

Armino Antonio Alves

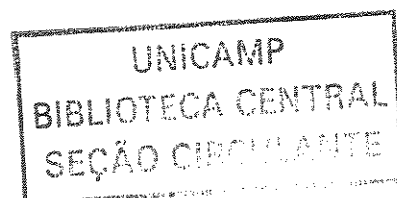
**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO E
TECNOLOGIA PARA SUA QUANTIFICAÇÃO**

Para assinar, preencher a datação final da tese (datação final) candidato (a) <i>Armino Antonio Alves</i>	Assinatura da Comissão Julgadora. <i>Denise Vaz de Macedo</i>
---	--

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

Orientadora – Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo
Departamento de Bioquímica – I. B.
UNICAMP

Campinas, 2002



NIDADE 80
CHAMADA T/UNICAMP
AL 87m
EX
JMBD BDI 51152
ROC 10-837/02
DX
REQO R\$11,00
ATA 01/10/02
CPD

CM00174654-3

IB ID 259907

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

AL87m **Alves, Armindo Antonio**
Marcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e tecnologia para sua quantificação/Armindo Antonio Alves. -- Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia.

1. Exercício físico. 2. Estresse oxidativo. 3. Proteínas carboniladas.
4. Eletrodos amperométricos. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 29 de Julho de 2002

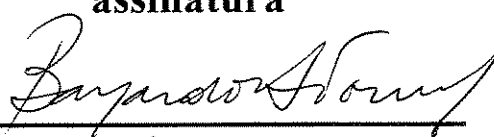
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Denise Vaz de Macedo
(IB – UNICAMP) – Orientadora)



assinatura

Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres
(IQ – USP)



assinatura

Prof. Dra. Iolanda Midea Cuccovia
(IQ – USP)



Assinatura

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota
(IQ – UNICAMP)



assinatura

Prof. Dra. Lucia Pereira da Silva
(IB – UNICAMP)



assinatura

Prof. Dr. José Camilo Novello
(IB – UNICAMP)

assinatura

Prof. Dra. Nilce Correia Meirelles
(IB – UNICAMP)

assinatura

00246302

AGRADECIMENTOS

Agradeço a/aos:

- Dra Denise Vaz de Macedo, pela orientação, por tudo, tudo e muito mais, pela esperança, principalmente.
- Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela orientação no preparo do sensor e principalmente pela compreensão.
- Dra Lucia Pereira da Silva, Dr. Douglas Wagner Franco e Dra. Maria de Fátima Nepomuceno, pela confiança e respeito.
- Dra. Nilce Correia Meirelles e Dra Iolanda Mideia Cuccovia, pelas sugestões que muito contribuíram para este trabalho.
- Minha família: mãe (Deolinda), irmãos (José Alberto, Antonio, Heitor e Nelson), irmã (Conceição) e sobrinho (Lucas), razão e porto seguro de minhas viagens.
- Meus amigos do LABEX: Fernanda, Neuzinha, Soraya, Agnes, Cláudio, Neto, Daniel, Nilceia, Fernando, Lucas, Lígia, Rodrigo, Marcela, Alexandre, Leandro, por me aturarem.
- Meus alunos: Kátia, Daniel, Mariana e Gerson, por sonharem juntamente comigo.
- Meus colegas, Alexandre, Acácio, Carmen.
- Meus amigos do Depto. de Bioquímica do IB-Unicamp, em especial à Dra. Eneida de Paula, Sônia, Marina, Andréia, Carmem e Patrícia.
- A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e àqueles que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

Em especial:

Ao Leo e à Marcela pela parceria,

À FAPESP pelo apoio financeiro,

Ao meu pai, que muito orgulho sentia de mim...

- A construção do SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS, teve a co-orientação do Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota do Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
I. Treinamento, Overtraining e Lesão Muscular	4
Exercício Físico e Espécies Reativas de Oxigênio	6
Peroxidação Lipídica	8
Oxidação Protéica	10
Antioxidantes Musculares	12
Efeitos de EROS sobre a Contração Muscular	14
II. Sensores Eletroquímicos	18
OBJETIVOS	20
MATERIAIS E MÉTODOS	22
Animais	22
Exercício Exaustivo	22
Protocolo de Treinamento	23
Coleta de Amostras	23
Dosagem de Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico	24
Dosagem de proteínas carboniladas no plasma	25
Dosagem de Grupamentos Sulfidrila	26
Dosagem de Atividades Enzimáticas	26
Sensor para medir a atividade da enzima glutathione redutase	28
Análise Estatística	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
I. Efeito dos treinamentos contínuo e intermitente sobre marcadores de ataque oxidativo	31
II. Estudo de biomarcadores de estresse oxidativo em diferentes tempos pós-exercício exaustivo nos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca) e no plasma.	35
III. Sensor amperométrico para determinação da atividade da enzima glutathione redutase em hemolisado de hemácias.	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ABREVIACÕES

BHT – Butil hidroxi-tolueno

CAT – Catalase

CK – Creatina Quinase

DNA – Ácido Desoxi-ribonucleico

DNPH – 2,4, Dinitrofenilhidrazina

DTNB – Ácido 5,5'- Ditio-bis (2-nitrobenzoico)

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetraacético

EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

GPX – Enzima Glutathiona Peroxidase

GR – Enzima Glutathiona Redutase

GS – Grupamentos Sulfidrila

GSH – Glutathiona Reduzida

GSSG – Dímero de Glutathiona Oxidada

HEPES – Ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N-[2-etano sulfônico]

HSP – Proteínas "Heat Shock"

MOPS – Ácido 3-[N-Morfolino] propano sulfônico

NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato (forma oxidada)

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato (forma reduzida)

PC – Proteínas Carboniladas

PMSF – α - Tolueno Sulfonil Flúor

PUFA – Ácidos Graxos Poliinsaturados

SOD – Enzima Superóxido Dismutase

TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tio-Barbitúrico

TCA – Ácido Tricloro Acético

Tris – Tris(hidroximetil aminometano)

RESUMO

O estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, dependendo do nível atingido, é um fator importante tanto nos processos que levam à melhora da performance quanto nos que induzem fadiga ou lesão muscular. O nosso principal objetivo foi responder se as respostas induzidas por diferentes protocolos de treinamento podem ser quantificadas através de marcadores de estresse e desta forma serem aplicadas para o diagnóstico de "overreaching". Para isso, analisamos marcadores sanguíneos e musculares em diferentes situações de exercício físico. Primeiramente mostramos que a concentração de TBARS na urina e a concentração de proteínas carboniladas (PC) e grupamentos sulfidrila no plasma refletem as diferenças na adaptação induzida por dois tipos de treinamento distintos, contínuo e intermitente. Em seguida, mostramos que após um exercício exaustivo a cinética dos biomarcadores de ataque no músculo apresenta um aumento, com pico 3 horas após o exercício, e que se reflete no sangue 6 horas após o estímulo. Esse estresse é acompanhado pela queda na atividade do sistema antioxidante muscular. O pico de concentração de TBARS e PC no músculo coincide com o pico de atividade da creatina quinase no plasma. Mostramos ainda que há uma correlação positiva entre o pico de concentração de TBARS no músculo com o do sangue e de ambas com o pico da CK plasmática, não ocorrendo o mesmo com a de PC. Esses dados indicam que a coleta dos biomarcadores no tempo certo permitem a utilização de amostras de sangue para o acompanhamento do estresse oxidativo induzido pelos diferentes tipos de exercício, de forma que o treinamento induza o aumento desejado da performance, sem no entanto, provocar danos musculares. Outro ponto importante refere-se à metodologia adequada para determinação desses marcadores. Assim, desenvolvemos um sensor amperométrico para a análise da atividade da enzima glutathione redutase para ser utilizado em campo. Este apresentou uma boa linearidade da resposta em função da atividade entre 0-0,40 UI/mL, usando-se 3µL de hemolisado de hemácias, que pode ser obtido a partir de uma gota de sangue

Palavras Chave: sensores amperométricos, estresse oxidativo, exercício exaustivo, glutathione redutase, lesão muscular, proteínas carboniladas, TBARS, treinamento físico.

ABSTRACT

Physical exercise induced oxidative stress is widely documented in literature. However, training is essential to improve the performance leading to an adaptative response, although it can lead also to oxidative damage of cellular structures and ultimately to tissue injury. This points the importance of choosing the best suitable training program. Our aim was to answer if the induced response obtained employing different training protocols could be quantified through the determination of oxidative stress biomarkers and used to overreaching diagnosis. Our approach was to analyse blood and muscle biomarkers in different exercise situations. First we showed that the variation of TBARS concentration in urine and the concentration of plasma carbonyl proteins and sulfhydryl groups reflected the different adaptations induced by two types of training protocols: continuous and intermittent training. Then we showed that after an exhaustive exercise the biomarkers of oxidative attack reached maximum values at 3 hours after the exercise, resulting in the blood maximum values 6 hours after the stimulus. This stress was followed by the decrease of the muscular enzymatic antioxidant system. The muscle TBARS and carbonyl proteins peak coincided with the peak concentration of plasma activity of creatine kinase. There was a positive correlation when we compare the concentration of TBARS in both muscle and blood, and both with plasma creatine kinase activity. There was no such correlation with the carbonyl protein concentrations. Our data indicated that the correct time of sampling is an important factor to allow the use of blood samples to follow the different exercise-induced stress in order to prevent overreaching. Another important point is how to develop a suitable method for determination of these biomarkers. So, we built an amperometric sensor for the glutathione reductase activity to be used in the ground. This sensor has the accuracy for 0-0.4 IU/mL using 3 μ L of erythrocyte haemolysate, obtained from a blood drop.

INTRODUÇÃO

Uma das características mais notáveis das células musculares é sua capacidade de adaptação a diferentes demandas funcionais. Essas adaptações são específicas do treinamento.

O treinamento físico consiste no aumento da intensidade e volume de esforço, com o objetivo de aumentar a capacidade de rendimento, que deve, no momento certo estar no pico. Assim, o processo de treinamento se divide em períodos chamados ciclos. A quantidade de ciclos durante um ano competitivo pode variar de acordo com a modalidade praticada ou o número de competições em que se deseja participar (Weineck, 1989). Basicamente, os ciclos podem ter uma predominância de atividades aeróbias, de maior duração, realizadas em intensidades de sub-máximas a máximas (treinamento contínuo ou de *endurance*) ou conter atividades de menor duração, realizadas em intensidades supra-máximas, com predomínio, portanto, do metabolismo anaeróbio como gerador de ATP (treinamento intermitente ou de resistência, de alta intensidade). Neste tipo de treinamento os exercícios são sempre intercalados por pausas curtas, quando predomina o metabolismo aeróbio, importante para facilitar o re-amarzenamento, principalmente de fosfocreatina nas células musculares.

O treinamento de resistência resulta em aumentos na massa muscular e força, além de hipertrofia de fibras (McDonagh e Davies, 1987; Tesch, 1987) enquanto o treinamento de *endurance* resulta em aumentos na densidade mitocondrial, capilarização e captação máxima de O₂, além de alterar enzimas-chave do metabolismo (Holloszy e Booth, 1976; Sjodin *et al*., 1990). Embora as adaptações bioquímicas e fisiológicas induzidas por diferentes tipos de exercícios estejam bem caracterizadas, os mecanismos moleculares que permitem essas adaptações específicas ainda estão em fase de discussão e pobremente definidos (Nader e Esser, 2001).

Uma das formas possíveis dessas alterações nos ambientes externo e interno, serem convertidas em resposta apropriada dentro das células, seria através da ativação de moléculas sinalizadoras, que regulariam alvos específicos envolvidos na resposta molecular (Hunter, 1997). Nesse sentido, já foram caracterizadas várias vias sinalizadoras, algumas delas atuando na regulação da expressão gênica ao

nível de transcrição (Hunter, 1997; Jeffries *et al*, 1997) e tradução de RNAm (Jeffries e Thomas, 1996). Em um trabalho bastante interessante mostrou-se que diferentes protocolos de exercício resultaram na ativação seletiva de vias sinalizadoras intracelulares específicas, o que poderia determinar a adaptação diferenciada induzida por cada forma de exercício (Nader e Esser, 2001).

Uma outra via de sinalização muito discutida na literatura é a alteração no estado redox intracelular, induzido pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que acompanha o aumento da atividade contrátil muscular. Essas moléculas, por sua vez podem atuar como oxidantes potentes (Jenkins, 1988). Fisiologicamente, todas as células aeróbicas geram EROS diariamente, mas as abundantes defesas antioxidantes dos organismos previnem um dano oxidativo mais amplo. Na década de 90, espécies oxidantes como radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$) e hidroperóxidos lipídicos (intermediários da cadeia de peroxidação lipídica) começaram a ser relacionadas com a indução de vários processos biológicos, tais como, crescimento celular, adesão das células, apoptose e ativação do vírus HIV (Iuliano *et al*, 1992; Suzuki *et al*, 1997). Evidências experimentais sugerem que esta ação seja ao nível de transdução de sinal, através da interação com receptores, levando à proposição de que as EROS também poderiam exercer funções de segundo mensageiro celular (Iuliano *et al*, 1992). Mostrou-se que a exposição de células de músculo esquelético a EROS aumentou as velocidades dos transportes de glicose (Balon e Nadler, 1994) e iônico, incluindo a troca Na^+/Ca^{2+} (Goldhaber, 1996) e de potássio (Sen, 1995) pelo sarcolema.

Por outro lado, apesar do sistema antioxidante reduzir os riscos de lesões oxidativas pelas EROS, os organismos podem se deparar com situações onde este nível de proteção seja insuficiente. Quando isso acontece, aumentam os níveis de **estresse oxidativo**, considerado como uma situação de desequilíbrio entre os sistemas que estimulam a geração de EROS e os sistemas protetores (Sen, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1998), permitindo um maior ataque oxidativo ao organismo. Níveis elevados de estresse oxidativo estão associados a diversas patologias tais como aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas, danos causados por reperfusão, etc (Gutteridge, 1993; Knight, 1995) e também com o exercício físico

(Davies *et ali*, 1982; Jenkins,1988; Essig e Nosek, 1997). Como se pode observar, este efeito dual exercido pelas EROS parece ser dependente de sua concentração nos tecidos, que por sua vez parece ser dependente da atividade do sistema de defesa antioxidante e da intensidade e duração do exercício físico (Ji e Fu, 1992; Alessio, 1993; Sen, 1995, Ji, 2002).

Esse assunto é objeto de estudo em nosso laboratório, principalmente, em relação aos aspectos da quantificação dos níveis de estresse oxidativo e dano muscular induzido pelo exercício, em ratos e atletas submetidos a diferentes tipos de exercício.

TREINAMENTO, "OVERTRAINING" E LESÃO MUSCULAR.

Do ponto de vista bioquímico e fisiológico o processo de treinamento é uma somatória de estímulos, que resultam na quebra da homeostase intracelular. Uma das consequências da quebra da homeostase pelo exercício é uma maior mobilização de macrófagos e neutrófilos circulantes, indicativo de um processo inflamatório, importante para a remoção do tecido danificado e reparo (Tiidus, 1998). Ou seja, conforme mostrado na Figura 1, o estresse induzido pelo exercício é responsável pelo distúrbio agudo de células e órgãos, relacionado à fadiga (I), que ativa a fase de recuperação (II). Esta fase é responsável pelo desencadeamento do processo adaptativo, restabelecendo uma nova homeostase celular, com níveis de atividade enzimática e de substratos metabólicos mais elevados (III), quando comparado aos detectados anteriormente. Isto propicia melhor suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, então, uma economia de energia em atividades físicas que já eram habituais na estrutura de treinamento. Se um mesmo estímulo for imposto novamente após a ocorrência da adaptação, os mecanismos homeostáticos não serão rompidos na mesma extensão (Fry *et ali*, 1992). Por outro lado, se não for aplicado novo estímulo ocorre uma involução da adaptação obtida (IV).

É importante ressaltar que os processos regenerativos resultam numa supercompensação, conforme mostrado na Figura 1.

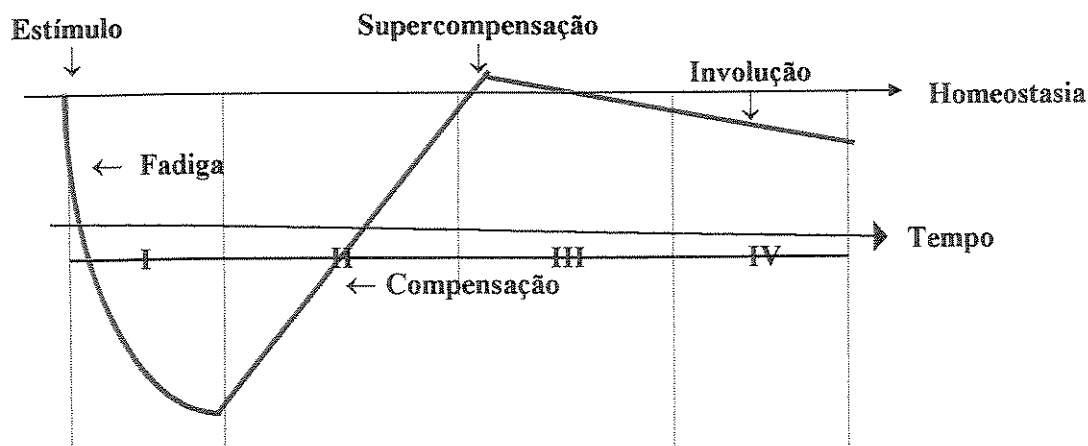


Figura 1. O processo de supercompensação metabólica. Adaptado de Bompa (1990).

A adaptação positiva é resultado de uma alternância corretamente programada entre indução de estresse e regeneração (Bompa, 1990). Portanto, os fatores que delimitarão a ocorrência da supercompensação serão a otimização dos intervalos de recuperação/repouso entre sucessivas sessões de treinamento e a regulação da carga de treinamento em cada atividade programada. O objetivo em selecionar os intervalos e cargas de treinamento de modo otimizado é assegurar que uma subsequente sessão de treinamento coincida com a fase de supercompensação (Zatsiorsky, 1985).

Quando a recuperação é incompleta, observa-se fadiga prematura; neste caso, estamos falando de supertreinamento ou "overtraining", que tem como consequência final a diminuição do rendimento, até o desencadeamento de distúrbios mais graves ou lesões, de difícil recuperação ou muitas vezes até irrecuperáveis (Urhausen e Kindermann, 2002). Entretanto, "overtraining" é um termo geral, que não diferencia entre seus estágios. O primeiro estágio do "overtraining", também conhecido como "overreaching" se instala quando o repouso entre o próximo treinamento ou competição é insuficiente (Bruin *et ali*, 1994, Tiidus, 1998; Lehmann *et ali*, 1998). Embora esta condição induza fadiga prematura, pois a recuperação é incompleta, pode ser facilmente revertida, com um ou dois dias de pouco ou nenhum treino, sugerindo ser induzida por um estresse principalmente metabólico. Porém, se o desbalanço entre treinamento e recuperação durar um período mais longo de tempo, pode instalar-se essa condição referida como "síndrome do overtraining". Os sinais associados a esta síndrome são alta fadigabilidade, além de alterações endócrinas e comportamentais. Esta síndrome não é facilmente revertida, podendo levar várias semanas ou meses para ocorrer a recuperação (Kuipers e Keizer, 1998). Entretanto, o limiar entre um treinamento ideal e o "overtraining" é muito tênue.

Como pouco é conhecido em relação à quantidade ótima de treinamento e dos fatores que influenciam a recuperação e supercompensação, ainda hoje existe um componente muito grande de empirismo na aplicação dos métodos de treinamento, que são na sua grande maioria empregados sem muita base científica. Desta forma, os atletas normalmente são submetidos a cargas de esforço muito altas, para não se pecar pela falta, sendo impossível prever se a carga de esforço exigido da equipe

está excedendo o limite individual de estresse que o organismo pode suportar. O maior problema é que não existem ainda descritos na literatura marcadores completamente confiáveis, nem de adaptação, nem de "overreaching" ou "overtraining" que ajudem a diagnosticar esse limite individual de estresse.

Por sua vez, a maior utilização das fibras musculares durante o exercício físico também as torna mais suscetíveis a lesões. De fato, já foi bem documentado que atividades exercidas acima da intensidade habitual de esforço aumentam os níveis de lesão muscular em várias espécies animais (Clarkson e Tremblay, 1988). Vários autores já relataram a ocorrência de tais lesões após esforço intenso diretamente, através de alterações histológicas no sarcômero ou indiretamente, pela quantificação no plasma de proteínas musculares específicas, como mioglobina, a enzima lactato desidrogenase e principalmente a enzima creatina quinase (Jacobs *et al*, 1987; Apple *et al*, 1988; Volfinger *et al*, 1994).

Em revisão feita por Pyne (1994) o autor aponta duas hipóteses para explicar a lesão muscular induzida pelo exercício físico. A primeira argumenta que o extravasamento de proteínas musculares para o plasma se deve principalmente ao estresse mecânico, provocado pelo processo de contração muscular. Assim, o ciclo contração-relaxamento executado pelas miofibrilas, ocasionando contínuo alongamento e encurtamento dos sarcômeros seria suficiente para alterar a estrutura da membrana celular. A outra hipótese propõe que esta perda de integridade se deve principalmente a um estresse metabólico, consequência de um ataque de espécies reativas de oxigênio ao sarcolema, ocasionando um processo de lesão oxidativa na membrana (Pyne, 1994; Frankiewicz-Jozko *et al*, 1996).

EXERCÍCIO FÍSICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

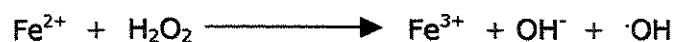
As mitocôndrias dos músculos esqueléticos geram continuamente uma cascata de moléculas difusíveis de baixo peso molecular que derivam do O₂ molecular, conhecidas como espécies reativas de O₂ (EROS). As EROS são resultado de reduções incompletas do O₂ molecular e incluem um amplo espectro de espécies radicalares, como o radical ânion superóxido (O₂⁻) e radical hidroxila (·OH) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

O caminho para a formação de EROS começa geralmente com a redução monoelétrica do O_2 , com formação do $O_2^{\cdot-}$. Durante o exercício físico há um aumento em torno de 10 vezes no volume de oxigênio total consumido (VO_2) e de 100 vezes nas fibras musculares ativas (Astrand e Rodahl, 1986; Sjödin *et al*, 1990). Desta forma, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser formado nos músculos esqueléticos de várias maneiras (Sjodin *et al*, 1990; Bejma e Ji, 1999; Reid, 2001):

- Na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, devido ao vazamento de elétrons, principalmente pelo complexo I e Coenzima Q;
- Por enzimas como xantina oxidase, que estão ativas quando há perda da homeostase do Ca^{2+} ;
- Pelas enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 oxidase;
- Pela auto-oxidação de catecolaminas;
- Através da ativação de neutrófilos e macrófagos, que promovem a inflamação pós-exercício, importante para a remoção do tecido danificado e reparo.

O músculo esquelético também produz óxido nítrico ($\cdot NO$) a partir do aminoácido arginina, pela reação da enzima óxido nítrico sintase (Tews *et al*, 1997). O óxido nítrico pode reagir com $O_2^{\cdot-}$, formando peroxinitrito, um intermediário instável, com reatividade similar ao radical hidroxila ($\cdot OH$). Foi proposto mais recentemente que além das EROS, o $\cdot NO$ também poderia ter um papel importante nos músculos esqueléticos, e que músculos submetidos a contrações repetitivas poderiam produzir quantidade suficiente de $\cdot NO$ para influenciar o balanço oxidante/antioxidante (Reid, 1998).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ser dismutado enzimaticamente ou não, levando à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , como agente oxidante é considerado fraco, mas na presença de íons de metais de transição pode sofrer quebra na ligação O-O, produzindo o radical hidroxila ($\cdot OH$), uma das espécies mais reativas entre as que podem ser encontradas nos meios biológicos. Esta reação denomina-se reação de Fenton:



Todos os derivados parcialmente reduzidos de O_2 retém, em menor ou maior grau atividade redox e podem influenciar processos intracelulares sensíveis a esse

estado. Como os radicais livres são inespecíficos, sua reatividade é inversamente proporcional à sua meia vida. Desta forma, há espécies radicalares de tempo de vida muito curto, como o $O_2^{\cdot -}$ e o $\cdot OH$ e de tempo de vida muito longo como a molécula de oxigênio (O_2) e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . Por esse motivo, os radicais livres não escolhem seus alvos, podendo atacar lipídios, proteínas, ácidos nucleicos ou qualquer outra molécula dos meios biológicos, para se estabilizar.

Peroxidação Lipídica

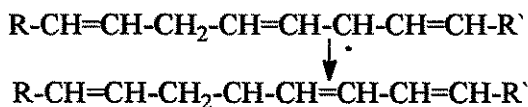
Peroxidação lipídica é um processo degenerativo das membranas biológicas mediada pelo ataque de EROS às pontes metilênicas entre as duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Esse ataque oxidativo desencadeia uma série de reações em cascata. Suas consequências são alterações na composição dos fosfolipídios, diminuindo a fluidez da membrana. Como esta fluidez está intimamente relacionada com a maioria de suas funções, tais como: permeabilidade seletiva, atividade de enzimas, transporte de íons, utilização de receptores (Halliwell e Gutteridge, 1998), esses processos serão comprometidos.

O par redox PUFA/PUFA tem um potencial de óxido-redução de 0,6 V em pH 7,0. Desta forma, para poder ser oxidado, o par redox radical livre/radical reduzido deve ter potencial ainda maior. Entre os possíveis iniciadores da peroxidação lipídica estão $\cdot OH$, $HO_2^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $RO_2^{\cdot}$ e íons de ferro, provavelmente em estados de valência mistos, complexados com O_2 (Kornbrust e Mavis, 1980; Aust *et al*, 1982).

O início do processo ocorre pelo ataque radicalar ao lipídio, que se transforma num radical centrado no carbono:



O radical lipídico, sofre um rearranjo, formando um dieno conjugado.



Este pode, por sua vez, reagir com uma outra molécula de oxigênio, formando um radical centrado no oxigênio, o radical hidroperoxil ($LOO^{\cdot}$):



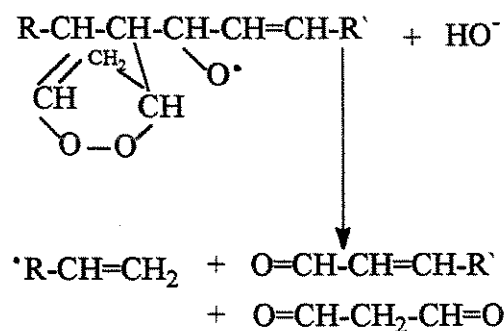
O radical hidroperoxil pode reagir com outro lipídio da membrana, formando um hidroperóxido lipídico (LOOH) e um outro radical lipídico ($L^{\cdot}$), propagando assim o processo:



O carbono oxidado pode pertencer ao mesmo lipídio, formando-se um endoperoxido lipídico

Os hidroperóxidos lipídicos podem ser oxidados ou reduzidos por metais de transição (Fe ou Cu), podendo originar radicais hidroperoxil ($LOO^{\cdot}$) ou alcóxil ($LO^{\cdot}$):

Os radicais alcóxil sofrem clivagem da ligação do carbono α , produzindo aldeídos de ácidos graxos e radicais alquila:



Os produtos finais da peroxidação lipídica são aldeídos de baixo peso molecular (malondialdeído e β -hidroxinonenal) e alcanos (etano e n-pentano). Esses aldeídos são bastante reativos e podem se conjugar com resíduos de aminoácidos pertencentes a proteínas, outros lipídios, carboidratos e bases nitrogenadas podendo causar a formação de pontes cruzadas entre essas moléculas (Esterbauer,

et ali, 1991). Aldeídos de baixo peso molecular também reagem com ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexos coloridos que podem ser quantificados. Estes complexos, formados por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) são amplamente usados como biomarcadores de peroxidação lipídica em sistemas biológicos (tecidos e sangue), podendo ser medidos por espectrofotometria ou por fluorescência (Yagi, 1976; Ohkawa *et ali.*, 1979, Yagi, 1987).

Oxidação Protéica

O ataque radicalar às proteínas resulta na modificação dos resíduos de aminoácidos, principalmente pela adição de grupamentos carbonila e hidroxila, que também podem ser quantificados. Estas modificações levam à formação de produtos inertes (não radicalares) irreparáveis, que podem ser removidos somente pelo catabolismo protéico (Garrison, 1987). Seus efeitos incluem fragmentação, formação de ligações cruzadas, modificações nas estruturas terciárias e quaternárias, ocasionando alterações ou até perda de atividade e função das proteínas (Garrison, 1987; Stadman, 1992, 1993; Dean *et ali*, 1997; Stadtman e Levine, 2000).

O ataque oxidativo a proteínas induz nelas uma cadeia de reações radicalares, como a peroxidação lipídica, porém caracterizada por ser mais curta e com menor consumo de O₂ (Neuzil *et ali*, 1993). Podem ser produzidos intermediários reativos, capazes de atacarem estruturas próximas ou mais distantes (Dean *et ali*, 1993). É bastante sitio específica, conforme descrito abaixo.

Os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina são alvo preferencial do radical hidroxila, resultando na adição de grupamentos -OH ao anel aromático (Garrison, 1987, von Sonntag, 1987). O ataque à fenilalanina resulta na produção de orto, para e meta tirosinas. Além disso, pode ocorrer dimerização e oxidação da cadeia lateral (Garrison, 1987). Na tirosina, o ataque do radical hidroxila resulta na formação de radicais fenoxil, que levam a vários produtos, como dímeros com ligações cruzadas C-C e C-O. Ocorre ainda a formação de produtos hidroxilados, por adição do próprio radical hidroxila, como por exemplo, o DOPA (3,4 - Di-hidroxifenil alanina) (Giese *et ali*, 1993). A formação preferencial deste último derivado se deve ao efeito direto orto/para do substituinte -OH quando adicionado a um anel

aromático, visto que a posição pára está protegida por uma ligação com o carbono seguinte.

