

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Karine Beatriz Costa**

**EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO DA AMOSTRA NA ESTABILIDADE  
DE BIOMARCADORES DE ESTADO REDOX NO GASTROCNÊMIO, CORAÇÃO E  
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE  
EXERCÍCIO MÁXIMO**

**Diamantina  
2017**

**Karine Beatriz Costa**

**EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO DA AMOSTRA NA ESTABILIDADE  
DE BIOMARCADORES DE ESTADO REDOX NO GASTROCNÊMIO, CORAÇÃO E  
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE  
EXERCÍCIO MÁXIMO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do  
Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das  
exigências do Programa Multicêntrico de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas, como requisito  
para obtenção do título de Mestra.

Orientadora: Etel Rocha Vieira

**Diamantina  
2017**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

C837e

Costa, Karine Beatriz

Efeito do tempo de congelamento da amostra na estabilidade de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos swiss submetidos a uma sessão de exercício máximo. / Karine Beatriz Costa. – Diamantina, 2017.

99 p. : il.

Orientadora: Etel Rocha Vieira

Dissertação (Mestrado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Estresse oxidativo. 2. Desbalanço redox. 3. Criopreservação. 4. Dano oxidativo. 5. Enzima antioxidante. I. Vieira, Etel Rocha. II. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 612**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).


KARINE BEATRIZ COSTA

**Efeito do tempo de congelamento da amostra na estabilidade de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos swiss submetidos a uma sessão de exercício máximo**


Dissertação apresentada ao PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - STRICTO SENSU, nível de MESTRADO como parte dos requisitos para obtenção do título de MAGISTER SCIENTIAE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Orientador : Prof.ª Dr.ª Eteí Rocha Vieira

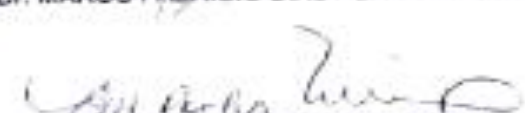
Data da aprovação : 14/07/2017



Prof.Dr. JORGE LUIZ PESQUERO - UFMG



Prof.Dr. MARCO FABRICIO DIAS PEIXOTO - UFVJM



Prof.ª Dr.ª ETEL ROCHA VIEIRA - UFVJM

DIAMANTINA

*Aos meus amados pais por todos os ensinamentos que vão além dos livros, por transformarem meus sonhos em seus.*

*Ao Marcelo, por todo amor e cuidado.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser tão generoso comigo, concedendo-me muitas oportunidades, saúde e sabedoria para concluir todas as etapas desse estudo, além de colocar em meu caminho as melhores pessoas, verdadeiros anjos.

Palavras não podem expressar o quanto eu agradeço aos meus pais por todos os sacrifícios que fazem por mim, pela motivação, exemplo e confiança. É por vocês que acordo todos os dias sorrindo e dando o meu melhor sempre. Obrigada por sonharem e acreditarem em meus sonhos comigo.

Obrigada ao meu irmão por todo o incentivo. Aos meus avós (*in memoriam*, minha amada avó Alice), tios (*in memoriam*, tia Leiva e tia Maria) e primos pelo carinho e torcida indiscutível.

Ao Marcelo, meu companheiro de todos os momentos, não poderia imaginar todo esse percurso sem você. Obrigada por sempre confiar em mim, por me fazer compreender todos os dias o sentido da fé, do acreditar. Agradeço por estar comigo a cada passo, seja na vida ou na ciência, por caminhar junto e construir sonhos.

Minha eterna gratidão à Etel. Sem sua paciência, incentivo, entusiasmo e imenso conhecimento, esse trabalho não teria sido possível. Você não só me apresentou ao mundo da pesquisa, como me fez amá-lo. Obrigada por me fazer crescer.

Agradeço aos anjos de jaleco que a pesquisa me apresentou, a melhor equipe que eu poderia imaginar, o time BIOEX! Bruna, Rosa, Patrício, Patrícia, Vinícius, Marcos, Gabriela, Bakir e os agregados durante esse estudo, Fran e Chris, não é preciso dizer o quanto são especiais para mim e que, sem vocês eu não poderia ter concluído esse trabalho. Obrigada pela disponibilidade de vocês e entusiasmo durante todas as etapas do estudo. Vocês são sensacionais!

Sou muitíssimo grata aos grandes amigos Josué, Rodrigo, Gabriela, Dinilza, Vilmarlene, Anna Satéphane, Viviane, Helen e Édina que, mesmo indiretamente, também contribuíram para esse estudo, seja através de orações ou incentivos.

Aos amigos de pós-graduação do Labimuno, LEB, LIM, LaFiEx e LETFis.

Aos professores que contribuíram para a realização dos experimentos por permitirem o uso dos laboratórios (LIM, NEA, LabImuno) que coordenam. E a todos os professores que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento acadêmico e científico.

Para sempre serei grata à Tatiana Barreto e professor Jader pela acolhida no Laboratório de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular (LAMEX) da UFMG, por toda atenção e conhecimento transmitido.

Obrigada ao Biotério do CEBIO/UFMG, especialmente ao Cândido, pelo fornecimento dos animais.

Agradeço aos órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). Agradecimento especial ao CNPq, que também auxiliou-me com o fornecimento da bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pelo ensino público e de qualidade e pelo fornecimento de espaços.

Ao Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq) pela estrutura, equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos.

Enfim, a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído meus sinceros e eternos agradecimentos.

*“Um bom designer tem muito em comum com um bom pesquisador, ambos buscam excelência e perfeição. E você tem que se concentrar muito nos detalhes, e não tem como saber realmente qual será o resultado final antes de obtê-lo.”*

*(May-Britt Moser, Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2014)*



## RESUMO

O desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a ação dos sistemas de defesa antioxidante é uma condição conhecida como desequilíbrio redox. O exercício físico máximo é associado ao aumento da produção de espécies reativas e pode ser utilizado como modelo fisiológico para o estudo do desequilíbrio redox. Condições pré-analíticas de manejo de amostras biológicas, como o tempo de congelamento, podem interferir na integridade de analitos. Assim, esse estudo avaliou o efeito do tempo de congelamento da amostra na quantificação de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos *swiss* submetidos a uma sessão de exercício máximo. Vinte e seis camundongos foram divididos em grupo controle, que não realizou exercício, e grupo exercício, submetido a uma sessão de exercício em piscina, com aumento progressivo de carga, até a exaustão. Os tecidos foram coletados imediatamente após o protocolo experimental e seccionados para avaliação a fresco e após 1, 3 e 6 meses de congelamento a -80 °C. O exercício máximo modificou o estado redox de tecidos frescos, demonstrado pelo aumento da peroxidação lipídica, da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase e diminuição da capacidade antioxidante total em todos os tecidos analisados e pelo aumento de derivados carbonílicos em proteínas no gastrocnêmio e cérebro. O efeito do exercício sobre a peroxidação lipídica foi reduzido no gastrocnêmio congelado por 6 meses e no cérebro e coração isso ocorreu já com um mês de congelamento da amostra. Por outro lado, o tempo de congelamento não alterou o efeito do exercício sobre os derivados carbonílicos em proteínas e a capacidade antioxidante total não enzimática. A resposta ao exercício da catalase, em todos os tecidos, e da superóxido dismutase no gastrocnêmio foi reduzida após um mês de congelamento. Já no cérebro e coração a resposta da superóxido dismutase ao exercício foi reduzida apenas após três meses de congelamento. De maneira geral, os resultados desse estudo mostram que o tempo de congelamento afeta, de maneira dependente do tecido e do marcador em análise, a resposta de biomarcadores do estado redox a uma sessão de exercício máximo.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo. Desbalanço redox. Criopreservação. Dano oxidativo. Enzima antioxidante.

## ABSTRACT

The imbalance between the production of oxygen and nitrogen species and the antioxidant system function is known as redox imbalance. Maximum physical exercise is associated with increased production of reactive species and can be used as a physiological model for the study of redox imbalance. Pre-analytical conditions, such as sample freezing duration, may interfere with analyte integrity. Thus, this study evaluated the effect of sample freezing duration on the quantification of redox biomarkers in the gastrocnemius, heart and brain of Swiss mice submitted to a maximal exercise session. Twenty-six mice were divided into control group, who did not exercise, and exercise group, who performed a maximal swim test. The tissues were collected immediately after the experimental protocol and sectioned for fresh evaluation and after 1, 3 and 6 months of freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The maximal exercise modified the redox status of fresh tissues, demonstrated by the increase on levels of lipid peroxidation, activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase and reduction of the total antioxidant capacity, in all the analyzed tissues, and by the increase of protein carbonyl content in the gastrocnemius and brain. The effect of exercise on lipid peroxidation was reduced in gastrocnemius frozen for 6 months and in the brain and heart this occurred in samples after one month of freezing. On the other hand, the freezing duration did not alter the exercise effect on proteins carbonyl content and the total non-enzymatic antioxidant capacity. The catalase response to exercise in all tissues and the superoxide dismutase response in the gastrocnemius were reduced after one month of freezing. However in the brain and heart the response of superoxide dismutase to exercise was reduced only after three months of freezing. This study shows that freezing duration, depending on the tissue and marker under analysis, affects the evaluation of the redox state response to a maximal exercise session.

**Keywords:** Oxidative stress. Redox imbalance. Cryopreservation. Oxidative damage. Antioxidant enzyme.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema representativo do processo de peroxidação lipídica.....	24
Figura 2- Exemplo de processos de formação de grupos carbonilas por oxidação de aminoácidos.....	25
Figura 3- Reação entre o ácido tiobarbitúrico e malondialdeído.....	32
Figura 4 - Reação do grupo carbonila com o 2,4-dinitrofenilhidrazina. ....	33
Figura 5 - Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio por xantina oxidase.....	39
Figura 6 - Desenho experimental do estudo.....	48
Figura 7 - Piscina utilizada no estudo.....	49

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito do exercício máximo e do tempo de congelamento da amostra nas concentrações de TBARS no gastrocnêmio, coração e cérebro.....60
- Tabela 2 - Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento nas concentrações de derivados carbonílicos em proteínas no gastrocnêmio, coração e cérebro...60
- Tabela 3 - Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na atividade da catalase no gastrocnêmio e coração.....63
- Tabela 4 - Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na atividade da superóxido dismutase no gastrocnêmio, coração e cérebro.....63
- Tabela 5 - Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na capacidade antioxidante total pelo método FRAP no gastrocnêmio, coração e cérebro. ....65
- Tabela 6 - Efeito do tempo de congelamento em biomarcadores de parâmetros redox no gastrocnêmio, coração e cérebro na resposta ao exercício máximo. ....68

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina

ADP – Difosfato adenosina

AMP – Monofosfato de adenosina

BioEx – Laboratório de Biologia Molecular e do Exercício

BSA - *Bovine serum albumin*

CAT – Catalase

CEBIO – Centro de Bioterismo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIPq - Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde

cm - Centímetro

CON – Grupo controle

COX - Citocromo oxidase

Cu,Zn-SOD - Superóxido dismutase cobre/zinco

Cu<sup>2+</sup> - Íon Cobre (II)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

EC - *Enzyme commission number*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ERO - Espécies reativas de oxigênio

EX – Grupo exercício

EUA - Estados Unidos da América

Fe<sup>2+</sup> - Íon ferroso

Fe<sup>3+</sup> - Íon férrico

Fe<sup>3+</sup>-TPTZ - Ferri–tripiridiltriazina

Fe<sup>2+</sup>-TPTZ - Ferroso–tripiridiltriazina

FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*

*g* - Força da gravidade

g - Grama

GPx - Glutathione Peroxidase

GR- Glutathione Redutase

GSH - Glutathione Reduzida

GSSH - Glutathione Dissulfeto

GST - Glutathione S-transferase

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

H<sub>2</sub>O - Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

L· - radical lipídico

LAFIEX – Laboratório de Fisiologia do Exercício

LabImuno - Laboratório de Imunologia

LEB – Laboratório de Ensaios Biológicos

LETfis – Laboratório Experimental de Treinamento Físico

LH – Ácido graxo poli-insaturado

LIM – Laboratório de Inflamação e Metabolismo

L-L – Ligação lipídio-lipídio

LOO· - radical peroxila

LOOH - hidroperóxido de lipídio

M – Molar

MDA - Malondialdeído

mg - miligrama

mM – milimolar

mL - mililitro

min - minuto

µM – Micromolar

MnSOD - Superóxido Dismutase Manganês

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NEA – Núcleo de Experimentação Animal

nmol - Nanomol

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion superóxido

HO<sup>•</sup> - radical hidroxila

PBS - Tampão fosfato salina

pH – Potencial Hidrogênico

SOD - Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS - *Thiobarbituric Reactive Substances*

T0 – a fresco

T1- 1 mês de congelamento

T2 – 3 meses de congelamento

T3 – 6 meses de congelamento

UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 Espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo .....	21
2.2 Sistema de defesa antioxidante .....	26
2.3 Desequilíbrio redox e seus marcadores em sistemas biológicos .....	31
2.4 Desequilíbrio redox induzido por exercício e seu impacto em diferentes tecidos	34
2.5 Variabilidade pré-analítica nas análises de estado redox .....	40
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1 Animais .....	47
4.2 Protocolo Experimental.....	49
4.2.1 Dissecção.....	50
4.3.1 Preparo da amostra – Maceração .....	51
4.3.2 Análise da peroxidação lipídica .....	52
4.3.3 Derivados carbonílicos em proteínas .....	52
4.3.4 Atividade da enzima CAT.....	53
4.3.5 Atividade da enzima SOD.....	53
4.3.6 Capacidade antioxidante não enzimática .....	54
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A respiração celular e o conseqüente consumo de oxigênio oferecem vantagem metabólica sobre a vida anaeróbica. No entanto, o metabolismo do oxigênio gera uma série de produtos reativos e potencialmente tóxicos, conhecidos como espécies reativas. O termo espécies reativas refere-se a uma série de compostos de natureza radicalar e não radicalar que podem ser centrados no oxigênio e, assim, são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas espécies são produzidas normalmente durante o metabolismo celular e estão envolvidas em processos fisiológicos, como a expressão gênica, ativação de receptores celulares e na sinalização celular. No entanto, em altas concentrações, as espécies reativas levam a danos nas estruturas celulares, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Mecanismos protetores endógenos e exógenos atuam para minimizar os efeitos lesivos das espécies reativas nos tecidos. Estes mecanismos incluem antioxidantes enzimáticos, como por exemplo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e não-enzimáticos, representados pela glutathione reduzida, vitamina E, vitamina C e ácido úrico. De maneira geral, esses antioxidantes atuam na neutralização ou prevenção da formação das ERO.

