synthases. **FEBS Letters**, v. 291, p. 145–149, 1991.
- SCHWANE, J. et al. Delayed-onset muscle soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 15, n.1, p. 51-56, 1983.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V.. Nitric oxide and synaptic function. **Annual Reviews Neurosciences**, v. 17, p. 153-183, 1994.
- SCOTT, B. G. et al. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. **Free Radical Research Communications**, v. 19, p. 241-245, 1993.
- SELMAN, C. et al. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative; the effects of short-term voluntary wheel running. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 401, p. 255-261, 2002.
- SEN, C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 3, p. 368-370, 2001.

SEN, C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, p. 675–686, 1995.

SESSA, W. C. et al. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circulation Research**, v. 74, p. 349-353, 1993.

SILVAGNO, F., XIA, H.; BREDT, D.S. Neuronal nitric oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 11204-11208, 1996.

SILVEIRA, L. R. et al. Formation of hydrogen peroxides and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 5, p. 455-464, 2003.

SLATER, T. F. Free radicals mechanisms in tissue injury. **Journal of Biochemistry**, v. 222, p. 1-15, 1984.

SLUPPHANG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, v. 531, p. 231-251, 2003.

SMITH, L. W.; SMITH, J. D.; CRISWELL, D. S. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 2005-2011, 2002.

STAMLER, J. S. et al. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v. 258, p. 1898-1902, 1992.

STAMLER, J. S. Redox signaling; nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p.931-936, 1994.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiology Reviews**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STANSBIE, D. et al. Effect of exercise on plasma pyruvate kinase and creatine kinase activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 132, p. 127-132, 1983.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

STULL, A.; WEHLING, M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. **American Journal Physiology**, v. 275 (Cell Physiol.) v. 44, p. C260–C266, 1998.

SUZUKI, M.; KATAMINE, S.; TATSUMI, S.. Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. **Journal of Nutrition and Science Vitaminology**, v. 29, p. 141-151, 1983.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 140/141, p. 105-112, 2003.

TAIRA, J. et al. Essential oil phenylpropanoids: useful as $\cdot\text{OH}$ scavengers? **Free Radical Research Communications**, v. 16, p. 197-204, 1992.

TATSUZAWA H. et al. Singlet oxygen ((1) Δ (g) O (2)) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 262, n. 3, p. 647-50, 1999.

THOMPSON, M. et al. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, p. 2415–2420, 1996.

TODA, S.; KUMURA, M.; OHNISHI, M. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. **Planta Medica.**, v. 57, p. 8-10, 1991.

TSUDA, T.; HORIO, F.; KATO, Y.; OSAWA, T. Cyanidin 3-*O*- β -D-glucoside attenuates the hepatic ischemia-reperfusion injury through a decrease in the neutrophil chemoattractant production in rats. **Journal of Nutrition and Science Vitaminology**, v. 48, p. 134-141, 2002.

URSO, M. L; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VIRÁG, L. et al. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicology Letters**, v. 140/141, p. 113-124, 2003.

VITI, A. et al. Effect exercise on plasma interferon levels. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, p. 426-428, 1985.

VIRGILLI, M. et al. Developmental effects of in vivo and in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons. **Brain Research**, v. 839, p. 164-172, 1999.

WANG, M. X. et al. Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 5, n.3, p. 219-232, 2001.

WATANABE, N.; FORMAN, H.J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 411, 145-157, 2003.

WEINECK, J. **Manual do treinamento esportivo**. 2^a ed. São Paulo: Manole, 1989.

WILLIAMS, G. et al. Cytokine induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. **American Journal Physiology.**, v. 267, p. R1020–R1025, 1994.

WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M; HALLIWELL. B.. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O_2 . **Free Radical Biology & Medicine**, v. 2, p. 1119-1122, 1981.

WINTERBOURN C C, VISSERS M C, KETTLE A J. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology**, v.7, n.1, p. 53-58, 2000.

WOLFF, D.J.; LUBESKIE, A.. Aminoguanidine is a isoform-selective, mechanism-base inactivator of nitric-oxide synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 1, p. 291-301, 1995.

YANISHLIEVA, N. V. E MARINO, E. M. Effects of antioxidant stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, p. 377-382, 1995.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-161, 1994.

ZERBA, E.; KOMOROWSKI, T.E.; FAULKNER, J. A.. Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. **American Journal Physiology**, v. 258, p. C429-C435, 1990.

ZHANG, J. et al. In vivo visualization of aging-associated gene transcription: evidence for free radical theory of aging. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 239-247, 2004.

ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 1/2, p. 202-226, 1999.