O aminoácido triptofano pode ser hidroxilado no anel pirrólico ou no anel de benzeno. O principal produto de degradação em solução oxigenada é a fenilcinurenina (modificação no anel pirrólico), além de pequenas quantidades de produtos de ataque ao anel aromático como o 7-hidroxi-triptofano (Maskos *et ali*, 1992). O radical hidroxila pode ainda se adicionar ao anel imidazólico da histidina, preferencialmente aos carbonos 2 e 5, cujos produtos ainda não são totalmente conhecidos. Destaque para a 2-oxo-histidina (Uchida e Kawakishi, 1993) e o aspartato (Dean *et ali*, 1989).

A reação entre o radical hidroxila e a cisteína é extremamente rápida e ocorre preferencialmente no grupamento -SH, por abstração de hidrogênio, formando radical tiil ($RS\cdot$) (von Sonntag, 1990). Esses radicais, na presença de O_2 reagem rapidamente, formando tio-peróxidos ($RSOO\cdot$). Esta reação pode ser reversível. Os peróxidos podem atacar outro grupo tiol, formando tio-hidroperóxidos ($RSOOH$) e radical tiil ($RS\cdot$). Entre os produtos finais do ataque a cisteína estão RSO_2H e RSO_3H (Prudie, 1967, Davies *et ali*, 1999).

A metionina também sofre ataque ao enxofre de seu grupo tio-éter (Asmus, 1979). Seus produtos finais incluem metionina sulfoxido ($RS(O)CH_3$) e metionina sulfona ($RS(O)_2CH_3$) (Amus, 1979). Os aminoácidos alifáticos podem ser oxidados a hidroperóxidos. Vários foram detectados como tal, ou reduzidos a hidróxidos mais estáveis. Detectaram-se as estruturas de três hidróxidos de valina diferentes e cinco produtos de oxidação de leucina (3 hidróxidos) (Fu *et ali*, 1995, Fu e Dean, 1997). O mecanismo de formação dos hidroperóxidos é semelhante ao de formação dos hidroperóxidos lipídicos. Estudos demonstram que em aminoácidos livres, os hidroperóxidos são formados preferencialmente nos carbonos das cadeias laterais (Simpson *et ali*, 1992, Gebicki e Gebicki, 1993).

Como relatado acima, uma variedade de produtos pode ser obtida após o ataque oxidativo a proteínas, tais como, hidroxilação de aminoácidos aromáticos, oxidação de aminoácidos que possuem enxofre (cisteína), peroxidação de aminoácidos alifáticos, formação de grupos carbonila. Todos esses processos estão associados à perda ou alteração nas funções das proteínas (Stadman e Levine,

2000). Entretanto, a despeito da importância do assunto, são poucos os trabalhos na literatura que utilizam como marcadores de estresse oxidativo produtos de proteínas modificadas.

ANTIOXIDANTES MUSCULARES

A atividade biológica das EROS na musculatura é limitada por uma série de antioxidantes endógenos e proteínas relacionadas ao estresse (Smolka *et ali*, 2000, Reid e Durham, 2002). Embora o aumento na expressão de proteínas de estresse induzido pelo exercício físico também seja objeto de estudo em nosso laboratório, não vai ser tratado nessa tese.

Três enzimas, específicas para EROS degradam seletivamente espécies moleculares individuais, acelerando reações de conversão que ocorrem espontaneamente (Reid, 2001). A enzima **superóxido dismutase** (SOD) catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A SOD citosólica contém um átomo de cobre e outro de zinco (CuZnSOD) no seu sítio ativo enquanto a isoforma mitocondrial é dependente de manganês. Por sua vez, o H_2O_2 é reduzido enzimaticamente a H_2O e O_2 molecular pela enzima **catalase** (CAT). A outra enzima, **glutathione peroxidase** (GPX) tem menos especificidade para o substrato, reduzindo tanto H_2O_2 quanto outros hidroperóxidos a álcool. Além disso, os K_M para peróxidos da CAT e da GPX também são diferentes. Enquanto a GPX atinge sua V_{MAX} em baixas concentrações de H_2O_2 , a CAT só atinge sua velocidade máxima de catálise em altas concentrações de peróxido de hidrogênio (Powers *et ali*, 1999). Nas duas reações catalisadas pela GPX a glutathione reduzida (GSH) funciona como doador de elétrons. A glutathione oxidada (GSSG) formada nesta reação é reduzida enzimaticamente a GSH pela ação da enzima glutathione redutase (GR). Todas essas quatro enzimas são expressas constitutivamente pelos músculos. Entretanto, sua distribuição tende a variar de acordo com as propriedades metabólicas das fibras musculares, exibindo atividades maiores em fibras do tipo I, oxidativas (Powers *et ali*, 1999).

Antioxidantes não enzimáticos também conferem proteção contra EROS. A GSH inativa uma variedade de espécies oxidantes diretamente, além de tamponar peróxidos pela reação catalisada pela GPX, sendo um dos mais importantes

antioxidantes celulares. Nos músculos esqueléticos de rato, sua concentração também varia, conforme o tipo de fibra presente. Em fibras tipo I (oxidativas), como no músculo sóleo é de $\sim 3\text{mM}$, ao passo que nas fibras tipo II (glicolíticas), como no músculo vasto lateral, sua concentração é cerca de seis vezes menor (Powers *et al*, 1999). A razão GSH/GSSG na maioria das células é de 10/1 (Halliwell e Gutteridge, 1998). Além da GSH as células musculares possuem outros antioxidantes importantes tais como vitamina E, incluindo uma família de antioxidantes lipossolúveis que incluem o α -tocoferol. Por serem hidrofóbicas, sua função é proteger as membranas contra oxidação. Ao contrário, a vitamina C (ácido ascórbico) distribui-se na fase aquosa, seqüestrando EROS diretamente, além de facilitar o ciclo redox da vitamina E.

A Figura 2 resume as principais fontes de EROS durante o exercício e a ação das enzimas do sistema de defesa antioxidante.

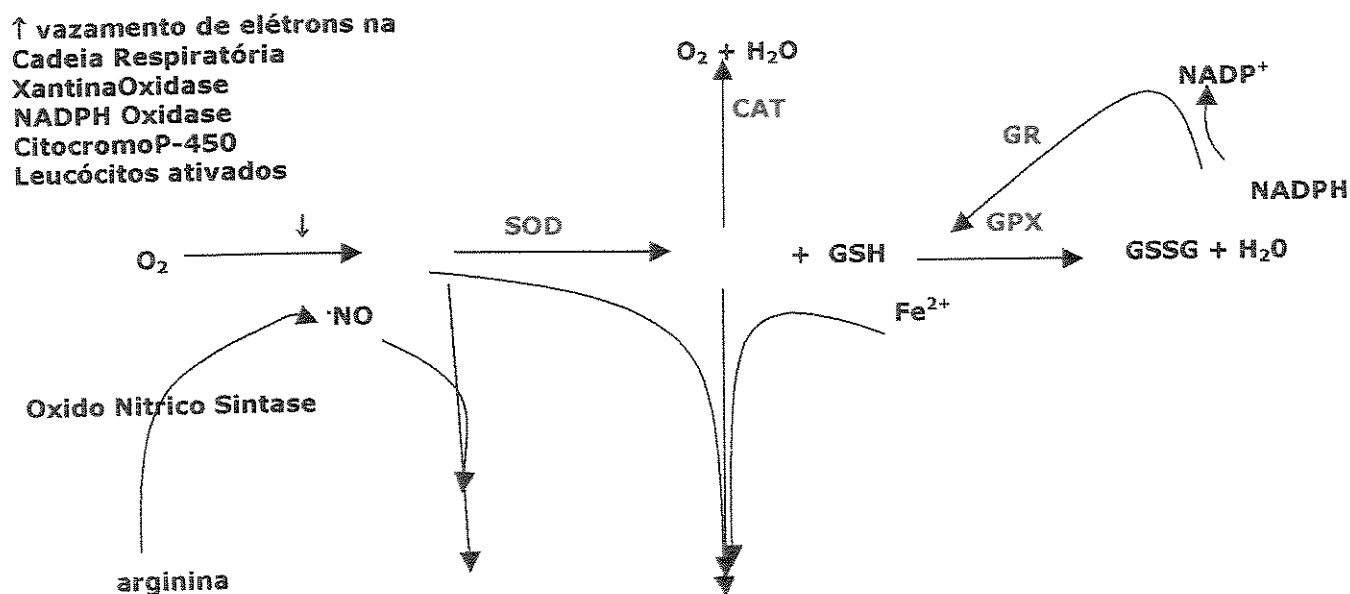


Figura 2. Vias de formação de EROS e mecanismo enzimático de defesa antioxidante. $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Radical ânion superóxido); $\text{OH}^{\bullet}$ (radical hidroxila); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); $\text{NO}^{\bullet}$ (óxido nítrico); $\text{ONOO}^{\bullet -}$ (ânion peroxinitrito).

EFEITOS DE EROS SOBRE A CONTRAÇÃO MUSCULAR

Foi proposto que as EROS exercem um efeito bifásico sobre as funções contráteis de músculos esqueléticos não fadigados (Reid, 2001). Mostrou-se que baixos níveis de EROS, presentes em condições basais eram essenciais para a produção de força, pois a depleção seletiva de EROS pela adição de SOD ou CAT diminuía a força. Contrariamente, um aumento modesto na produção de EROS aumentava a força. Este efeito positivo, entretanto foi revertido em altas concentrações de EROS, sendo que a produção de força caiu de uma maneira tempo e dose-dependente. Esses efeitos negativos foram inibidos pelo pré-tratamento do músculo com antioxidantes ou foram revertidos pela administração de agentes redutores (Andrade *et ali*, 1998; Reid *et ali*, 1993).

Davies *et ali*, em 1982, foram os primeiros a mostrar diretamente, através de um aumento significativo no sinal de EPR em homogenatos de músculo de ratos, aumento na produção de EROS induzida por um exercício exaustivo. Desde então, acumulou-se um grande número de evidências experimentais, sugerindo haver correlação entre estresse oxidativo e fadiga ou injúria muscular induzida pelo exercício (Alessio, 1993, Bruin *et ali*, 1994, Essig e Nosek, 1997, Alessio *et ali*, 2000). Vários trabalhos mostraram esse aumento na produção de EROS indiretamente, através do aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas (Alessio, 1993), de carbonilação de proteínas (Smolka *et ali*, 2000) e até danos ao DNA intracelular (Jenkins, 1988). Além do exercício, outros fatores também afetam a atividade de EROS nos músculos. O envelhecimento parece aumentar a carga de exposição a oxidantes. Dano muscular, decorrente de reperfusão ou distensão também resultam em estresse oxidativo ligado a perda de função. Finalmente os músculos também aumentam os níveis de estresse oxidativo em processos patológicos inflamatórios (Reid, 2001).

A ação de EROS sobre o sistema enzimático antioxidante também parece ter relação direta com o nível de produção de EROS (Alessio, 1993; Ji, 2002). Desta forma, os vários trabalhos da literatura sobre esse assunto apontam, a partir de uma observação consistente que indivíduos ou animais submetidos a um protocolo de treinamento possuem níveis mais elevados de enzimas antioxidantes e de certos

oxidantes não enzimáticos no músculo, demonstrando uma maior força muscular e uma resistência maior ao estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (Sen, 1995; Radak *et al*, 1999; Ji, 2002), até um efeito inibitório na atividade dessas enzimas numa situação de exercício exaustivo (Ji e Fu, 1992; Smolka *et al*, 2000). Além dos efeitos do exercício aumentando os níveis de oxidantes musculares, também foi mostrado o mesmo tipo de modulação nas enzimas antioxidantes das hemácias. Os motivos pelos quais tais alterações ocorrem, principalmente nos eritrócitos, ainda não são totalmente conhecidos. Eritrócitos são células anucleadas e, portanto não possuem o material genético necessário para que ocorra síntese protéica. A sugestão é que alterações em curto prazo na atividade destas enzimas induzidas por atividades agudas se dão através de interações diretas com a estrutura protéica da enzima (Tauler *et al*, 1999). Kosenko *et al* (1997) propuseram que o H_2O_2 possui efeito estimulatório na SOD, enquanto o radical ânion superóxido parece ter efeito estimulante sobre a enzima CAT. O mecanismo molecular deste efeito na atividade da CAT, embora não tenha sido estudado em detalhes, parece estar na redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , presente no grupamento heme de sua molécula, deixando-a mais ativa quando reduzida (Hawkins *et al*, 1993).

Todas essas observações com o músculo não fatigado e fatigado levaram à proposição do modelo homeostático, mostrado na Figura 3. Este modelo assume que o estado redox citosólico é uma variável regulada fisiologicamente, sendo balanceado pela produção de oxidantes e capacidade de tamponamento antioxidante. Esse modelo prediz que existe um estado redox intracelular que é ótimo para a geração de força. Qualquer desvio desse ótimo seria prejudicial. Como essas relações são aplicáveis para outras variáveis reguladas homeostaticamente, tais como pH, temperatura ou osmolaridade, aparentemente são consistentes com o que já sabemos sobre os efeitos de EROS sobre a contração muscular.

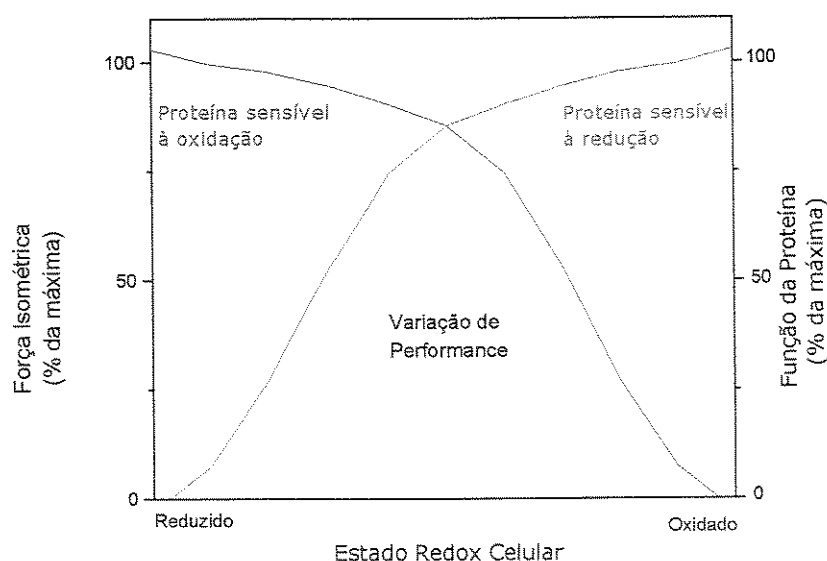


Figura 3 – Modelo de mecanismo de dois componentes redox que limitam a força isométrica. As linhas representam a alteração funcional de duas proteínas hipotéticas reguladoras da contração muscular. Uma é limitada pela oxidação e outra pela redução. O modelo assume que ambas são essenciais para o desenvolvimento da força, embora tenham efeito independente. As curvas estado redox/função definem o limite máximo de desenvolvimento da força ao longo da variação do estado redox. (Adaptado de Reid,2001).

O efeito do exercício sobre a integridade celular, no entanto, ainda não está totalmente definido na literatura, pois não está estabelecido se a peroxidação lipídica é causa ou consequência do dano tissular (Alessio *et ali*, 2000). A maioria dos trabalhos mostra injúria muscular após vários tipos de protocolos de exercício, através de um aumento na atividade da enzima creatina quinase (CK) plasmática. A controvérsia está em que alguns autores observam associação entre aumento de CK e níveis aumentados de peroxidação lipídica (Davies *et ali*, 1982; Kanter *et ali*, 1986; Maughan *et ali*, 1989) enquanto outros não observam essa mesma correlação (Viinika *et ali*, 1984; Sahlin *et ali*, 1991; Saxton *et ali*, 1994; Ortenblad *et ali*, 1997). Nossa hipótese é que normalmente a quantificação de marcadores de dano oxidativo é feita em um único tempo pós-exercício, o que poderia explicar a falta de correlação com o dano muscular observado por alguns autores na literatura. Nesse sentido, já foi mostrado em humanos que produtos de peroxidação lipídica exibem um pico de concentração máxima no plasma 6 horas após uma corrida de 45 min na

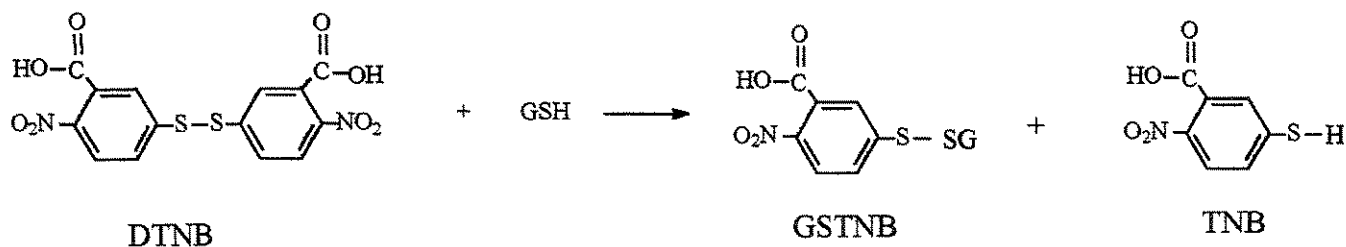
descida (Maughan *et ali*, 1989). Esses autores mostraram também que indivíduos com os níveis de TBARS mais elevados apresentavam também níveis altos de CK plasmática.

II. SENSOR ELETROQUÍMICO

A investigação e o controle dos processos metabólicos que levam à fadiga exigem cada vez mais técnicas que ofereçam especificidade, sensibilidade, respostas rápidas e que possam ser usados em campo. Os sensores eletroquímicos parecem responder a esta demanda, porque permitem a miniaturização e por isso a utilização de pequenas quantidades de amostra. Destaque ainda para a possibilidade de se produzir dispositivos descartáveis descartáveis a custo baixo, diminuindo a possibilidade de contaminação (Bakker e Telting-Diaz, 2002). Os sensores eletroquímicos têm se mostrado úteis em determinações analíticas em meios biológicos com larga aplicação em análises clínicas. Desta forma, têm sido utilizados na análise de glicose, uréia, colesterol, oxalato, creatinina, lisina, lactato e cisteína em amostras de sangue, tecidos e urina (Neto e Yamanaka, 1988, Fatibello-Filho e Capelato, 1992; Rover-Junior, 2001a).

A reação catalisada pela enzima glutathiona redutase é a redução do dímero de glutathiona oxidada (GSSG) a duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH), com conseqüente oxidação de NADPH. Em pH fisiológico os pares-redox $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e $\text{GSSG}/2\text{GSH}$ possuem $E^0 = -0,320 \text{ V}$ e $E^0 = -0,230 \text{ V}$ (Loach, 1976), respectivamente, permitindo que sua reação seja acompanhada através do monitoramento da corrente. O acoplamento de uma outra reação de oxido redução envolvendo a oxidação da GSH e a redução do DTNB, pode reforçar a corrente ou ainda, como esta reação consome o produto da reação catalisada pela enzima, favorecendo a sua ocorrência.

A literatura apresenta alguns métodos para dosagem da enzima glutathiona redutase, entre eles aqueles que acompanham a queda na absorbância do NADPH a 340 nm (Carlberg e Mannervick, 1985), a queda na fluorescência do NADPH a 340 nm de excitação e 464 nm de emissão (Austin, 1988) e o que usa DTNB como oxidante da GSH (Smith *et al*, 1988), conforme mostrado abaixo:



A concentração do TNB formado é monitorada espectrofotometricamente a 412 nm e a velocidade de seu aumento é relacionada com a atividade da enzima.

Para análise da concentração de GSH por métodos eletroquímicos existem métodos potenciométricos (Companhone *et ali*, 1994) e voltamétricos (Nalini e Narayanan, 1988; Wring *et ali*, 1989; Kulys e Drungiliene, 1991), sendo esses últimos bastante sensíveis, embora não sejam adequados quando se necessita de resultados rápidos e confiáveis. Recentemente foi proposto um biossensor amperométrico contendo a enzima glutathione peroxidase imobilizada em uma matriz de carbodiimida para a análise da concentração plasmática da GSH (Rover Jr *et ali*, 2001,b). Isto permitiu uma análise rápida e confiável, porque não exige métodos prévios de extração e/ou de concentração da amostra.

O acompanhamento da concentração desta substância é importante para o monitoramento do treinamento físico porque a GSH é uma das principais moléculas que fazem parte dos sistemas antioxidantes tanto no músculo quanto no plasma. Como já discutimos antes, durante o exercício físico a maior parte da GSH é fornecida pela atividade da enzima glutathione reductase, que reduz o dímero GSSG produzido durante a reação catalisada pela GPX. Nossa opção nesse trabalho pelo monitoramento da atividade da enzima glutathione reductase deve-se ao fato de sua atividade refletir a capacidade do organismo em obter rapidamente GSH e, portanto mostrar as variações da defesa antioxidante. Além disso, nossos dados mostraram que esta enzima é sensível à modulação por diferentes tipos de exercício (Smolka *et ali*, 2000).

OBJETIVOS

O grupo de pesquisadores do Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), do qual faço parte, tem como principal objeto de interesse responder se as respostas induzidas por diferentes protocolos de exercício podem ser quantificadas através de biomarcadores de estresse e, desta forma serem aplicadas para o diagnóstico de "overreaching" em atletas. Para isso analisamos marcadores sanguíneos e musculares dos sistemas oxidativo, oxidante e antioxidante em diferentes situações de exercício físico, tais como, exercício exaustivo agudo, treinamento contínuo e treinamento intermitente. O objetivo geral do laboratório é verificar quais são os biomarcadores mais eficientes na determinação de sucesso adaptativo ou "overreaching", de uma forma confiável e aplicável nos esportes. As análises são feitas em ratos correndo em esteira rolante e atletas de futebol, volei e atletismo, fruto de um trabalho integrado e em equipe, do qual esta tese fez parte.

O projeto de pesquisa do Labex prevê o desenvolvimento de uma nova tecnologia de avaliação física, denominada por nós de **Limiar de Estresse**, a ser aplicada em atletas. A determinação do Limiar de Estresse estaria baseada no acompanhamento, ao longo do período de treinamento, da evolução individual dos níveis sanguíneos de biomarcadores de ataque oxidativo e defesa contra o estresse oxidativo, combinado com os níveis de biomarcadores de lesão muscular. O objetivo é avaliar o grau de impacto do estímulo aplicado pelo exercício e traçar previsões do sucesso adaptativo, na tentativa de estabelecer ajustes no protocolo de treinamento, de forma a obter o maior aumento possível da capacidade aeróbica/anaeróbia, com o mínimo de lesão muscular de origem oxidativa.

Nesse sentido, quando iniciei o projeto de doutorado em 1997, meu primeiro objetivo foi a padronização da dosagem de marcadores de peroxidação lipídica e oxidação proteica no plasma e urina e sua quantificação ao longo de dois protocolos de treinamento distintos. Esses dados, analisados em conjunto com os dados sobre as alterações nas enzimas antioxidantes CAT e GR e expressão de HSP72 fazem parte do manuscrito publicado em 2000 na revista *American Journal of Physiology*, mostrado no Anexo I (Smolka *et al*, 2000).

Para testar nossa hipótese, de que o tempo de coleta das amostras é determinante para se observar dano oxidativo, no segundo trabalho desta tese

seguimos o acúmulo de biomarcadores de peroxidação lipídica e oxidação protéica nos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca), em diferentes tempos pós-exercício exaustivo. Quantificamos também esses mesmos biomarcadores e o nível de lesão muscular no plasma. Nossos objetivos foram: i) determinar o melhor momento de coleta das amostras para o estudo do estresse agudo induzido pelo exercício exaustivo; ii) estudar o tipo de relação entre ataque oxidativo e lesão muscular; iii) determinar se o estresse oxidativo sofrido pelos músculos durante o exercício poderia ser detectado sistemicamente.

Os dados apresentados nessa tese, em conjunto com o de outros alunos do Labex mostraram que as enzimas GR e CAT sofrem modulação pelo tipo de protocolo de exercício empregado não somente em ratos, mas também em amostras de hemolisados de hemácias de atletas. Dessa forma, o objetivo do terceiro trabalho foi desenvolver um sensor, capaz de mensurar a atividade da enzima glutathione redutase com volumes de amostras de hemolisado de hamácias muito pequenos, que pudessem ser coletados do lóbulo da orelha através de capilares. O relatório contendo esses dados já foi submetido ao órgão competente da Unicamp (Edistec) com a solicitação do pedido de patente.

MATERIAIS E MÉTODOS

“EX VIVO”

Animais

Ratos machos, da linhagem Wistar, com dois meses de idade no início dos experimentos, foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram acomodados em biotério climatizado a 25° C (± 1), com controle de ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, invertido.

Para os protocolos de exercício descrito abaixo os animais foram submetidos previamente a uma semana de adaptação, consistindo de duas seções diárias de atividade de corrida em esteira rolante adequada à velocidade de 10 m/min por um período de 5 minutos. Esta semana teve como objetivo separar os animais que correm voluntariamente daqueles que não correm. Do primeiro grupo retiramos o grupo controle, sedentário (composto de ratos confinados apenas à movimentação dentro das gaiolas) e os diferentes grupos de exercício.

Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP - (CEEA-IB-UNICAMP).

Exercício Exaustivo

O ponto de exaustão foi definido como aquele em que o animal sedentário não consegue mais correr, independentemente da depleção dos substratos (glicogênio, por exemplo).

Os animais, após uma semana de adaptação à corrida em esteira foram submetidos, sem pausas, aos seguintes exercícios:

Tabela I. Protocolo de exaustão ao qua os animais foram submetidos.

Tempo (min)	Velocidade (m/min)
10	5
15	10
20	15
20	20
15	25
10	30

A inclinação da esteira rolante foi de -3° .

Um lote de 5 animais foi sacrificado nos seguintes tempos pós exaustão: 0, 3, 6, 12 e 24 h. Cinco animais fizeram parte do grupo controle.

Protocolos de Treinamento

Foram utilizados 90 ratos, divididos em 3 grupos: Controle, Contínuo, Intermitente. Os grupos Contínuo e Intermitente continham 35 animais cada e o grupo Controle era de 20 animais. Os animais dos grupos Contínuo e Intermitente foram submetidos a dois tipos diferentes de treinamento, cujas intensidades e durações estão descritas na Tabela II.

Tabela II. Protocolos de treinamento de endurance e intermitente aos quais os animais foram submetidos.

Contínuo				Intermitente				
Semanas	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Número de sessões diárias	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Pausa (min)	Número de Repetições	Número de sessões diárias
1ª	15	20	1	20	5	2	4	1
2ª	20	30	1	30	2,5	1	4	1
3ª	22,5	45	1	32,5	2,5	1	6	1
4ª	25	60	1	35	2,5	1	6	1
5ª a 8ª	25	60	1	35	2,5	1	6	1

A inclinação da esteira rolante foi de -3° .

Coleta de Amostras

a) Urina

Durante o experimento de treinamento, foi coletada urina dos animais para análise de TBARS. Os animais, 5 de cada grupo, foram mantidos por 24 horas em gaiola metabólica após cada semana do treinamento e a urina foi colhida sob tolueno, adicionando-se BHT 90 μM e congelada a -15°C até à realização das análises.

b) Sangue

Nos ratos, o sangue foi coletado pela veia hepática, mantendo-se o animal anestesiado com hidrato de cloral 10%. Após a coleta o animal foi sacrificado por

punção cardíaca. Foi utilizado como anticoagulante heparina sódica. O sangue foi mantido em banho de gelo até o fracionamento ou a utilização nos experimentos nos quais se usou sangue total.

Nos sujeitos humanos, o sangue foi colhido pela veia braquial em tubo heparinizado e mantido em banho de gelo até o fracionamento.

Para a separação do plasma, o sangue total foi centrifugado sob refrigeração (4°C) a 300 x g por 10 minutos. Adicionou-se BHT 90 µM para prevenir ataque oxidativo. O plasma foi então congelado em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer em -70°C até à realização das dosagens.

Para se preparar o homogenato de hemácias, a papa de hemácias obtida do sedimento da centrifugação acima descrita, foi lavado 3 vezes com PBS (tampão fosfato 0,2 M mais NaCl 0,9%) e hemolisado com água (1:1 v/v) em banho de gelo por 5 minutos. Após, foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer a -70°C até à realização das dosagens. Quando da realização das análises, o homogenato foi diluído 1:50 (v/v) com solução de PBS.

c) Músculos

Os músculos sóleo e gastrocnêmio dos ratos foram retirados logo em seguida à retirada do sangue, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C para análises posteriores. No momento da análise, os músculos (30 mg de tecido) foram homogeneizados (Polytron PT2100) numa solução gelada contendo sacarose 440 mM, MOPS 50 mM, pH 7,2, PMSF 0,01 mM e EDTA 100 mM. O homogenato foi centrifugado a 40.000 x g por 20 minutos a 4°C, descartando-se o sedimento. Adicionou-se 90 µM BHT ao sobrenadante, para prevenir oxidação.

Dosagem de Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

As amostras foram preparadas conforme descrito por Yagi (1987). Vinte µL de plasma foram diluídos em 4 mL de H₂SO₄ (0,04 M). Adicionou-se 0,5mL de ácido fosfotungstico 10%, aguardou-se 5 minutos e centrifugou-se a 300 x g por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de H₂SO₄ (0,04 M), seguido da adição de 0,3 mL de ácido fosfotungstico 10%. Após centrifugação a 3000 rpm, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 0,5 mL de H₂O. A essa mistura foi adicionado 1 mL da solução

reagente de ácido tio-barbitúrico, composta de ácido tio-barbitúrico 0,67% em ácido acético 50%. Incubou-se a mistura final em banho maria (90°C) por 1 hora. Após, esfriou-se em banho de gelo e efetuou-se a extração dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico) com 5 mL de butanol, agitando-se vigorosamente. Finalmente a medida da emissão da fluorescência da fase orgânica foi feita a 553 nm com excitação em 515 nm. O espectrofluorímetro utilizado foi o modelo SPF-500C™ SLM Aminco (SLM Instruments, Inc.).

Para se calcular a concentração de TBARS, usou-se uma curva padrão de tetraetoxipropano, conforme descrito por Yagi (1987). Os resultados foram expressos em nmol/mL de plasma. Para as amostras de músculo, usou-se 500 µL de do homogenato, seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o plasma e os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de tecido.