O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, quando há um excesso de oxidantes, leva a perturbação da sinalização celular e do controle redox e a danos moleculares, situação esta denominada desequilíbrio redox (SIES e JONE, 2007).

Algumas moléculas podem ser usadas como marcadores de estado redox (condição que representa o potencial de oxidorredução presente na célula ou tecido) em amostras biológicas, já que as ERO têm, em sua maioria, meia vida curta e reagem rapidamente com as biomoléculas. Assim, marcadores de estado redox comumente utilizados incluem, entre outros, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *thiobarbituric acid-reactive substances* - TBARS), indicador de dano oxidativo aos lipídeos, e derivados carbonílicos em proteínas (indicador de dano oxidativo a proteínas).

O exercício agudo é uma condição que sabidamente leva ao aumento da produção de ERO e conseqüentemente a alterações nos sistemas de defesa antioxidantes e no estado redox em praticamente todos os fluidos corporais, células e tecidos. Vários mecanismos são propostos para justificar o desequilíbrio redox ocasionado pelo exercício agudo, que incluem,

entre outros: aumento da respiração mitocondrial, da atividade da xantina oxidase e a ativação de neutrófilos e outros fagócitos.

A forma com que o exercício agudo afeta os diferentes tecidos está relacionada com a capacidade de cada tecido em gerar espécies reativas em resposta ao tipo e a intensidade de exercício e com sua capacidade intrínseca de defesa antioxidante. Dentre os tecidos estudados até o presente, o músculo esquelético, o coração e o cérebro mostram-se muito suscetíveis ao dano oxidativo pelo exercício. Tal fato se deve a características intrínsecas desses tecidos, como a alta atividade metabólica do músculo esquelético durante o exercício e alta atividade metabólica basal do coração e cérebro, além da baixa atividade antioxidante dos três em relação aos outros tecidos (HERRERO e BARJA, 1997). Há um aumento considerável do fluxo sanguíneo no músculo esquelético e cardíaco durante exercício físico intenso, que leva à ativação de vários sistemas geradores de ERO, enquanto no cérebro, o fluxo sanguíneo tende a sofrer moderadas alterações, mas suficientes para aumentar a produção de ERO local (RADAK, CHUNG e GOTO, 2007).

A análise de biomarcadores de estado redox, assim como de outros marcadores biológicos, pode ser afetada por variações pré-analíticas, definidas como qualquer variação sofrida pela amostra entre a coleta e a análise (BETSOU *et al.*, 2009). As variações pré-analíticas são as mais difíceis de gerir em ensaios biológicos e podem ter um grande impacto na confiabilidade dos resultados obtidos (BASTARD, DEYN e ENGELBORGHES, 2015; BETSOU *et al.*, 2009; ESPINA *et al.*, 2009). Assim, condições de coleta, temperatura e o período de armazenamento e o processamento de amostras biológicas devem ser rigorosamente estabelecidos a fim de se evitar erros analíticos.

Em muitas pesquisas é necessário armazenar as amostras por algum período de tempo para análises subsequentes, sendo o congelamento o método mais utilizado de armazenamento em laboratórios de pesquisa. Contudo, o congelamento pode comprometer a integridade bioquímica do tecido, por uma série de fatores relacionados as características físicas e químicas do gelo e ao modo e tempo de armazenamento. A tolerância ao congelamento é dependente do tipo de tecido, que pode apresentar diferente condutibilidade térmica dependendo da sua composição (SINGH e KUMAR, 2013). Além disso, alguns estudos demonstram que a tolerância ao congelamento também é dependente do biomarcador avaliado (JUNG *et al.*, 1993; BORTOLIN *et al.*, 2016).

Considerando os inúmeros fatores relacionados ao congelamento e ao tempo de armazenamento de amostras biológicas que podem interferir consideravelmente em

biomarcadores de estado redox e devido à importância desses biomarcadores na investigação de condições que se relacionam ao desequilíbrio redox, como o exercício físico e a patogênese de algumas doenças, é fundamental determinar qual o tempo ideal de estocagem de amostras para que os resultados não sejam comprometidos. Até então nenhum estudo investigou o efeito do tempo de congelamento em amostras sob condições de desequilíbrio redox. Assim, nesse estudo avaliou-se o efeito do tempo de congelamento da amostra na quantificação de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos *swiss* submetidos a uma sessão de exercício máximo.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo

Uma das vantagens metabólicas dos organismos aeróbicos em relação aos anaeróbicos refere-se à respiração celular, em que a oxidação aeróbica de algumas poucas moléculas de glicose ou ácido graxo produz grande quantidade de energia livre que, então, é convertida em trifosfato de adenosina (ATP), a “moeda” energética da célula. Isso permitiu o desenvolvimento de organismos multicelulares mais complexos. Contudo, o metabolismo aeróbico pode levar à produção de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos que podem comprometer importantes processos biológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; KEHRER, 1993). Esses metabólitos reativos são conhecidos como espécies reativas, que incluem os radicais livres, e a presença de tais espécies em materiais biológicos foi descrita pela primeira vez na década de 50 por Commoner *et al.*, (1954).

Radicais livres são espécies capazes de existir de forma independente. São moléculas, íons ou átomos com um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa ou camada de valência, sendo que elétron desemparelhado (simbolizado por  $\bullet$ ) é aquele que se encontra sozinho em um orbital atômico ou molecular (PRYOR, 1986; HALLIWELL, 1991). Essa característica justifica a alta reatividade e a curta meia vida dos radicais livres em relação a outras moléculas (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

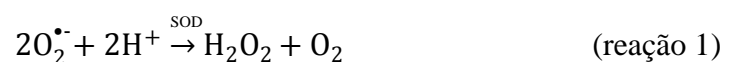
Radicais livres, assim como algumas outras moléculas e íons, derivados do oxigênio são coletivamente denominados de espécies reativas de oxigênio. Portanto, o termo espécies reativas de oxigênio (ERO) engloba uma série de compostos de natureza radicalar e não radicalar. Essa classificação inclui moléculas que são caracterizadas por propriedades químicas e biológicas distintas, como, por exemplo, seletividade e velocidade de reação com moléculas biológicas (HALLIWELL e CROSS, 1994). As principais espécies reativas radicalares centradas no oxigênio são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e as não radicalares são representadas pelo oxigênio singlete ( $^1O_2^*$ ) e pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

As ERO são continuamente formadas em decorrência da atividade metabólica celular, por processos enzimáticos e não enzimáticos, e também podem ser produzidas por processos de origem exógena como a exposição à radiação, poluição do ar, intoxicação por oxigênio, cigarro e álcool (PRYOR, 1986).

O ânion superóxido pode ser gerado pela redução incompleta do oxigênio na cadeia respiratória da membrana mitocondrial interna (FINAUD, LAC e FILAIRE, 2006; JENKIS, 1988). Durante a respiração celular, o oxigênio molecular recebe elétrons por meio da oxidação de NADH e FADH<sub>2</sub> o que leva a formação de gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, que é utilizado na síntese de ATP. Os elétrons, que deveriam servir como substratos para a completa redução da molécula de oxigênio à água, podem escapar da cadeia respiratória durante a passagem pelos complexo I e III e reagir de forma inadequada com o oxigênio, reduzindo-o a superóxido, (BLEIER, *et al.*, 2015; BRAND *et al.*, 2004, MULLER, LIU e VAN REMMEN, 2004).

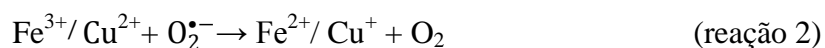
Em decorrência da atividade metabólica celular há outras importantes fontes endógenas de ânion superóxido além da membrana mitocondrial interna, que incluem a reação catalisada pela xantina oxidase, que leva a oxidação de hipoxantinas e xantinas para a formação de ácido úrico e a ação da NAPH oxidase em células fagocíticas durante a explosão respiratória (MOREL, DOUSSIERE e VIGNAIS, 1991; VIÑA; GIMENO e SASTRE, 2000).

O superóxido é relativamente impermeável a membranas celulares, no entanto, possui maior meia-vida em relação a outras ERO, o que lhe permite difundir dentro da célula, aumentando seu número de alvos moleculares (HALLIWELL, 1995). Esse radical pode, ao receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio, sofrer dismutação, formando o peróxido de hidrogênio. Essa reação pode ocorrer de forma espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (reação 1) (FRIDOVICH, 1973; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

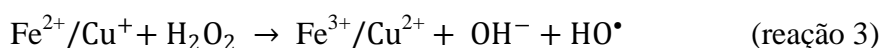


O peróxido de hidrogênio é pouco reativo na ausência de metais de transição e tem meia-vida relativamente longa dentro da célula, o que contribui para que possa difundir-se pelas membranas celulares e exercer tanto seus efeitos tóxicos quanto de sinalização (BIENERT, *et al.*, 2007; BIENERT e CHAUMONT, 2014; SIES, 2014; WATANABE, *et al.*, 2016). Apesar de ser considerado um fraco agente oxidante, o peróxido de hidrogênio é citotóxico e seus efeitos decorrem, principalmente, pela capacidade de formar o radical hidroxila. Este é capaz de reagir facilmente com moléculas próximas ao sítio onde é produzido e é considerada a espécie mais reativa, podendo reagir com quase todas as moléculas encontradas nas células (VALKO *et al.*, 2004; HALLIWELL, 1991; GOMEZ -

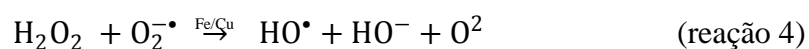
CABRERA, VIÑA e JI, 2009). A formação do radical hidroxila, a partir do peróxido de hidrogênio, ocorre por meio de reações catalisadas por metais de transição, tais como o  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , que estão presentes abundantemente nos tecidos e são potencialmente capazes de formar espécies reativas. Essas reações ocorrem em duas etapas. Na primeira, o  $\text{Fe}^{3+}$  ou o  $\text{Cu}^{2+}$  são reduzidos respectivamente a  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$  pelo ânion superóxido (reação 2).



O  $\text{Fe}^{2+}$  ou o  $\text{Cu}^+$  é utilizado na segunda etapa, na reação conhecida como reação de Fenton (reação 3), quando o radical hidroxila é formado a partir de peróxido de hidrogênio.



A reação líquida final, conhecida como reação Haber-Weiss, é a seguinte (reação 4):

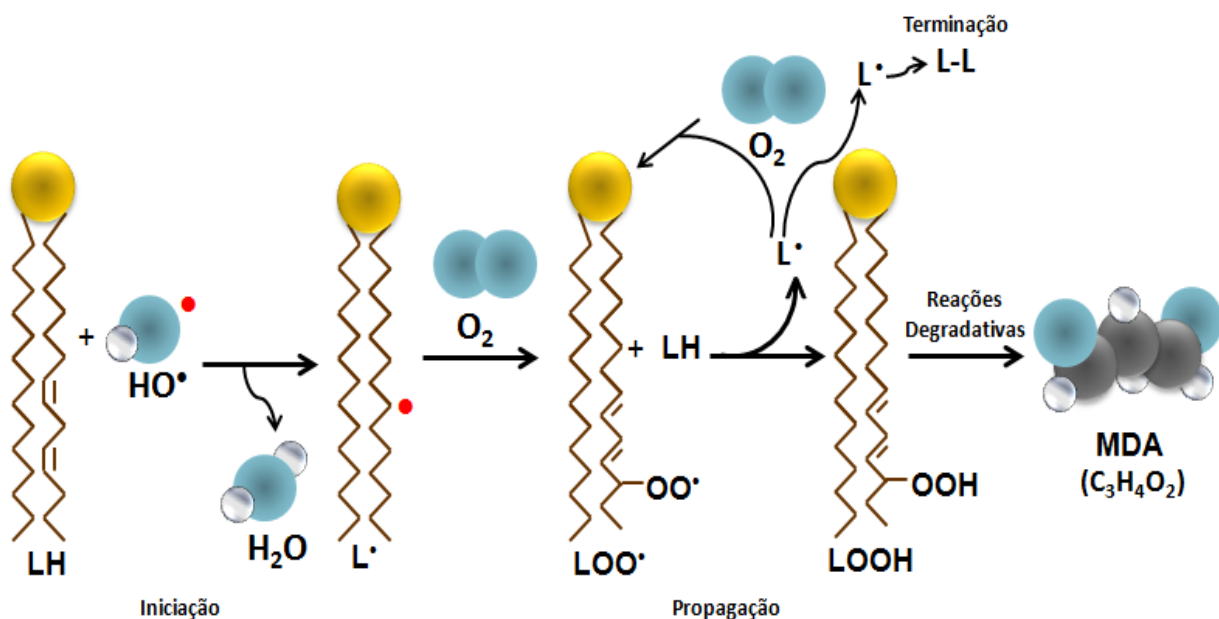


As ERO desempenham duplo e antagônico papel no organismo. Quando produzidas em baixas ou moderadas concentrações participam na modulação de várias condições fisiológicas importantes como a ativação da expressão gênica, de receptores da sinalização celular, no controle do tônus vascular e nos mecanismos de defesa dos fagócitos contra agentes infecciosos (ALLEN e TRESINI, 2000; HEHNER *et al.*, 2000; HENSLEY *et al.*, 2000). Porém, quando há uma produção de ERO que exceda a capacidade antioxidante elas induzem processos de morte celular que estão relacionados a danos na membrana lipídica, a proteínas e ao ácido desoxirribonucléico (DNA).

Os lipídeos são os alvos biológicos mais comuns de oxidação pelas ERO, e esse processo é denominado peroxidação lipídica. Os ácidos graxos poli-insaturados são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo pelas ERO devido a duplas ligações presentes em sua estrutura. Embora sejam mais resistentes, lipídios monoinsaturados e saturados também podem ser oxidados (GATÉ *et al.*, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O processo de peroxidação lipídica, ilustrado na Figura 1, engloba reações de iniciação, propagação e terminação, que são comuns a reações radicalares. Na etapa de

iniciação, um radical reativo, que pode ser tanto o radical hidroxila como o oxigênio singlete, remove hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado na membrana e produz um radical lipídico ( $L^\bullet$ ). A remoção do elétron adjacente à dupla ligação do ácido graxo resulta na formação de radical alquila (radical centrado no carbono) que causa *cross-links* inter ou intramoleculares, que perturbam a membrana lipídica (MARNETT, 1999). O radical lipídico reage com o oxigênio molecular e forma o radical peroxila ( $LOO^\bullet$ ). Na etapa de propagação, o radical peroxila abstrai hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado e forma-se, então, um hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ) e outro radical lipídico. O radical lipídico reage com oxigênio e reinicia o processo, ou se combina, na etapa de terminação, com outro radical e forma um não-radical ( $L-L$ ) (AUGUSTO, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O hidroperóxido lipídico sofre outras reações, a maioria degradativas, e produz, assim, alcanos e aldeídos como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal, que podem reagir com outras moléculas, levando a danos secundários (FISHER-WELLMAN e BLOOMER, 2009). Íons metálicos podem participar do processo quando catalisam reações do hidroperóxido lipídico e formam radicais que geram uma nova propagação ao reagirem com ácido graxo poli-insaturado.