Nas amostras de urina, 500 µL de urina de 24 horas colhida conforme já descrito foi adicionada a 1 mL da solução reagente de ácido tio-barbitúrico. Incubou-se a mistura final em banho maria (90°C) por 1 hora e após seguiram-se os mesmo procedimentos usados para as outras amostras. Os resultados foram apresentados normatizados pela quantidade de creatinina em mg/mL dosada pela reação de Jeffé, conforme Jenkins et ali (1992).

Dosagem de Proteínas Carboniladas no Plasma

Os grupamentos carbonila das proteínas reagem com o composto 2,4-dinitrophenilhidrazina (2,4 DNPH), formando um cromóforo que absorve a 380 nm.

Amostras de 200 µL de plasma foram diluídos para 1 mL de H₂O, adicionando-se 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% para precipitação das proteínas. Após centrifugação a 300 x g por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso e incubado durante 50 minutos a 37°C com 1 mL de 2,4 DNPH 10 mM dissolvido em HCl 2 M, com agitação em vortex a cada 5 minutos. Após, foi feita nova precipitação das proteínas com 2 mL de TCA 20%. Lavou-se o precipitado três vezes com uma mistura de etanol/acetato de etila (1:1 v/v) e ressuspendeu-se o precipitado em guanidina 6 M dissolvida em fosfato de potássio 2 mM, pH 2,3 corrigido com ácido trifluoracético. Paralelamente outros 200 µL de plasma foram tratados da mesma maneira, sendo a solução de 2,4 DNPH substituída por HCL 2 M, e este tubo foi utilizado para zerar o aparelho (branco).

Determinou-se a absorvância a 380 nm. Para o calculo da concentração usou-se o coeficiente de extinção molar descrito na literatura ($\epsilon = 22.000/\text{M}/\text{cm}$) (Faure e Lafont, 1995; Radak *et ali*, 1998). Os valores foram expressos em nmol/mL de plasma.

Para as amostras de músculo, utilizamos 200 μL do homogenato, usando-se o mesmo procedimento descrito para o sangue e os resultados foram expressos em termos de nmol de proteínas carboniladas por mg de tecido.

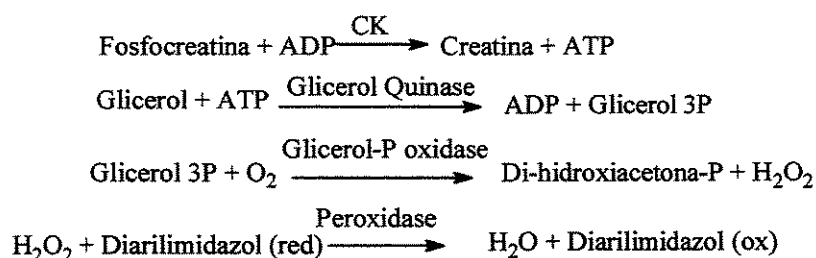
Dosagem de Grupamentos Sulfidril Totais em plasma

Adicionamos a 1 mL de meio constituído de Tris 0,25 mM e EDTA 20 mM, pH 8,2, uma alíquota de plasma (50 μL), medindo-se a absorvância a 412 nm (A1). Adicionou-se a essa mistura 20 μL de ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM diluído em metanol. Após 15 minutos fez-se a segunda leitura (A2). Para zerar o aparelho usou-se o meio de reação e como branco usou-se DTNB diluído no mesmo tampão (B). O procedimento foi feito à temperatura ambiente. Para se calcular a concentração de grupamentos sulfidril o coeficiente de extinção molar do DTNB (13600/M/Cm) (Faure e Lafond, 1995):

Dosagens das Atividades Enzimáticas

a) Creatina Quinase (CK) em sangue total

A dosagem desta enzima foi feita em aparelho Reflotron (Boehringer Mannheim), que utiliza uma fita reagente à qual se adiciona 30 μL de sangue total (Braun *et ali*, 1987). O fundamento do método baseia-se numa seqüência de reações catalisadas pelas enzimas: CK, glicerol quinase, glicerol fosfato oxidase, e uma peroxidase, conforme mostra a seqüência abaixo:



O aparelho monitora a oxidação do indicador, diarilimidazol.

b) Glutathione Redutase

Os ensaios de ambas as amostras, músculo e hemolisado de hemácias foram conduzidos de acordo com Smith *et al* (1988).

As amostras (5 µL de hemolisado de hemácias ou músculo - volume de homogeneizado correspondente a concentração de 50 mg/mL de proteína) foram adicionadas ao meio de reação contendo 50µL de NADPH 2 mM, 250µL de DTNB 3mM e 50 µL de GSSG 20 mM, a fim de iniciar a reação. A formação de TNB foi acompanhada a 412 nm. A hemoglobina foi dosada pelo método de Drabkin.

O método de dosagem da enzima glutathione redutase se baseia nas seguintes equações:



Para o cálculo da atividade da enzima no sangue foi utilizada a seguinte equação:

$E = 100 \times A / [\text{Hb}]$, onde E é a atividade da enzima por mg de hemoglobina e A é a atividade da enzima presente na amostra e [Hb] é a concentração da hemoglobina no hemolisado em g/mL. O valor A é calculado utilizando-se a equação:

$A = (\Delta D / 13.600) \cdot (V_H / V_C)$, onde ΔD é a diferença de absorbância a 412 nm em um minuto, $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ é o valor do coeficiente de extinção molar do TNB a 412 nm, V_H é o volume do hemolisado adicionado e o V_C é o volume total da solução.

Os valores de atividade da GR no sangue estão apresentados em UI/mg Hb e no homogenato de músculo fizemos a padronização pelo peso do tecido utilizado e o resultado está apresentado em UI/mg de músculo.

c) Catalase

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras de sangue ou músculo em tampão fosfato 50 mM e

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM, (Aebi, 1984). A queda nos valores de absorvância do H_2O_2 foi seguida espectrofotometricamente a 240 nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase plasmática foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde a é o volume de hemolisado adicionado e b é o volume total da solução, A_1 o valor da absorvância em $t = 0$ e A_2 é o valor da absorvância no tempo final, que em nosso caso se dá aos 15 segundos após o início da reação (Aebi, 1984). Para o cálculo da atividade desta enzima no músculo utilizamos o valor de coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240 nm de $43.600 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Andersen *et al*, 1997).

“IN VITRO”

Sensor para Medir Atividade da Enzima Glutathiona Redutase

Soluções

A enzima glutathiona redutase (9 mg/mL) foi diluída no meio reação contendo fosfato de potássio 0,2 M pH 7,4, com EDTA 1 mM, pH 7,4, conforme descrito por Smith *et al* (1988). Os substratos NADPH 4 mM e GSSG 40 mM foram diluídos no mesmo tampão e acrescidos de DTNB 3 mM. As amostras constaram de hemolisado de hemácias diluído (1:100) com o PBS (Tampão fosfato 0,2 M mais NaCl 0,9 %).

Equipamento

O dispositivo utilizado constitui-se de duas placas de teflon (2 cm x 10 cm), uma delas servindo de suporte inferior e a outra vazada (2 cm de diâmetro) servindo de proteção superior. Na placa inferior foram feitas ranhuras por onde introduzimos dois eletrodos de platina. Entre as placas, foi colocada uma membrana hidrofóbica de PVDF tipo Millipore. As duas placas e a membrana foram dispostas formando um “sanduiche” e imobilizadas por um grampo. Os reagentes e as amostras foram introduzidos por seringa Hamilton pelo espaço vazado da placa superior. Os eletrodos são ligados a um amperímetro modelo Biosensor (Universal Sensors Inc.), ligado à corrente de 110V. O esquema utilizado está mostrado na Figura 4.

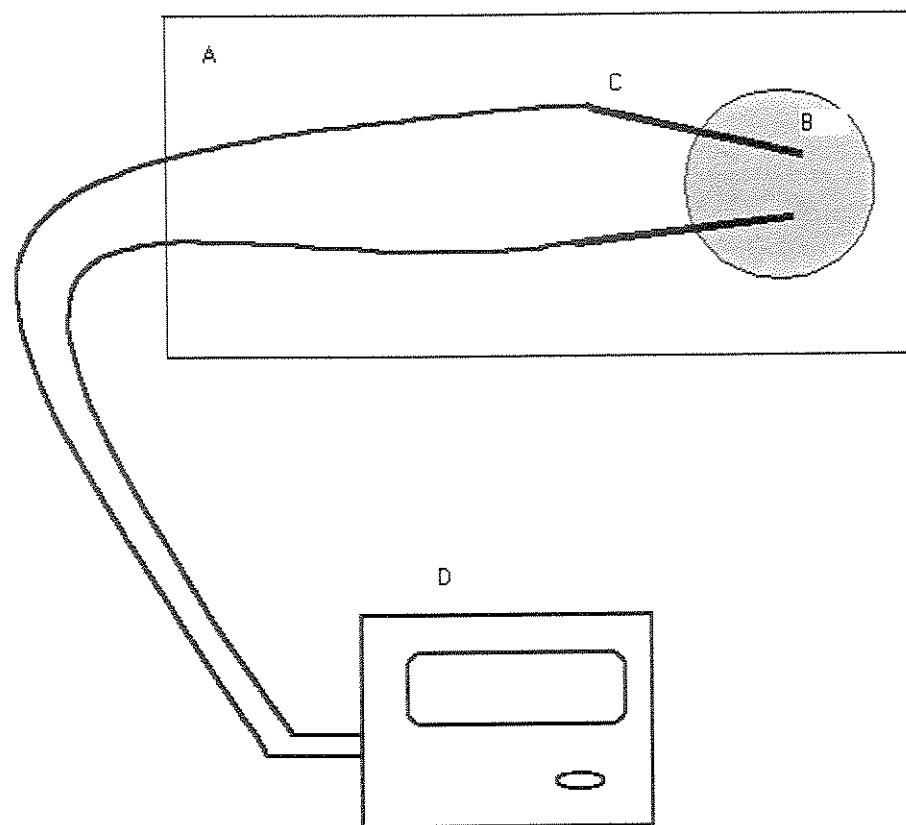


Figura 4. Esquema mostrando o equipamento usado no sensor para dosagem da GR. A – placas de teflon, B – membrana hidrofóbica, C – eletrodos de platina, D – nano-amperímetro.

Procedimentos

Primeiramente adicionamos sobre a membrana, 7 μL da solução contendo os substratos. Aguardou-se 3 minutos para estabilização do sinal e após, adicionou-se 3 μL da solução contendo a enzima ou a amostra. Anotou-se a leitura da corrente antes e após 3 minutos da adição da amostra. O potencial aplicado variou conforme o experimento e foi de -300 .

Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos a uma análise estatística paramétrica ANOVA para mais de dois grupos e teste t de *student* para 2 grupos. O nível de significância prefixado foi de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I. EFEITO DOS TREINAMENTOS CONTÍNUO E INTERMITENTE SOBRE MARCADORES DE ATAQUE OXIDATIVO

Ao longo das oito semanas que compreenderam os treinamentos contínuo e intermitente, realizados conforme os protocolos descritos em Materiais e Métodos, medimos as concentrações de TBARS na urina e de proteínas carboniladas e grupamentos sulfidríla totais no plasma dos animais. Nosso objetivo nesse estudo foi avaliar se esses marcadores sistêmicos seriam capazes de detectar os diferentes graus de ataque oxidativo produzido nos músculos pelos dois tipos de treinamento, antecipando ou não o sucesso do processo adaptativo.

As Figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, o comportamento da concentração de TBARS na urina de ratos e de proteínas carboniladas no plasma, ao longo dos dois protocolos de treinamento: contínuo e intermitente.

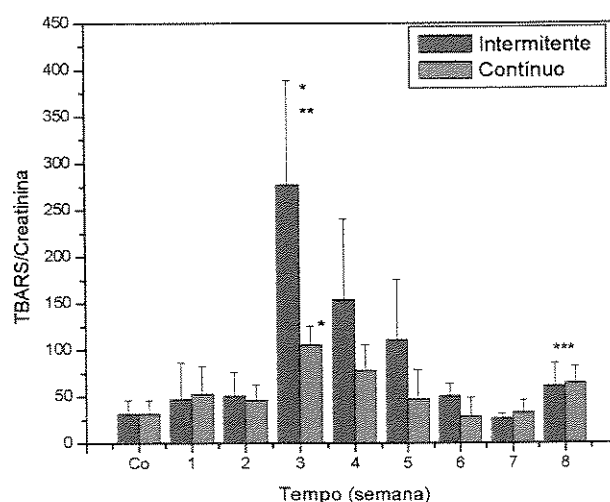


Figura 5. Variação da concentração de TBARS na urina de ratos (24hs) durante os protocolos de treinamentos descrito em materiais e métodos. (*) indica diferença significativa entre o controle e a 3ª semana, (**) entre o grupo contínuo e o grupo intermitente, (***) entre a 3ª e 8ª semanas. ($P < 0,05$). $n=7$.

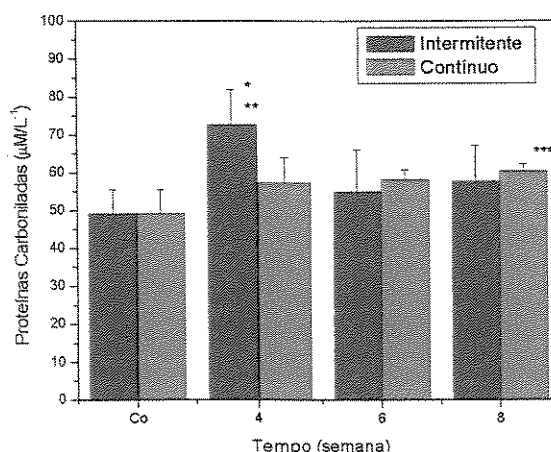


Figura 6. Variação da concentração de proteínas carboniladas durante o protocolo de treinamento descrito em materiais e métodos. (*) indica diferença significativa entre o controle e a 3ª semana, (**) indica diferença significativa entre o grupo contínuo e o grupo intermitente, (***) entre a 3ª e 8ª semanas. ($P < 0,05$). $n=7$.

A Figura 5 mostra que na terceira semana de treinamento houve aumento significativo na produção de TBARS na urina, sendo este aumento maior para o grupo de animais em treinamento intermitente quando comparado ao grupo em treinamento contínuo. A partir da terceira semana, houve diminuição nos níveis de TBARS em ambos os grupos, voltando a valores próximos aos do grupo controle. A Figura 6 mostra o comportamento da concentração de proteínas carboniladas no plasma ao longo das 8 semanas de treinamento. Novamente observa-se que o exercício intermitente induziu um aumento maior na concentração de proteínas carboniladas que o treinamento contínuo. Da mesma forma, observa-se que no grupo em treinamento intermitente houve um pico de concentração na quarta semana seguido de decréscimo. No caso do exercício contínuo, não houve aumento estatisticamente significativo da concentração de proteínas carboniladas ao longo das oito semanas de treinamento.

Estes dados sugerem que, principalmente na fase inicial dos treinamentos, onde houve incremento na intensidade e duração do esforço ao longo das semanas, o treinamento intermitente foi mais lesivo aos animais que o treinamento contínuo. É importante ressaltar que o maior ataque oxidativo observado nesta fase para o grupo de treinamento intermitente correlacionou-se com a falta de estímulo sobre o sistema de defesa enzimático, analisado pelas atividades das enzimas catalase e

glutathione redutase e também com um aumento nos níveis de CK plasmática. Esses resultados estão descritos em Smolka *et al* (2000) e mostrados em Anexo I.

Podemos observar também que ambos os tipos de treinamento levaram, ao seu final, a uma adaptação benéfica dos animais ao exercício, evidenciada neste trabalho pelo retorno dos níveis de TBARS na urina e de proteínas carboniladas plasmáticas a valores bastante próximos aos do grupo controle. Ou seja, qualquer dos dois tipos de treinamento levou os animais a suportarem uma carga maior de esforço com menor produção de produtos de ataque oxidativo e menor nível de lesão. Novamente, nossos dados da oitava semana se correlacionaram com um aumento significativo na atividade das enzimas do sistema antioxidante desses animais (Smolka *et al*, 2000). Corroborando esta interpretação, os dados da Figura 7 mostram que ao final da oitava semana houve um aumento significativo na concentração de grupamentos sulfidril totais no plasma dos animais treinados, refletindo uma importante adaptação metabólica traduzida pelo aumento da capacidade antioxidante do sangue.

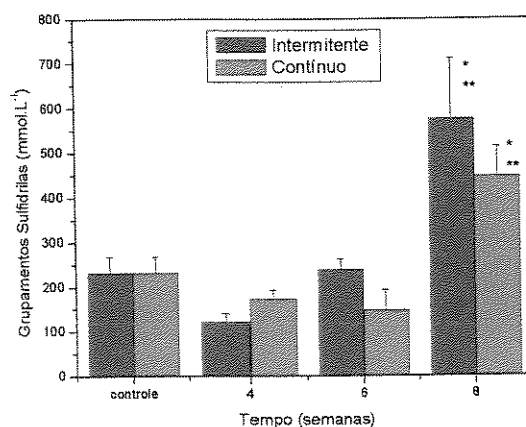


Figura 7. Efeito dos treinamentos contínuo e intermitente sobre a concentração de Grupamentos sulfidril totais no plasma. (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle, (**) indica diferença estatística em relação à 4ª semana. $P < 0,05$. $n = 5$

Uma observação importante, referente à variação da concentração de grupamentos sulfidril no plasma é que este parâmetro está relacionado principalmente aos resíduos de cisteína reduzidos, presentes nas proteínas plasmáticas, principalmente albumina, que durante o ataque oxidativo são alvos

preferenciais (Halliwell e Gutteridge, 1998), sendo, portanto seu aumento o reflexo da melhoria das condições antioxidantes do plasma, provavelmente devido ao aumento de atividade do sistema GR/GPx.

II. ESTUDO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES TEMPOS PÓS-EXERCÍCIO EXAUSTIVO NOS MÚSCULOS SÓLEO E GASTROCNÊMIO (PORÇÃO BRANCA) E NO PLASMA.

Inicialmente, para testar nossa hipótese de que o tempo de coleta das amostras é determinante para se observar dano oxidativo, seguimos o acúmulo de biomarcadores de dano oxidativo nos músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca) em diferentes tempos, após submetemos ratos a um protocolo de exercício exaustivo. Quantificamos esses mesmos biomarcadores e também o nível de lesão muscular no plasma, em diferentes tempos pós-exaustão. Nesse estudo os objetivos foram: i) determinar o melhor momento de coleta das amostras para o estudo do estresse agudo induzido pelo exercício exaustivo; ii) determinar se o estresse oxidativo sofrido pelos músculos durante o exercício pode ser detectado sistemicamente e iii) determinar o tipo de relação entre ataque oxidativo e lesão muscular.

Estabelecimento das intensidades empregadas no protocolo de exaustão pela determinação do Limiar Anaeróbio

Padronizamos nesse trabalho o teste de determinação da velocidade de limiar em lactatemia mínima (Tegtborg, 1993) para ratos sedentários. Esses resultados foram obtidos em colaboração com o doutorando Cláudio César Zoppi, do nosso laboratório. Nosso teste consistiu inicialmente de um "sprint" de 2 minutos a uma velocidade de 40 m/min, com o objetivo de induzir um aumento na concentração de lactato sanguíneo. Após a coleta de sangue pela cauda do animal e dosagem da concentração de lactato, os animais foram submetidos a cargas de corrida em velocidades sub-máximas e crescentes, com duração de 3 minutos e pausa de 30 segundos entre os exercícios para dosar a concentração de lactato ao final de cada carga de esforço. Podemos observar pela Figura 8 que inicialmente a concentração de lactato tendeu a cair, devido à predominância do metabolismo aeróbio, voltando a subir quando a velocidade ultrapassou o limiar aeróbio, indicando predomínio do metabolismo anaeróbio. O ponto do gráfico onde a lactatemia é mínima estabelece

a velocidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio e é denominado limiar anaeróbio (Tegtbur, 1993).

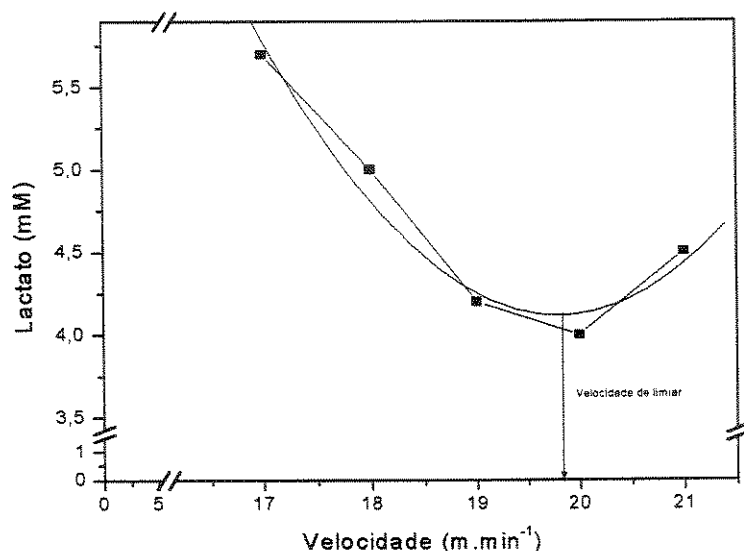


Figura 8. Representação gráfica da curva de lactato típica do protocolo de velocidade em lactatemia mínima (LMS) de um animal (Tegtbur *et ali.*,1993).

Os valores de limiar anaeróbio dos animais antes do treinamento estão mostrados na Tabela II:

Tabela III. Limiar anaeróbio de 5 animais sedentários

Animal	Velocidade de Limiar (m.min ⁻¹)
1	19
2	20
3	21
4	19
5	20
X±DP	19,8±0,8

Podemos observar tanto pelo protocolo de exercício (Tabela I - Materiais e Métodos) quanto pelas velocidades de limiar mostrados na Tabela III, respectivamente, que nos 70 minutos iniciais do protocolo de exercício agudo foram feitos numa intensidade relativa sub-limiar, chegando no máximo até a velocidade de limiar dos animais. Ou seja, durante esse período de esforço foi utilizado basicamente o metabolismo oxidativo como via de ressíntese de ATP, levando ao recrutamento predominante de fibras com características mais oxidativas, como é o

caso do músculo sóleo. Já os últimos 25 minutos foram feitos numa intensidade supra limiar, utilizando basicamente as vias de ressíntese de ATP anaeróbicas, isto é as reservas de fosfocreatina e a glicólise anaeróbia. Somente nesse período é que haveria uma predominância de recrutamento de fibras mais glicogenolíticas, como é o caso do músculo gastrocnêmio, porção branca.

O Exercício Exhaustivo Induz Aumento Nos Níveis de Estresse Oxidativo Muscular

As Figuras 9 e 10 mostram a quantificação da concentração de proteínas carboniladas (A) e de TBARS (B) nos músculos sóleo e gastrocnêmio imediatamente após e nos tempos 3 e 6 horas pós-exaustão.

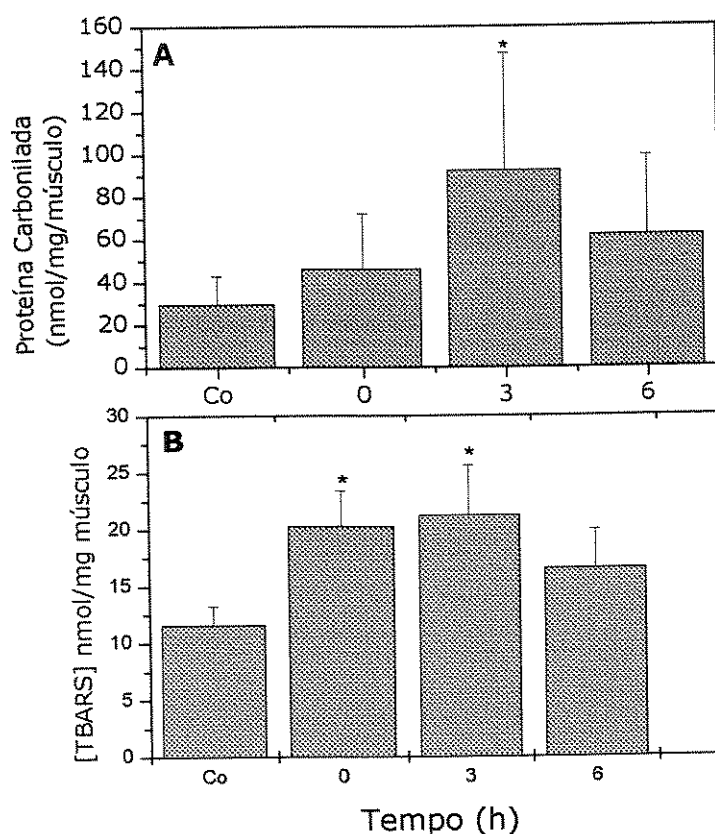


Figura 9. Variação da quantidade de proteínas carboniladas (A) e TBARS (B) no músculo sóleo de ratos submetidos à exaustão, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão (n=5). * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle.

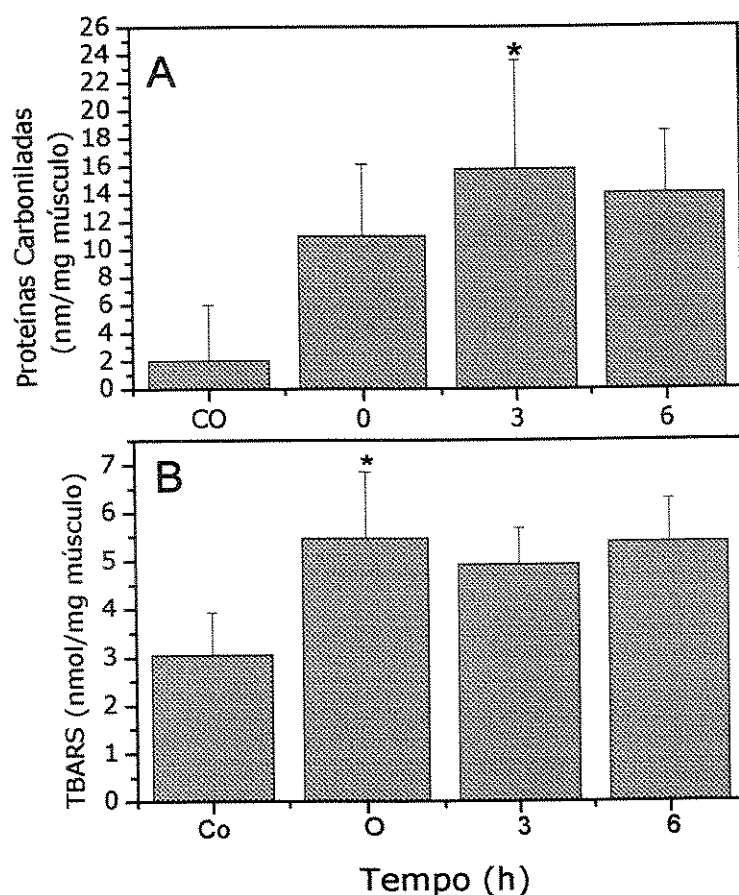


Figura 10. Variação da quantidade de proteínas carboniladas (A) e TBARS (B) no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a exaustão, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * $P<0,05$ comparado com o grupo controle.

Podemos observar que tanto a concentração de proteínas carboniladas quanto a de TBARS do grupo controle são menores no músculo gastrocnêmio quando comparadas com o músculo sóleo. Por sua vez, a concentração de TBARS ficou significativamente aumentada imediatamente após o exercício, com um pico de concentração 3 horas após o exercício, no músculo sóleo enquanto no músculo gastrocnêmio ocorreu aumento significativo logo após o estímulo, permanecendo a concentração elevada durante todo o período considerado (6 horas). As proteínas carboniladas apresentaram o mesmo comportamento de TBARS no músculo sóleo sendo que 3 horas após o estímulo a concentração de proteínas carboniladas apresentavam-se em sua concentração máxima em ambos os músculos estudados.

Considerando que estresse oxidativo significa desbalanço entre produção de EROS e defesa contra essas espécies, analisamos também as atividades das enzimas glutathiona redutase e catalase, como representantes do status antioxidante nos dois músculos. As Figuras 11 e 12 mostram a atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) (A) e catalase (B) dos músculos sóleo e gastrocnêmio, respectivamente, mensuradas no grupo controle e imediatamente (0), 3 e 6 horas pós-exercício exaustivo.

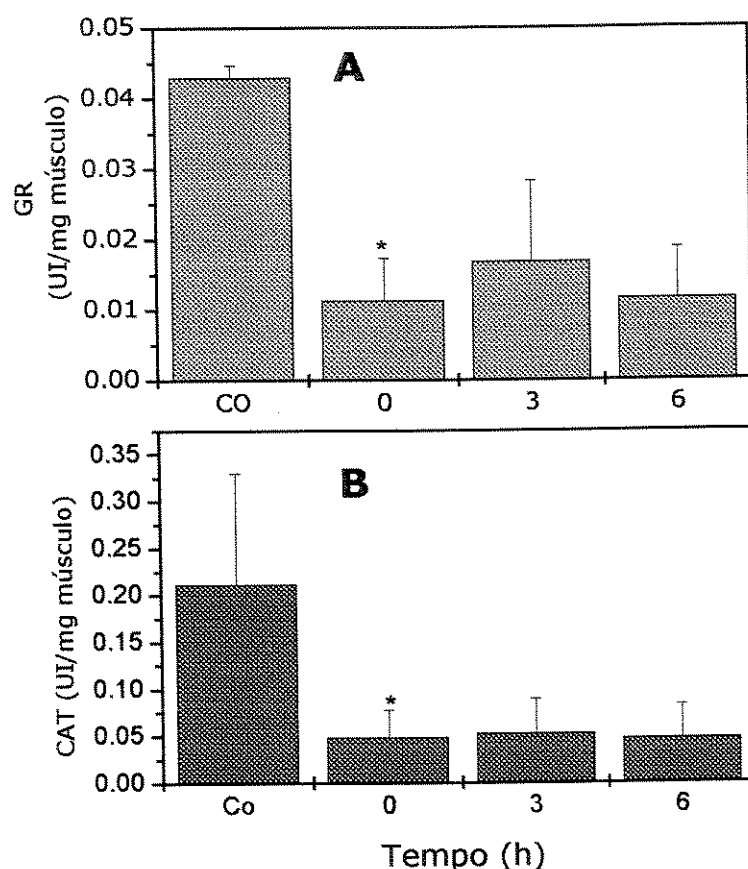


Figura 11. Atividade das enzimas GR (A) e CAT (B) no músculo sóleo de ratos submetidos a exercício exaustivo, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). (*) $P<0,01$ comparado com o grupo controle.

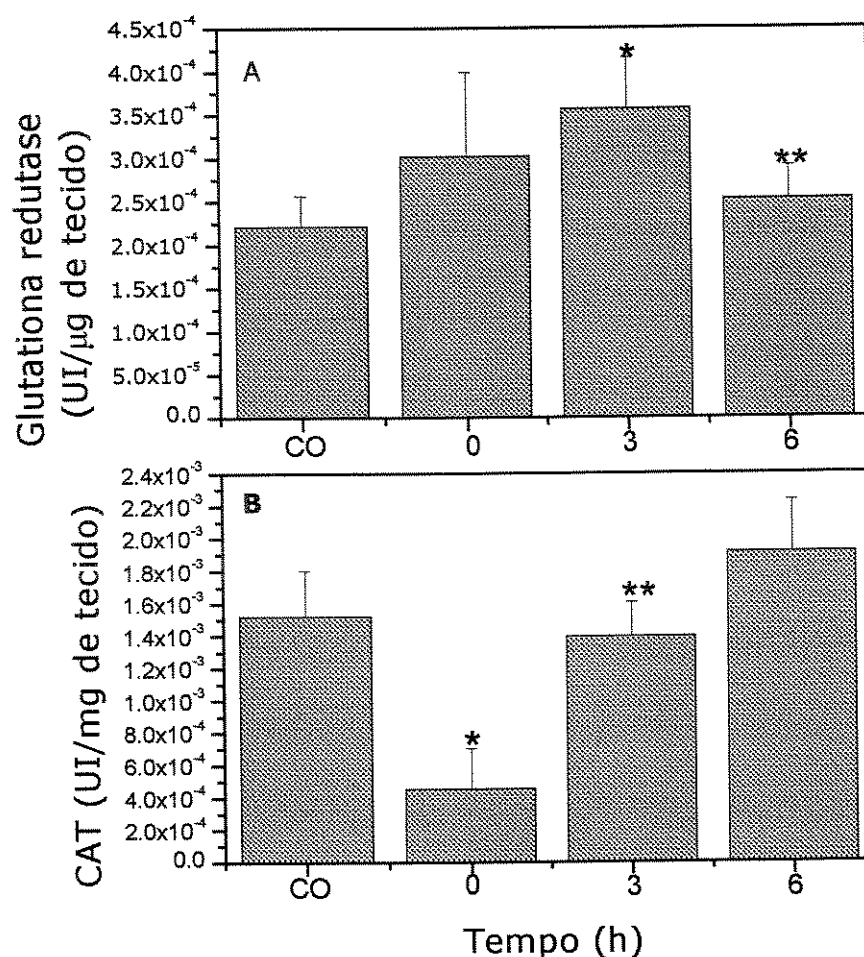


Figura 12. Atividade das enzimas GR (A) e CAT (B) no músculo gastrocnêmio (porção branca) de ratos submetidos a exercício exaustivo, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * $P<0,01$ comparado com o grupo controle. (**). Sem variação significativa em relação ao grupo CO.

Podemos observar que os efeitos do exercício sobre as enzimas foram diferentes quando comparamos os dois músculos. Enquanto observamos no músculo sóleo uma diminuição significativa na atividade das duas enzimas logo após o exercício ($P<0,01$), que se manteve mesmo após 6 horas de repouso, as atividades enzimáticas no músculo gastrocnêmio foram afetadas diferentemente. A GR sofreu um aumento significativo 3 horas pós-exercício e a CAT, embora tenha mostrado queda na sua atividade após o exercício, retornou a valores semelhantes ao do grupo controle após 3 e 6 horas da exaustão.

O Estresse Oxidativo Induzido pela Exaustão Correlaciona-se com Níveis Aumentados de Lesão Muscular e é Refletido Sistemicamente

A Figura 13 mostra o efeito do exercício exaustivo na concentração plasmática de proteínas carboniladas (A) e TBARS (B) no grupo controle e 0, 3, 6, 24 e 48 horas após o exercício.

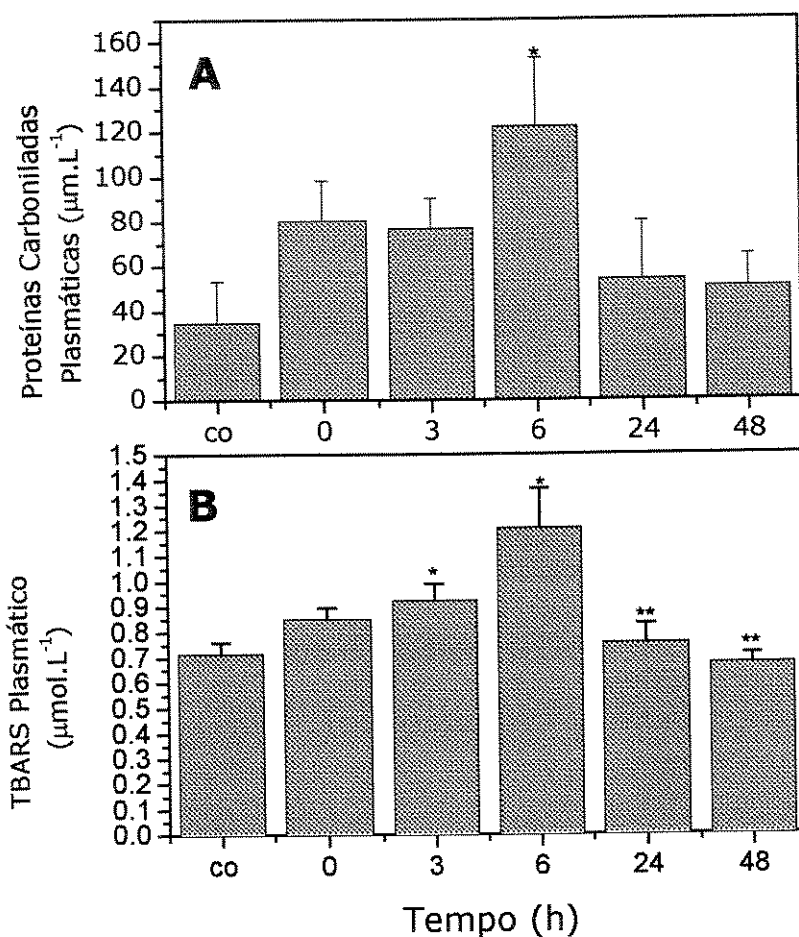


Figura 13. Variação da concentração de proteínas carboniladas (A) e TBARS (B) no plasma de ratos submetidos à exaustão, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * $P<0,05$ comparado com o grupo controle ** $P<0,05$ comparado com o resultado da sexta semana.

Comparando-se com o grupo controle, a concentração de TBARS no plasma do grupo submetido à exaustão (Figura 13B) exibiu um pico de concentração

máxima 6 horas pós-exercício ($P<0,01$). Observa-se ainda que o valor em 24 horas foi praticamente igual ao do grupo controle, mantendo-se inalterado após 48 horas. A concentração de proteínas carboniladas no plasma também apresentou um comportamento muito semelhante (Figura 13A) ao observado para TBARS, sugerindo que os produtos de ataque muscular poderiam extravasar para a via sanguínea. O pico de concentração também ocorreu 6 horas após o exercício ($P<0,01$), voltando aos níveis do grupo controle 24 horas após. A análise estatística mostrou correlação positiva entre os valores máximos de TBARS no músculo sóleo com os valores máximos de TBARS no plasma ($r=0,709$; $P=0,003$), porém não encontramos essa mesma correlação entre os valores obtidos para o músculo gastrocnêmio e plasma. Por outro lado, não foi observada nenhuma correlação estatística entre os valores máximos de proteínas carboniladas em nenhum dos músculos estudados como os valores máximos encontrados no plasma.

A Figura 14 mostra o efeito do exercício exaustivo sobre a atividade plasmática da enzima creatina quinase (CK) nos mesmos tempos descritos para a Figura anterior.

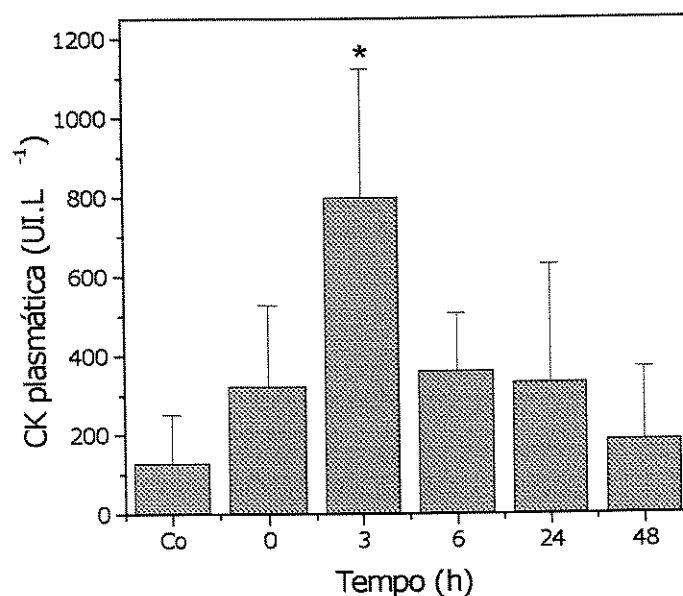
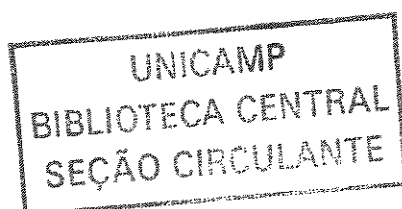


Figura 14. Variação da atividade da enzima creatina quinase em plasma de ratos submetidos a exaustão, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * $P<0,05$ comparado com o grupo controle.

Podemos observar que a atividade da enzima creatina quinase também se elevou significativamente após o exercício, apresentando um pico de atividade plasmática em 3 horas ($P < 0,01$). Após 6 horas a atividade da CK já estava nos níveis do grupo controle, permanecendo assim pelas próximas 48 horas de observação. Observamos correlação positiva entre atividade da CK plasmática (valores máximos) e concentração máxima de TBARS no músculo sóleo ($r = 0,688$; $P = 0,003$), ocorrendo o mesmo quando analisamos estatisticamente a concentração máxima de TBARS no plasma e atividade da CK plasmática ($r = 0,761$; $P = 0,001$). Novamente não registramos correlação entre os valores de pico de proteínas carboniladas e atividade de CK no plasma, nem entre esta e o pico de TBARS no músculo gastrocnêmio.



DISCUSSÃO

O mecanismo molecular envolvido no estresse oxidativo e o dano muscular induzido por um protocolo de exercício agudo têm sido objeto de intensa investigação nesses últimos anos (Davies *et al*, 1982; Maughan *et al*, 1989; Sahlin *et al*, 1991; Saxton *et al*, 1994; Ortenblad *et al*, 1997; Reid, 2001).

A liberação de proteínas musculares, tais como a CK é tida como uma evidência de dano muscular, pois normalmente esta enzima é incapaz de atravessar membranas celulares. Desta forma, considera-se que a liberação de CK, via vasos linfáticos, refletiria alterações ocorridas na estrutura das membranas, tornando-as mais permeáveis a grandes moléculas tais como as proteínas. Alguns autores mostraram um padrão inalterado de TBARS no músculo esquelético após exercício agudo, com nível plasmático elevado de CK, sugerindo que esses níveis elevados não seriam consequência da lipoperoxidação dos tecidos (Viinika *et al*, 1984; Sahlin *et al*, 1991; Saxton *et al*, 1994; Ortenblad *et al*, 1997). Por outro lado, outros autores mostraram correlação entre níveis séricos elevados de TBARS e CK após um exercício intenso (Kanter *et al*, 1986, Maughan *et al*, 1989). Além disso, Navarro-Arévalo e Sánchez-del-Pino (1998) mostraram aumento significativo na concentração de TBARS em homogenato de músculo sóleo de ratos submetidos a exercício de exaustão. Estes autores não discutem o tempo decorrido entre o estímulo e a coleta da amostra. Por outro lado, Alessio e Goldfarb (1988) encontraram aumento significativo na concentração de TBARS em músculo quadríceps branco de ratos sedentários submetidos a exercício de exaustão, mas não encontrou diferença em músculo quadríceps vermelho desses animais. Nestes experimentos as amostras de músculo foram coletadas imediatamente após o exercício, o que poderia explicar a discrepância de resultados.

Para testar nossa hipótese, de que o tempo de coleta das amostras pós-exercício poderia estar envolvido nesses resultados discrepantes apresentados na literatura, quantificamos marcadores de ataque oxidativo e dano muscular em diferentes tempos pós-exercício em amostras de sangue e em dois músculos que variam na sua capacidade oxidativa e padrão de recrutamento pelo exercício físico. Nosso objetivo foi mostrar um quadro mais abrangente do processo.

Os resultados aqui apresentados indicam que o protocolo de exercício agudo utilizado levou a um quadro diferenciado de estresse oxidativo muscular, detectado por um aumento significativo nas concentrações de TBARS e proteínas carboniladas até 3 horas pós-exercício, com o músculo sóleo sendo aparentemente mais afetado que o músculo gastrocnêmio (porção branca), conforme mostram as Figuras 7-10. O ataque oxidativo é um processo que ocorre numa cadeia de eventos, o que explicaria o "lag-time" de 3 horas para a obtenção dos valores máximos. Já foi proposto que exercícios de curta duração, até a exaustão, poderiam induzir aumentos na formação de EROS, a uma velocidade acima da capacidade de proteção do sistema de defesa (Sjodin *et al*, 1990). Nesse sentido, Pigeolet *et al*, (1990) mostraram que altas concentrações de espécies reativas foram capazes de reagir com as próprias enzimas antioxidantes, inativando-as. Nossos resultados sugerem que esta, provavelmente, foi a situação atingida no músculo sóleo, onde as enzimas antioxidantes mostraram queda na sua atividade enquanto que no músculo gastrocnêmio, 3 horas após o exercício, a atividade da GR estava significativamente aumentada e a da CAT praticamente não foi afetada, sugerindo que o músculo sóleo foi submetido a um nível de produção de EROS maior quando comparado ao gastrocnêmio. O diferente padrão de recrutamento desses músculos durante os 95 minutos de exercício, mostrados nas tabelas I e III poderia ser o responsável pelos diferentes níveis de estresse nesses músculos. Ou seja, o tempo de exposição a EROS parece ser, de fato, um fator importante na sua ação sobre estruturas celulares, conforme proposto por Powers *et al* (1994). Embora não haja um consenso sobre o assunto, alguns autores mostraram diminuição na atividade de enzimas antioxidantes pelo exercício exaustivo, entre elas a GR (Sen *et al*, 1995). Alessio e Goldfard (1988) também mostraram diminuição significativa na atividade da catalase nas partes vermelha e branca do músculo vasto lateral de ratos submetidos a exercício agudo e intenso. Por sua vez, Ji *et al*, (1992) não observaram qualquer alteração nem na atividade da enzima CAT nem GR imediatamente após um exercício agudo. Uma possível explicação para isso é que neste trabalho os ratos correram menos tempo que no nosso estudo, reforçando que a carga e a duração do esforço parecem ser importantes para disparar um distúrbio também nas enzimas antioxidantes musculares.

A diminuição nos produtos de ataque oxidativo no músculo sóleo após 6 horas da exaustão, mesmo quando a atividade das enzimas continua baixa sugerem a ativação de sistemas de defesa antioxidante secundários, como, por exemplo, aumento na expressão de proteínas de estresse, que ajudam a reparar o dano oxidativo. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que 2 h após um protocolo de exercício exaustivo ocorre um aumento de cerca de 100% na expressão de HSP 72 (Smolka *et ali*, 2000).

É importante ressaltar que as concentrações plasmáticas de produtos de ataque oxidativo também exibiram um pico de concentração, embora este tenha ocorrido 6 horas pós-exercício. Esses dados estão em concordância tanto com dados prévios de nosso laboratório (Smolka *et ali*, 2000) quanto de outros laboratórios, que também mostraram um pico de concentração plasmática de produtos de lipoperoxidação 6 horas após o exercício (Maughan *et ali*, 1989). Uma observação interessante feita em nosso trabalho é que o pico de atividade plasmática da CK coincide com o pico de concentração de TBARS e proteínas carboniladas nos músculos. A correlação positiva entre concentração máxima de TBARS no músculo sóleo (o mais afetado pelo exercício) e plasma e entre esses valores e atividade máxima de CK plasmática indicam claramente a que há uma boa correlação entre peroxidação lipídica e aumento na permeabilidade da membrana, sugerindo que a peroxidação lipídica deve ser a causa do dano muscular observado após um exercício exaustivo, conforme proposto por alguns autores (Kanter *et ali*, 1986, Maughan *et ali*, 1989; Navarro-Arévalo e Sanches-del-Pino, 1998; Navarro-Arevalo *et ali*, 1999).

A falta de correlação entre os valores máximos de proteínas carboniladas no músculo sóleo e plasma e entre eles e atividade da CK plasmática sugerem também que a oxidação protéica parece ser um evento independente dos eventos de peroxidação lipídica e processos de injúria a membrana muscular. Os resultados obtidos por Radak *et ali* (1999), com ratos exercitados em altas altitudes comparados com animais treinados ao nível do mar reforçam essa interpretação. Esses autores mostraram aumento nos níveis de proteínas carboniladas sem o aumento concomitante na concentração de TBARS nos ratos exercitados em alta altitude. Além disso, a concentração de proteínas carboniladas no plasma não pode

ser correlacionada apenas com a oxidação protéica ocorrida nas células musculares. Aparentemente, está também relacionada ao estresse induzido por hidroperóxidos (H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos) no sangue. Estes são produtos principalmente da peroxidação lipídica, que se propagam no sangue, sendo parte deles excretados na urina (Halliwell e Gutteridge, 1998). Esses hidroperóxidos podem atacar estruturas sanguíneas, tais como membranas de eritrócitos e de outras células, hemoglobina, lipoproteínas e albumina, causando aumento na concentração de proteínas carboniladas. Os estudos sobre os efeitos do exercício agudo sobre os níveis de oxidação protéica muscular são ainda escassos na literatura. Foi sugerido que proteínas específicas, especialmente as proteínas contráteis seriam mais sensíveis a oxidação protéica induzida por EROS (Goto *et al*, 1988). Leeuwenburgh *et al* (1999) e Radak *et al* (2000) mostraram aumento nos níveis de oxidação protéica mitocondrial, mas não em proteínas citosólicas, sugerindo a mitocôndria como um alvo importante do ataque oxidativo induzido pelo exercício exaustivo. Nesse sentido, resultados muito recentes de nosso laboratório mostraram queda na atividade dos complexos I e IV mitocondriais em diferentes tempos após esse mesmo protocolo de exaustão (Resultados não publicados).

Os resultados aqui descritos sugerem que o uso de marcadores plasmáticos de dano oxidativo e muscular pode ser uma estratégia importante para evidenciar os mecanismos envolvidos no dano muscular induzido pelo exercício agudo, desde que as amostras sejam coletadas no tempo correto. Como já mencionado, nossos dados explicam, pelo menos parcialmente os resultados discrepantes freqüentemente encontrados na literatura. Além disso, baseados nas correlações observadas entre os biomarcadores analisados nas amostras de músculo sóleo e de sangue, podemos passar a utilizar somente amostras de sangue, um processo bem menos invasivo que a biópsia muscular, para medir indiretamente as conseqüências do estresse agudo induzido por um exercício físico realizado até a exaustão.

Esses resultados foram apresentados na forma de pôster no 48^a. Reunião Anual do Congresso Americano de Esportes. O resumo foi publicado na revista *Med & Science in Sports Exerc.* 33(5):S218. O manuscrito contendo este conjunto de dados está em fase final de revisão para posterior publicação.

III. SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS.

Para podermos padronizar o sensor, primeiramente, determinamos a atividade de concentrações crescentes da enzima GR, pelo método descrito por Smith *et al*, (1988). O resultado está descrito na Figura 15 e os parâmetros estatísticos foram: coeficiente de correlação linear $R = 0,9989$ e nível de significância $P < 0,0001$. Este resultado mostrou que a enzima utilizada no trabalho tinha uma boa atividade e as concentrações usadas estavam dentro da faixa de linearidade do método. A curva padrão obtida, foi utilizada para determinar a atividade enzimática nos outros experimentos.

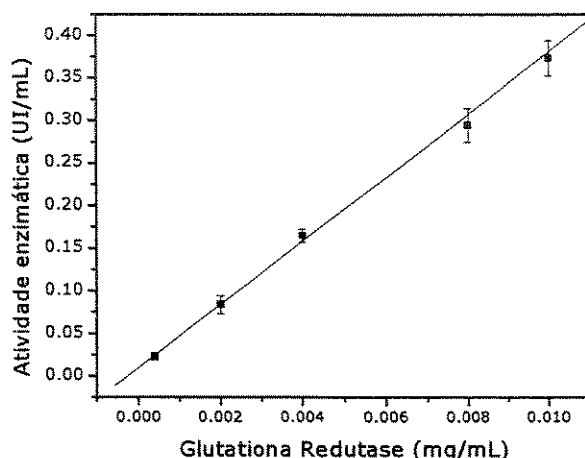


Figura 15. Curva Padrão de atividade da enzima glutatona redutase, usando o método espectrofotométrico descrito por Smith *et al* (1988). Concentrações crescentes da enzima (0,002 a 0,010 mg/mL), diluídas em tampão fosfato 0,2 M com EDTA 1 mM, pH 7,4, mais GSSG 40 mM, NADPH 4 mM, DTNB 3 mM.

Na Figura 16 mostramos que quando submetemos 0,05 mg/mL de enzima ao sensor, o aumento na corrente ocorre até 100 s e depois se estabiliza, indicando que é necessário pelo menos 100 s para que o sinal se estabilize. Embora o sinal já esteja estável após 2 minutos da adição da amostra, achamos por bem utilizar 3 minutos para garantir a estabilidade do sinal. Este resultado nos levou a estipular a medição da corrente, antes e 3 minutos após a adição da amostra.

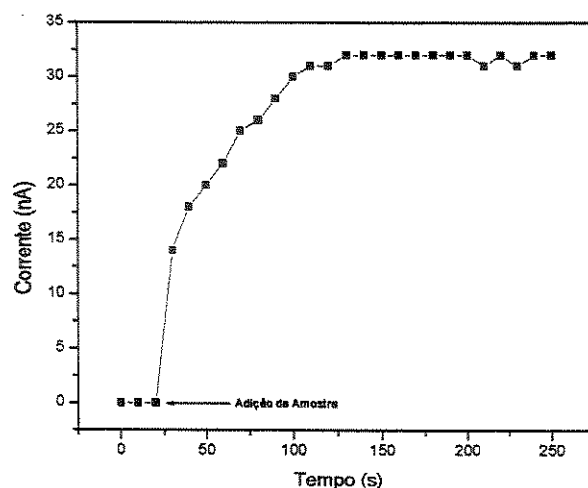


Figura 16. Efeito da adição de 0,05 mg/mL de GR sobre a corrente durante 4 minutos usando o potencial de -300 mV.

Para se determinar o potencial ideal de trabalho, submetemos concentrações crescentes da enzima (0-0,010 mg/mL) a quatro potenciais diferentes. A Figura 17 mostra a variação no coeficiente angular da reta média dos gráficos, que relacionam a concentração de enzima com a corrente (nA).

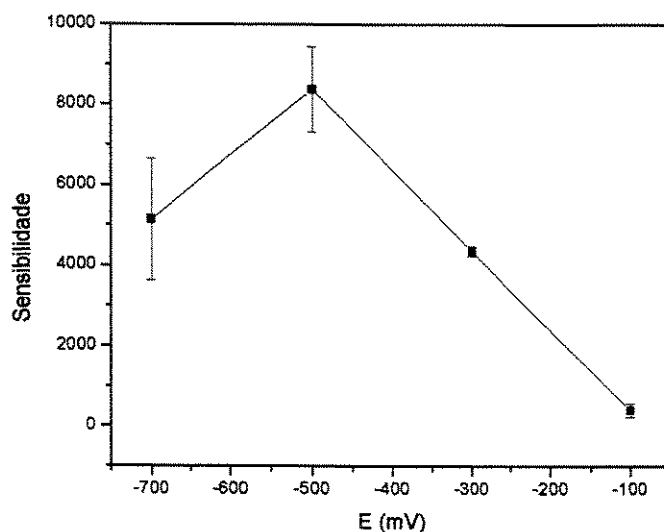


Figura 17. Variação da sensibilidade do método (coeficiente angular das retas) quando se submeteu concentrações crescentes da enzima GR (0,002 a 0,010 mg/mL), diluídas em tampão fosfato 0,2 M com EDTA 1 mM, pH 7,4, mais GSSG 40 mM, NADPH 4 mM e DTNB 3 mM em diferentes potenciais.

Estes dados indicam que o eletrodo parece ser mais sensível quando se utilizou o potencial de -500 mV. No potencial -300 mV o sensor apresentou uma menor sensibilidade, porém maior precisão que pode ser explicada pela diminuição da interferência de reações paralelas, que podem ser causadas por exemplo pelo O₂ no meio. Resultados prévios, feitos na ausência do DTNB não apresentaram correlação linear entre a concentração de enzima e a corrente, mesmo como o aumento de 10 vezes da concentração de NADPH (dados não apresentados). Smith *et al* (1988) compararam o ensaio da atividade da enzima GR por dois métodos, monitorando a queda da absorbância em 340 nm (oxidação do NADPH) ou o aumento em 412 nm (redução do DTNB). Estes autores mostraram que o aumento da absorbância em 412 é três vezes maior comparando-se com a queda em 340, para a mesma concentração de enzima, melhorando assim a sensibilidade do método.

Nossa explicação para a melhor eficiência do sensor na presença do DTNB é que como a reação do DTNB com a GSH também é uma reação de oxido/redução, poderia estar contribuindo para o aumento do sinal. Outra possibilidade é o fato desta reação consumir o produto da reação catalisada pela enzima, aumentando a eficiência da reação mesmo em baixas concentrações de NADPH.

Tabela IV. Efeito da adição de concentrações crescentes de GR na corrente, após 3 minutos da adição da amostra sob diferentes potenciais (n=5).

GR (mg/mL)	Corrente (nA)			
	-100 mV*	-300 mV**	-500 mV***	-700 mV****
0,002	4,97 ± 2,5	12,83 ± 1,1	32,20 ± 11,1	67,50 ± 15,2
0,004	4,63 ± 3,2	21,50 ± 4,2	51,25 ± 6,0	75,50 ± 24,7
0,008	5,30 ± 4,3	37,83 ± 4,7	69,00 ± 7,2	69,40 ± 19,0
0,010	4.80 ± 6,3	49,17 ± 5,5	89,33 ± 8,1	97,4 ± 7,8

*R=0,8097; P=0,0967; **R=0,9989, P>0,0001; ***R=0,9768; P=0,0042; ****R=0,8915; P=0,0422

A Figura 18 mostra a curva obtida e os parâmetros estatísticos, quando utilizamos o potencial de -300 mV na presença de DTNB ($R = 0,9989$ e $P < 0,0001$). Estes dados mostraram uma boa precisão ($n=5$). O intervalo de sensibilidade foi de 50 nA para 0,40 UI/mL de GR. Nestas condições, quando utilizamos o potencial de -300 mV, obtivemos desvios padrões menores e um coeficiente de correlação linear melhor quando comparado com os obtidos quando se utilizou o potencial -500, conforme mostrado na Tabela IV. Estes dados mostram que os resultados no potencial -300 mV são mais precisos do que no potencial -500 mV.

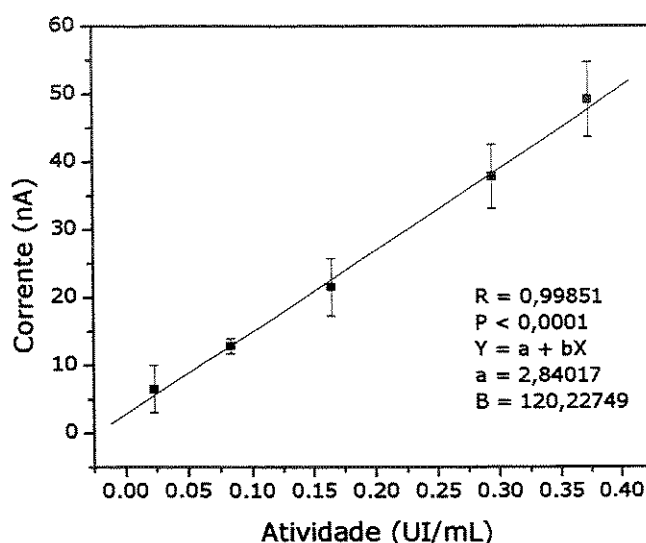


Figura 18. Efeito da adição do aumento da atividade enzimática da GR sobre a corrente, após 3 minutos da adição da amostra (0,002 a 0,010 mg/mL), diluídas em tampão fosfato 0,2 M com EDTA 1 mM, pH 7,4, mais GSSG 40 mM, NADPH 4 mM e DTNB 3 mM. Voltagem aplicada = -300 mV.

Na Figura 19, podemos verificar que os parâmetros estatísticos ($r=0,98101$ e $P < 0,00313$) indicam que quando se utilizou o potencial de -500 mV, o método foi mais sensível quando comparado com os dados obtidos quando se usou uma voltagem de -300 mV, porém menos preciso. Quando se usou a voltagem de -700 mV e -100 mV, os resultados obtidos não foram satisfatórios, visto que os desvios foram muito grandes e não apresentaram diferenças estatísticas entre as cinco diferentes concentrações utilizadas (Tabela IV).