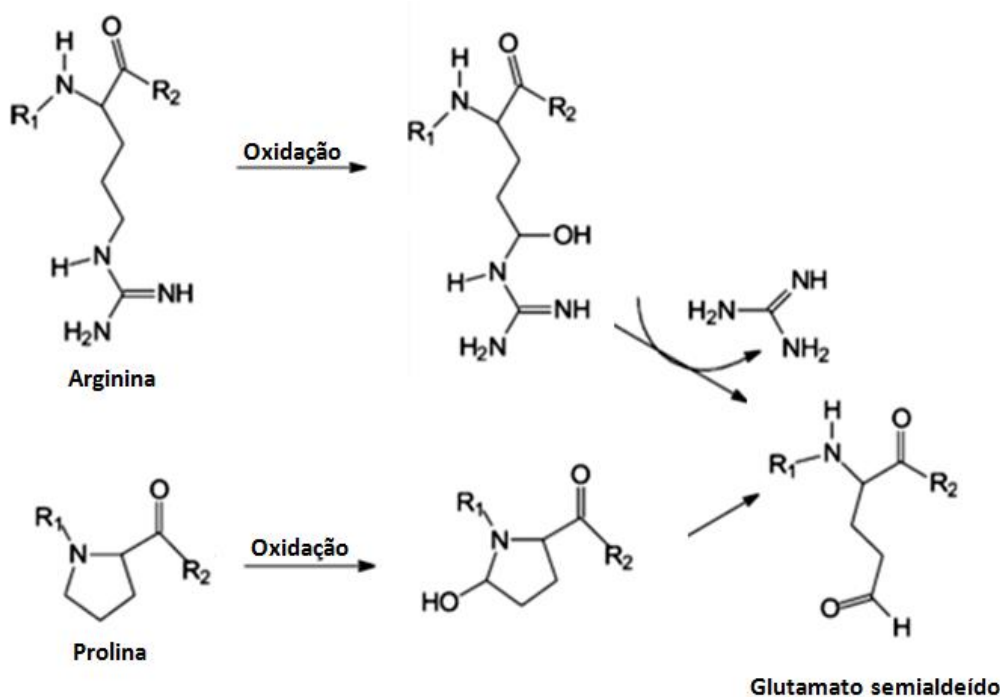


**Figura 1: Esquema representativo do processo de peroxidação lipídica.** LH = ácido graxo poli-insaturado;  $HO^\bullet$  = radical hidroxila;  $L^\bullet$  = radical lipídico;  $H_2O$  = água;  $O_2$  = oxigênio;  $LOO^\bullet$  = radical peroxila; L-L = ligação lipídio-lipídio (não radical);  $LOOH$  = hidroperóxido de lipídio;  $MDA$  ( $C_3H_4O_2$ ) = malondialdeído. Fonte: Adaptado de AUGUSTO, 2006.



Na célula, a peroxidação lipídica tem como consequência o desarranjo da bicamada lipídica, por alteração da fluidez, aumento da viscosidade e rigidez da membrana. Essas condições permitem que proteínas situadas do lado interno da membrana sejam atacadas diretamente por ERO prejudicando funções essenciais, tal como atividade intrínseca de enzimas e transportadores de membrana (KOZYREV e SLUTSKY, 2010).

O dano oxidativo a proteínas é definido como uma modificação covalente de determinada proteína induzida diretamente por ERO ou indiretamente por reações com subprodutos secundários de dano redox (SHACTER, 2000). A modificação oxidativa de proteínas pode ser catalisada por metais, por meio da conversão de espécies menos reativas ao radical hidroxila, formando grupos carbonilas nas cadeias laterais de aminoácidos das proteínas, ou, ainda, as proteínas podem sofrer tais modificações de forma indireta, quando são modificadas por moléculas geradas pela oxidação de outros produtos como os radicais alquila, derivados da peroxidação lipídica (SHACTER, 2000; STATDMAN e LEVINE, 2003). A oxidação direta de lisina, arginina e prolina contribui de maneira expressiva (~50%) para as concentrações de derivados carbonílicos nos tecidos. Como exemplo, um desses derivados carbonílicos é o glutamato semialdeído, produto da oxidação da prolina e arginina (Figura 2).



**Figura 2- Exemplo de processos de formação de grupos carbonilas por oxidação de aminoácidos.** A oxidação de resíduos de prolina e arginina resulta em Glutamato semialdeído como produto. Fonte: Adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007.

A formação do grupo carbonila leva a alterações na conformação das proteínas, aumentando a agregação, fragmentação, distorção das estruturas secundária e terciária, suscetibilidade à proteólise e alteração da função (BUTTERFIELD *et al.*, 1998). Além disso, o grupo carbonila é um marcador de inativação protéica que leva à degradação proteossômica, contudo o próprio proteossoma pode ser alvo de inativação oxidativa, o que limita a capacidade das células de processarem proteínas com derivados carbonílicos (WU *et al.*, 2009).

O desequilíbrio redox acelera o dano ao DNA, mas apenas algumas espécies reativas e alguns produtos resultantes da peroxidação lipídica podem levar a esse dano. O radical hidroxila reage com o DNA, adicionando hidrogênio a duplas ligações presentes nas bases nitrogenadas, ou removendo hidrogênios dos grupamentos metílenos presentes na timina e na desoxirribose. A remoção de um átomo de hidrogênio do grupo metileno da timina resulta em radicais alil ou propenil, enquanto que a adição do hidroxila à dupla ligação dos carbonos 5 e 6 das pirimidinas leva à formação de adutos de hidroxila. O radical hidroxila também pode ser adicionado aos carbonos 4, 5 e 8 das bases púricas, formando adutos de hidroxila: o aduto C4-HO<sup>•</sup> com propriedades oxidantes, e os adutos C5-HO<sup>•</sup> e C8-HO<sup>•</sup>, com propriedades redutoras (COOKE *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2004). Assim, o DNA pode sofrer diferentes alterações como consequência do dano oxidativo, como deleções, translocações, rearranjos, mutações, *cross-links*, mudanças no número de cromossomos e alterações em padrões de metilação/acetilação.

## 2.2 Sistema de defesa antioxidante

Para manter a integridade celular, os organismos desenvolveram uma série de mecanismos de defesa contra o excesso de espécies reativas que incluem mecanismos antioxidantes de prevenção e interceptação e mecanismos de reparo, além de defesas físicas (KÖNIG *et al.*, 2001; MASELLA *et al.*, 2005; RADAK *et al.* 1999; SIES, 1993;).

HALLIWELL e GUTTERIDGE (1989) propuseram uma definição ampla de antioxidantes: “são substâncias que quando presentes em baixas concentrações comparadas as do substrato oxidável, regeneram o substrato ou previnem significativamente a oxidação do mesmo”. O termo substâncias oxidáveis inclui todas as moléculas orgânicas, como lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL, 1990; KOZYREV e SLUTSKY, 2010). No entanto, essa definição não leva em conta sistemas de reparo ou inibidores da geração de espécies reativas,

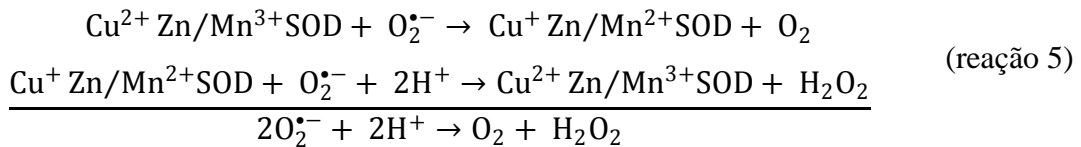
o que levou Halliwell e Gutteridge (2007) a proporem uma nova e mais simples definição para antioxidantes, que foram, então, definidos como: “qualquer substância que atrasa, previne ou remove dano oxidativo a uma molécula alvo”.

As principais estratégias desempenhadas pelo sistema de defesa antioxidante incluem conversão de ERO em moléculas menos ativas e prevenção da transformação de espécies menos reativas em formas mais reativas, como, por exemplo, inibição da conversão de peróxido de hidrogênio em hidroxila (POWERS e LONNON, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Dois mecanismos antioxidantes endógenos funcionam como uma unidade para controlar os efeitos de ERO nas células: enzimáticos e não-enzimáticos, ambos encontrados nos meios intra e extracelulares (POWERS e LONNON, 1999). Os antioxidantes enzimáticos catalisam reações com a finalidade de remover ERO ou regenerar os antioxidantes oxidados, reduzindo-os. As principais enzimas antioxidantes incluem SOD, Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione S-transferase (GST), Peroxirredoxinas e Tiorredoxinas. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem a glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), Vitamina E e ácido úrico (POWERS e JACKSON, 2008; SIES e STAHL, 1995; WAYNER *et al.*, 1987), dentre outros. Embora os mecanismos de ação dos componentes da defesa antioxidante variem bastante, todos possuem em comum a capacidade de interromper reações de oxidorredução.

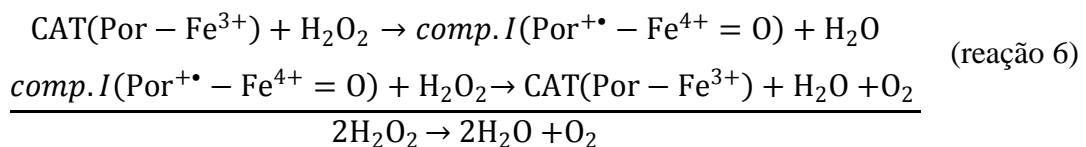
A SOD, descrita pela primeira vez por Mc-Cord e Fridovich (1969), é a primeira linha de defesa antioxidante enzimática e constitui a defesa celular contra os radicais superóxido, sendo capaz de catalisar a dismutação destes em uma espécie menos reativa, o peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.

A SOD possui isoformas que diferem tanto na localização celular quanto ao cofator metálico ligado ao seu sítio ativo. Assim, pode-se distinguir três isoformas de SOD, sendo que duas contêm cobre e zinco (SOD1 e SOD3) e uma contém manganês (SOD2). Essas isoformas catalisam a dismutação do superóxido com eficiência e modo semelhantes (OH-ISHL *et al.*, 1995) (reação 5) e a velocidade da reação é, em várias ordens de grandeza, mais rápida que em condições fisiológicas na ausência de SOD (FORMAN e FRIDOVICH, 1973).



A SOD1, ou Cu,Zn-SOD (MC-CORD e FRIDOVICH, 1969), é encontrada no citoplasma, lisossomos e espaço intermembranas da mitocôndria e é muito ativa no fígado. A SOD2, ou Mn-SOD, está localizada na matriz mitocondrial e é mais ativa no córtex-renal que em outros tecidos (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007; FRIDOVICH, 1995; OHNO *et al.*, 1995; SRIVASTATAVA *et al.*, 2007; WEISIGER e FRIDOVICH, 1973). Já a SOD3 ou SOD extracelular (EC-SOD) é encontrada em fluidos extracelulares como plasma, linfa e líquido sinovial. Essa isoforma contém um domínio de alta afinidade pela heparina que contribui para sua localização na matriz extracelular. A SOD3 é muito expressa em vasos sanguíneos, coração, rins e pulmões e menos expressa em fígado, músculo esquelético e cérebro (FATTMAN, SCHAEFER e OURY, 2003; MARKLUND, 1982; NOZIK-GRAYCK, SULIMAN e PIANTADOSI, 2005; OOKAWARA *et al.*, 1998;).

A CAT é a enzima que catalisa a remoção do peróxido de hidrogênio, que pode ocorrer também na ausência de CAT de forma mais lenta em reação catalisada por metais, como descrito na reação de Fenton. Para a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular a enzima utiliza o  $\text{Fe}^{3+}$  como cofator. Para isso, uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida o ferro ligado ao grupamento heme na CAT a um composto ativo (comp. I) de alta valência ( $\text{Por}^{+\bullet} - \text{Fe}^{4+} = \text{O}$ ). Esta espécie, que se refere a outro estado da enzima, é altamente oxidante e capaz de reagir com outra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, assim, o composto I é reduzido para regenerar a enzima e liberar água e oxigênio (reação 6) (CHELIKANI, FITA e LOEWEN, 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; KIRKMAN e GAETANI, 2006).

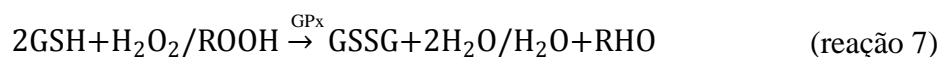


A CAT é amplamente ou completamente localizada em peroxissomos, de modo que essa enzima precisa se difundir por essas organelas para desempenhar sua ação no citosol (CHANCE, SIES e BOVERIS, 1979; GOO, CHAL e KIM, 2005). Ela está presente em todos

os tecidos animais e tem alta atividade em eritrócitos, fígado e rim e baixa atividade no cérebro (DEL MAESTRO e MCDONALD, 1982; SZIMONIK-LESIUK *et al.*, 2003).

Por um longo tempo estudos apontaram a CAT como secundária na remoção do peróxido de hidrogênio e sugeriam a GPx como mais ativa na remoção dessa espécie reativa. Contudo, alguns autores provaram que a CAT atua como principal enzima na catálise da neutralização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em eritrócitos e possivelmente em outros tecidos, enquanto a principal função da GPx seria a dismutação de peróxidos orgânicos e a manutenção de tióis protéicos em seu estado reduzido (GAETANI *et al.*, 1996; MUELLER, RIEDEL e STREMMEL, 1997; VESKOUKIS *et al.*, 2009). Assim, é provável que mais da metade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido na célula seja neutralizado pela CAT.

A enzima GPx é, assim como a CAT, responsável por reduzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à água, mas diferentemente dessa, requer um agente redutor para desempenhar sua função, além de catalisar também a redução de hidroperóxidos orgânicos a seus correspondentes alcoóis. A GPx contém um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo (FLOHÉ *et al.*, 1973). Esse resíduo de aminoácido participa do ciclo catalítico pelo qual hidroperóxidos orgânicos (ROOH) são reduzidos a alcoóis e água, enquanto o peróxido de hidrogênio é convertido em água. Nesse processo a glutathione em sua forma reduzida (GSH) é oxidada a glutathione dissulfeto (GSSG) (reação 7). A atividade da GPx é dependente do fornecimento constante de GSH, que é regenerado a partir de GSSG pela glutathione redutase (GR), enzima que usa o NADPH como doador de elétrons na reação (reação 8). Essa reação é fundamental para a biodisponibilidade da GSH *in vivo* (BJORNSTEDT, 1997).



A GTS é responsável por remover produtos tóxicos tais como carcinógenos químicos e poluentes ambientais, realizando, de fato, uma detoxificação do organismo. Exerce seu efeito protetor por catalisar a conjugação de GSH com produtos finais de oxidação e representa uma segunda linha de defesa contra a toxicidade de substâncias produzidas por reações mediadas por ERO (MASELLA, *et al.*, 2005). Pode ser encontrada no citoplasma, mitocôndrias e microsomas (MASELLA, *et al.*, 2005).

As Peroxirredoxinas são enzimas antioxidantes que protegem proteínas e lipídeos do dano oxidativo causado por peróxidos orgânico e peróxido de hidrogênio. As diferentes isoformas das Peroxirredoxinas são distribuídas de modo distinto dentro da célula e podem estar localizadas no citosol, nas mitocôndrias, no espaço extracelular e nos peroxissomos (DEATON e MARLIN, 2003). Catalisam sua reação semelhante à GPx, embora possuam eficiência catalítica muito menor que esta e a CAT. São capazes de remover baixas concentrações de hidroperóxidos e peroxinitritos e, ainda, as Peroxirredoxinas são as principais reguladoras da sinalização por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iniciada por receptores celulares de superfície (WOOD *et al.*, 2003).

As Tiorredoxinas têm importante papel na regulação redox por repararem os grupos sulfidrilos oxidados, removerem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também estão envolvidas na regeneração de ácido ascórbico oxidado. Elas podem ser abundantes no citosol, núcleo, mitocôndrias, podem estar associadas com a membrana celular e secretadas extracelularmente em sua forma oxidada por diferentes tipos de células incluindo monócitos e linfócitos após ativação (HOLMGREN, 1985; ARNÉR e HOLMGREN, 2000).

Tratando-se dos antioxidantes não enzimáticos, para neutralizar espécies reativas, eles podem atuar como doadores de elétrons ou prótons, como agentes quelantes de íons metálicos ou ainda de forma a restituir outro antioxidante.

A GSH, que funciona como cofator da família de enzimas glutathiona peroxidases, é a principal reguladora não enzimática do estado redox intracelular e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidril, sendo, a GSH, o único tiol não protéico em seres aeróbicos. Falha nesta função leva a formação de meta-hemoglobina e consequente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio, além de impedir sua passagem para órgãos vitais por causar uma variação na forma do eritrócito (SIES, 1999). No núcleo, a GSH mantém o estado redox de proteínas sulfidrilas importantes que são necessárias para expressão e reparo do DNA (VALKO *et al.*, 2007).

A vitamina E corresponde a um conjunto de compostos que inclui os tocoferóis e tocotrienóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a forma com maior atividade biológica. A vitamina E é lipossolúvel e é a principal antioxidante a interromper a reação em cadeia que leva a peroxidação de lipídios através do fornecimento de prótons aos radicais, sendo também capaz de converter o superóxido e o radical hidroxila em formas menos reativas (HERRERA e BARBAS, 2001; PAKER, 1991; POWERS e LONNON, 1999). Está localizada nas membranas celulares e lipoproteínas (PAKER, 1991).

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é hidrossolúvel e está localizada no citosol e no meio extracelular. Além de eliminar diretamente os radicais superóxido e hidroxila e os hidroperóxidos lipídicos, por doar elétrons, a vitamina C desempenha um importante papel na regeneração da  $\alpha$ -tocoferol (PAKER, 1991; SIES e STAHL, 1995).

O ácido úrico possui uma forma ionizada, o urato, que reage rapidamente com o radical hidroxila, contudo sua reação mais importante é com os radicais peroxila, ação esta que é a base do seu efeito antioxidante protetor ao DNA e lipídios. O urato reage com os radicais peroxila antes de penetrarem a membrana e iniciarem danos e é capaz de recuperar estruturas que foram convertidas a radicais livres doando um elétron e um próton (SAUTIN e JOHNSON, 2008; SIMIC e JOVANOVIC, 1989).

Em geral, o corpo possui reservas de antioxidantes adequadas para lidar com a produção de ERO sob condições fisiológicas (BANERJEE *et al.*, 2003; WAYNER *et al.*, 1987). As concentrações e a composição das defesas antioxidantes diferem entre os tecidos e os diferentes tipos celulares (SZYMONIK-LESIUK *et al.*, 2003). As defesas são frequentemente aumentadas depois da exposição do organismo às espécies reativas. No entanto, as defesas antioxidantes não são totalmente efetivas em impedir a ação das ERO e, dessa forma, evitar alterações oxidativas em seus alvos. Esse fato permite que as espécies reativas exerçam suas funções biológicas, como por exemplo, sinalização celular, enquanto os antioxidantes minimizam danos oxidativos a biomoléculas (HALLIWELL, 1995).

### **2.3 Desequilíbrio redox e seus marcadores em sistemas biológicos**

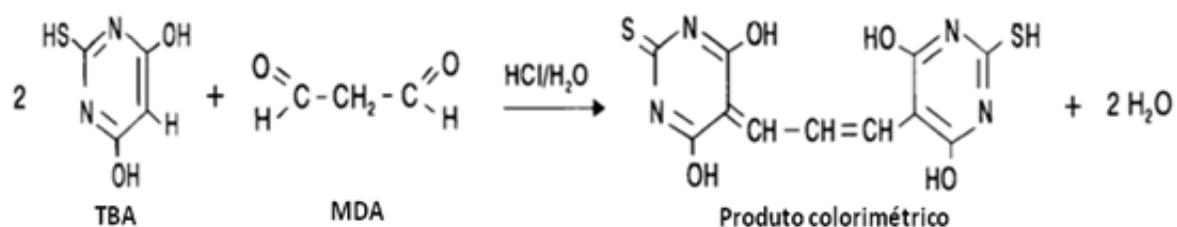
O conceito de estresse oxidativo foi introduzido de forma simples em 1985 como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, que conduziriam a potenciais danos moleculares (SIES, 1985). Contudo, esse conceito não abrange processos fundamentais que envolvem reações de oxidorredução celulares denominadas, de modo coletivo, de sinalização redox ou controle redox (JONES, 2006). Assim, o conceito de estresse oxidativo foi atualizado para se concentrar em respostas biológicas e incluir o papel de sinalização redox e passou a ser considerado como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, que leva à perturbação da sinalização e do controle redox e/ou a danos moleculares (SIES e JONES, 2007).

Com o aprimoramento desse conceito, o emprego do termo estresse oxidativo se tornou muito geral, e até mesmo exagerado, para descrever reações químicas específicas que

ocorrem em células ou tecidos específicos e não deve ser utilizado (SIES, 2015; BREITENBACH e ECKL, 2015). Além disso, é difícil associar o conceito biológico de estresse com o entendimento da química básica de oxido-redução, o qual inclui transferência de elétrons, radicais livres e metabolismo de oxigênio. Por isso, nesse trabalho, será adotado o termo desequilíbrio redox para designar condições químicas e físicas que perturbam a homeostase redox.

O desequilíbrio redox favorece a oxidação de biomoléculas e leva a produção de metabólitos específicos que podem ser usados como marcadores desse fenômeno. Tais marcadores são derivados principalmente da oxidação de lipídios, proteínas e DNA.

O produto da peroxidação lipídica mais frequentemente utilizado como marcador de desequilíbrio redox é o MDA. Contudo, apesar da principal fonte de MDA em amostras biológicas ser a peroxidação lipídica, ele também pode ser formado em certos tecidos por processos enzimáticos, como, por exemplo, na biossíntese de tramboxano A2, a partir da prostaglandina H<sub>2</sub> pela ação da tramboxano sintase (HECKER e ULRICH; 1989). Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a presença de MDA como indicador de peroxidação lipídica, podendo ser mensurado por HPLC (*high-performance liquid chromatography*), espectrofotometria ou espectrofluorimetria (AGARWAL e CHASE, 2002; ESPINOSA, DURÁN e LÓPEZ, 1996; YOUNG e TRIMBER, 1991). O teste colorimétrico mais comum para mensurar a formação de MDA baseia-se em sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando em um composto que pode ser quantificado espectrofotometricamente (Figura 3). Esse método de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é conhecido como TBARS (do inglês: *thiobarbituric-acid-reactive substance*).

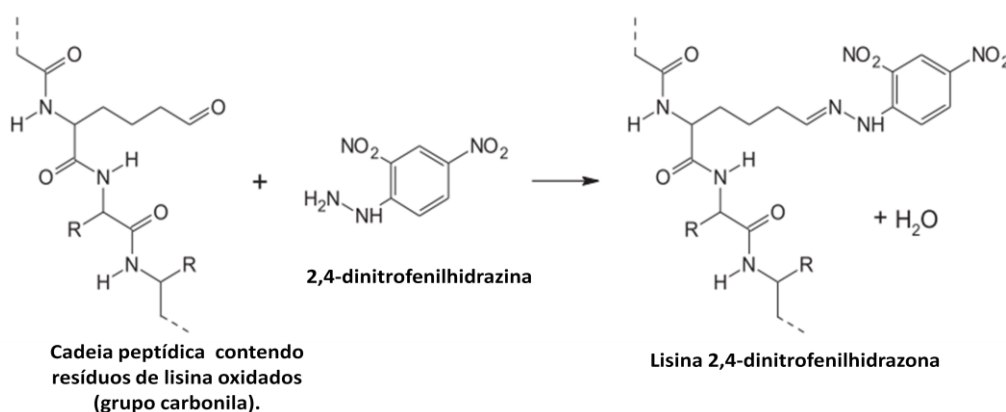


**Figura 3- Reação entre o ácido tiobarbitúrico e malondialdeído.** TBA = ácido tiobarbitúrico, MDA = malondialdeído.



A quantificação de TBARS, como indicativo de formação de MDA, tem reduzida especificidade pelo fato do TBA reagir com outros produtos da oxidação, além do MDA (ESTERBAUER, SCHAUR e ZOLLHER, 1991). Outro problema inerente ao ensaio é que, para se obter o produto final de condensação, ele deve ser realizado sob alta temperatura e isso pode levar a oxidação adicional (DEL RIO, STEWART e PELLEGRINI, 2005). Porém, apesar das críticas ao método, sua utilização pode ser justificada quando o objetivo é saber se um tratamento induziu a peroxidação lipídica ou se a amostra contém produtos da peroxidação. Nesses casos, o primeiro método de escolha deve ser o de reação com o TBA já que não se tem interesse em produtos específicos (ESTERBAUER, SCHAUR e ZOLLNER, 1991). Caso o ensaio não dê positivo, não há necessidade de tentar um dos métodos mais sofisticados (ESTERBAUER, SCHAUR e ZOLLNER, 1991). Mas, caso contrário, se o resultado encontrado for positivo, deve-se optar por métodos adicionais mais específicos ou outras medidas de desequilíbrio redox antes de chegar a qualquer conclusão.

Outro importante marcador de desequilíbrio redox é a formação de derivados carbonílicos em proteínas. Grupos carbonílicos adicionados as cadeias laterais das proteínas constituem porções quimicamente estáveis, o que torna viável sua detecção e quantificação (DALLE-DONE et al., 2003). Muitos dos ensaios para mensuração de danos oxidativos a proteínas envolvem reação do derivado carbonílico com a 2,4-dinitrofenilhidrazina, levando à formação de 2,4-dinitrofenilhidrazona, que é estável e pode ser detectado espectrofotometricamente (Figura 4) (LUO e WEHR, 2009; LEVINE et al., 2000). Ensaios para detecção de derivados carbonílicos em proteínas quantificam qualquer grupo carbonílico protéico, independente da fonte. E os ensaios com maior sensibilidade e especificidade são apenas semi-quantitativos (SHACTER, 2000).



**Figura 4- Reação do grupo carbonila com o 2,4-dinitrofenilhidrazina.** A reação resulta na formação de 2,4-dinitrofenilhidrazona e é mostrada por um resíduo de lisina oxidado. Adaptado de WEBER, DAVIES e GRUNE, 2015.

## 2.4 Desequilíbrio redox induzido por exercício e seu impacto em diferentes tecidos

Uma sessão de exercício aumenta as taxas de consumo de oxigênio e, assim, hipotetizou-se que ele poderia causar desequilíbrio redox e consequentes danos aos tecidos. Dillard *et al.*, (1978) foram os primeiros a evidenciar que o exercício agudo pode causar desequilíbrio redox. Os autores avaliaram o volume de pentano expirado, que é um indicador de peroxidação lipídica, em indivíduos submetidos a 60 minutos de exercício, a 50% do consumo máximo de oxigênio, em bicicleta ergométrica. Esses autores observaram aumento de 1,8 vezes no pentano expirado nos indivíduos exercitados em relação aos indivíduos que foram mantidos em repouso, demonstrando, pela primeira vez, o aumento da peroxidação lipídica durante o exercício. Contudo, esse trabalho não identificou a fonte de ERO responsável pelo dano lipídico. Posteriormente, Davies *et al.* (1982) demonstraram, por meio da técnica de ressonância paramagnética de elétrons, que o exercício realizado até a exaustão aumenta a concentração de produtos de peroxidação lipídica e leva a perda da integridade estrutural do retículo sarcoplasmático no músculo esquelético e no fígado de ratos. Os autores detectaram aumento de duas a três vezes na amplitude do sinal de radicais livres nesses tecidos.

Hoje se sabe que o exercício agudo leva a alteração do estado redox em praticamente todos os fluidos corporais, células sanguíneas e órgãos. A partir de estudos que avaliaram o estado redox em diferentes tecidos pode-se concluir que o exercício agudo, de fato, é capaz de alterá-lo de forma sistêmica. Vários estudos, tanto em animais como em humanos, encontram alterações no estado redox após exercício agudo no plasma (TAKAHASHI, SUZUKI e MATOBA, 2012), eritrócitos (ŞENTÜRK *et al.*, 2001), linfócitos (FERRER *et al.*, 2009; TOSSIGE-GOMES *et al.*, 2016), neutrófilos (SUREDA *et al.*, 2005), músculo esquelético (VIÑA *et al.*, 2000; POWERS *et al.*, 1994; LIU, HE e LI, 2013; BARRETO *et al.*, 2012), coração (SOMANI *et al.*, 1995; SEWARD, 1995; NIE *et al.*, 2010), rim (RADÁK *et al.*, 1996), fígado (DAVIES *et al.*, 1982; LIU *et al.*, 2000) e cérebro (PEDREANEZ *et al.*, 2006).