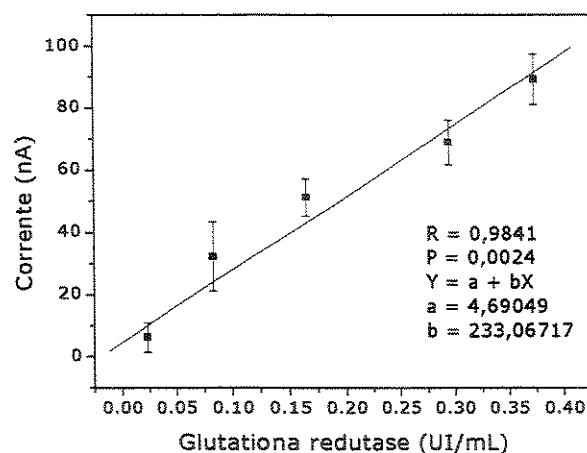


Figura 19. Efeito do aumento da atividade enzimática da GR sobre a corrente, após 3 minutos da adição da amostra (0,002 a 0,010 mg/mL), diluídas em tampão fosfato 0,2 M com EDTA 1 mM, pH 7,4, mais GSSG 40 mM, NADPH 4 mM e DTNB 3 mM. Voltagem aplicada = -500 mV.

Diante dos dados descritos acima, decidimos utilizar o potencial de -300 mV para os experimentos mostrados a seguir, porque neste potencial obtivemos uma boa precisão e uma sensibilidade comparável ao método espectrofotométrico. O gráfico da Figura 18 foi então utilizado como curva-padrão para as dosagens das amostras.

A Figura 20 mostra que o sensor foi sensível para mostrar o comportamento da enzima quando submetida a diferentes pHs, mostrando que no pH=7,4 a enzima teve maior atividade, confirmando a literatura, já que esse pH está muito próximo do pH ótimo da enzima (Pai e Schultz, 1983).

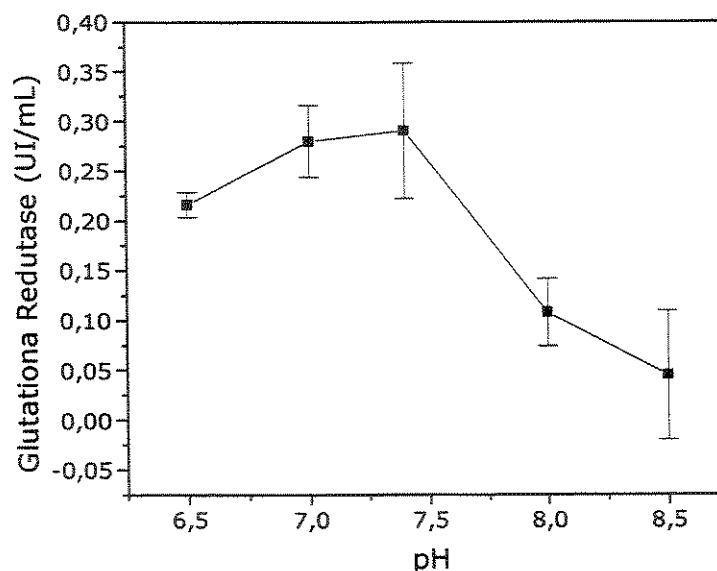


Figura 20. Efeito da variação do pH do meio de reação sobre a atividade da enzima GR na corrente, após 3 minutos da adição da amostra. A voltagem utilizada foi -300 mV.

Além disso, o sensor também foi sensível à inibição da GR pelo inibidor safranina-A. Este composto é um inibidor não competitivo desta enzima, ligando-se a um sítio específico já conhecido promovendo a inibição da enzima (Savvas *et al*, 1996). Os dados da Tabela V mostram que 0,3 mM de Safranina-A promoveram a inibição de 63,76 % da enzima e 6 mM de safranina inibiram totalmente o sinal. Este resultado mostra que o que está aumentando a corrente, nos resultados sem inibidor é realmente a atividade da enzima GR, já que este inibidor, apesar de ser não competitivo é bastante específico (Karplus *et al*, 1989).

Tabela V. Efeito da inibição da enzima GR pelo inibidor não competitivo safranina-A GR 0,010 g/mL diluída em tampão fosfato 0,2 M com EDTA 1 mM, pH 7,4, mais a adição de GSSG 40 mM, NADPH 4 mM, DTNB 3 mM.

[Safranina-A] mM	Atividade da enzima glutationa redutase (IU/mL)
0,0	0.24 ± 0,01
0,3	0.09 ± 0,70
6,0	0,0 ± 0,0

Para testar a aplicabilidade do sensor, foram analisadas amostras de sangue de atletas humanos. A Tabela VI mostra o comparativo entre o método espectrofotométrico, descrito por Smith *et al* (1988) e o sensor aqui descrito. Estes resultados mostram que o sensor é bastante fidedigno (desvio < 10 % em relação ao espectrofotômetro). Existe uma correlação direta entre os valores obtidos pelos dois métodos ($R = 0,97385$ e $P < 0,0001$).

Tabela VI. Comparação dos valores de atividade da enzima GR obtidos pelo método proposto (amperométrico) com os obtidos pelo método de referência (espectrofotométrico) em hemolisado de hemácias. Os valores são a média de 3 medidas.

Amostras de hemolisado	Atividade da enzima GR (UI/mL)		Desvio Relativo (%) [*]
	Espectrofotômetro ^{**}	Sensor ^{***}	
1	0.102 ± 0,004	0,096 ± 0,02	-5.6
2	0.120 ± 0,006	0.109 ± 0,04	-9.7
3	0.138 ± 0,01	0.137 ± 0,04	-0.1
4	0.132 ± 0,01	0.126 ± 0,03	-4.2
5	0.114 ± 0,02	0.122 ± 0,05	6.8
6	0.106 ± 0,04	0.104 ± 0,02	-2,1
7	0.152 ± 0,02	0.146 ± 0,02	-3.8
8	0.176 ± 0,04	0.169 ± 0,05	-4.0

* Desvio Relativo entre os valores obtidos pelo sensor e o método espectrofotométrico.

** Método de referência (espectrofotométrico) usando DTNB ($\lambda = 412$ nm)

*** Sensor ($E_{apl.} = -300$ mV)

É importante destacar o baixo custo dessas análises, já que no sensor usam-se apenas 7 μ L de meio de reação, ao passo que no espectrofotômetro se usaria, no mínimo 1 mL. O volume de amostra também é muito menor, pois para preparar 3 μ L de hemolisado de hemácias pode-se usar uma gota de sangue, retirada do dedo ou do lóbulo da orelha do sujeito. Isto permite que a análise seja feita "in situ", garantindo diagnósticos mais rápidos e fidedignos, além de permitir uma intervenção mais rápida, visando neutralizar os efeitos do estresse. Desta forma, a resposta obtida com este sensor permitiria a intervenção rápida da equipe técnica durante o treinamento de atletas. Caso a atividade da GR em um atleta estivesse abaixo dos valores de referência, o atleta seria individualizado do treino coletivo e submetido a um treinamento mais leve, para fortalecer o sistema antioxidante. A recuperação também pode ser acompanhada pelo aumento na atividade desta

mesma enzima. Após a recuperação do sistema antioxidante, o atleta poderia então voltar a carga de treino prevista para o grupo, na certeza de que seu sistema de defesa antioxidante está preparado para isso.

Para outras situações envolvendo aumento na produção de EROs, tais como processos inflamatórios, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) etc, a utilização deste sensor também permitiria, de forma rápida, precisa, prática e econômica o monitoramento dos níveis de estresse oxidativo, importante tanto para o diagnóstico quanto para avaliar a evolução do tratamento e a recuperação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
- Alessio, H. M. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exercise* 25: 218-224.
- Alessio, H. M., Goldfarb, A. H. (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J. Appl. Physiol.* 64:1333-1336.
- Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Fulkerson, B. K., Ambrose, J., Rice, R. E., Wiley, R. L. (2000) Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exercise* 32: 1576-1581.
- Andersen, H.R., Nielsen, J.B., Nielsen, F., Grandjean, P. (1997) Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chem.* 43: 562-568.
- Andrade, F. H., Reid, M. B., Allen, D. G., Westerblad, H. (1998) Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibers from mouse. *J. Physiol. (Lond)* 509: 565-575.
- Apple, F. S., Hellsten, Y., Clarkson, P. M. (1988) Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. *Clin. Chem.* 32: 41-44.
- Asmus, K. D. (1979) Stabilization of oxidized sulfur centers in organic sulfides, Radical cations na odd-electron sulfur-sulfur bonds. *Acc. Chem. Res.* 12: 436-442.
- Astrand, P. O., Rodahl, K. (1986) In: *Textbook of work physiology: Physiological bases of exercise*. McGraw-Hill, New York.
- Aust, S.D. Svingen, B.A., Tien, M. (1982) An investigation into the role of hydroxyl radical in xanthine oxidase-dependent lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 216:142-151.
- Austin, L., Arthur, H., De Niese, M., Gurunsih, A., Baker, M. S. (1988) Micromethods in single muscle fibers: 2. Determination of glutathione reductase and glutathione peroxidase. *Anal. Biochem.* 174: 575-579.
- Bakker, E., Telting-Diaz, M. (2002) Electrochemical sensors. *Anal. Chem.* 74: 2781-2800.
- Balon, T.W. and Nadler, J.L. (1994) Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J. Appl. Physiol.* 77: 2519-2521.
- Bejma, J., Ji, L. L. (1999) Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle *J. Appl. Physiol.* 87: 465-470.
- Bompa, T.O. (2000) In: *Periodização Teoria e Metodologia do Treinamento*. Phorte Editora Ltda.

- Braun, H. P., Deneke, U., Rittersdorf, W., (1983) Analytical performance of reflotron-R creatine-kinase reagent carriers compared with the CK-NAC-method. *Clin. Chem.* 33:988-988.
- Bruin, G., Kuipers, H., Keizer, H.A., Vandervusse, G.J. (1994) Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. *J. Appl. Physiol.* 76:1908-1913
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Meth. Enzymol.* 113: 484-490.
- Clarkson, P. M., Tremblay, I. (1988) Exercise-Induced muscle damage, repair and adaptations in humans. *J. Appl. Physiol.* 65:1-6.
- Companhone, D., Federici, G., Scarciglia, L., Palleschi, G. (1994) Flow through analysis of glutathione in human erythrocytes with a amperometric biosensor. *Anal. Lett.* 27: 15-27.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., Packer L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:1198-1205.
- Davies, M. J., Fu, S., Wang H., Dean, R.T. (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 1151-1163.
- Dean R. T., Nick, H. P., Schnebli, H. P. (1989) Free radicals inactive human neutrophil elastase and its inhibitors with comparable efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 821-827.
- Dean, R. T., Geiseg, S., Davies, M.J. (1993) Reactive-species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 437-441.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324: 1-18.
- Essig, D. A., Nosek, T. M. (1997). Muscle Fatigue and Induction of Stress Proteon Genes: A dual Function of Reactive Oxygen Species. *Can. J. Appl. Physiol.* 22: 409-428.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-128.
- Fatibello-Filho, O., Capelato, M. D. (1992) Biossensores *Química Nova* 15: 28-39.
- Faure, P., Lafond, J.L. (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: *Analysis of free radicals in biological systems*. Favier A. E. et alii eds. Verlag, Boston, 237-248.
- Frankiewicz-Jozko, A., Faff, J., Sieradzan-Gabelska, B. (1996). Changes in concentration of tissues free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74: 470-474.

- Fry, R. W., Morton A. R., Garciawebb, P., Crawford, G. P. M., Keast, D. (1992) Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur. J. Appl. Physiol.* 64: 335-344.
- Fu, S., Gebicki, S., Jessup, W., Gebicki, J.M., Dean, R. T. (1995) Biological fate of amino acid peptide and protein hidroperoxides. *Biochem. J.* 311-821-827.
- Fu, S. L., Dean, R. T. (1997) Strutural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins. *Biochem. J.* 324-41-48.
- Garrison, W. M. (1987) Radiation mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chem. Rev.* 87: 381-398.
- Gebicki, S., Gebicki, J. M. (1993) Formation of peroxides in aminoacids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.* 289: 743-749.
- Geiseg, S. P., Simpson, J. A., Charlton, T.S., Duncan, M.W., Dean R.T. (1993) Protein bound 3-4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins *Biochem.* 32: 4780-4786.
- Goldhaber, J. (1996) Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *Am.J.Physiol.* 271: H838-H833..
- Goto, S., Nakamura, A., Radak, Z., Nakamoto, H., Takahashi, R., Yasuda, K., Sakurai, Y., Ishii, N. (1988) Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approachs. *Mech. Age Dev.* 107: 245-253.
- Gutteridge, J. M. C. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence, *Free Rad. Res. Commun.*, 19: 141-158.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1998). In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2^a ed. Oxford University Press.
- Hawkins, P. T., Poyner, D. R., Jackson, T. R., Letcher, A., J. Lander D. A., Irvine, R. F., (1993) Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates- a possible physiological-funtion for myoinositol hexakisphosphate. *Biochemical J.* 294: 929-934.
- Holloszy J. A., Booth F. W. (1976) Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 38: 273-291
- Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell* 88: 333-346.
- Iuliano, L., Violi, F., Pedersen, J. Z., Praticò, G. R., Balsano, F. (1992). Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. *Arch. Biochem. Biophys* 299: 220-224.
- Jacobs, I., Esbjörnsson, M., Sylvén, C., Holm, I. and Jansson, E. (1987). Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fibres types and blood lactate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 19:368-374.

- Jeffries, H. B. J., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., Thomas G. (1997) Rapamycin supresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70^{S6k}. *EMBO J.* 16: 3693-3704.
- Jeffries, H. B. J., Thomas, G. (1996) Ribossomal S6 protein phosphorylation and signal transduction. In: *Translational Control*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory press, p. 389-409.
- Jenkins R. R. (1988) Free-Radical Chemistry – Relationship to exercise. *Sports Med.* 5: 156-170.
- Jenkins, R. R., Krause, K., Schofield, L. S. (1992) Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 213-217.
- Ji, L. L. (2002) Increasing healthy life span: conventional measures and slowing the innate aging process. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959: 82-92.
- Ji L. L., Fu R. G. (1992) Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J. Appl. Physiol.* 72: 549-554.
- Kanter, M. M., Kaminsky, L. A., Laham-Saeger, J., Lesmes, G. R., Nequin, N. D. (1986) Serum enzyme levels and lipid peroxidation in ultra marathon runners. *Ann. Sports Med.* 3: 39-41.
- Karplus, P. A., Schulz, G. E. (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione-reductase as derived from refined enzyme-substrate crystal-structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 210: 163-180.
- Knight, J. A. (1995). Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25: 111-121.
- Kornbrust, D. J., Mavis, R. D. (1980) Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain, and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. *Lipids* 15: 315-322.
- Kosenko, E. A., Kaminsky, Y. G., Stavroskaya, I. G., Sirota, T. V., Kondrashova, M. N. (1997) The stimulatory effect of negative air ions and hydrogen peroxide on the activity of superoxide dismutase. *FEBS Lett.* 410: 309-312.
- Kuipers, H., Keizer, H. A. (1988) Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. *Sports Med.* 6: 79-92.
- Kulys, J., Drungiliene, A. (1991) Chemically modified electrodes for the determination of sulfhydryl compounds. *Anal. Chim. Acta* 243: 287-292.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P. A., Holloszy, J. O., Heinecke, J. W. (1999) Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 186-192.

- Lehmann, M., Foster, C., Dickhuth, H. H. and Gastmann, U. (1998) Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30:1140-1145.
- Loach, P.A. In: Fassman, G.D. (Ed.) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* 3^a Ed. Physical and Chemical Data, Vol. I, pp 123-130, CRC Press (1976).
- Maskos, Z., Rush, J. D., Koppenol, W. H. (1992) The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: a comparison with salicylate and tryptophan. *Arch.Biochem. Biophys.* 261: 521-529.
- Maughan, R. J., Donnelly, A. E., Gleeson, M. (1989) Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve.* 12: 332-336.
- McDonagh, M. J. N., Davies C. T. M. (1987) Adaptative responses of mammalian skeletal muscle to exercise with high loads. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56: 178-198.
- Nader G. A., Esser K. A. (2001) Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J. Appl. Physiol.* 90: 1936-1942.
- Nalini, B., Narayanan, S. S. (1998) Electrocatalytic oxidation of sulfhydryl compounds at ruthenium (III) diphenyldithiocarbamate modified carbon pasta electrode. *Electroanalysis* 10:779-793.
- Navarro-Arévalo, A., Canavate, C., Sanchez-del-Pino, M. J. (1999) Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mech. Age. Dev.* 108:207-217.
- Navarro-Arévalo A., Sánchez-del-Pino M. J. (1998) Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and solues muscle tissues of rats. *Mech. Age. Dev.* 104:91-102.
- Neto, G. O., Yamanaka, H. (1988) Enzimas e materiais biológicos imobilizados. *Química Nova* 11: 432-435.
- Neuzil J., Gebicki J. M., Stocker, R. (1993) Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibitors by antioxidants. *Biochem. J.* 293: 601-606.
- Ohkawa, H., Nobuko, O., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358.
- Ortenbald N., Madsen K., Djurhuus, M. S. (1997) Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am. J. Physiol.* 272: R1258-R1263.
- Pai, E. F., Shultz, G. E. (1983) The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* 258: 1752-1757.
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M. D., Remacle, J. (1990) Glutathione-peroxidase,

superoxide-dismutase and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 51: 283-279.

Powers, S. K., Ji, L. L., Leeuwenburg, C. (1999) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exercise* 31:987-997.

Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L. L., Martin, D., Herb, R. A. Dudley, G. (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266: R375-R380.

Purdie, J. W. (1967) γ -Radiolysis of cysteine in aqueous solution. Dose-rate effects and a proposed mechanism *J. Am. Chem. Soc.* 89: 226-230.

Pyne, D. B. (1994). Exercise-induced muscle damage and inflammation: A review. *Australian J. Sci. Med. Sports*, R6: 49-58.

Radak, Z., Nakamura A., Nakamoto, H., Assano, K.,; Ohno, H., Goto, S. (1998) A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lung of rats. *Pflug. Arch. Eur.J. Phy.* 435: 439-442.

Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvári, M. Nyakas, C., Goto, S. (1999) The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 69-74.

Radák, Z., Sasvari, M., Nyakas, C. Taylor, A.W., Ohno, H., Nakamoto, H., Goto, S. (2000) Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 383(1): 114-118.

Reid, M. B. (1998) Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol. Scand.* 162: 401-409.

Reid, M. B. (2001) Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: What we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90: 724-731.

Reid, M. B., Durham, W. J. (2002) Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle – Potential impact on aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959:108-116.

Reid, M. B., Khawli, F. A., Moody, M. R. (1993) Reactive oxygen in skeletal muscle III. Contraility of unfatigued muscle. *J. Appl. Physiol.* 75: 1081-1087.

Rover Junior L. Höer, N. F., Vellasco A. P., Kubota, L. T. (2001a) Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova* 24:112-119.

Rover Junior, L., Kubota, L. T., Höehr, N. F. (2001b) Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for the analysis of reduced glutathione from serum. *Clin.Chim. Acta* 308:55-67.

Sahlin, K. Ekberg, K. Cizinsky, S. (1991) Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol. Scand.* 142:275-281.

Savvas, N. S., Karplus, P. A. (1996) Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor.

Saxton, J. M., Donnelly, A. E., Roper, H. P. (1994) Indices of free radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *J. Appl. Physiol.* 68: 189-193.

Sen, C. K. (1995) Oxidants and antioxidant in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79: 675-686.

Simpson, R. J., Cooper, C. E., Rafa, K. B., Halliwell B., Evans, P. J., Auruoma, O. I., Sing, S., Konjin, A. M. (1992) Non-transferrin bound iron species in the serum of hypotransferrinemic mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1156: 19-26.

Sjödin, B., Wesling, H., Apple, S. (1990) Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 10: 236-254.

Smith, I. K., Vierheller, T. L. Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.

Smolka, M. B., Zoppi, C. C., Alves, A. A., Silveira L. R., Marangoni, S., Pereira-da-Silva, L., Novello, J. C., Macedo, D.V. (2000) HSP72 as a complementary protection against exercise induced stress in the muscle of rats. *Am. J. Physiology* 279: R1539-R1545.

Stadtman, E. R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science.* 257: 1220-1224.

Stadtman, E. R. (1993) Oxidation of free amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalysed reactions. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 797-821.

Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2000) Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:191-208.

Suzuki, J. Y., Forman, H. J., Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 269-285.

Tauler, P., Gimeno, I., Aguilo, A., Guix, M. P., Pons, A. (1999) Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 438:782-787.

Tergtbur, U. (1993) Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med. Sports Exerc.* 25:620-627

- Tews, D. S., Goebel, H. H., Schneider, I., Gunkel, A., Stennert, E., Neiss, W. F. (1997) DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. *Neuropath. Appl. Neuro.* 23: 141-149.
- Thesch P.A. (1987) Acute and long-term metabolic changes consequent to heavy-resistance exercise. In *Medicine and Sport Science Series*, Ed. Hebbelink M., Shefard R.J. Basel: Krager, Vol. 26 p. 67-89
- Tiitus, P.M. (1998) Radical species in inflammation and overtraining. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76: 533-538.
- Uchida, K., Kawakishi, S. (1993) 2-oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins *FEBS Lett.* 332:208-210.
- Urhausen, A., Kindermann, W. (2002) Diagnosis of overtraining What tools do we have? *Sports Med.* 32:96-102.
- Viinika, L., Vuori, J., Ylikorkala, O. (1984) Lipid peroxides, protacyclin, and thromboxane A₂ in runners during acute exercise. *Med. Sci. Sport Exercise* 16: 275-277.
- Volfinger, L., Lassourd, V., Michaux, J. M., Braun, J. P., Tourtain, P. L. (1994). Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *Am. J. Physiol.* 266: R434-R441.
- von Sonntag, C. (1987) In: *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London.
- von Sonntag, C. (1990) Free-radical reactions involving thiols and disulphides. In: *Sulfur-Centered Reactive intermediates in Chemistry na Biology*. Edited by C. Chatilialoglu and K. D. Asmus. Pp 359-366, Plenum: New York.
- Weineck, J. (1989). Manual do treinamento esportivo. São Paulo: ed. Manole, 2ª ed.
- Wring, A. S., Hart, J. P., Birch, B. J. (1989) Development of an improved carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine as a reusable sensor for glutathione. *Analyst* 114: 1563-1570.
- Yagi, K. (1976). A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216.
- Yagi K.(1987) Lipid peroxides and human diseases. *Chem. Phys. Lipids* 45: 337-351.
- Zatsiorsky, V. M., Sirota, M. G., Prilutsky, B. I., Raitsin, L. M., Seluyanov, V. N., Chugunova, L. G. (1985) Body biomechanics and movements after 120-day head-down tilt. *Kosm. Biol. Aviak. Med.* 19:23-27.
- Zerbetto, E., Vergani, L., Dabbeni-Sala, F. (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 18: 2059-2064.

ANEXO I

HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats

MARCUS B. SMOLKA, CLAUDIO C. ZOPPI, ARMINDO A. ALVES,
LEONARDO R. SILVEIRA, SERGIO MARANGONI, LUCIA PEREIRA-DA-SILVA,
JOSÉ C. NOVELLO, AND DENISE V. MACEDO

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade
Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil*

Received 23 September 1999; accepted in final form 13 June 2000

Smolka, Marcus B., Claudio C. Zoppi, Armino A. Alves, Leonardo R. Silveira, Sergio Marangoni, Lucia Pereira-Da-Silva, José C. Novello, and Denise V. Macedo. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R1539–R1545, 2000.—Given the potential of reactive oxygen species to damage intracellular proteins during subsequent bouts of muscle contractions, it was suggested that, when this production exceeds the antioxidant capacity, the preexisting antioxidant pathways may be complemented by the synthesis of the defense mechanism represented by heat shock proteins (HSPs), stress proteins with the function of repair and maintaining protein folding. To test this hypothesis, we analyzed reactive carbonyl derivatives in plasma and the expression of HSP72 and activities of enzymes from the oxidative and antioxidant defense systems in the soleus muscle of sedentary rats and rats trained by two protocols: continuous and intermittent. We analyzed all three groups at rest and 2 h after acute exercise. After 8 wk of training, the animals from both groups clearly demonstrated higher resistance to exercise. Both trained groups showed significantly higher citrate synthase, catalase, and glutathione reductase activities than the control group ($P < 0.01$). After acute exercise, catalase and glutathione reductase activities significantly decreased ($P < 0.01$) and plasma reactive carbonyl derivatives significantly increased ($P < 0.05$) in the sedentary group, suggesting an oxidative-stress condition as responsible for exhaustion in this group. Finally, after acute exercise, the induction of HSP72 expression occurred only in the sedentary group, suggesting that HSP72 acts as a complementary protective mechanism in exercise-induced oxidative stress.

heat shock protein 72; reactive carbonyl derivatives; catalase; glutathione reductase; intermittent training; continuous training

MANY GENERATED STRESS CONDITIONS can result, at the molecular level, in a fast production of heat shock proteins (HSPs), stress proteins with the chaperone function of maintaining and repairing protein conformation. Despite the name, these proteins are impli-

cated not only in the protection of cells from heat stress, but also against different types of proteotoxic insults such as oxidative stress, exposure to amino acid analogs, heavy metals, and others (12, 37). Some of these insults, such as oxidative stress, heat stress, and low pH resulting from lactic acid accumulation, are generated during exercise (7, 19, 25, 27, 32). Thus HSP expression could represent an important protection mechanism against exercise-induced damage to muscle. The induction of HSPs is well established in many organisms and some tissues, but the importance of such proteins in the protection against exercise stress in skeletal muscle, especially oxidative stress, is a topic that needs further study. It was shown that sedentary rats submitted to a bout of intense exercise have increased muscular expression of HSP72 after a period of 2 h (12, 19, 25, 28), indicating that HSP72 is rapidly synthesized in response to exercise stress. Moreover, ischemia-reperfusion studies in the cardiac muscle provide evidence for a direct role of HSP72 in the prevention of oxidative-stress damage in this tissue (16, 20, 33).

Increased energy demand during physical exercise induces a multifold increase in oxygen supply to active tissues (26). This results in an increased production of reactive oxygen species (ROS), mainly due to elevated rates of mitochondrial respiration and increased xanthine oxidase activity (27). When ROS production overcomes the capacity of the antioxidant defense system, an oxidative stress occurs and many cellular constituents, such as lipids, proteins, and DNA, may suffer oxidation due to ROS attack, deeply compromising cellular functions. There is a large variety of biochemical parameters affected by an increased level of ROS. It includes the oxidation of one or more proteins of the excitation-contraction-coupled process (5) and the production of protein reactive carbonyl derivatives, leading to loss of catalytic activity and increased susceptibility to proteolytic degradation, as already described under different pathophysiological conditions (24). Moreover, free radical formation and lipid peroxidation

Address for reprint requests and other correspondence: D. Macedo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 3083-970, Brasil (E-mail: Labex@unicamp.br).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

observed after a bout of exhaustive exercise performed by sedentary or trained rats led to the proposition of a cause-and-effect relationship between oxidative stress and muscle fatigue (7, 27, 35). The occurrence of fatigue, however, seems to be dependent on the exercise conditions (e.g., intensity, type, duration) used in different studies (26).

A fundamental change in skeletal muscle in response to endurance training is the up adaptation in the antioxidant and oxidative enzyme activities (6, 23, 26, 34, 35). These and other adaptations seem to minimize disruption of homeostasis during an exercise bout, permitting the performance of physical work for a longer duration before fatigue (4). Thus increased activity of antioxidant defense system during physical work could contribute to a delay in the time required for the oxidative process to impair cell functions. The potential of ROS to damage intracellular proteins during subsequent bouts of muscle contractions led to the hypothesis that the preexisting antioxidant pathways may be complemented by the synthesis of another defense mechanism represented by HSPs (9).

To test this hypothesis, we analyzed the expression of HSP72, the activity of enzymes from the oxidative and antioxidant defense systems in the soleus muscle, and the plasma reactive carbonyl derivatives of sedentary rats and rats trained for 8 wk by two different protocols: continuous (CT; moderate intensity) and intermittent (IT; high intensity). The same parameters were also investigated after submitting all groups to a bout of exercise that led the control group of animals to exhaustion. Our objective was to investigate a possible relationship among HSP72 expression, biomarkers of oxidative stress, and the adaptation of the soleus muscle to training.

MATERIAL AND METHODS

Animals. The experiments were performed using 2-mo-old male Wistar rats. They were maintained on an inverted 12-h light-dark cycle at 22°C with food and water ad libitum.

Exercise training protocol. Thirty rats that showed willingness to run on a motorized treadmill were randomly assigned to a sedentary control group (Sed) or to one of two exercise training groups (10 animals in each group). IT or CT exercise training protocols were used as outlined in Table 1. Forty-eight hours after the end of the 8-wk training period, five rats from each of the three groups were also submitted to 82 min of exercise (EX), as described in Table 2, 82 min being the maximum time that the Sed rats could run before exhaustion, when they refused to continue running.

Table 2. Protocol of 82 min acute exercise

Time, min	Speed, m/min
0-5	10
6-10	15
11-25	20
26-27	0 (pause)
28-32	10
33-37	15
38-52	20
53-62	25
63-82	30

Grade was always -3°.

Muscle samples. The soleus muscles were removed either 48 h after the end of the training protocol (5 animals) or 2 h after running in the case of the rats submitted to the EX protocol (5 animals), enabling comparison of a resting situation (48 h after exercise) with an intense exercise situation under which HSP72 accumulation occurs 2 h after exercise (12, 19, 25, 28). Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate 10% (wt/vol), 0.3 ml for each 100 g of body weight, and right and left soleus muscles were carefully dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at -70°C until further analysis. The left muscles were used for the biochemical assays, and the right muscles were used for HSP72 analysis.

Enzyme assays. All tissue samples were homogenized in a solution of (in mM) 440 cold sucrose, 50 MOPS, 0.01 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 100 EDTA (pH 7.2). Homogenization was performed using a polytron homogenizer at its highest speed for 30 s. Homogenates were then centrifuged (4°C) for 20 min at 40,000 g (38). The supernatant was decanted and assayed for citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7), glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2), and catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activities as biomarkers of oxidative metabolism and antioxidant system, respectively. We choose these antioxidant enzymes because the methods to measure CAT and GR activities are less sensitive to small variations in reagent concentrations; in these assays, they are not rate limiting (3). All enzyme assays were performed in triplicate according to the following methods.