Especialmente músculo esquelético, coração e cérebro mostram-se muito suscetíveis ao dano oxidativo pelo exercício, quando comparados a outros tecidos. Tal fato se deve a características intrínsecas desses tecidos, como a alta atividade metabólica do músculo esquelético durante o exercício e alta atividade metabólica basal do coração e cérebro, além da baixa atividade antioxidante dos três em relação aos outros tecidos (HERRERO e BARJA,

1997). Enquanto o suprimento de oxigênio para o fígado e rim diminui significativamente durante uma sessão de exercício há um aumento considerável do fluxo sanguíneo nos músculos esquelético e cardíaco, o que leva à ativação de vários sistemas geradores de ERO. Já no cérebro, o fluxo sanguíneo tende a sofrer moderadas alterações, que devido a características peculiares do tecido, já é suficiente para ativar vários sistemas geradores de ERO (RADAK, CHUNG e GOTO, 2007).

No músculo esquelético, Barreto *et al.*, 2012, demonstraram alteração do estado redox em camundongos após exercício máximo de natação. Em animais não treinados o exercício levou ao aumento da concentração de MDA e da atividade da CAT e GPx no gastrocnêmio. Já Perez *et al.*, 2003, avaliaram o efeito de uma sessão aguda de exercício em diferentes protocolos de exercício no músculo esquelético e cardíaco de ratos. Em um dos protocolos os animais realizaram exercício exaustivo em esteira a 20m/min a 0% de inclinação e em outro um exercício máximo exaustivo iniciado a 10m/min a 0% de inclinação, seguido por aumento gradual da velocidade da esteira a cada 4 min até a 30 m/min, a 15% de inclinação e finalizando o protocolo após a exaustão do animal. Ambos os exercícios exaustivos deste estudo levaram a aumento da concentração de derivados carbonílicos em proteínas no coração e no gastrocnêmio. Venditti e Meo, 1996, também observaram aumento da peroxidação lipídica no gastrocnêmio e coração após protocolo de exercício máximo de natação, com acréscimo de 2% da massa corporal ao animal.

Somani, Frank e Rybak (1995) mostraram aumento da concentração de MDA e da atividade das enzimas antioxidantes, dentre elas CAT e SOD, no músculo cardíaco de ratos após exercício agudo em esteira a 100% da capacidade máxima de consumo de oxigênio com aumento progressivo da velocidade e da inclinação.

Em seu estudo, Aydin *et al.* (2008) submetem ratos a um protocolo agudo de natação até a exaustão e observaram, no cérebro, aumento da peroxidação lipídica, avaliada pela concentração de MDA, aumento de derivados carbonílicos em proteínas, por reação com o 2,4-dinitrofenilhidrazina e redução de GSH. Takiris *et al.* (2005) observaram redução na capacidade antioxidante total no cérebro de ratos submetidos a natação forçada por períodos de 2 ou 5 horas ( redução em 20 e 25% respectivamente).

Embora os diferentes tecidos, tal como o músculo esquelético, coração e cérebro, tenham sua homeostase redox alterada pelo exercício agudo, o modo como essa homeostase é afetada é influenciado pela capacidade de cada tecido em gerar espécies reativas e a

capacidade intrínseca de defesa antioxidante, já que essa pode variar muito de tecido para tecido, como mostrado por Grankvist et al., 1981.

As células que compõem o músculo esquelético contêm antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos que estão estrategicamente compartimentalizados no citoplasma e em organelas. No músculo esquelético de roedores a atividade da SOD e da CAT são maiores nos músculos oxidativos, caracterizados por conter elevado percentual de fibras do tipo I e do tipo IIa em comparação com aqueles com baixos volumes mitocondriais (IIx ou IIb) (POWERS *et al.*, 2011; CRISWELL *et al.*, 1993). Muitos trabalhos consideram que o músculo esquelético é a principal fonte de ERO durante o exercício (POWERS e JACKSON, 2008). Em intensidades de contração de moderada a alta o músculo é capaz de liberar grande quantidade dessas espécies (PATWELL *et al.*, 2004), que aumentam a oxidação local e sistêmica, inclusive em tecidos que não se contraem (CLOSE *et al.*, 2007).

O coração é um órgão aeróbio e tem uma das taxas mais elevadas de consumo de oxigênio no corpo, quando comparado ao músculo esquelético em repouso e ao fígado, por exemplo, sua taxa de consumo de oxigênio é mais que duas vezes o volume consumido pelo fígado por minuto e muitas vezes maior que o volume consumido pelo músculo esquelético em repouso (JI, 2000; SEN, 1995). Contudo, apesar de ter que lidar com altas taxas de formação de oxidantes, o tecido cardíaco tem quase duas vezes menos atividade de SOD do que o fígado, e a atividade da catalase é extremamente baixa, chegando a ser mais de dez vezes menor que a do fígado (GRANKVIST, MARKLUND e TALJEDAL, 1981). Além disso, outro fator torna o coração um órgão ainda mais sensível ao desequilíbrio redox pelo exercício, o grau de poli-insaturação dos ácidos graxos fosfolipídicos no músculo cardíaco é de 68%, o que é considerado alto comparado a maioria dos tecidos, e o torna mais suscetível a peroxidação (NIKOLAIDIS, PETRIDOU e MOUGIOS, 2006).

O tecido cerebral é altamente sensível ao desequilíbrio redox devido ao seu intenso consumo de oxigênio (consome uma das maiores taxas de oxigênio por unidade de massa de tecido, correspondente a 20% de todo o oxigênio recebido pelo corpo) e tem alto fluxo sanguíneo, alto teor de ferro e lipídios e baixa atividade de defesas antioxidantes (STREK, CZAPSKI e SILVA, 2013; OOKAWARA *et al.*, 1998). O fato da atividade antioxidante nesse tecido ser muito baixa quando comparada a outros tecidos também contribui para que o cérebro seja muito suscetível ao desequilíbrio redox, como o desencadeado pelo exercício máximo. A concentração de catalase é a mais baixa encontrada em tecidos estudados, e equivale a aproximadamente a 2% da catalase do fígado e 22% a do

coração de camundongos (GRANKVIST, MARKLUND e TALJEDAL, 1981). Além disso, durante o exercício máximo há uma maior demanda de energia no cérebro e o fluxo sanguíneo aumenta. Este tecido utiliza a glicose como fonte primária de energia e superóxidos são produzidos durante o seu metabolismo, além disso, a glicose pode interagir com outras moléculas e formar ERO (SOMANI e HUSAIN, 2000). O exercício também aumenta as concentrações séricas de glicocorticóides e, estes, em resposta ao exercício agudo, podem alterar o conteúdo não enzimático e a atividade de enzimas antioxidantes no tecido cerebral e, conseqüentemente, contribuem com o aumento das concentrações intracelulares de ERO, aumentando a peroxidação lipídica e dano a proteínas (MCLNTOSH, HONG e SAPOLSKY, 1998; MCLNTOSH e SAPOLSK, 1996).

Apesar de tudo isso, ainda há um debate sobre os mecanismos que levam ao aumento de espécies reativas sob a condição de alto consumo de oxigênio que representa o exercício físico aeróbico. Assim, foram propostas algumas vias de produção de ERO durante o exercício, que incluem: respiração mitocondrial, xantina oxidase, neutrófilos e outros fagócitos, auto-oxidação de catecolaminas, metabolismo das prostaglandinas e conteúdo de ferro livre.

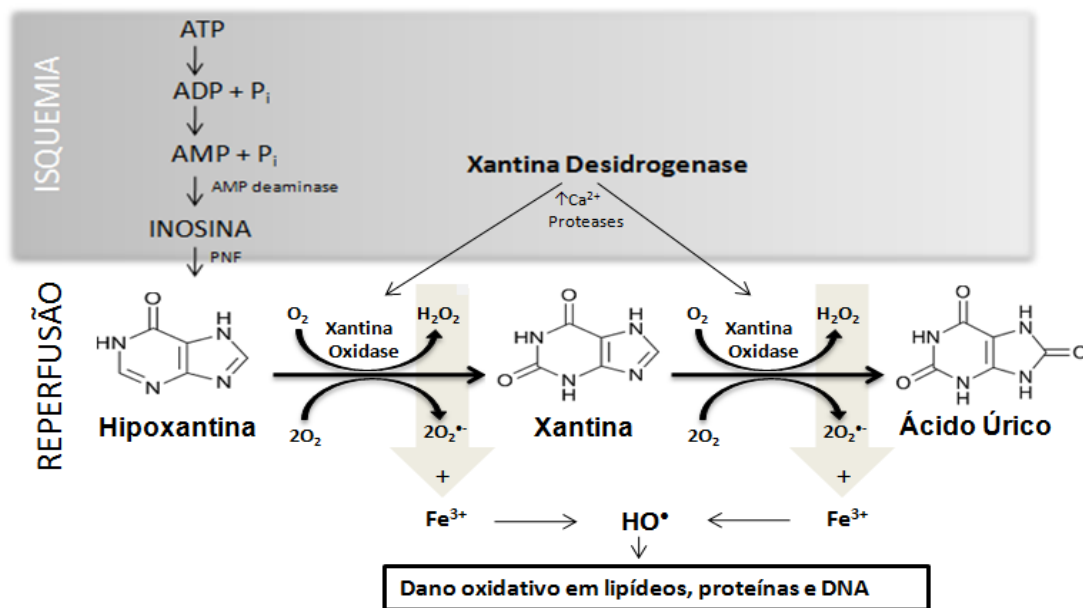
Durante muito tempo a respiração mitocondrial foi reportada como a maior produtora de ERO durante o exercício físico. Vários autores sugeriam que o aumento do consumo de oxigênio no exercício levaria, obrigatoriamente, ao aumento da atividade mitocondrial e conseqüente aumento da produção de ânion superóxido nos tecidos. Contudo, provou-se que no estado ativado, tal como ocorre no exercício, quando todos os substratos estão presentes em suspensão e grande quantidade de ATP é produzida a produção percentual de radicais livres pela mitocôndria é baixa e, possivelmente, inferior ao estado basal (ADHIHETTY *et al.*, 2005; CHANCE, SIES e BOVERIS, 1979; HANSFORD, HOGUE e MILDAZIENE, 1997; KOZLOV *et al.*, 2005; ST-PIERRE *et al.*, 2002).

Essa baixa taxa de produção de ERO pela mitocôndria durante o exercício, que tem sido estimada em 0,1 a 1% do total de oxigênio consumido, dependendo das condições experimentais, é várias ordens de grandeza inferior ao que foi descrito inicialmente e pode ser justificada pelo papel de proteínas desacopladoras como reguladoras da produção de ERO mitocondrial. Tais proteínas causam desacoplamento leve da cadeia respiratória por meio da diminuição da força motora de prótons pela membrana mitocondrial interna, essencial para a diminuição da disponibilidade de doadores de elétrons capazes de reduzir o oxigênio a superóxido e, assim, protegem a mitocôndria de danos oxidativos mediante pequena perda de

energia (BRAND *et al.*, 2004; BRAND e ESTEVES, 2005), principalmente quando o fluxo de oxigênio é intenso como no exercício físico. Apesar de tudo isso, deve ficar claro que, a baixa produção de ERO pela mitocôndria durante o exercício é suficiente para causar danos oxidativos (ST-PIERRE *et al.*, 2002).

Uma das principais hipóteses que vem sendo investigada na contribuição da produção de ERO durante o exercício está relacionada ao papel da xantina oxidase. Em condições fisiológicas a xantina oxidase está na forma de xantina desidrogenase, que é a forma dominante da enzima e responsável por oxidar tanto hipoxantina como xantina ao ácido úrico, em um processo que reduz  $\text{NAD}^+$  a NADH. O exercício agudo pode promover um breve estado de isquemia, e dependendo da intensidade do exercício, a ressíntese do ATP não acompanha a sua utilização e, nesse caso, o ATP é convertido em ADP, AMP, inosina e, por fim, em hipoxantina. Na condição de isquemia a xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase por modificação de resíduos de cisteína (VIÑA *et al.*, 2000) ou pela ação de proteases dependentes de cálcio, que aumentam quando há comprometimento da homeostase do cálcio, como ocorre no exercício intenso em consequência do dano muscular (BLOOMER, 2008).

A xantina oxidase não utiliza  $\text{NAD}^+$  como acceptor de elétrons, mas sim o oxigênio para que hipoxantina e xantina sejam convertidas em ácido úrico. O oxigênio será, nessas condições, reduzido a ânion superóxido e peróxido de hidrogênio que poderão ser convertidos em espécies mais reativas na presença de íons metálicos. Na condição de isquemia as concentrações intracelulares de xantina oxidase e hipoxantina aumentam consideravelmente e, por esse motivo, quando ocorre a reperusão a produção de radicais livres é alta, já que o oxigênio estará disponível para funcionar como acceptor de elétrons na reação catalisada pela xantina oxidase, o que resultará em dano oxidativo (HELLSTEIN *et al.*, 1988; BAILEY *et al.*, 2007). O processo de formação de espécies reativas a partir da xantina oxidase é ilustrado na Figura 5.



**Figura 5- Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio por xantina oxidase.** No processo de isquemia, trifosfato de adenosina (ATP) é convertido sequencialmente em difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) e, posteriormente, AMP é convertido em inosina pela enzima AMP deaminase. Xantina desidrogenase, via ativação de proteases cálcio-dependentes é convertida em xantina oxidase. Quando o oxigênio é reintroduzido (reperfusão), inosina forma hipoxantina por ação da purina nucleosídeo fosforilase (PNP), produzindo, assim, substrato para a xantina oxidase, que então produz superóxido e peróxido de hidrogênio como subprodutos. Na presença de ferro superóxido e peróxido de hidrogênio são convertidos em radical hidroxil. Adaptado de MCCORD, 1985.

Além do músculo esquelético, a lesão por isquemia e reperfusão pode acometer outros tecidos e o dano por esse processo é mais acentuado em alguns tecidos que em outros pela grande variação da concentração de xantina desidrogenase nos diferentes tecidos (EVANS *et al.*, 1997).

Outras fontes de ERO, além da mitocondrial e da xantina oxidase, têm sido investigadas e recebem destaque, especialmente se tratando de exercício exaustivo. Na resposta inflamatória em decorrência da lesão tecidual induzida por contrações sucessivas, neutrófilos e outros fagócitos podem ser ativados e produzem grande quantidade de espécies reativas, incluindo superóxido e peróxido de hidrogênio, contribuindo para desequilíbrio redox (QUINDRY *et al.*, 2003). ERO, especialmente o ânion superóxido, são geradas enzimaticamente pela NADPH oxidase localizada na membrana de leucócitos recrutados durante a fase inicial da resposta inflamatória na musculatura exercitada (ROSSI, 1986).

Além disso, exercícios que geram lesões significativas podem danificar proteínas que contêm ferro, favorecendo maior disponibilidade desse metal para catalisar reações radicalares (BLOOMER, 2008). Exercícios caracterizados pelo alto impacto mecânico, como

corrida em esteira, são os mais relatados por levar a esse tipo de dano, ao contrário da natação, que possui menos componentes excêntricos (LIU *et al.*, 2000).

## 2.5 Variabilidade pré-analítica nas análises de estado redox

As variabilidades interindividual, pré-analítica e analítica podem exercer grande influência nos resultados de ensaios biológicos. Dentre essas, as variações pré-analíticas, definidas como qualquer variação sofrida pela amostra entre a coleta e a análise, são as mais difíceis de gerir e podem ter um grande impacto na confiabilidade de resultados de estudos baseados na avaliação de biomarcadores teciduais (BETSOU *et al.*, 2009; ESPINA *et al.*, 2009).

As condições de coleta, período e temperatura de armazenamento e o processamento de amostras biológicas devem ser rigorosamente estabelecidos a fim de se evitar erros analíticos. Contudo, a extensão e o tipo de informação para as condições pré-analíticas reportadas em publicações científicas variam muito. A maioria dos trabalhos que envolvem a avaliação do estado redox tecidual descreve de forma breve e superficial como se procedeu a coleta e a técnica de processamento das amostras, por vezes não informando por quanto tempo as amostras permaneceram armazenadas até a análise. Isso pode dificultar a reprodutibilidade dos estudos e levar a divergências nos resultados, já que a estabilidade dos analitos pode ser comprometida.

É muito importante que a manipulação pré-analítica das amostras ocorra de forma cuidadosa, pois, tratando-se de análises do estado redox, uma série de procedimentos e etapas podem interferir no resultado das medidas, tais como condições de coleta, secção do tecido, homogeneização e diluição da amostra. A coleta de tecidos deve ocorrer de forma rápida e sob baixas temperaturas, pois a exposição da amostra por períodos, mesmo que breves, ao oxigênio atmosférico, contribui para a formação de radicais livres (MEYER *et al.*, 2014). Já a secção do tecido em muitas fatias pode levar a ruptura de proteínas contendo ferro e aumentar o conteúdo do ferro livre e, por fim, a catálise de reações radicalares. A utilização de homogeneizadores de tecidos automáticos, mesmo que por curto período de tempo, pode resultar em aumento da temperatura, mesmo se o procedimento for realizado no gelo, devido à alta velocidade do aparelho. Além disso, a alta velocidade da homogeneização leva a formação de bolhas, que contribuem para a inativação de enzimas (BODE e MEINEL, 1982). O homogenato de tecido mais concentrado resulta em menor risco de peroxidação lipídica



secundária àquela *in vivo*, provavelmente pelo fato de mais ferro estar ligado a proteínas, e também a maior estabilidade enzimática (BERNHEIM, 1963; CAO *et al.*, 2003; PEGG, 2015; TAMIYA, *et al.*, 1985). Portanto, todos esses procedimentos e etapas devem ser cuidadosamente conduzidos para que o erro pré-analítico seja minimizado.

Em muitas pesquisas é necessário armazenar as amostras por algum período de tempo para análises posteriores, visto que grande parte dos experimentos são muito longos para serem realizadas em um dia ou mesmo em alguns dias após a coleta das amostras. Um dos principais métodos para estocagem de amostras biológicas por longos períodos é o congelamento ou criopreservação, definido como a conservação em baixas temperaturas, visando cessar reversivelmente todas as funções biológicas dos tecidos vivos. Para esse fim, as amostras são normalmente armazenadas em freezers (-20 °C a -80 °C) ou em ultrabaixas temperaturas (-150°C a -196 °C em containers de nitrogênio líquido), com ou sem uso de crioprotetores, com o tecido íntegro ou em solução.

O armazenamento a -20 °C foi bastante utilizado no passado e em trabalhos mais recentes ainda é possível ter recomendações de estocagem a essa temperatura por até alguns meses (WEYDERT *et al.*, 2010), mas já está claro que ele leva a alterações de biomarcadores redox, dentre outros analitos, mesmo que por um curto período de estocagem (BORGES *et al.*, 2014; BORTOLIN, *et al.*, 2016; JUNG, *et al.* 1993; SHABIHKHANI *et al.*, 2014). Embora o nitrogênio líquido seja muito recomendado e muito utilizado em biobancos, o congelamento a -80 °C é o principal modo de armazenamento de amostras em laboratórios de pesquisa.

Os danos celulares e consequentes danos em analitos por congelamento, por vezes, estão intimamente relacionados à velocidade com que ele ocorre. O congelamento lento pode levar a alterações na osmolaridade intracelular, resultando em agregação de moléculas e desnaturação protéica (PARK *et al.*, 1998) e, também, pode haver ação de proteases e de reações químicas na solução parcialmente congelada devido ao aumento da concentração do soluto, mesmo que essas reações estejam lentificadas pela baixa temperatura.

É importante prever que a tolerância ao congelamento é dependente do tipo de tecido, que pode, inclusive, ter diferente condutibilidade térmica dependendo da sua composição (SINGH e KUMAR, 2013). Tecidos com maior composição de água tendem a ser mais vulneráveis aos efeitos do congelamento (ANDRUSHKIW, 1990). As células diferem quanto à permeabilidade a água e provavelmente também à suscetibilidade ao gelo intracelular (PEGG, 2002). Além disso, para cada analito existe uma condição de

armazenamento ideal, que, no entanto, não são conhecidas e é esperado que o período de armazenamento cause efeito temporal sobre os resultados (JUNG, *et al.*, 1993; KUMAR *et al.*, 2012).

O tempo de armazenamento de amostras pode durar de dias a meses ou anos e a temperatura pode oscilar durante esse período. Podem ocorrer flutuações de temperatura relacionadas à frequência de abertura dos freezers ao remover amostras, a falhas mecânicas e de energia e até mesmo a posição em que a amostra se encontra internamente no freezer, já que as regiões frontal e superior estão sujeitas a maiores oscilações de temperatura (SHABIHKHANI *et al.*, 2014; SU *et al.*, 1996). Apesar disso, as principais hipóteses para explicar os danos causados pelo congelamento e posterior descongelamento são baseadas nas mudanças físicas e químicas sofridas pela amostra durante esses processos.

Tratando-se da avaliação do estado redox, alguns estudos avaliaram se o congelamento e o tempo de estocagem podem interferir na integridade de analitos e afetar os resultados das análises. Kumar *et al.*, (2012) mantiveram amostras de plasma de mulheres grávidas em uso de suplementação de ferro congeladas a -20 °C por período variável (entre 1 e 708 dias). Os resultados desse estudo mostraram que as flutuações dos valores de concentração de MDA, pelo método TBARS, foram mínimas nos primeiros 28 dias de congelamento e, posterior a isso, aumentaram nas amostras armazenadas por até 200 dias. No entanto, após esse tempo a taxa de mudança das concentrações de MDA desacelerou e se manteve durante o segundo ano de congelamento. Assim, os autores concluíram que existe um efeito temporal na medida da concentração de MDA em amostras congeladas e sugeriram que mais estudos devem ser conduzidos para explicar melhor esse efeito.

Fishbein e Winkert (1978), em seu trabalho com soluções puramente enzimáticas, submeteram alíquotas de catalase de fígado bovino a diferentes taxas de resfriamento. Os autores observaram perda irreversível da atividade enzimática da catalase associada à sua desnaturação, o que foi relacionado à formação de gelo e as taxas de resfriamento.

Jung *et al.*, (1993) analisaram o comportamento da atividade catalítica da SOD, CAT, GPx e GST e conteúdo de GSH em fígado e rim de ratos em função do tempo e da temperatura de armazenamento. As amostras foram homogeneizadas em sacarose e estocadas a 4, -20 e -70 °C por 1, 3, 7, 14 e 28 dias. Um fragmento íntegro dos tecidos foi também mantido a -70 °C por 28 dias. No rim, tanto no tecido íntegro quanto no homogenato, a atividade da SOD e da CAT foram reduzidas após estocagem por 28 dias a -70 °C. Já a estocagem em -20°C reduziu a atividade dessas enzimas após 14 e 28 dias, respectivamente.

No fígado, a atividade da CAT foi reduzida após 28 dias de armazenamento a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Já a SOD, GPx e GST não sofreram alterações após congelamento do fígado íntegro a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 28 dias, assim como o conteúdo de GSH. Esses resultados mostram que a estabilidade da amostra depende da enzima analisada, do órgão e da temperatura de estocagem. Os autores concluíram, de maneira geral, que a estabilidade analítica do tecido homogeneizado em sacarose é menor que a do tecido íntegro e a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , dentre as avaliadas, é a mais adequada para manutenção da atividade enzimática.

Estudo semelhante foi conduzido por Bortolin *et al.*, (2016), que avaliaram os efeitos da temperatura ( $-20$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), tempo (0, 15, 30 e 60 dias) e forma de congelamento (tecidos homogeneizados e intactos) em parâmetros de estado redox no fígado, sangue e cérebro de ratos. Os autores observaram redução da atividade da CAT e da SOD após estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a partir de 15 dias e a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 dias, no fígado íntegro. No cérebro a atividade da CAT foi reduzida após estocagem a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 dias, enquanto a atividade da SOD não foi alterada. Houve aumento de derivados carbonílicos em proteínas no fígado e cérebro homogeneizados, estocados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a partir de 30 dias de armazenamento. No sangue o conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas reduziu após estocagem a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo dos grupos sulfidrilas mostrou-se sensível a degradação por armazenamento no fígado e cérebro em ambas temperaturas de estocagem, tanto nos tecidos homogeneizados quanto nos íntegros. Além disso, os autores demonstraram que o tempo de congelamento não alterou o imunoc conteúdo da CAT e da SOD nos tecidos, o que lhes permitiu sugerir então que a redução da atividade das enzimas em questão tenha sido decorrente de desnaturação ou oxidação das proteínas. Mais uma vez um estudo também mostrou que a estabilidade depende da enzima analisada, do órgão e da temperatura de estocagem e que o congelamento do tecido intacto e a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  interferem menos nos parâmetros analisados, mas que a análise a fresco é a melhor opção.

Os poucos estudos realizados até o momento mostram que o tempo de estocagem da amostra altera a estabilidade de biomarcadores de estado redox, de maneira dependente do tecido e marcador analisados. Essa interferência pode comprometer o resultado de pesquisas em que o desequilíbrio redox é o objeto principal de estudo, como no exercício físico e no estudo dos mecanismos de patogênese de doenças. Assim, torna-se crucial determinar, em condições experimentais específicas, qual o tempo máximo ou ótimo de estocagem das amostras para avaliação do estado redox e, até então, nenhum estudo investigou o efeito do tempo de congelamento em amostras sob condições de desequilíbrio redox. Portanto, nesse

estudo foi avaliado o efeito do tempo de congelamento da amostra na quantificação de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos *swiss* submetidos a uma sessão de exercício máximo.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito do tempo de congelamento da amostra na estabilidade de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos *swiss* submetidos a uma sessão de exercício máximo.

Especificamente nesse estudo avaliou-se o efeito do congelamento do coração, gastrocnêmio e cérebro, por 1, 3 e 6 meses, sobre o dano oxidativo a lipídios e proteínas, a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase e a capacidade antioxidante total após uma sessão de exercício máximo.

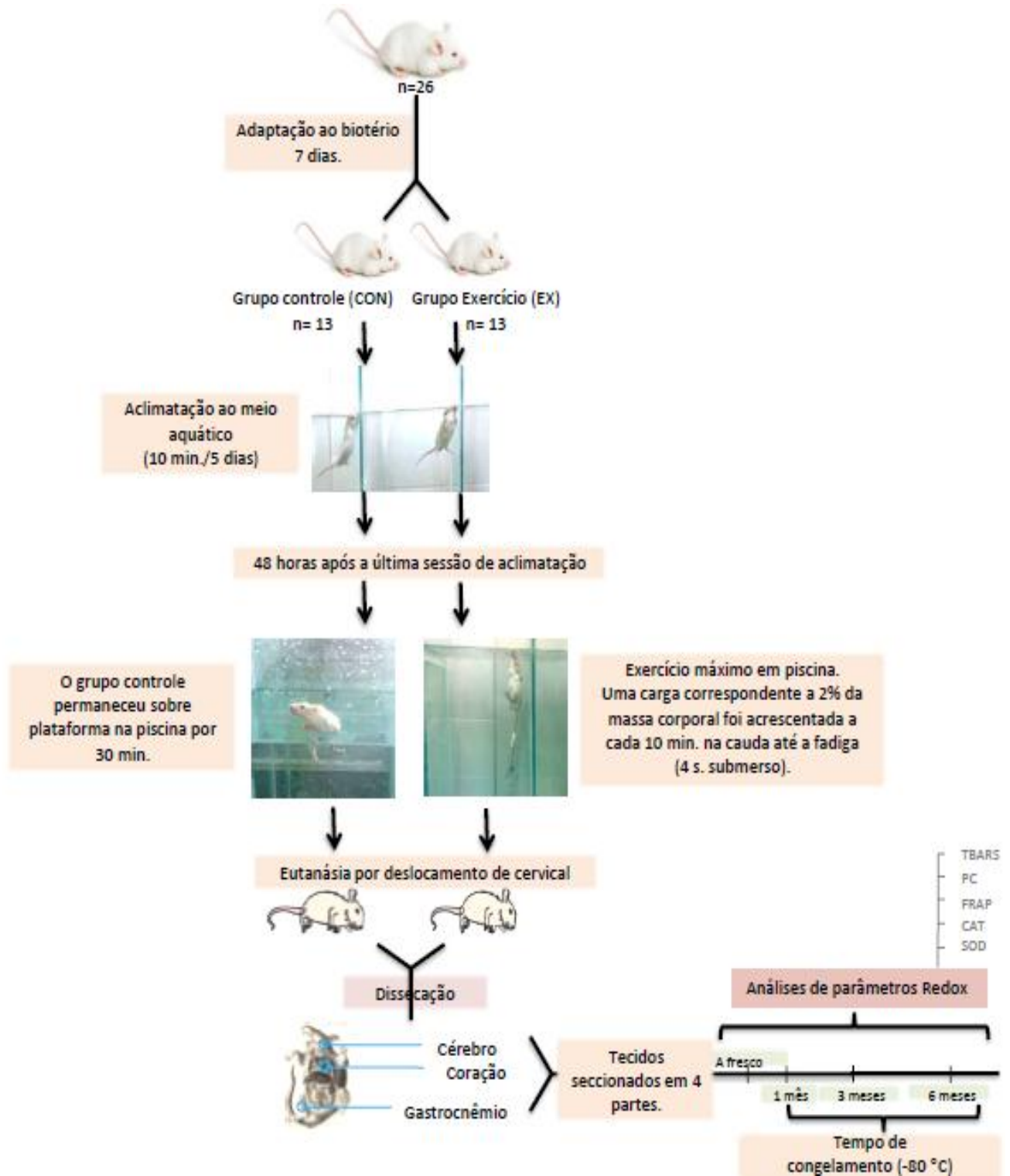


## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 26 camundongos *swiss*, machos, com 8 semanas de idade fornecidos pelo Biotério do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos no Biotério do Núcleo de Experimentação Animal (NEA) da UFVJM, em caixas de polipropileno coletivas (com dimensões de 30 x 20 x 13 cm), 4 animais por caixa, com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. Os animais tiveram livre acesso à água e à alimentação (Nuvilab CR1- NuvilabNutrients LTDA, Colombo, PR, Brasil). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA/UFVJM, protocolo n° 042/2015), conforme previsto pela Lei n° 11794 de 8 de outubro de 2008.