CS activity was measured in a medium containing 0.1 mM DTNB and 0.3 mM acetyl CoA by monitoring the decrease in absorbance at 412 nm for 3 min after the addition of 0.5 mM oxaloacetic acid (30). The soleus CS activity was expressed as international units per milligram wet tissue. GR activity was measured in a 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 2 mM EDTA, 0.1 mM NADPH, and 0.75 mM DTNB. Glutathione disulfide (1 mM) was added into the cuvette to start the reaction, and the absorbance was followed at 412 nm for 3 min (29). The soleus GR activity was expressed as international units per milligram wet tissue. CAT activity was

Table 1. Treadmill training protocols

Training Protocol Week of Training	Continuous		Intermittent			
	Speed, m/min	Duration, min	Speed, m/min	Duration, min	Pause, min	Number of runs
1	15	20	20	4 × 5	2	4
2	20	30	30	4 × 2, 5	1	4
3	22, 5	45	32, 5	2, 5	1	6
4	25	60	35	2, 5	1	6
5-8	25	60	35	2, 5	1	6

Animals trained 5 days/wk. Grade was always -3°.

measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm for 30 s after the addition of 10 mM hydrogen peroxide. One unit of catalase activity is the amount of enzyme present that decomposes 1 μM H_2O_2 /min at 25°C (1).

Plasma samples. The blood samples (5 ml) were collected through hepatic vein using heparinized syringes. Plasma was separated from blood cells by centrifugation at 1,000 g for 10 min, transferred to a fresh tube, and stored at -80°C until analysis.

Plasma reactive carbonyl derivatives. The plasma reactive carbonyl derivatives were determined by carbonyl reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), using the spectrophotometric method (10). Plasma (200 μl) was mixed with 1 ml H_2O and 2 ml 20% TCA and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was resuspended in 1 ml of 10 mM DNPH and incubated for 60 min at 37°C. For control, 1 ml of 1 M HCl was used instead of DNPH. Subsequently, 1 ml of 20% TCA was added, and the sample was centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was washed with 1:1 ethanol-ethyl acetate solution and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet was mixed with 1 ml of 6 M guanidine (diluted in 20 mM H_2PO_4 , pH 2.3). Finally, the sample was incubated for 40 min at 37°C. The absorbance was measured at 380 nm. The analyses were done in triplicate, and the mean was used for statistical analysis.

HSP72 analysis. The whole right muscle was carefully minced and homogenized at 4°C in three volumes (wt/vol) of a buffer (pH 7.2) containing (in mM) 300 NaCl, 100 KH_2PO_4 , 50 K_2HPO_4 , 10 EDTA, and 2 PMSF. The homogenate was sonicated in an ice bath for 5 min and then centrifuged at 500 g for 5 min. The supernatant was diluted 1:1 in sample buffer (pH 6.8) containing 180 mM Tris-HCl, 30% glycerol, 6.9% SDS, and 200 mM dithiothreitol. These samples were stored at -20°C until SDS-PAGE separation using 11% acrylamide gels, in which 80 μg of total muscle protein was loaded. The gels were used either for total protein staining using Coomassie blue or for electrotransfer of proteins to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Waters) using a TE minigel transfer system (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). After protein transfer, PVDF membranes were blocked with 5% nonfat dried milk powder in Tris-buffered saline (TBS; 150 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) for 1 h. Blots were washed for 1 min in TBS + 0.05% Tween 20 (TBST) and incubated overnight at 4°C with a monoclonal antibody specific for HSP72 (SPA-810, StressGen, Canada) diluted 1:1,000 with TBST. The membranes were then washed three times (10 min each) with TBST and incubated for 1 h with the secondary antibody (goat anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase; Promega) diluted 1:2,000 in TBST. Blots were washed three times (10 min each) in TBST and developed by immersion in a buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl_2 , pH 9.8) containing commercially specified amounts of *p*-nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (both from Promega). Quantification of bands from blots was performed by scanning with a Sharp scanner and using the computer program ImageMaster 1D Elite (Amersham Pharmacia). Linearity was analyzed by standard curves.

Statistical analysis. The data are expressed as means $\pm$ SE (indicated by vertical bars in the figures). Each group was composed of five animals. The program "Statistics for Windows" version 4.3 (Statsoft, 1993) was used for statistical analysis using $P < 0.01$ and $P < 0.05$ as the confidence limit.

RESULTS

The effect of different training protocols and a bout of exhaustive exercise on oxidative metabolism. Figure 1 shows the soleus CS activity of the three groups (Sed, CT, and IT) measured at the end of the 8-wk training period. The activities were determined either at rest (48 h after the last exercise of the training protocol in the case of the trained rats) or 2 h after EX. We can observe that the different training protocols resulted in different degrees of increased oxidative capacity. The IT group showed significantly higher CS activity compared with the CT group. Compared with the Sed group, muscle CS activity was 3.75-fold higher for the CT and 5.5-fold higher for the IT group. The data also show that, compared with the respective resting value, no significant variation on CS activity occurred after EX for all groups examined.

The effect of different training protocols and a bout of exhaustive exercise on biomarkers of oxidative stress. Figure 2 shows plasma reactive carbonyl derivatives (RCD) as a biomarker of protein oxidative attack (Fig. 2A) and the activities of soleus enzymes GR and CAT as biomarkers of an antioxidant system (Fig. 2, B and C) measured under the same experimental conditions described for the CS activity. We can observe that, after 8 wk of training, a significant increase in plasma RCD occurred only in the IT group compared with control group (Fig. 2A). On the other hand, the activities of the antioxidant system were significantly greater in both trained groups (Fig. 2, B and C), although a significantly higher increase was found in CT compared with either IT (1.6-fold for GR and 1.5-fold for CAT) or control groups (3.3-fold for GR and 5.2-fold for CAT). We can also observe that 2 h after EX, only in the Sed group, the activities of the antioxidant enzymes GR and CAT significantly decreased compared with the resting values. For both trained groups, there was no significant decrease in the activities of GR or CAT.

Figure 3 shows the 48-h kinetics of plasma RCD in Sed group after EX. We can observe a peak after 6 h that could reflect the ROS-induced damage in the tis-

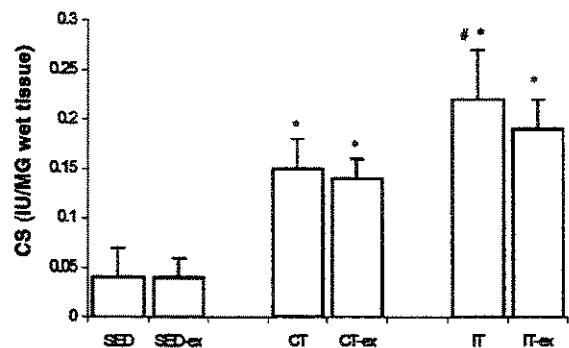


Fig. 1. Soleus citrate synthase (CS) activity (IU/mg wet tissue) of the 3 groups at rest and after 82 min acute exercise. SED, sedentary rats; CT, continuous trained rats; IT, intermittent trained rats; ex, 2 h after acute exercise. Data are means $\pm$ SD ($n = 5$). * $P < 0.01$ compared with SED group. # $P < 0.01$ compared with CT group.

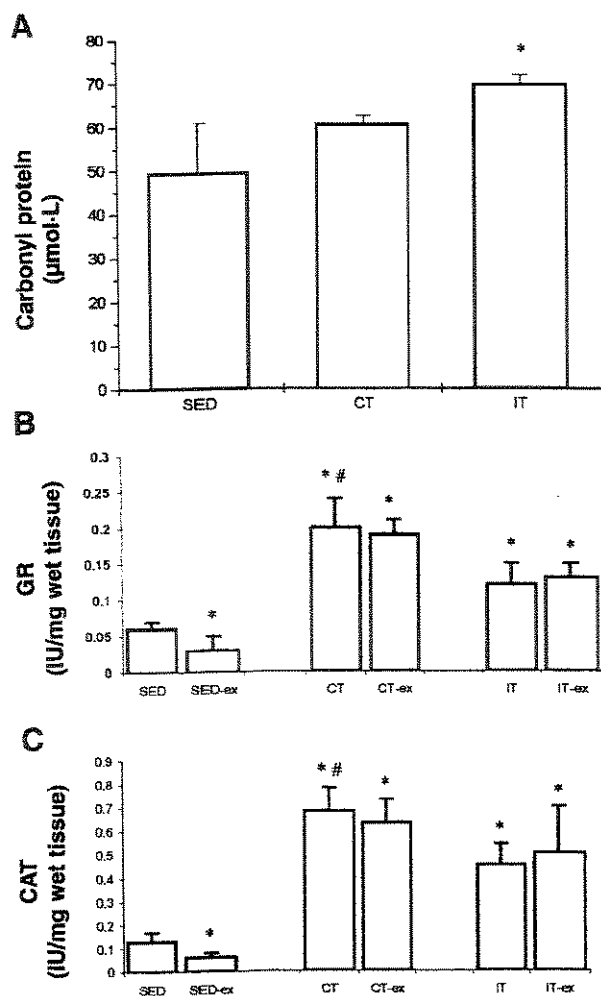


Fig. 2. Plasma reactive carbonyl derivatives (μmol ; A) of the 3 groups at rest and soleus glutathione reductase (GR; B) and catalase (CAT; C) activities (IU/mg wet tissue) of the 3 groups at rest and after 82 min acute exercise. Data are means $\pm$ SD ($n = 5$). * $P < 0.01$ compared with SED group. # $P < 0.01$ compared with IT group.

sue proteins. When the peak concentrations of plasma RCD in the Sed group at rest and after exhaustion are compared, a significant increase is observed. Taken together, these findings are consistent with an increase in oxidative stress level under exhaustive conditions for the control group.

The effect of different training protocols and a bout of exhaustive exercise on soleus HSP72 expression. Figure 4 shows representative Western blot detections of HSP72 in soleus muscle of rats from the three groups at rest and 2 h after EX. Densitometric data (Fig. 5) from Western blot analysis indicate a significant increase in HSP72 content after exercise only in the Sed group. In this case, the content of HSP72 was $\sim 97\%$ higher after exhaustion than at rest. No significant increase was noticed in trained rats independently of the training protocol. Moreover, when comparing HSP72 rest levels of untrained and trained rats, no significant difference was observed.

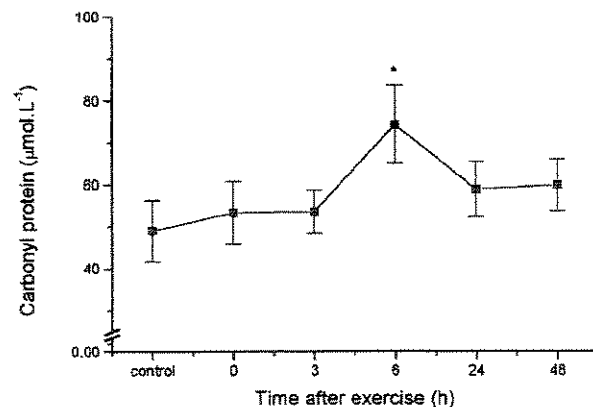


Fig. 3. Forty-eight-hour kinetics of plasma carbonyl protein concentration of SED group after 82 min acute exercise. Data are means $\pm$ SD ($n = 8$). * $P \leq 0.05$ compared with the control.

DISCUSSION

HSP72 as complementary protection against exercise-induced oxidative stress. According to the model proposed by Essig and Nosek (9), the higher the activity of the preexisting antioxidant enzymes, the more efficient the inhibition of ROS attack on proteins, thus requiring less synthesis of HSP72. In agreement with this proposal, we have shown in sedentary rats exercised to exhaustion a significant increase in HSP72 levels parallel to a decrease in the antioxidant enzymes' activities. A study from Ji (14) analyzing the activities of muscle antioxidant enzymes of sedentary rats after exhaustive exercise did not detect any decrease in such activities, differing from our results. This could be explained by the different time used to collect the samples. In the present work, the muscles were taken for analysis 2 h after the end of exercise, whereas in the work by Ji, the muscles were taken immediately after the exercise. This difference in the time of muscle collection could reflect the kinetics of protein ROS

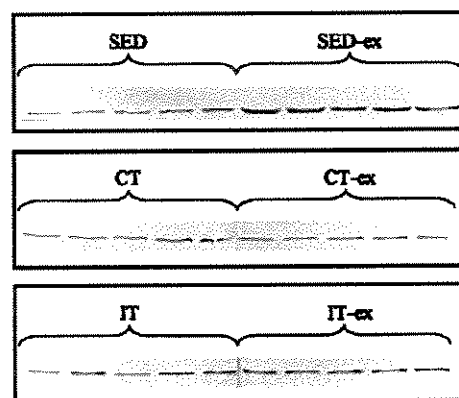


Fig. 4. Representative detection of heat shock protein 72 (HSP72) by Western blot. Total soleus muscle proteins (80 μg) from SED, CT, and IT rats at rest and after ex ($n = 5$) were separated by SDS-PAGE, and the part of the gel corresponding to the region between 40 and 90 kDa was transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for detection of HSP72 using monoclonal antibody as described in MATERIAL AND METHODS.

The cellular signals that regulate gene expression for individual antioxidant enzymes are still unclear, but there is the proposition that an increased rate of free radical formation may act as potential stimulus for the upregulation of antioxidant enzyme activity in muscle (14, 6). Our results indicate, however, that there is a limit of ROS production able to increase the activities of both enzymes analyzed. It seems that if the radical production was too high, the antioxidant enzyme itself could be oxidatively attacked. This could explain the lower increase in the activity of antioxidant enzymes and the higher plasma carbonyl derivative concentration observed at the end of training in the IT compared with CT group, as shown in Fig. 2. These results suggest that the animals trained by the intermittent protocol (high intensity and short duration) may be more vulnerable to an oxidative stress situation than the animals trained by the continuous protocol (low intensity and longer duration). Reinforcing our data, it was recently demonstrated that there were no alterations in thiobarbituric acid reactive substances or levels of reactive carbonyl derivatives after continuous swim training, reflecting a beneficial effect of exercise (24). Conversely, CS activity upregulation seems to be dependent on a higher ROS production level. In the CT group, in which the higher antioxidant enzymatic activities were sufficient to decrease ROS attack, the CS activity was lower compared with the IT group.

Perspectives

This work demonstrates that HSP72 may represent an important mechanism of protection against oxidative damage of proteins caused by ROS. The involvement of HSP72 (and other HSPs) in the antioxidant defense system is a topic still unclear and that certainly needs to be better analyzed. It is possible that the regulation of HSP72 expression represents an important point in muscle resistance to exercise stress.

HSP72 may be an important biomarker of fatigue. In a physiological view, to achieve the best condition to compete, an athlete must be submitted to increasing intensities of training. One of the main problems is to detect an overtraining condition in the beginning, before the onset of tissue damage. So, it is extremely important to find appropriate biomarkers to finalize the installation of oxidative stress at its very beginning. The biomarkers used here, as CAT and GR activities, plasma reactive carbonyl derivatives, and HSP72, show a close correlation between exercise intensity and oxidative damage. In this sense, the HSP72 detection could be a useful tool to balance the intensity of training exercises preventing the athlete from losing his or her performance.

The authors thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Brazilian agencies for financial support (Proc. 97/03889-4 and 98/00913-4).

M. B. Smolka, C. C. Zoppi, and A. A. Alves are recipients of Ph.D. grants (Proc. 98/14527-9, 98/15922-9, and 96/08880-2) from FAPESP. L. R. Silveira is the recipient of a Ph.D. grant from Capes.

REFERENCES

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984.
2. Alessio H and Goldfarb A. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol* 64: 1333-1336, 1988.
3. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, and Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 43: 562-568, 1997.
4. Booth FW and Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541-585, 1991.
5. Brotto MAP and Nosek TM. Hydrogen peroxide disrupts Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 81: 731-737, 1996.
6. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, and Grinton S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 25: 1135-1140, 1993.
7. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, and Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205, 1982.
8. Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS, Naito H, Fletcher LA, Vrabas I, Jessup JV, and Ji LL. Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc* 30: 1211-1216, 1998.
9. Essig DA and Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can J Appl Physiol* 22: 409-428, 1997.
10. Faure P and Lafond JL. Measurement of plasma sulphydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, edited by Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, and Pierre JL. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995, p. 237-248.
11. Gornall AG, Bardawill CJ, and David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766, 1949.
12. Hernando R and Manso R. Muscle fiber stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat shock proteins. *Eur J Biochem* 243: 460-467, 1997.
13. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197, 1991.
14. Ji LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 25: 225-231, 1993.
15. Kuipers H. Training and overtraining: an introduction. *Med Sci Sports Exerc* 30: 1137-1139, 1998.
16. Kukreja RC, Kontos MC, Loesser KE, Batra SK, Qian YZ, Gbur CJ, Naseem SA, Jesse RL, and Hess ML. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H2213-H2219, 1994.
17. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, and Korthuis RJ. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337-2343, 1990.
18. Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, and Ji LL. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme system. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 267: R439-R445, 1994.
19. Locke M, Noble EG, and Atkinson BG. Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 258: C723-C729, 1990.
20. Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, and Ianuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP72. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 269: H320-H325, 1995.
21. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410, 1993.
22. Powers SK, Criswell D, Lawer J, Ji LL, Martin D, Herb RA, and Dudley G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 266: R375-R380, 1994.

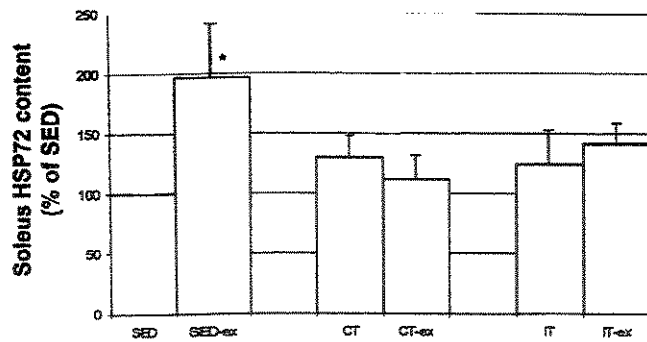


Fig. 5. Soleus content of HSP72, determined by Western blot, in rats from the 3 groups at rest and after ex. Data are means $\pm$ SD ($N = 5$). * $P < 0.01$ compared with SED group.

attack. This idea is supported by the experiment in which it was shown that plasma RCD shows a peak of maximum concentration 6 h after exhaustive exercise, possibly reflecting tissue damage. In this situation, we have shown an unbalance condition between antioxidant defense and oxidative attack, indicative of a higher degree of oxidative stress that is parallel to an important increase in HSP72 expression.

An interesting point explored here is that both untrained and trained rats were submitted to the same bout of EX. The time of exhaustion was determined by the untrained rats. So, the effect of training in response to EX could be directly analyzed. After 8 wk of training, the animals from both trained groups clearly demonstrated higher resistance to exercise as they were able to run for longer than the 82 min of the EX protocol if they were allowed to. Moreover, EX did not result in induction of HSP72 or on decreased activity of the antioxidant enzymes in either group of trained animals. Our interpretation is that EX was less stressful to the trained rats due to a higher activity of the preexisting antioxidant enzymes GR and CAT in the soleus muscle of these animals. Although plasma RCD was significantly higher in the IT group at the end of training, the HSP72 levels were not. Possibly, the significant increase in the antioxidant enzymes' activities compared with the control group could be sufficient to promote the resistance to EX observed in this group.

Experiments from other groups using rat heart reinforce the idea of the HSP72 as a complementary protection against oxidative stress when the preexisting antioxidant defense system cannot efficiently combat ROS attack. Turrens et al. (33) showed that protection from reperfusion injury by preconditioning hearts does not involve increased antioxidant defenses. Kukreja et al. (16) demonstrated that oxidative stress increases HSP72 mRNA in perfused rat heart. Demirel et al. (8), analyzing hearts from trained and untrained rats, showed that training provides protection against myocardial lipid peroxidation induced by ischemia-reperfusion and that this protection was not associated with increased antioxidant activity, but with increased levels of HSP72. In heart, training does not seem to

upregulate antioxidant enzymatic activity; so, the high HSP72 expression observed could represent a way of complementing the protection against ROS damage.

In agreement with others, we have shown that the antioxidant enzymatic activities from soleus muscle, differently from heart, may suffer modulation by exercise. It is possible that ROS attack on proteins in the muscle of rats from the Sed group could be the signal for HSP72 induction. The model proposed by Morimoto (21) and Voellmy (36) suggests that, under normal conditions, HSP72 is bound to heatshock factor and, in a proteotoxic stress condition, HSP72 binds to unfolded proteins leaving the HSF free to trimerize, entering the nucleus and activating HSP expression. In this sense, our data suggest that HSP72 is part of a secondary antioxidant defense system acting to provide fast additional protection when the main system is also attacked. Probably, due to higher levels of HSP72 in soleus muscle, oxidized or partially denatured muscle enzymes could be more rapidly stabilized, possibly preventing loss of function. On the other hand, if the preexisting antioxidant enzymatic system is sufficiently efficient to avoid or minimize the ROS attack to antioxidant enzymes, the HSP72 induction will not be triggered or will be low.

Muscle adaptations to different training protocols. The question of whether exercise intensity and duration increase the skeletal muscle antioxidant status still remains controversial. Whereas some authors have shown increased antioxidant enzymatic activity, mainly induced by high intensity endurance training, others do not report any exercise effect on these enzymes (2, 17, 22). The upregulation seems to be fiber-type specific, with highly oxidative muscles being most responsive (17, 18, 22). Additionally, information on the differential effects of the aerobic continuous versus intermittent high-intensity exercise training on skeletal muscle antioxidant status is scanty. Thus these ambiguous results could be related to interstudy differences in the exercise used to train the animals and/or differences in the muscle fiber types studied. This led us to compare the effects with two-experiment protocol training in the soleus muscle of rats.

An original finding here reported is that intermittent training results in a significant higher increase of the oxidative capacity but induces a lower increase in the activity of the antioxidant enzymes CAT and GR compared with continuous training. The data shown in Fig. 1 reflect, at the molecular level, the requirement of relatively high amounts of intensive exercise to push the performance capacity to its upper limit in athletic training (15). With the use of another antioxidant enzyme, Criswell et al. (6) have shown that intermittent exercise was superior to moderate continuous exercise in upregulating muscle glutathione peroxidase and that both resulted in a similar increase in superoxide dismutase activity. However, in contrast to our data, they observed almost the same increase in CS activity in trained rats compared with control group, independently of the training protocol used (6).

23. **Quiroga GB.** Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 13: 325–340, 1992.
24. **Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, and Goto S.** The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27: 69–74, 1999.
25. **Salo DC, Donovan CM, and Davies KJ.** HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* 11: 239–246, 1991.
26. **Sen CK.** Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79: 675–686, 1995.
27. **Sjodin B, Westing YH, and Apple FS.** Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10: 236–254, 1990.
28. **Skidmore R, Gutierrez JA, Guerriero JV, and Kregel KC.** HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 268: R92–R97, 1995.
29. **Smith IK, Vierheller TL, and Thorne CA.** Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 175: 408–413, 1988.
30. **Srere PA.** Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13: 3–11, 1969.
31. **Stadtman ER.** Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220–1224, 1992.
32. **Stainsby WN and Brooks GA.** Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 18: 29–63, 1990.
33. **Turrens JF, Thornton J, Barnard ML, Snyder S, Liu G, and Downey JM.** Protection from reperfusion injury by preconditioning hearts does not involve increased antioxidant defenses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262: H585–H589, 1992.
34. **Venditti P and Meo SD.** Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys* 331: 63–68, 1996.
35. **Venditti P and Meo SD.** Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 18: 497–502, 1997.
36. **Voellmy R.** Sensing stress and responding to stress. In: *Stress-Inducible Cellular Responses*, edited by Feige U, Morimoto RI, Yahara I, and Polla BS. Basel: Birkhäuser Verlag, 1996, p. 121–137.
37. **Welch WJ.** Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063–1081, 1992.
38. **Zerbetto E, Vergan L, and Dabbeni-Salla F.** Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 18: 2059–2064, 1997.



ANEXO II

Durante o período de doutorado também participei de estudo *in vitro* em trabalhos em colaboração do laboratório com docentes do IQ da Usp-São Carlos, que resultaram em dois manuscritos que não fazem parte da tese, mas serão mostrados em Anexos II e III.

Antioxidant effect of dipyridamole and its derivative RA-25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane

Maria Fátima Nepomuceno ^{a,b}, Maria Eugênia de Oliveira Mamede ^a,
Denise Vaz de Macedo ^a, Armindo Antonio Alves ^a, Lúcia Pereira-da-Silva ^a,
Marcel Tabak ^{c,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas SP, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Metodista de Piracicaba, 13400-901 Piracicaba SP, Brazil

^c Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos SP, Brazil

Received 7 January 1999; received in revised form 23 February 1999; accepted 2 March 1999

Abstract

Dipyridamole (DIP), a coronary vasodilator, presents coactivator activity for a number of antitumor drugs as well as antioxidant activity in membrane systems. DIP and derivatives interact with membrane systems such as micelles, phospholipid monolayers and vesicles. The antioxidant effect of DIP and several derivatives upon iron-induced lipoperoxidation on mitochondria has been reported and a good correlation between the hydrophobicity and their protective effect was found (M.F. Nepomuceno et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 23 (1997) 1046–1054). In the present work an effort is made to better understand the role of DIP as inhibitor of Fe²⁺-induced lipid peroxidation in mitochondria. At low concentration, no significant effect on either state IV or state III respiration was found, discarding a possible direct interaction of DIP or RA-25 with the peripheral benzodiazepine receptor. The association constants for DIP and RA-25 in mitochondria were estimated, being 0.7 (mg/ml)⁻¹ for DIP and 0.2 (mg/ml)⁻¹ for RA-25. Oxygen consumption studies in the presence of FeSO₄ showed that the antioxidant effect of DIP or RA-25 did not involve the initial step of Fe²⁺ oxidation. Our data strongly support the hypothesis that the antioxidant effect of both DIP and RA-25 is related to their partition in the lipid phase of the mitochondrial membrane and not to a specific interaction with membrane proteins. This protection may be due either to a direct inhibition of the propagation steps or a scavenger effect on the radical species that would trigger the peroxidative process. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Dipyridamole; Oxidative stress; Mitochondrial membrane; Binding constant; Lipid peroxidation

1. Introduction

Dipyridamole (DIP) is a compound that has been used in coronary heart diseases for its antiplatelet and vasodilating activities [1,2]. This drug also

showed an antioxidant action as superoxide and hydroxyl radical scavenger [3,4], and its chain-breaking activity places it as an efficient and powerful biological antioxidant, as potent as vitamin E [5]. Our data demonstrated that DIP was a potent antioxidant in mitochondrial membrane mainly against Fe²⁺ effects and that its antioxidant action may be associated to its partition in the lipid bilayer, where lipid peroxidation takes place [6].

* Corresponding author. Fax: +55-16-273-9976;
E-mail: marcel@sc.usp.br

Lipid peroxidation seems to play a major role in many pathological situations such as ischemia–reperfusion [7]. The alterations caused by the lipid peroxidation may affect the mitochondrial energy transduction related processes [8]. Moreover, the damage to the membrane may also increase the Fe^{2+} free concentration [9]. The requirement for Fe^{2+} to induce lipid peroxidation in biological membranes has long been recognized, although the mechanism of this process, particularly the identity of the initiating species, remains controversial [10–15]. Besides $\cdot\text{OH}$ produced through the Fenton reaction, as the species responsible for the attack to the membrane [12,14], there is also experimental evidence in the literature that lipid peroxidation requires as inducers both Fe^{2+} and Fe^{3+} , probably as a dioxygen–iron complex [14–17], perferryl radical, ferryl radical [15], or even membrane-bound Fe^{2+} [18].

The interaction of DIP in model membrane systems has been described by Borissevitch et al. [19], demonstrating different affinities of DIP and its derivatives (RA14, RA47 and RA-25) in micelles. According to these studies the hydrophobicity of the compound correlates with its location in the membrane [19].

On the other hand, the binding of DIP to proteins such as the benzodiazepine receptor of kidney mitochondrial membranes was also described in the literature [20]. The subunit composition of the mitochondrial purified benzodiazepine receptor complex apparently includes the voltage-dependent anion channel (VDAC), the adenine nucleotide carrier (ADC) and another protein of 18 kDa [21]. It has been proposed that all three proteins comprise the activity receptor, with a high affinity for a number of drugs leading to an increase in the state IV and a decrease in the state III respiration rates, resulting in a significant decrease in the respiratory control ratio (RC) [22]. The benzodiazepine receptor is also suspected to play some role during hypoosmotic stress in astrocytes [23], and superoxide radical generation by phagocytes was found to be markedly sensitive to benzodiazepine receptor ligands [24]. It is possible that these compounds would be modulating the oxidative response capacity of these cells [25].

The purpose of the present work is to verify whether the DIP antioxidant action is correlated with its partition in the mitochondrial membrane,

dependent of a specific protein binding site in the membrane or simply due to iron chelation. O_2 consumption of isolated mitochondria submitted or not to Fe^{2+} in the presence or in the absence of DIP and its derivative RA-25 (structural formulae are presented in Fig. 1) were monitored. To study their location in the membrane we estimated the association constant of DIP and RA-25 to the mitochondrial membrane.

Our results strongly support that the partition of DIP and RA-25 in the mitochondrial membrane according to their lipophilicity order is responsible for the inhibitory effect of DIP on the lipid peroxidation induced by Fe^{2+} . Apparently, the binding to the mitochondrial benzodiazepine receptor, in liver mitochondria and under our experimental conditions, does not occur to a significant extent. Moreover, a possible chelation of Fe^{2+} or Fe^{3+} by DIP in our reaction medium has been discarded, although a direct scavenger effect of DIP on the radical species initiating the peroxidative process could also be an explanation for our data.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of mitochondria

Liver mitochondria were isolated from overnight fasted adult female Wistar rats, according to the procedure described in the literature [26]. The mitochondrial pellet was resuspended in isosmotic buffer containing 120 mM KCl and 20 mM Hepes (pH 7.2) to give a final protein concentration of 80–100 mg, determined by the biuret method modified with cholate addition [27].

2.2. Oxygen uptake measurements

Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode in a 1.8-ml glass chamber equipped with a magnetic stirrer and without O_2 limitation.

2.3. Standard incubation conditions

The fluorescence experiments were performed in basic medium containing 120 mM KCl plus 20 mM Hepes, pH 7.2. Previous incubations were done at

temperature of 30°C and for 50 min. Oxygen consumption experiments were performed in basic medium containing 125 mM saccharose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7.2), 3 mM phosphate, 5 mM succinate and 5 μ M rotenone. FeSO₄ was added at concentrations shown in the figure legends and tables.

2.4. Determination of association constants

Determination of association constants of the drugs to the mitochondrial membranes was performed with titration of the drug solution at fixed concentration with variable mitochondrial membrane protein concentration (from 0.8 to 4.0 mg protein/ml). Either DIP or RA-25, at a fixed concentration, were added to the medium immediately before the mitochondrial suspension. Samples were exposed to a previous incubation or not, followed by a centrifugation at 4000 $\times g$ for 15 min. The fluorescence emission spectra of the supernatant were measured in the range 425–600 nm with excitation at 405 nm for DIP and in the range 400–600 nm with excitation at 370 nm for RA-25. Data from the titrations were analyzed as double reciprocal plots of fluorescence intensity change (ΔF) at 480 nm for DIP and 430 nm for RA-25 and membrane concentration (determined as mg of protein/ml) or by direct fitting of the law of mass action, which gives ΔF versus membrane concentration as previously described [19,28–30].

2.5. DIP and RA-25 binding to mitochondria

Measurement of DIP or RA-25 binding to mitochondria was made by titration as described for determination of the association constants. The fluorescence intensity of the supernatants decreased with the increase in the membrane protein concentration. In order to estimate the amount of drug left in the pellet (bound to the membrane) the following procedure was performed. The pellets were immediately placed in liquid nitrogen [31] and then dissolved in 1 ml of 1% Triton X-100, 10% NaCl and centrifuged at 4000 $\times g$ in a Beckman microfuge for 25 min. The fluorescence of the drug in the supernatants obtained from this solubilization in the detergent was determined as already described in the previous section for the supernatants from the initial titration. The

amount of drug in the pellet was estimated with standard solutions of drug in the same media in the absence of mitochondria.

2.6. Estimation of lipid peroxidation

Mitochondria (1 mg protein) were added to 1 ml of medium immediately followed by DIP or its derivative RA-25 and oxidant addition at different concentrations as indicated in the figures, with subsequent incubation for 20 min. After this incubation period, 0.1 ml of 50 μ M butylhydroxytoluene was added to prevent further lipoperoxidation, and the samples were treated with 3 ml of 0.04 M H₂SO₄ and 2 ml of 0.8% thiobarbituric acid (TBA) in 0.1 M NaOH. The samples were boiled for 45 min at 100°C, and after cooling, 4.0 ml of *n*-butanol was added. The mixture was thoroughly mixed and centrifuged at 900 $\times g$ for 10 min. The TBA-reactive substances (TBARS) were determined in the organic layer with a spectrophotometer at 535 nm. The content of TBARS was calculated from a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane as described by Yagi et al. [32].

3. Results

3.1. DIP and RA-25 do not significantly alter mitochondrial respiration

A decrease in the respiratory control (RC) due to an increase on state IV respiration and a decrease on state III respiration in mitochondria incubated with peripheric benzodiazepine receptor ligands [22], including DIP [20,22], have previously been reported. To verify if DIP presented an effect per se on mitochondrial respiration, we measured the rate of oxygen consumption by mitochondria energized with succinate during states IV and III and the RC was calculated for different DIP or RA-25 concentrations. The data in Table 1 show that under our experimental conditions both compounds exhibit a very slight effect on these parameters, even when used at low concentrations. Since higher concentrations of RA-25 are necessary to produce its antioxidant effect, this derivative caused a higher decrease in RC as compared to DIP.

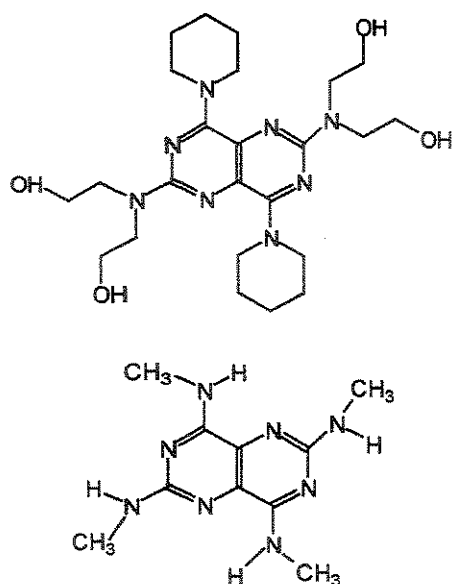


Fig. 1. Structural formulae of dipyridamole and its derivative RA-25.

3.2. DIP and RA-25 effect on oxygen consumption by mitochondria in the presence of FeSO_4

When Fe^{2+} is added to respiring mitochondria we observe bursts of extra oxygen consumption, separated by an increasing lag time (Δt) as shown in Fig. 2. Unpublished results from our laboratory indicate that the first burst of extra O_2 consumption (V_1) is related with Fe^{2+} oxidation and that the peroxidative damage occurs during the second burst of extra O_2 consumption (V_2). The existence of a latent period, Δt , before the lipid peroxidation induced by iron could start was already described in the litera-

Table 1

Effect of DIP and RA-25 on oxygen consumption by mitochondria

	V_4	V_3	$RC = V_3/V_4$
	(natom of O/min per mg protein)		
[DIP] μM			
0	58 ± 4	212 ± 25	4.0 ± 0.4
2.5	59 ± 5	207 ± 20	3.5 ± 0.4
5.0	62 ± 6	200 ± 22	3.5 ± 0.2
7.5	65 ± 4	198 ± 18	3.2 ± 0.2
10.0	65 ± 4	201 ± 19	3.2 ± 0.2
50.0	101 ± 15	250 ± 20	2.4 ± 0.2
100.0	118 ± 18	262 ± 21	2.1 ± 0.2
[RA-25] μM			
0	58 ± 4	212 ± 25	4.0 ± 0.4
50	75 ± 7	233 ± 25	3.0 ± 0.4
100	80 ± 3	235 ± 22	2.7 ± 0.2
250	84 ± 6	233 ± 22	2.7 ± 0.2
500	88 ± 5	218 ± 25	2.5 ± 0.2

Oxygen consumption was measured in the presence of DIP or RA-25 increasing concentrations. Mitochondria were added in the basic medium in the presence of succinate. Values are mean $\pm$ S.D. from four experiments.

ture [15,18] and is explained as the time needed for the formation of the initiating species, which depends on a critical ratio $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$. Data from Table 2 show that DIP was able to inhibit the second burst at very low concentration, as already observed when the peroxidation was followed through TBARS formation [6], without changing V_1 . An increase in V_1 was observed only when very high DIP concentrations (100 μM) and low Fe^{2+} concentrations were used. It is important to stress that DIP inhibits V_2 even when added just before it starts (not shown).

Table 2

Effect of DIP upon the extra oxygen consumption induced by FeII

[DIP] μM	V_1 [Fe^{2+}] μM				V_2 [Fe^{2+}] μM				$\Delta t_{\min}$ [Fe^{2+}] μM			
	50	100	200	500	50	100	200	500	50	100	200	500
0	50 ± 6	74 ± 8	111 ± 2	218 ± 10	37 ± 5	47 ± 2	81 ± 8	150 ± 6	6 ± 1	7 ± 1	9 ± 1	11 ± 1
2.5	60 ± 2	72 ± 7	108 ± 5	219 ± 6	—	—	—	—	—	—	—	—
5.0	65 ± 5	73 ± 7	110 ± 2	219 ± 8	—	—	—	—	—	—	—	—
7.5	62 ± 4	86 ± 4	111 ± 2	223 ± 9	—	—	—	—	—	—	—	—
10.0	64 ± 7	91 ± 8	111 ± 5	225 ± 7	—	—	—	—	—	—	—	—
50.0	67 ± 7	101 ± 1	141 ± 8	228 ± 3	—	—	—	—	—	—	—	—
100.0	104 ± 5	140 ± 11	165 ± 7	240 ± 9	—	—	—	—	—	—	—	—

Mitochondrial suspensions (1 mg/ml) were incubated in the presence of increasing DIP concentrations for 1 min before Fe^{2+} addition. The oxygen consumption was measured as shown in Fig. 2.

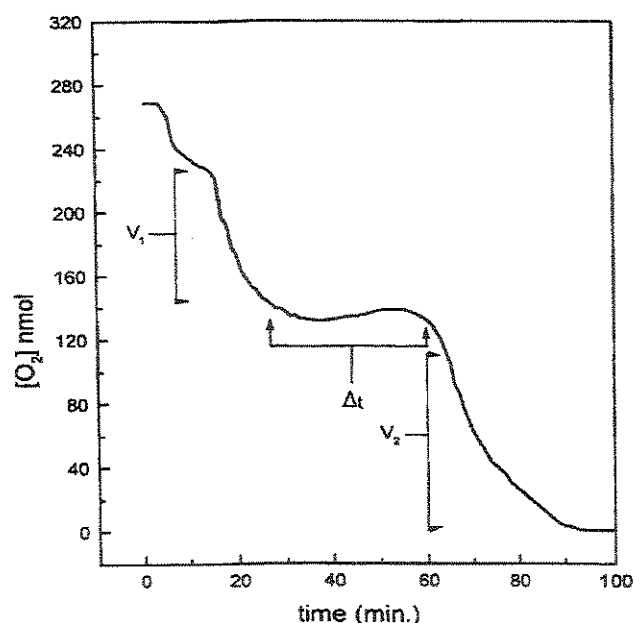


Fig. 2. Effect of FeSO_4 on mitochondrial oxygen consumption measured with a Clark-type polarographic oxygen electrode. Mitochondrial suspensions (1 mg/ml) were incubated in basic medium for 1 min and 0.2 mM FeSO_4 was added. The figure shows the extra oxygen consumption in respiring mitochondria. The first peak (V_1) was attributed to Fe^{2+} oxidation and the second one (V_2) to lipid peroxidation. Δt is the lag time between the two peaks.

This result suggests that the antioxidant effect of DIP can not be attributed to inhibition of Fe^{2+} oxidation but also does not discard the possibility that it prevents either the initiator formation or the initiator attack, since DIP also eliminates Δt .

Similar results were obtained with RA-25, a less lipophilic derivative than DIP. The protective effect against the peroxidative damage also occurred but at

much lower extent and at higher concentrations than DIP (Table 3), in agreement with our previous data [6].

3.3. Previous incubation of DIP with mitochondria results in inhibition of CuOOH -induced lipid peroxidation

DIP was shown to be a powerful antioxidant when the lipid peroxidation was induced by FeSO_4 ($\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$) but was ineffective when CuOOH was the oxidant inductor [6]. In the present work, the mitochondrial suspensions were previously incubated for 50 min in the presence of increasing concentrations of DIP before the CuOOH addition. CuOOH is a lipophilic compound and generates alcoxyl radicals in the membrane when cleaved by mitochondrial cytochromes [33], leading to lipid peroxidation as other organic hydroperoxides [7]. Under these conditions a partial inhibition ($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$) can be observed as shown in Fig. 3. However this concentration is much higher when compared to the IC_{50} obtained when peroxidation was induced by Fe^{2+} .

3.4. Binding constants of DIP and RA-25 to mitochondria

Titration of a 2 μM solution of DIP with variable concentrations of mitochondria gave a series of emission spectra obtained for the supernatants after centrifugation and shown in Fig. 4. It is seen that for higher membrane concentrations the intensity of fluorescence emission decreases, consistent with more binding of the drug to the membrane and less drug remaining in the supernatant. These changes in emis-

Table 3
Effect of RA-25 upon the extra oxygen consumption induced by Fe^{2+}

[RA-25] μM	V_1 [Fe^{2+}] μM				V_2 [Fe^{2+}] μM				Δt_{min} [Fe^{2+}] μM			
	50	100	250	500	50	100	250	500	50	100	250	500
0	50 $\pm$ 6	74 $\pm$ 8	111 $\pm$ 2	218 $\pm$ 10	37 $\pm$ 7	47 $\pm$ 2	80 $\pm$ 8	149 $\pm$ 7	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1
50	71 $\pm$ 12	92 $\pm$ 13	130 $\pm$ 12	227 $\pm$ 13	31 $\pm$ 6	34 $\pm$ 3	62 $\pm$ 8	83 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1
100	79 $\pm$ 12	105 $\pm$ 13	146 $\pm$ 9	241 $\pm$ 2	25 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	48 $\pm$ 1	74 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1
250	86 $\pm$ 13	121 $\pm$ 13	156 $\pm$ 15	243 $\pm$ 14	—	—	—	—	—	—	—	—
500	92 $\pm$ 7	151 $\pm$ 13	171 $\pm$ 16	246 $\pm$ 11	—	—	—	—	—	—	—	—

Mitochondrial suspensions (1 mg/ml) were incubated in the presence of increasing RA-25 concentrations for 1 min before FeSO_4 addition. The oxygen consumption was measured as shown in Fig. 2.

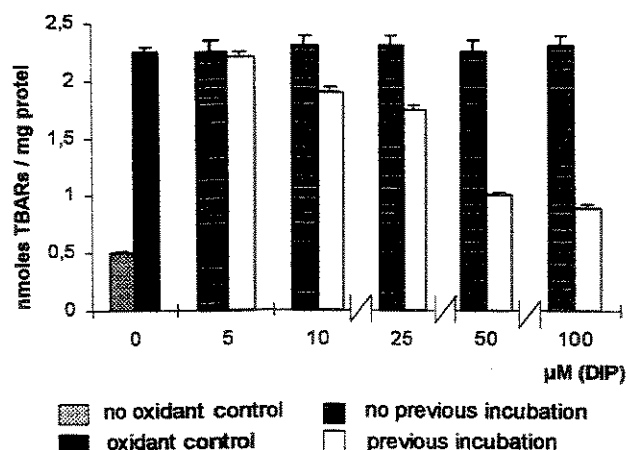


Fig. 3. DIP action upon lipid peroxidation induced by CuOOH with or without previous incubation. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in basic medium with increasing DIP concentration for 50 min before CuOOH addition. When no previous incubation was performed, both DIP and CuOOH were added simultaneously. The first column shows the control experiment.

sion spectra were used to estimate the association constant of DIP to the membrane.

Considering the equilibrium:



where D represents the drug and M the mitochondria, the total fluorescence observed is due to the free and bound species of D. ΔF represents the difference between the fluorescence emission intensity of the drug at a certain concentration of the mitochondria (F) and the initial fluorescence intensity (F^0), in the absence of the mitochondrial membrane. This difference (ΔF) is related to the quantity of the drug associated with the mitochondria. In order to obtain quantitatively the association constants for the binding of DIP to mitochondria, data for titrations of the drug with mitochondrial suspension were treated using the mass-action law and the method of the double reciprocal plot [29,30]. This latter treatment is based on the following equation:

$$1/\Delta F = 1/\Delta F_{\max} + 1/\Delta F_{\max} \cdot 1/K_b \cdot 1/[M] \quad (2)$$

A plot of $1/\Delta F$ as a function of $1/[M]$ may be used to find K_b , the binding constant. The results obtained for both treatments are listed on Table 4. Some typical results of these titrations are presented in Fig. 5. In this figure the binding of DIP to mitochondria at

37°C and pH 7.0 is shown, while the insert corresponds to the same data presented as a double reciprocal plot.

In Table 4 data for binding of DIP to phospholipid vesicles of pure dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) were also included for comparison [30,34]. The data for binding of the drugs to mitochondria are presented in $(\text{mg/ml})^{-1}$ since the protein concentration in mg/ml was used in the plots and in the calculations. In order to transform these data to a molar basis and compare them to the binding to pure lipids and micelles, the following procedure was performed. For every lipid component of mitochondrial membrane an average molecular mass was calculated assuming a mixture of steroyl and palmitoyl alkyl chains as well as the unsaturated oleyl, so that for phosphatidylcholine as an example an average molecular mass of 760 g/mol was obtained (this is the average of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), palmitoyl oleylphosphatidylcholine (POPC), disteroyl phosphatidylcholine (DSPC) and steroyloleylcholine (SOPC) taken with identical proportions). After this calculation, an average molecular mass for the

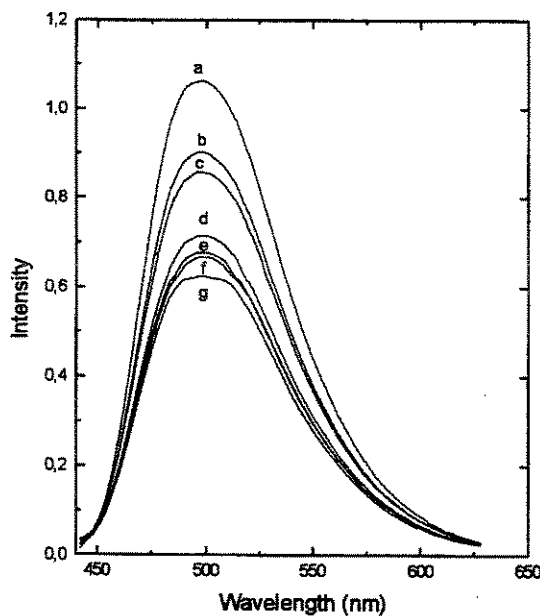


Fig. 4. Fluorescence emission spectra of DIP in supernatants from mitochondria at different protein concentrations. Concentration of DIP 2×10^{-6} M. Excitation wavelength 405 nm. Protein concentration in the range 0.8–4.0 mg/ml.

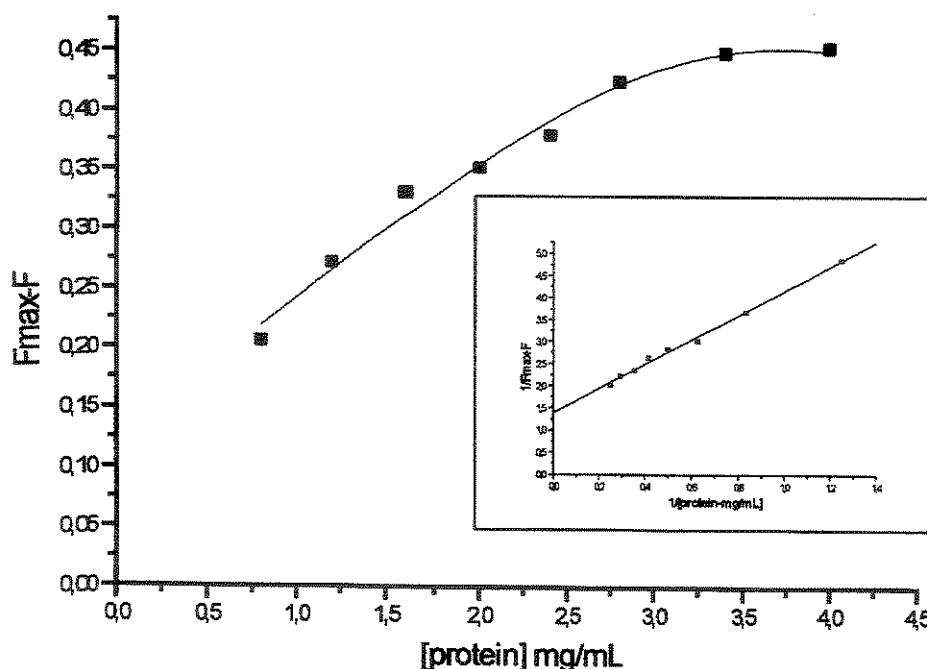


Fig. 5. Fitting of fluorescence data for the binding of DIP to mitochondrial membrane using the mass-action law as the change in emission intensity ΔF versus mitochondrial suspensions protein concentrations. Concentration of DIP 2×10^{-6} M. Protein concentrations the same as in Fig. 4. Excitation at 405 nm and emission at 480 nm. Inset corresponds to the double reciprocal plot for the same data.

lipids in the outer membrane was obtained using the known composition and the percentage of lipids relative to proteins [35].

For the outer membrane the total composition is 52% protein and 48% lipid. So, for 1 mg/ml of total protein in the sample $0.48/0.52 = 0.92$ mg/ml is lipid. Our calculation gave an average lipid molecular mass of 756 g/mol for the outer and 861 g/mol for the inner membrane. Assuming that the binding of DIP takes place at the outer membrane, 1 mg/ml of protein corresponds to 1.22 mM of lipid and this can be used to transform the estimated binding constant to the outer membrane from 0.5 (mg/ml)^{-1} to 410 M^{-1} . Since in the inner mitochondrial membrane the proportions of protein and lipid are quite different, 75% and 25%, respectively, the binding of the drug to the inner membrane even to a small extent would lead to a considerable increase of the molar binding constant to lipids. It is interesting that the binding constants to mitochondrial membranes estimated above (Table 4) are smaller as compared to pure phospholipids and micelles [19,28,30,34]. In the case of RA-25 it

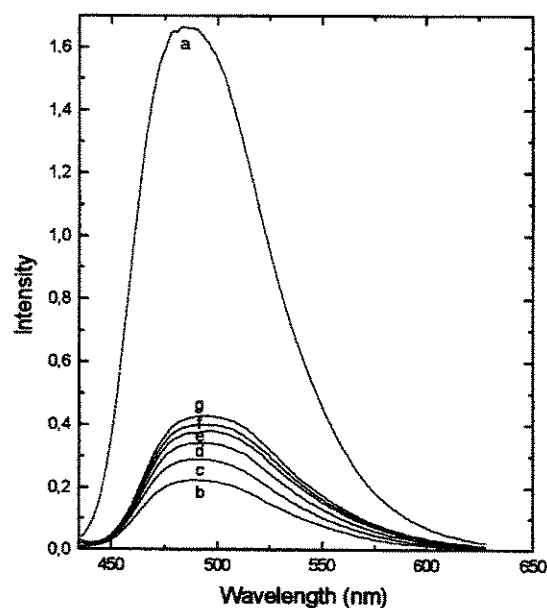


Fig. 6. Fluorescence emission spectra of DIP in pellets from the same preparations treated with detergent as described in Section 2. Concentration of DIP 2×10^{-6} M. Excitation wavelength 405 nm. Protein concentration in the range 0.8–4.0 mg/ml.

Table 4

DIP and RA-25 binding constants in mitochondrial membranes and phospholipid vesicles

	pH	Temp. (°C)	K_b (M^{-1}) ^a	K_d (10^{-3} M)	K_b (M^{-1}) ^b
DIP					
DPPC	7	30	633 ± 22	1.52 ± 0.08	658 ± 35
		50	1149 ± 16	0.85 ± 0.02	1176 ± 28
DPPG	7	30	727 ± 81	1.39 ± 0.09	719 ± 46
		50	1500 ± 60	0.70 ± 0.02	1428 ± 41
MITO ^c	7.2	37	0.54 ± 0.04 (443 ± 33)		
MITO ^d	7.2	37	0.42 ± 0.04 (344 ± 33)		
MITO ^e	7.2	37	0.7 ± 0.1 (574 ± 82)		
MITO ^f	7.2	37	0.58 ± 0.05 (475 ± 41)		
RA 25					
DPPC	7	50	295 ± 70	4.3 ± 1.1	232 ± 59
MITO ^g	7.2	37	0.25 ± 0.07 (205 ± 57)		—

Binding constants of dipyrindamole (DIP) and RA-25 to phospholipids (from [30,34]) calculated by the method of the ^adouble reciprocal and by ^bthe mass-action law. In mitochondria the concentrations of DIP are ^c2 μ M, ^d5 μ M and ^ethat of RA-25 is 2 μ M. Data were obtained ^fwithout incubation and ^gwith 50 min incubation. Binding constants to mitochondria are in (mg/ml)⁻¹ based on total protein concentration. Values in parentheses correspond to data in M^{-1} calculated as described in the text. K_d is a dissociation constant and K_b an association constant for DPPC and DPPG [34].

is also seen that the binding constant is reduced by a factor of two as compared to DIP while the concentration to achieve 50% inhibition of lipid peroxidation is two orders of magnitude different, higher for the more polar derivative RA-25. Our data also show that, when the mitochondrial suspensions were pre-incubated with DIP, the binding constant increased and saturation occurred at lower membrane concentrations. In fact, these results showed that DIP permeates the membrane and this process is time dependent.

All of the above results show the binding as the

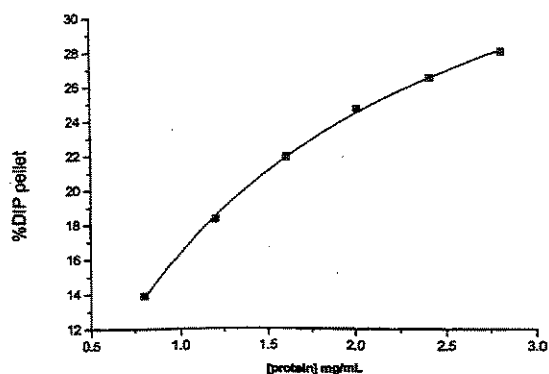


Fig. 7. Fitting of fluorescence data for the binding of DIP to mitochondrial membrane obtained from measurement of fluorescence spectra of pellet treated with detergent as described in Section 2. Same data as in Fig. 6.

decrease of drug concentration in the supernatant. In order to assess the amount of drug bound to the membrane in a more direct way, the same pellet of the samples used to measure the emission in the supernatants were dissolved in Triton X-100 detergent in the presence of NaCl, centrifuged, and the new supernatants were examined for their fluorescence emission. The obtained emission spectra are presented in Fig. 6, and show the increase in fluorescence with the increase in membrane protein concentration. In Fig. 7 a plot of the fraction of DIP in the pellet as a function of membrane protein concentration is presented. This plot was fitted by the mass-action law, resulting in an association constant of 0.8 ± 0.1 (mg/ml)⁻¹ and maximum saturation at 47% of DIP. This means that at 2 micromolar DIP and an excess of mitochondria, around 47% of the drug is bound. The value of binding constant is quite close to the value obtained from the change of fluorescence of the supernatants after incubation of the drug (Table 4).

4. Discussion

DIP is a potent antioxidant against the Fe²⁺-induced lipid peroxidation in mitochondria [6] and this effect seems to be related to its high hydrophobicity,

since less hydrophobic derivatives [19,30] are also less effective in the protection against this peroxidation in mitochondria [6]. However, it has also been reported that DIP can bind to the peripheral benzodiazepine receptor located at the mitochondria outer membrane [20,22], although its affinity for the benzodiazepine receptor was found to be five times lower (IC_{50} 170 nM) than those reported for other benzodiazepine receptor ligands such as RO-5-4864 and PK 11195 [22]. The mitochondrial respiratory control is decreased due to this binding since DIP changes both rates of oxygen consumption, increasing state IV and decreasing state III respiration [22]. However, these data refer to experiments performed with isolated rat kidney mitochondria, which contain significantly higher amounts of benzodiazepine receptors as compared to liver [36]. Under our experimental conditions, working with liver mitochondria, to observe such alterations much higher concentrations of both DIP and RA-25 were necessary. The data presented in Table 1 show that although DIP per se presents a small effect on the respiratory chain even at low concentrations, a significant decrease in RC values occurs only at DIP or RA-25 concentrations much higher than those required for the inhibition of lipid peroxidation ($IC_{50} = 1 \mu\text{M}$ for DIP protection [6]). The decrease in RC values at concentrations above $10 \mu\text{M}$ could be due to cytotoxic effects resulting from the high drug concentration. The concentrations of DIP and RA-25 required to cause 50% inhibition of iron-induced lipid peroxidation differ by two orders of magnitude, being $1 \mu\text{M}$ and $100 \mu\text{M}$, respectively [6]. These results are corroborated by the data shown in Table 2, where $2.5 \mu\text{M}$ DIP completely abolishes the second peak of extra oxygen consumption (v_2), attributed to the peroxidative process, whereas an RA-25 concentration 100 times higher is needed to observe the same effect (Table 3). The binding constants (K_b) of both compounds, DIP and RA-25, to the mitochondrial membrane were calculated (Table 4). A two- to threefold difference in K_b values was obtained, certainly related to the higher hydrophobicity of DIP as compared to RA-25 [19,30]. Interestingly, the binding constants of DIP and RA-25 measured from the fluorescence spectra in the membrane pellet are 0.8 ± 0.1 and 0.17 ± 0.03 (mg/ml)⁻¹, which correspond to a ratio similar to that obtained in DPPC vesicles and equal to 4. How-

ever, this ratio is much smaller than the observed IC_{50} ratio [6] and cannot explain by itself the two orders of magnitude difference in antioxidant activity.

The results showing that DIP is able to permeate the membrane in a time dependent way with only a partial inhibitory effect against CuOOH-induced lipid peroxidation indicate that the binding to the membrane is not sufficient either to avoid the radical species formation by CuOOH or the propagation of this process.

One general observation on iron-induced peroxidation is the existence of a latent period (Δt) until the peroxidation reaction effectively starts. This lag time was explained as the period necessary for the radical initiator formation prior to the membrane attack [18]. Recently it was shown that the removal of either Fe^{2+} or Fe^{3+} by adding a free iron chelator at the end of the lag time resulted in inhibition of the lipid peroxidation, supporting the hypothesis that an Fe^{2+} – Fe^{3+} complex is responsible for the iron-initiated lipid peroxidation [9,37]. Indeed, our results also have shown the effectiveness of DIP, since independently of its addition during the observed Δt or just before it, and even after the beginning of V_2 , it was able to inhibit the peroxidation process. So it is more likely that DIP prevents both the radical formation and the propagation reaction.

The lack of effect of low concentrations of DIP on the first peak of extra oxygen consumption (V_1) was a first indication that there was no direct interaction of DIP with Fe^{2+} . Since DIP is a highly fluorescent compound, its complexation with iron would result in quenching of the fluorescence due to either heavy metal or paramagnetic quenching. The possibility of a direct interaction between DIP and Fe^{2+} or Fe^{3+} was investigated through the monitoring of the fluorescence quenching by iron of a solution of DIP in the reaction medium in the absence of mitochondria. The direct experiment with ferrous sulfate quenching was not quantitative due to the rapid oxidation of iron (Fe^{2+} to Fe^{3+}), which leads to a strong time-dependent optical absorption of the solution preventing the analysis. Besides the iron oxidation, the solution becomes turbid, probably, due to precipitation of iron hydroxide. We therefore made a control experiment by incubating the solution of DIP with FeSO_4 and FeCl_3 for 3 h followed by centrifugation.