O desenho experimental do estudo está ilustrado na Figura 6, cujo detalhamento é apresentado nas sessões que seguem.



**Figura 6- Desenho experimental do estudo.** TBARS= Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC= Proteína Carbonilada; FRAP= Poder Antioxidante de Redução do Ferro (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*); CAT= Catalase; SOD=: Superóxido Dismutase.



## 4.2 Protocolo Experimental

Inicialmente os animais foram adaptados ao ambiente do biotério por 7 dias antes do início dos experimentos. Após adaptação ao biotério os animais foram pesados e divididos em dois grupos experimentais, pareados pela massa corporal: grupo controle (CON), que não foi submetido ao exercício e grupo exercício (EX), que foi submetido a protocolo de exercício máximo em piscina.

Os animais de ambos os grupos foram aclimatados ao meio aquático por 5 dias consecutivos antes da sessão experimental. A aclimação ocorreu em piscina aquecida a temperatura de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 10 minutos por dia. Os animais foram deixados livres dentro das raias, sem adição de carga. A piscina, mostrada na figura 7, consiste em um tanque de vidro (80 x 20 x 70 cm), composto por 4 raias individualizadas (20 x 20 cm), com profundidade de 50 cm e sistema de aquecimento e recirculação de água.



**Figura 7:** Piscina utilizada no estudo.

Quarenta e oito horas após a última sessão do período de aclimação ao ambiente aquático os camundongos do grupo EX foram submetidos a exercício máximo, de carga progressiva, até a exaustão. Inicialmente, os animais foram pesados em balança semi-analítica e foram confeccionados anéis de metal correspondentes a 2% da massa corporal do animal. A sessão de exercício foi realizada individualmente, em água a temperatura de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . O

animal era colocado na piscina já com um gancho de metal, preso à cauda, correspondente a 2% da sua massa corporal. A cada 10 minutos a carga era aumentada em 2% da massa corporal, até que o animal atingisse a exaustão. A exaustão foi determinada no momento em que o camundongo permanecesse submerso por 4 segundos (BARRETO, *et al.*, 2012). Alcançado esse tempo, o animal era removido imediatamente da água com auxílio de uma peneira e eutanasiado, imediatamente, por deslocamento de cervical.

No dia seguinte à eutanásia do grupo EX, os animais do grupo CON, que não foram submetidos ao exercício, foram mantidos na piscina, com o nível de água próximo à região escapular, sobre uma plataforma de acrílico, nas mesmas condições de temperatura que o grupo exercitado, por 30 minutos. Esse tempo foi determinado pela média do tempo que os animais do grupo EX permaneceram na piscina até a exaustão.

#### 4.2.1 Dissecção

Imediatamente após serem eutanasiados, os animais tiveram o cérebro, o coração e os músculos gastrocnêmios de ambos os membros posteriores rapidamente dissecados, tal como descrito a seguir.

Para dissecção do cérebro o animal foi decapitado após a eutanásia e uma incisão foi realizada na porção posterior do crânio. O osso occipital foi então cortado, passando pelos parietais, frontais, até próximo aos nasais, acompanhando a sutura sagital. Esse procedimento evita danos ao tecido cerebral. Os parietais foram, então, removidos juntamente com parte dos frontais e o cérebro foi exposto totalmente íntegro. Com o auxílio de uma espátula, este foi removido da caixa craniana e colocado imediatamente em tampão fosfato salina (PBS 0,15M, pH 7,34) gelado, no qual foi mantido por cerca de 1 minuto. Após ser retirado da solução foram removidos e descartados o cerebelo e o tronco encefálico. Os hemisférios foram separados e um corte sagital foi realizado em cada um deles. Assim, o cérebro foi dividido em 4 fragmentos, assegurando que todos possuíssem as mesmas áreas do cérebro. Três fragmentos foram imediatamente colocados em gelo e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente 1 hora depois da extração, para análises posteriores e um fragmento foi mantido no gelo para análise a fresco. O procedimento de dissecção do cérebro e obtenção dos fragmentos durou aproximadamente 5 minutos.

O coração foi dissecado por meio de esternotomia mediana longitudinal. Após ser retirado da caixa torácica o pericárdio foi removido e o coração foi lavado em PBS (0,15M,

pH 7,34) e fatiado sagitalmente em 4 partes. Após a secção, 3 fragmentos foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior, enquanto o outro fragmento foi mantido no gelo para análise a fresco. O procedimento foi realizado em aproximadamente 4 minutos.

Para dissecação do músculo gastrocnêmio foi realizada uma incisão longitudinal na pele do camundongo na face posterior dos membros posteriores, a fim de expor os músculos. Os músculos foram dissecados, lavados em PBS (0,15M, pH 7,34) gelado e seccionados em 2 partes equivalentes, de forma a conter porção medial e lateral em cada uma das partes. Três fragmentos foram congelados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores (aguardando aproximadamente 1 hora em gelo antes do congelamento) e um fragmento foi reservado no gelo para análise a fresco. A dissecação dos músculos levou cerca de 6 minutos para cada animal.

### **4.3 Análises de parâmetros redox**

Para determinar se o tempo de congelamento do tecido altera a mensuração de parâmetros de estado redox os fragmentos foram analisados a fresco (sem passar por congelamento – T0) e após 1 (T1), 3 (T2) ou 6 (T3) meses de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram descongeladas imersas no gelo momentos antes dos ensaios. Os parâmetros de estado redox avaliados foram os seguintes: 1. dano oxidativo a lipídeos, pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); 2. dano oxidativo a proteínas, pela mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas; 3. atividade da catalase; 4. atividade da superóxido dismutase e 5. capacidade antioxidante total, determinada pelo poder de redução do ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*). Um mesmo avaliador conduziu uma determinada análise em todos os tempos (T0-T3), para minimizar variações interavaliador. Além disso, os mesmos materiais, reagentes e equipamentos (pipetas, provetas, balança analítica, pHmetro, dentre outros) foram utilizados na repetição (T0-T3) de um mesmo procedimento.

#### **4.3.1 Preparo da amostra – Maceração**

As amostras foram maceradas em um macerador de tecidos Potter-Elvehjem (Corning) mantido no gelo, em PBS (0,15M, pH 7,34) gelado. O homogenato foi dividido em duas alíquotas. A primeira alíquota foi centrifugada (Thermo Electron. Led GMBH

D37520, Alemanha) a 5000 g, por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi destinado à mensuração TBARS e à capacidade antioxidante não enzimática. O sedimento foi utilizado para a mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas. A segunda alíquota foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade das enzimas SOD e CAT, como parâmetro da capacidade antioxidante enzimática. As alíquotas para cada ensaio foram mantidas no gelo enquanto aguardavam dosagem.

#### 4.3.2 Análise da peroxidação lipídica

A reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de TBARS, de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.*, (1979). Alíquotas do homogenato (0,230 mL) foram adicionadas a 0,250 mL de ácido acético (2,5 M, pH 3,4), 0,1 mL de duadecil sulfato de sódio (8,1%) e 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 95 °C durante 90 minutos. Decorrido esse período, as amostras foram resfriadas e centrifugadas durante 5 minutos, a 5000 g (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) e 0,25 mL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços de fundo chato. Na sequência, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 532 nm em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA). A concentração de TBARS nas amostras foi determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de MDA (1,1,3,3 – tetrametoxipropano - Sigma, EUA) e expressa em nmol MDA/mg proteína. As medidas foram realizadas em duplicata.

#### 4.3.3 Derivados carbonílicos em proteínas

A determinação da concentração de derivados carbonílicos em proteínas nos tecidos foi realizada conforme descrito por Levine *et al.*, (1994). O sedimento do homogenato de cada um dos tecidos foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,7, contendo 1 mM de ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA). Em seguida, cada amostra foi homogeneizada e dividida em branco e teste. Foi adicionado ácido tricloroacético 10% a todas as amostras que, então, foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se, ao sedimento do teste 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM) (Sigma-Aldrich®, EUA) diluído em ácido clorídrico 2mM. Ao branco foi adicionado apenas

HCl 2 mM. As amostras foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos e homogeneizadas com o vórtex a cada 15 minutos. Após esse período foi adicionado ácido tricloroacético 10% às amostras, que foram homogeneizadas e centrifugadas a 5000 g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado em 1 mL de etanol e acetato de etila (1:1) e centrifugado a 5000 g, por 10 min e a 4 °C, por duas vezes. Por fim o sedimentado foi dissolvido em SDS 6% e centrifugado a 10000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi avaliado espectrofotometricamente a 370 nm, em placa de 96 poços, em leitor de microplacas, em triplicata.

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas foi determinada utilizando a equação de Lambert Berr:  $A=c.b.\epsilon$ . Onde  $A$  é a diferença entre a absorbância do teste e do branco,  $c$  é a concentração,  $b$  é o caminho óptico e  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar. O coeficiente de extinção molar para o DNPH a 370 nm é  $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e o caminho óptico nesse ensaio foi de 0,73 cm. O conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas foi expresso como nmol de derivados carbonílicos por mg de proteína (nmol/mg prot.)

#### 4.3.4 Atividade da enzima CAT

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada pelo decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio a 240nm, de acordo com o método descrito por Nelson e Kiesow (1972). As amostras foram adicionadas a uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03 M (Sigma, EUA). A reação de decomposição do peróxido de hidrogênio foi acompanhada durante 1 minuto, a 25°C, espectrofotometricamente, a 240 nm (Double beam spectrophotometer visible UV, CE-Libra S22, Faotuo) em cubetas de quartzo. A atividade da catalase foi expressa em milimolar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposto por minuto por miligrama de proteína ( $\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg prot.}$ ). As medidas foram realizadas em triplicata.

#### 4.3.5 Atividade da enzima SOD

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da autooxidação do pirogalol, de acordo com Maklund e Maklund (1974). As amostras de cada tecido foram adicionadas a tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8.2, 37 °C) contendo 1 mM de ácido dietilenotriaminopenta-acético (Sigma, EUA) e a reação foi iniciada por adição de pirogalol (1,2,3-benzenotriol, Sigma, EUA) a 0,2 mM. A reação foi determinada espectofotometricamente em leitor de microplacas a 420 nm, 37°C, durante 4 minutos. A

atividade da SOD foi expressa em U/mg proteína, onde uma unidade de enzima é a quantidade que causa inibição da autooxidação do pirogalol em 50%. As medidas foram realizadas em duplicata.

#### 4.3.6 Capacidade antioxidante não enzimática

A capacidade antioxidante não enzimática das amostras foi determinada pelo método FRAP, de acordo com Benzie e Strain (1996). A capacidade de redução do complexo da forma  $\text{Fe}^{3+}$ -ferri-tripiridiltriazina (TPTZ) para a forma  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ pelos antioxidantes não enzimáticos do homogenato, em pH ácido, vai determinar o poder antioxidante da amostra.

Para a confecção do reagente FRAP, 25 mL de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6) foram acrescentados a 2,5 mL de TPTZ (10 mM, Sigma-Aldrich®, EUA) e depois misturados a 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20 mM). A uma alíquota de 528  $\mu\text{L}$  do reagente FRAP foi adicionado 72  $\mu\text{L}$  do homogenato. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 min, e o sobrenadante foi analisado espectofotometricamente, em duplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$ , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de  $\text{FeSO}_4$  e normalizada pela quantidade de proteína na amostra. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$  de proteína.

#### 4.3.7 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de quantificação de Bradford (*Comassie blue assay*) (Bradford, 1976). Albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL) foi utilizada para construção de uma curva com concentrações conhecidas de proteína (curva padrão). A leitura, em triplicata, foi realizada espectofotometricamente em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA) a 590 nm e os valores de proteína determinados pelo Software Softmaxpro® (V5.4, molecular Devices, EUA) em mg/mL.

#### 4.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA *Two Way* com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Tuckey para as avaliações intragrupo e efeito principal do congelamento e Sidak para avaliações intergrupo. Para as análises utilizou-se o *software* GraphPadPrism (versão 6.00, GraphPad *Software*, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .





## 5 RESULTADOS

Neste estudo investigou-se o efeito do tempo de congelamento da amostra sobre a resposta de biomarcadores do estado redox a uma sessão de exercício máximo no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos. Vinte e seis camundongos *swiss*, machos, com 8 semanas de idade foram divididos em dois grupos, controle (CON) e exercício (EX), pareados pela massa corporal. A massa corporal média dos animais não foi diferente entre os grupos ( $38,9 \pm 2,7$  g e  $39,0 \pm 2,2$  g, CON e EX, respectivamente). No grupo exercício o tempo médio para exaustão foi de 34 min e 38 s  $\pm$  10 min e 30 s e os animais atingiram carga máxima média de  $3,2 \pm 0,7$  g. Os animais do grupo controle foram mantidos por 30 minutos na água, sob as mesmas condições de temperatura do grupo exercício ( $32,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ) sobre uma plataforma.