All of the DIP initially present in the solution remained in the supernatant as judged by both optical absorbance and fluorescence of the drug. This is also an indication against the possibility of direct complex formation of DIP with either Fe^{2+} or Fe^{3+} , excluding a chelation effect.

Although this complex mechanism has not been fully elucidated, our data indicate that binding to the peripheral benzodiazepine receptor is not likely to be important at the low concentrations under which DIP completely inhibits the peroxidative process. The partition of the drugs into the mitochondrial membrane gave a better explanation to the effects of DIP on the propagation reactions of the lipid peroxidation induced by Fe^{2+} . Moreover, the results presented in this work also confirm the radical scavenger ability of DIP on Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in isolated mitochondria. It is possible that simplifying the system, using mitoplasts instead of mitochondria, will allow further experimental evidence to be obtained, giving a more detailed understanding of the mechanisms involved in the protection of peroxidation by DIP. Such experiments are under way in our laboratory.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPESP Brazilian agencies for partial financial support. M.F.N. is a recipient of a postdoctoral grant and A.A.A. is a recipient of a Ph.D. grant, both from FAPESP. M.E.O.M. is a recipient of a M.Sc. fellowship from CAPES.

References

- [1] G.A. Fitzgerald, *N. Engl. J. Med.* 316 (1987) 1247–1257.
- [2] D. Steimberg, *Circulation* 85 (1992) 2338–2343.
- [3] L. Iuliano, F. Violi, A. Ghiselli, C. Alessandri, D. Balsano, *Lipids* 24 (1989) 430–433.
- [4] L. Iuliano, D. Praticò, A. Ghiselli, M. Bonavita, F. Violi, *Lipids* 7 (1992) 349–353.
- [5] L. Iuliano, A.R. Colavita, D. Praticò, F. Violi, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 999–1007.
- [6] M.F. Nepomuceno, A. Alonso, L. Pereira-da-Silva, M. Tabak, *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997) 1046–1054.
- [7] A. Bindoli, *Free Radic. Biol. Med.* 5 (1998) 247–267.
- [8] S. Mittnacht Jr., J.L. Farber, *J. Biochem.* 256 (1981) 3199–3206.
- [9] G. Minotti, S.D. Aust, in: H. Esterbauer, K. Cheeseman (Eds.), *Chemistry and Physics of Lipids*, Elsevier, Ireland, 1989, pp. 191–209.
- [10] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1–85.
- [11] J.M. McCord, E.D. Day, *FEBS Lett.* 86 (1993) 139–146.
- [12] G. Minotti, S.D. Aust, *Free Radic. Biol. Med.* 3 (1987) 379–387.
- [13] T.P. Ryan, S.D. Aust, *Crit. Rev. Toxicol.* 22 (1992) 110–141.
- [14] C. Rice-Evans, R. Bordon, *Prog. Lipid Res.* 32 (1993) 71–110.
- [15] G.A. Pogorian, Y.S. Dremina, V.S. Sharov, A.Y. Zakaryan, Y.A. Vladimirov, *Free Radic. Biol. Med.* 3 (1987) 379–387.
- [16] W.H. Koppenol, J.F. Leibman, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 99–101.
- [17] E.S. Driomina, V.S. Sharov, Y.A. Vladimirov, *Free Radic. Biol. Med.* 15 (1993) 239–247.
- [18] P. Hochstein, K. Nordebrad, L. Ernester, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14 (1964) 323–328.
- [19] I.E. Borisovitch, C.P.F. Borges, G.P. Borisovitch, V.E. Yushmanov, S.R.W. Louro, M. Tabak, *Z. Naturforsch.* 51-C (1996) 578–590.
- [20] L.P. Davies, V. Huston, *Eur. J. Pharmacol.* 73 (1981) 209–211.
- [21] M.W. McEnery, *J. Bioenerg. Biomembr.* 24 (1992) 63–69.
- [22] J.D. Hirsch, C.F. Beyer, L. Malkowitz, B. Beer, A.J. Blume, *Mol. Pharmacol.* 34 (1988) 157–163.
- [23] Y. Itzhak, A.S. Bender, M.D. Norenberg, *Brain Res.* 644 (1994) 221–225.
- [24] F. Zavala, M. Lanfant, *Ann. NY Acad. Sci.* 496 (1987) 240–249.
- [25] K.E. Krueger, *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995) 453–470.
- [26] W.C. Shineider, G.H. Hogeboom, *J. Biol. Chem.* 183 (1951) 123–128.
- [27] A.G. Gornal, C.I. Barwill, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751–757.
- [28] M. Tabak, I.E. Borisovitch, *Biochim. Biophys. Acta* 1116 (1992) 241–249.
- [29] C.P.F. Borges, I.E. Borisovitch, M. Tabak, *J. Luminescence* 65 (1995) 105–112.
- [30] P.M. Nassar, L.E. Almeida, M. Tabak, *Biochim. Biophys. Acta* 1328 (1997) 140–150.
- [31] D.E. Robertson, H. Rottenberg, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 11039–11048.
- [32] K.A. Yagi, *Biochem. Med.* 15 (1976) 212–232.
- [33] C.H. Kennedy, D.F. Church, G.W. Winsgton, W.A. Pryor, *Free Radic. Biol. Med.* 12 (1992) 361–387.
- [34] P.M. Nassar, L.E. Almeida, M. Tabak, *Langmuir* 14 (1998) 6811–6817.
- [35] G. Daum, *Biochim. Biophys. Acta* 822 (1985) 1–42.
- [36] J.D. Hirsch, L.M. Beyer, C.C. Loullis, A.J. Blume, *Mol. Pharmacol.* 34 (1988) 164–172.
- [37] L.X. Tang, J.L. Yang, X. Shen, *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 265–272.

ANEXO III

Release of NO by a nitrosyl complex upon activation by the mitochondrial reducing power

José Carlos Toledo Jr.^a, Luiz Gonzaga de França Lopes^a, Armindo Antonio Alves^b,
Lucia Pereira da Silva^b, Douglas Wagner Franco^{a,*}

^aInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense 400, CP 780, 13560-970, São Carlos-SP, Brazil

^bInstituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970, Campinas-SP, Brazil

Received 14 February 2001; received in revised form 7 November 2001; accepted 19 November 2001

Abstract

The reaction of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]³⁺ and mitochondria was investigated through differential pulse polarography and fluorimetry. The nitrosyl complex undergoes one-electron reduction centered on the NO ligand site. The reaction between the mitochondrial reductor and *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]³⁺ exhibits a second order specific rate constant calculated as $k=2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The reduced species, *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]²⁺, quickly releases NO, yielding *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺. The low toxicities of both *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]²⁺ and *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺ and its ability to release NO after reductive activation in a biological medium make the nitrosyl compound a useful model of a hypotensive drug. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Nitrosyl; Mitochondria; NADH; Ruthenium complexes

1. Introduction

As metal ions are involved not only in the biological production of NO [1–3], but also are found as part of the receptor sites for this molecule on a wide variety of physiological processes [4,5], it is important to understand the chemistry of NO when coordinated to metal ions. Moreover, since metallonitrosyl compounds, such as nitroprusside [6], are used as pharmaceuticals to regulate physiological processes through the controlled release of NO, ways of modulating the release of this molecule must be developed [7–11].

Hypoxia is an important condition to be taken into account in different clinical situations such as tissue injury and cancer treatment. For instance, solid tumors contain a population of cells which are distant from the blood supply, and thus are under low oxygen concentrations, i.e. hypoxia. This low oxygen environment renders these cells resistant to both radio- and chemotherapy [12]. These cells are thus the stem cell population which can give rise to tumor reoccurrence after treatment. Since hypoxia creates a

reducing cellular environment, strategies using bio-reductive agents have been investigated to target these cell populations [13]. Using electron transfer from components of the mitochondria, these agents are activated only under low oxygen environment. Recent studies have shown that release of NO can dramatically enhance the effectiveness of both radio- and chemotherapy in hypoxic cells [14]. In our laboratory we are exploring the reductive chemical release of NO from ruthenium complexes as potential bio-reductive NO releasing agents specifically targeted to hypoxic tissues.

Ruthenium(II) ammine complexes are generally stable and provide a good model for the systematic study of various dissociation pathways [15–17]. The primary coordination sphere of ruthenium ammine complexes typically remains intact after the oxidation of Ru(II) to Ru(III) [15–18]. The *trans*-[Ru(NH₃)₄LNO]²⁺ system was chosen for investigation due to the ammonia ligands substitution inertness, and the fact that chemical properties of the coordinated NO can be modulated by judicious choice of L [19–21]. In ruthenium(II) chemistry, tertiary phosphorus ligands such as P(OEt)₃ used here are known to be very effective in labilizing *trans* ligands and in stabilizing low oxidation states of the metal [17,18,22].

The reduction product of *trans*-[Ru(N-

*Corresponding author. Tel.: +55-21-1627-39976; fax: +55-21-1627-39976.

E-mail address: douglas@iqsc.sc.usp.br (D.W. Franco).

$\text{H}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}]^{3+}$ complex ion has been shown to have one of the highest known specific rate constants for release of NO yet measured ($k_{-\text{NO}}=0.97 \text{ s}^{-1}$, at 25°C) [23], and presents a strong facilitating effect on the population spike in hippocampal slices from C57BL/6J+ mice [24]. Furthermore, this compound and its corresponding aqua species, $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, show very low toxicities on IC_{50} tests [25] and exhibit hydrophobic solubility properties [17] due to the $\text{P}(\text{OEt})_3$ ligand. The $(E_{1/2})_{\text{NO}^+/\text{NO}^0}$ of the title compound is -0.11 V versus saturated calomel electrode (SCE) [23], thus it is plausible that it could be reduced by natural biological reductors [26]. Considering the redox potential range of the components of the respiratory chain in the mitochondrial system [26,27], we suggest here the use of mitochondria as a biological probe for the reduction of $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$.

Here we report the reduction of $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ by mitochondria with a consequent nitric oxide release due to the phosphite *trans*-effect and *trans*-influence.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The chemicals (high purity) were used as supplied. All solvents were purified following known procedures [28] and doubly distilled water was used throughout. All preparations and measurements were carried out under an argon atmosphere, using well-known techniques for handling air-sensitive compounds [29]. Ionic strength was adjusted with KCl or CF_3COONa . The $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ was prepared as previously described [23].

Liver mitochondria were isolated as described [30] from overnight fasted Wistar rats weighing $\sim 200 \text{ g}$. The resulting mitochondrial pellet was resuspended in an isotonic medium containing 130 mM KCl and 20 mM HEPES buffer ($\text{pH } 7.2$) to give a final protein concentration of $80\text{--}100 \text{ mg ml}^{-1}$, as measured by the biuret method modified by the addition of cholate [31] and using serum albumin as standard.

These isolated mitochondria (1.0 mg ml^{-1}) in the presence of either malate (2 mM) or succinate (2 mM) combined with rotenone ($4 \mu\text{M}$) were used as the NADH source [32], the presumed reductant. Since rotenone at this concentration is known to completely inhibit the mitochondrial electron transport at the complex I reaction chain, its presence in the reaction medium ensures that all mitochondrial pyridine nucleotide content is in the reduced form, NADH [32–37]. According to electrochemical and spectrophotometric measurements, rotenone, malate or succinate, alone or combined, do not react with $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ in the same experimental con-

ditions. Fluorimetric measurements clearly indicate that NADH is quite stable (for more than 10 min) in presence of rotenone, malate and/or succinate.

The reaction between $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ion and NO in aqueous solution has been studied under pseudo first order conditions (excess of NO) following the absorbance changes of the aqua complex at $\lambda=316 \text{ nm}$, $\epsilon=6.5\times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18]. The observed rate constants were determined from slopes of plots $\ln(A_i - A_\infty)$ versus time (A_i , initial absorbance value; A_∞ , absorbance at each time). These plots are linear for at least three half-lives. The second order specific rate constants were calculated by dividing k_{obs} by the NO concentration. Oxygen free, saturated NO solution was prepared and standardized according to the literature method [4,5].

The $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ ions reduction was observed by following the changes in the differential pulse polarogram ($C_{\text{Ru}}=0.50 \text{ mM}$, Hepes/KCl $\text{pH } 7.2$, $\mu=100 \text{ mM}$, $T=25^\circ\text{C}$). NADH deactivation through hydrolysis ($k=8.6\times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) [32] is negligible on the time scale of the differential pulse polarographic (DDP) experiments. The electrochemical measurements were carried out using an EG&G Princeton Applied Research (PAR) Model 264 A, and a three electrode electrochemical cell: glassy-carbon, platinum and saturated calomel (SCE) electrodes were used respectively as working, auxiliary and reference electrodes.

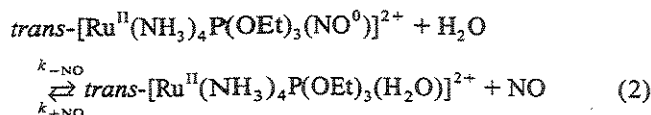
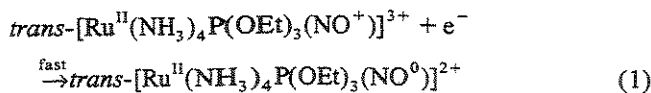
The NADH oxidation in the intact and homogenized mitochondria was observed using time resolved fluorescence [32] with $\lambda_{\text{irradiation}}=366 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}}=450 \text{ nm}$ ($C_{\text{Ru}}=3.0 \text{ mM}$, Hepes/KCl $\text{pH } 7.2$, $\mu=100 \text{ mM}$, $T=25^\circ\text{C}$). The decrease in fluorescence of the respiring mitochondria suspension (1.0 mg ml^{-1}) after mixing was measured using an SLM-Aminco SPF-500 spectrofluorometer.

Kinetic reactions were run under pseudo first order conditions (excess of the ruthenium nitrosyl complex). These reactions were monitored by following the NADH fluorescence decrease at $\lambda_{\text{emission}}=450 \text{ nm}$. The observed rate constants, k_{obs} , were determined by the slopes of the plots of fluorescence intensity versus time. These plots are linear for at least three half-lives. Second order specific rate constants were obtained from plots of k_{obs} versus concentration of the $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ species.

3. Results and discussion

Only one redox process is observed in the voltammetric experiments of solutions containing the $\text{trans}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ ion in the -0.45 V to $+1.2 \text{ V}$ range [23]. According to literature data [20–22], for related ruthenium(II) tetrammine nitrosyl complexes, the reduction at $E_{1/2}=-0.11 \text{ V}$ is in general localized on the NO ligand than on Ru(II) [19–21,23,38].

After one electron reduction of the *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ ion complex, it quickly releases the NO ligand ($k=0.97\text{ s}^{-1}$, $\Delta H^\ddagger=1.0\times 10^2\text{ KJ/mol}$, $\Delta S^\ddagger=90\text{ J/mol K}$) [23] according to



The presence of resulting *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄P(OEt)₃(H₂O)]²⁺ aqua product was confirmed by its UV-vis spectrum ($\lambda=316\text{ nm}$; $\epsilon=6.5\times 10^2\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) as well as by cyclic voltammogram ($E_{\text{Ru}}^{0\text{ III/II}}=0.46\text{ V vs. SCE}$) [17,18].

The second order specific rate constant ($k_{+\text{NO}}$), was estimated by us as $30\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ at 25°C through spectrophotometric measurements. Thus, the value of 30 M^{-1} , calculated from the ratio $k_{+\text{NO}}/k_{-\text{NO}}$, could be considered as an upper limit for the NO affinity for the *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(H₂O)]²⁺.

As pointed out before, the voltammogram of a solution containing the *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ ion shows one cathodic wave, at $E_{\text{pc}}=-0.11\text{ V}$ [23], attributed to the redox couple *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]^{3+/2+}. When a mitochondrial suspension was added to a solution containing the *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ complex ion, this peak disappeared completely (Fig. 1).

Since, the *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ is a coordinatively saturated species, and on the time scale of these experiments does not undergo any substitution reaction [23], the observation above suggests the nitrosyl complex

was fully reduced by mitochondrial reducing agents. Under the same experimental conditions, we also observed the mitochondrial NADH oxidation by *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ in intact mitochondria, in presence of either malate or succinate as a substrate and rotenone as a inhibitor [26,32–37], as measured by the fluorescence decrease at 366-nm excitation and 450-nm emission (Fig. 2).

There are numerous components present in the mitochondrial respiratory chain thermodynamically able to reduce [26] the nitrosyl ion complex, such as NADH, flavin coenzymes FMNH₂ and FADH₂, complex I and complex II iron sulfur centers and the mobile electron carrier ubiquinone. Although the exact site of rotenone binding is still unknown, it is well-accepted [26] that in the presence of this inhibitor the flavoproteins and all the Fe/S centers are in their reduced forms. Thus, it is likely that the inhibition by rotenone occurs at the final stage of the electron transfer of the complex I reactions chain [26]. However, when malate is used as substrate, it is enzymatically oxidized to oxaloacetate, thus reducing NAD⁺ to NADH [32–37]. Since rotenone was present, the further re-oxidation of NADH by the respiratory chain is inhibited [32–37]. The NAD⁺ is not fluorescent [26], thus the decrease in fluorescence observed in Fig. 2 supports the hypothesis that NADH has been oxidized by the nitrosyl complex. Under the other experimental condition, succinate was the substrate and its enzymatic oxidation causes FAD reduction to FADH₂. Since the electron transport through the components of the respiratory chain now occurs beyond the rotenone inhibition site, FADH₂ does not remain in the reduced form, but is immediately re-oxidized by ubiquinone and no FADH₂ is available to reduce the nitrosyl complex [32–37]. Moreover, under

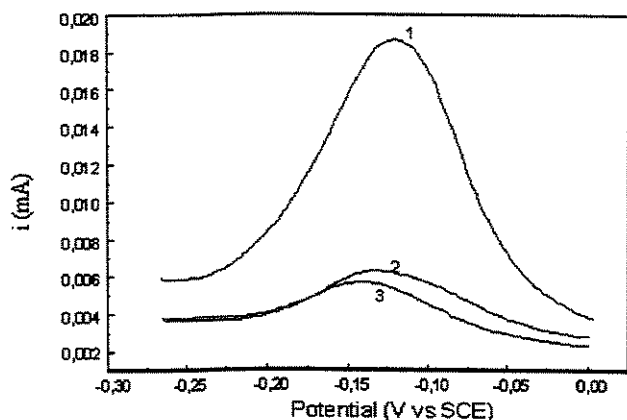


Fig. 1. Differential pulse polarograms for *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO](PF₆)₃, $\mu=0.1\text{ M}$, $T=25^\circ\text{C}$, scan rate= 10 mV s^{-1} : (1) $5\text{ mM trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$ in HEPES/KCl medium, pH 7.2; (2) after the addition of mitochondria (1 mg ml^{-1}) in the presence of 2 mM malate and $4\text{ }\mu\text{M rotenone}$; (3) after the addition of mitochondria (1 mg ml^{-1}) energized by 2 mM succinate in the presence of $4\text{ }\mu\text{M rotenone}$.

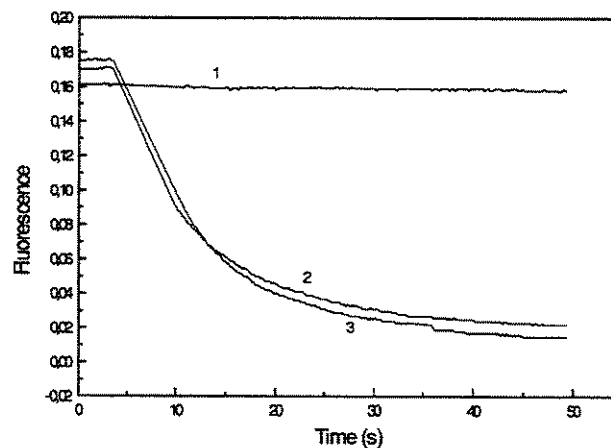
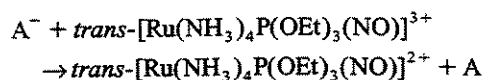
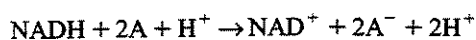


Fig. 2. Fluorescence decrease of mitochondrial NADH: (1) mitochondria (1 mg ml^{-1}) in the presence of either 2 mM malate or 2 mM succinate and $4\text{ }\mu\text{M rotenone}$ in incubation medium; (2) as 1, but using 2 mM malate as substrate and $3\text{ mM trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$; (3) as 1, but using 2 mM succinate as substrate and $3\text{ mM trans-[Ru(NH}_3)_4\text{P(OEt)}_3\text{NO]}(\text{PF}_6)_3$.

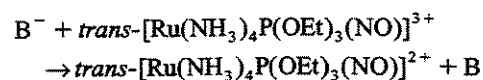
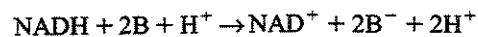
both conditions the same fluorescence behavior can be observed, as shown in Fig. 2, thus indicating that the nitrosyl complex reduction occurs through the simultaneous oxidation of NADH. Therefore, the use of malate or succinate as substrate in the presence of rotenone indicates, as explained above, that NADH is likely to be the only available reductor species in the mitochondrial suspension to react with the nitrosyl complex.

Assuming NADH to be the most available reductor under our experimental conditions, the second order specific rate constant for the NADH oxidation using intact mitochondria was calculated as $k = 20 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Under comparable experimental conditions, but using freshly homogenized mitochondria, we found $k = 23 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Therefore, $2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ would be a reliable value for the second order specific rate constant for NO ligand reduction in $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ by mitochondrial system.

At the moment we do not have clear evidence for direct reaction between pure NADH and the $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ ion. Actually, despite it being thermodynamically allowable [26], the reaction between commercial NADH and $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ proved to be much slower than that observed with mitochondrial suspension. This is not unexpected since the effective redox potential of a component in the respiratory chain is usually different from the redox potential of the purified individual component [26]. However, the possibility of an electron-transfer mediator (A) siphoning off the electron flow to the nitrosyl complex in such a complex system as mitochondria, cannot be completely ruled out.



Indeed, Fig. 3 shows a significant non-zero intercept that could reflect a more complex redox mechanism mediating the net oxidation of NADH, involving the possibility of a competitive nitrosyl complex reduction by different electron carriers (A and B) of the mitochondrial respiratory system. The detailed study of the mechanism is beyond the scope of the present work and is currently under investigation at our laboratory.



The Ru(III) complexes tend to be less biologically active than the similar Ru(II) complexes [39]. In the current uses of ruthenium-based drugs, utilization of the in vivo reduction of Ru(III) to Ru(II) by biological reductors agents is a common approach to activation [39]. Moreover, in the design of a metal complex intended to function as a NO donor, the in vivo reduction of M^{n+}NO^+ fragment to

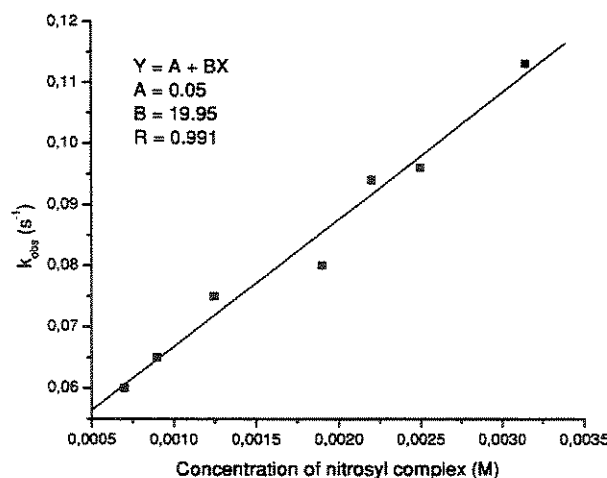


Fig. 3. Plot of k_{obs} versus concentration of $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ for the reaction between this compound and mitochondria (pH 7.2, $\mu = 100 \text{ mM}$, $T = 25 \pm 1^\circ \text{C}$).

M^{n+}NO^0 is also fundamental [6–8,23,24]. Thus, this initial observation that an intracellular component is able to reduce the nitrosyl ligand is very promising as an optional route for drug activation and target site specificity.

4. Conclusions

The one electron reduced form of the $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ complex exhibits fast NO release. Its reduction potential shows it to be suitable for reduction by biological systems. Indeed, Figs. 1 and 2 present through two different experimental methods, the reduction of $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ with concomitant mitochondrial NADH oxidation. The observation that a nitrosyl ligand can be reduced by an intracellular component is very important providing a good model for in vivo reduction of metallopharmaceuticals as a strategy for drug activation.

These results, taken together with the low toxicity of this complex [25] and of its corresponding aqua species $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, strongly suggest the title ion complex as an interesting new targeted model for NO release in vivo. In fact, a related study in mice shows that the $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}]^{3+}$ ion complex promotes a hypotensive effect comparable to the sodium nitroprusside, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ [25], a drug regularly used in clinical trials as a NO donor [6].

Acknowledgements

The authors thank the FAPESP, CNPq and CAPES for Financial Support and Johnson and Matthey for the loan of RuCl_3 . The authors also thank Professors Jeff C. Curtis

and David Wink for reading the paper and for their suggestions.

References

- [1] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, *Pharm. Rev.* 43 (1991) 109.
- [2] R.M.J. Palmer, D.S. Ashton, *Nature* 333 (1988) 664.
- [3] L.J. Ignarro (Ed.), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press, New York, 2000.
- [4] J. Lancaster Jr. (Ed.), *Nitric Oxide: Principles and Actions*, Academic Press, New York, 1996.
- [5] F. Martin, S.S. Jonathan (Eds.), *Methods in Nitric Oxide Research*, Wiley, Chichester, 1996.
- [6] M.J. Clarke, J.B. Gaul, *Struct. Bond.* 81 (1993) 147.
- [7] S.P. Fricker, *Platinum Metals Rev.* 4 (1995) 150.
- [8] S.P. Fricker, E. Slade, N.A. Powell, O.J. Vaughan, G.R. Henderson, B.A. Murrer, I.L. Megson, S.R. Bisland, F.N. Flitney, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 1441.
- [9] Y. Chen, M.A. Sweetland, R.E. Shepherd, *Inorg. Chim. Acta* 260 (1997) 163.
- [10] D. Lang, L.G.F. Lopes, A.A. Ferro, L.L.G. Vasconcellos, J. Davis, A. Prock, D.W. Franco, E. Tfouni, A. Wieraszko, M.J. Clarke, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2294.
- [11] Y. Chen, R.E. Shepherd, *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 183.
- [12] D.M. Brizel, S.P. Scully, J.M. Harrelson, L.J. Layfield, J.M. Bean, L.R. Prosnitz, M.W. Dewhirst, *Cancer Res.* 56 (1996) 941.
- [13] P. Workman, I.J. Stratford, *Cancer Metastasis* 12 (1993) 73.
- [14] D.A. Wink, Y. Vodovotz, J.A. Cook, M.C. Krishna, D. Coffin, W. DeGraff, A.M. Deluca, J. Liebmann, J.B. Mitchell, *Biochemistry (Mosc.)* 63 (1998) 802.
- [15] P.C. Ford, *Coord. Chem. Rev.* 5 (1970) 75.
- [16] H. Taube, *Comm. Inorg. Chem.* 1 (1981) 17.
- [17] D.W. Franco, H. Taube, *Inorg. Chem.* 17 (1978) 573.
- [18] D.W. Franco, *Coord. Chem. Rev.* 119 (1992) 199.
- [19] S.S.S. Borges, C.V. Davanzo, E.E. Castellano, J.Z. Schepctor, S.L. Silva, D.W. Franco, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 2670.
- [20] M.G. Gomes, C.U. Davanzo, S.C. Silva, L.G.F. Lopes, P.S. Santos, D.W. Franco, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 94 (1998) 601.
- [21] C.W.B. Bezerra, S.C. Silva, M.T.P. Gambardella, R.H.A. Santos, L.M.A. Plicas, E. Tfouni, D.W. Franco, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 5660.
- [22] J.C. Nascimento Filho, J.B. Lima Neto, D.W. Franco, *J. Mol. Catalysis* 90 (1994) 257.
- [23] L.G.F. Lopes, E.E. Castellano, J.Z. Schepctor, A.G. Ferreira, C.U. Davanzo, M.J. Clarke, A. Wieraszko, D.W. Franco, *Inorg. Chem.* (submitted for publication).
- [24] A. Wieraszko, M.J. Clarke, D. Lang, L.G.F. Lopes, D.W. Franco, *Life Sci.* 68 (2001) 1535.
- [25] A.S. Torsoni, B.F. Barros, J.C. Toledo, Jr., M. Haun, M.H. Krieger, E. Tfouni, D.W. Franco, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* (in press).
- [26] D.G. Nicholls (Ed.), *Bioenergetic: An Introduction To the Chemiosmotic Theory*, Academic Press, London, 1982.
- [27] B. Testa, J. Caldwell (Eds.), *Biochemistry of Redox Reactions*, Academic Press, London, 1995.
- [28] D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, D.R. Perrin (Eds.), *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Elmsford, NY, 1980.
- [29] D.F. Shriver (Ed.), *The Manipulation of Air-Sensitive Compound*, McGraw-Hill, New York, 1969.
- [30] W.C. Schneider, G.H. Hogeboom, *J. Biol. Chem.* 183 (1950) 123.
- [31] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. Daid, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751.
- [32] J.M.L. Einstein (Ed.), *Methods in Enzymology XII*, Vol. XXX, Academic Press, New York, 1969.
- [33] E. Zerbetto, L. Vergani, F. Dabbeni-Sala, *Electrophoresis* 18 (1997) 2059.
- [34] A.E. Vercesi, V.L. Ferraz, D.V. Macedo, G. Fiskum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 (1998) 934.
- [35] D.V. Macedo, M.F. Nepomuceno, L. Pereira da Silva, *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 595.
- [36] D.V. Macedo, C. Costa, L. Pereira da Silva, *Comp. Biochem. Physiol.* 118b (1997) 209.
- [37] R.H. Valente, J.C. Novello, S. Marangoni, B. Oliveira, L. Pereira da Silva, D.V. Macedo, *Venon. Toxicon.* 36 (1998) 901.
- [38] S.I. Gorelsky, S.C. Silva, A.B.P. Lever, D.W. Franco, *Inorg. Chim. Acta* 302 (2000) 698.
- [39] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, *Platinum Metals Rev.* 45 (2001) 62.