A Tabela 1 mostra o efeito do exercício máximo e do tempo de congelamento na concentração de TBARS no gastrocnêmio, coração e cérebro. A análise de efeito principal revelou que o congelamento da amostra reduziu a concentração de TBARS nos três tecidos analisados ( $p < 0,0001$ ) e foi observada interação significativa entre o tempo de congelamento e o efeito do exercício na concentração de TBARS para o gastrocnêmio ( $p = 0,005$ ), coração ( $p = 0,018$ ) e cérebro ( $p = 0,029$ ).

No gastrocnêmio a concentração de TBARS foi maior, após o exercício, nas amostras avaliadas a fresco (T0,  $p < 0,0001$ ) e após 1 (T1,  $p < 0,0001$ ) e 3 meses (T2,  $p < 0,05$ ) de congelamento a  $-80^\circ\text{C}$ . Isso indica que a sessão de exercício máximo promoveu peroxidação lipídica no gastrocnêmio e que o congelamento da amostra por até 3 meses não alterou a medida deste marcador no tecido em questão. Contudo, em 6 meses de congelamento (T3), observou-se redução da concentração de TBARS no gastrocnêmio, tanto dos animais exercitados ( $p < 0,0001$ ), como no grupo controle ( $p < 0,05$ ) em relação a T0, de maneira que o efeito do exercício na concentração de TBARS não foi mais observado ( $p > 0,05$ , CON *versus* EX, T3). Os resultados encontrados indicam que o congelamento por 6 meses compromete a integridade do gastrocnêmio para a quantificação de TBARS, o que compromete a avaliação do efeito do exercício máximo nesse tecido.

Resultados semelhantes foram observados para a quantificação de TBARS no coração e no cérebro (Tabela 1), porém, nestes tecidos o efeito do congelamento foi observado mais precocemente. Em ambos os tecidos foi observado aumento da concentração de TBARS em resposta ao exercício, tanto para as análises a fresco (T0,  $p < 0,0001$ ), como após 1 mês de congelamento (T1,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,05$ , coração e cérebro, respectivamente).

A análise do efeito principal revelou que, no coração, o congelamento por tempo igual ou superior a 3 meses reduziu a concentração de TBARS, independente da condição experimental (efeito principal do congelamento,  $p < 0,01$ , T2 *versus* T0), enquanto no cérebro este efeito foi observado já após 1 mês descongelamento (efeito principal do congelamento,  $p < 0,05$ , T1 *versus* T0). Assim, tanto no coração ( $p > 0,05$ , CON *versus* EX, T2) como no cérebro ( $p > 0,05$ , CON *versus* EX, T2) não foi observado efeito do exercício na concentração de TBARS em amostras congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por período igual ou superior a 3 meses. Vale destacar que, nos animais não exercitados, o congelamento por até 6 meses não modificou as concentrações de TBARS no coração ( $p > 0,05$ , T3 *versus* T0), diferentemente do cérebro ( $p < 0,05$  T3 *versus* T0). Os resultados indicam que o congelamento de amostras de coração e cérebro por 3 meses ou mais interfere na avaliação da peroxidação lipídica induzida pelo exercício máximo.

Em resumo, os resultados indicam que no gastrocnêmio a avaliação do efeito do exercício máximo na concentração de TBARS pode ser seguramente avaliada em amostras congeladas por até 3 meses. Já no coração e no cérebro esta avaliação deve ocorrer em até 1 mês após o congelamento das amostras. Assim, o efeito do tempo de congelamento da amostra na avaliação peroxidação lipídica em resposta ao exercício máximo é dependente do tecido em avaliação.

Os efeitos do exercício máximo e do tempo de congelamento nas concentrações de derivados carbonílicos em proteínas estão mostrados na Tabela 2. Assim como observado para o TBARS, o exercício máximo aumentou a concentração de derivados carbonílicos em proteínas no gastrocnêmio ( $p < 0,0001$ , efeito do exercício, independente do congelamento) e o congelamento, independente da condição experimental, não teve efeito na concentração deste marcador ( $p = 0,83$ ). Esses dados indicam que a concentração de derivados carbonílicos em proteínas no gastrocnêmio não é alterada pelo congelamento por até 6 meses e portanto a avaliação da resposta ao exercício máximo também não é afetada.

No cérebro, o congelamento reduziu a concentração de derivados carbonílicos em proteínas ( $p = 0,012$ , efeito principal do congelamento) e foi observada interação significativa entre o congelamento da amostra e o efeito do exercício na concentração desse marcador ( $p = 0,006$ ). Nos animais exercitados foi observada maior concentração de derivados carbonílicos em proteínas no cérebro, comparado ao controle, tanto nas amostras analisadas a fresco como após 1, 3 ou 6 meses de congelamento ( $p < 0,05$ , CON *versus* EX), embora nas amostras do grupo exercício congeladas por tempo igual ou superior a 3 meses a concentração de

derivados carbonílicos em proteínas tenha sido reduzida ( $p < 0,001$ , T2 versus T0). Assim, apesar do congelamento das amostras de cérebro por tempo igual ou superior a 3 meses ter reduzido a concentração do marcador de dano oxidativo a proteínas nos camundongos submetidos ao exercício máximo, essa redução não foi suficiente para comprometer a avaliação do efeito do exercício nesse biomarcador (Tabela 2).

Os efeitos do congelamento e do exercício máximo na concentração de derivados carbonílicos em proteínas no coração foram distintos daqueles observados para o cérebro e gastrocnêmio (Tabela 2). O congelamento da amostra de coração, independente da condição experimental, aumentou a concentração de derivados carbonílicos em proteínas em 6 meses de congelamento ( $p < 0,0001$ , T3 versus T0) e foi observada interação significativa entre o tempo de congelamento e o efeito do exercício na concentração desse marcador ( $p < 0,029$ ). A concentração de derivados carbonílicos em proteínas foi maior após 6 meses de congelamento da amostra nos animais não exercitados ( $p < 0,01$ , T3 versus T0), enquanto que nos animais exercitados o aumento da concentração de derivados carbonílicos em proteínas no coração já foi observado com 3 meses de congelamento da amostra ( $p < 0,05$ , T2 versus T0). Vale destacar que, embora a análise de variância tenha indicado efeito do exercício na concentração de derivados carbonílicos em proteínas no coração ( $p = 0,0115$ , efeito do exercício, independente do congelamento), a análise *post-hoc* não foi capaz de localizar a diferença.

Assim, os resultados indicam que o congelamento do gastrocnêmio, cérebro e coração por até 6 meses não compromete a avaliação do efeito do exercício máximo sobre o dano oxidativo a proteínas.

**Tabela 1. Efeito do exercício máximo e do tempo de congelamento da amostra nas concentrações de TBARS no gastrocnêmio, coração e cérebro.**

	Gastrocnêmio		Coração		Cérebro	
	CON	EX	CON	EX	CON	EX
T0	2,59 ± 1,65	5,74 ± 3,34*	2,84 ± 0,59	4,60 ± 1,72*	4,08 ± 1,42	6,47 ± 1,62*
T1	2,14 ± 1,38	5,79 ± 2,40*	2,14 ± 0,60	4,17 ± 1,54*	3,51 ± 2,15	4,90 ± 0,99* <sup>a</sup>
T2	2,23 ± 1,03	4,06 ± 1,74*	2,18 ± 0,52	3,09 ± 0,63 <sup>a</sup>	3,19 ± 1,44	4,13 ± 0,92 <sup>a</sup>
T3	0,74 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,48 <sup>a,b,c</sup>	2,41 ± 0,43	3,14 ± 0,60 <sup>a</sup>	2,61 ± 0,72 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,95 <sup>a,b</sup>

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão e representam a concentração de MDA, em nmol/mg de proteína. T0 = a fresco, T1= 1 mês de congelamento, T2 = 3 meses de congelamento, T3 = 6 meses de congelamento, CON = controle, EX = exercício. \*Efeito do exercício.<sup>a, b, c</sup>Efeito do congelamento, em um mesmo grupo, comparado a T0 (<sup>a</sup>), T1 (<sup>b</sup>) ou T2 (<sup>c</sup>). Anova *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey (intragrupo e efeito principal do congelamento) e Sidak (intergrupo).

**Tabela 2. Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento nas concentrações de derivados carbonílicos em proteínas no gastrocnêmio, coração e cérebro.**

	Gastrocnêmio		Coração		Cérebro	
	CON	EX	CON	EX	CON	EX
T0	0,21 ± 0,15	0,46 ± 0,27*	1,27 ± 0,47	0,90 ± 0,36	5,26 ± 2,24	19,35 ± 11,71*
T1	0,19 ± 0,18	0,47 ± 0,31*	1,15 ± 0,42	0,69 ± 0,17	4,63 ± 2,07	16,86 ± 5,75*
T2	0,17 ± 0,10	0,48 ± 0,27*	1,22 ± 0,34	1,51 ± 0,46 <sup>a,b</sup>	4,64 ± 2,56	11,67 ± 3,83* <sup>a,b</sup>
T3	0,19 ± 0,09	0,55 ± 0,31*	1,94 ± 0,52 <sup>a,b,c</sup>	1,58 ± 0,79 <sup>a,b</sup>	5,92 ± 3,25	11,48 ± 3,81* <sup>a,b</sup>

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão e representam a concentração de derivados carbonílicos em proteínas em nmol/mg de proteína. T0 = a fresco, T1= 1 mês de congelamento, T2 = 3 meses de congelamento, T3 = 6 meses de congelamento, CON = controle, EX = exercício. \*Efeito do exercício.<sup>a, b, c</sup>Efeito do congelamento, em um mesmo grupo, comparado a T0 (<sup>a</sup>), T1 (<sup>b</sup>) ou T2 (<sup>c</sup>). Anova *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey (intragrupo e efeito principal do congelamento) e Sidak (intergrupo).

Os efeitos de uma sessão de exercício máximo e do congelamento na atividade da CAT no gastrocnêmio e no coração estão mostrados na Tabela 3. Não foi possível determinar a atividade dessa enzima no cérebro, possivelmente devido à sua baixíssima atividade intrínseca de catalase e o método utilizado nesse estudo não foi sensível o bastante para detectar alguma atividade na fração de tecido reservada. No gastrocnêmio e no coração o congelamento da amostra reduziu a atividade da CAT ( $p < 0,0001$ , efeito principal do congelamento) e foi observada interação entre o tempo de congelamento e o efeito do exercício ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0004$ , gastrocnêmio e coração, respectivamente). Nas amostras analisadas a fresco, a atividade da CAT foi maior nos dois tecidos nos animais exercitados ( $p < 0,0001$ , CON *versus* EX) e a atividade da enzima foi reduzida quando ambos, gastrocnêmio e coração foram congelados por tempo igual ou superior a 1 mês, tanto no grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , gastrocnêmio e coração, respectivamente) quanto no grupo exercício ( $p < 0,0001$ ), quanto no exercício. Com isso, tanto no gastrocnêmio quanto no coração, não foram observadas diferenças significativas entre os animais exercitados e o controle nas amostras congeladas por 1 mês ou mais. Esses dados indicam que o congelamento do gastrocnêmio e do coração por 1 mês compromete a avaliação da resposta da atividade da CAT ao exercício máximo.

Resultados semelhantes foram observados na análise do efeito do congelamento na resposta da SOD ao exercício máximo nos três tecidos avaliados (Tabela 4). No gastrocnêmio, coração e cérebro o congelamento reduziu a atividade desta enzima ( $p < 0,0001$ , efeito principal do congelamento) e houve interação entre tempo de congelamento e o efeito do exercício ( $p < 0,01$ ). Nos três tecidos, nas amostras analisadas a fresco, a atividade da SOD foi maior nos animais exercitados, comparado ao controle (gastrocnêmio:  $p < 0,001$  CON *versus* EX, T0).

No gastrocnêmio e no coração o congelamento da amostra, independente da condição experimental, por tempo igual ou superior a 1 mês reduziu a atividade da enzima ( $p < 0,0001$ , T1 *versus* T0), enquanto que no cérebro a atividade da SOD foi menor nas amostras congeladas por tempo igual ou superior a 3 meses ( $p < 0,0001$ , T2 *versus* T0). A atividade da SOD no gastrocnêmio não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos CON e EX nas amostras desse tecido congeladas por 1 mês ou mais. Contudo, no coração e no cérebro, a atividade da SOD ainda se manteve aumentada em resposta ao exercício nas amostras congeladas por 1 mês ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ , CON *versus* EX, T1, cérebro e coração, respectivamente). Ainda, após 3 meses de congelamento a resposta da SOD ao exercício no cérebro diminuiu em

relação ao controle (  $p < 0,05$ , CON *versus* EX, T2), o que indica que o congelamento pode não apenas anular o efeito do exercício em determinada amostra, mas também pode invertê-lo (Tabela 4). Os dados indicam que o congelamento afeta resposta da atividade da SOD ao exercício máximo no gastrocnêmio, coração e cérebro, de maneira específica para cada tecido.

De maneira geral, os resultados mostraram que o efeito do exercício sobre a atividade antioxidante enzimática é comprometida com o congelamento do gastrocnêmio, coração e cérebro.

**Tabela 3. Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na atividade da catalase no gastrocnêmio e coração.**

	Gastrocnêmio		Coração	
	CON	EX	CON	EX
T0	1,69 ± 0,52	4,34 ± 2,59*	1,64 ± 0,75	3,14 ± 1,97*
T1	0,39 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,22 <sup>a</sup>
T2	0,51 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,11 <sup>a</sup>
T3	0,35 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,09 <sup>a</sup>

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão e representam a atividade da catalase em  $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$  proteína. T0 = a fresco, T1 = 1 mês de congelamento, T2 = 3 meses de congelamento, T3 = 6 meses de congelamento, CON = controle, EX = exercício. \*Efeito do exercício. <sup>a</sup>Efeito do congelamento, em um mesmo grupo, comparado a T0. Anova *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey (intragrupo e efeito principal do congelamento) e Sidak (intergrupo).

**Tabela 4. Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na atividade da superóxido dismutase no gastrocnêmio, coração e cérebro.**

	Gastrocnêmio		Coração		Cérebro	
	CON	EX	CON	EX	CON	EX
T0	3,08 ± 1,98	8,64 ± 3,66*	19,05 ± 3,03	23,88 ± 3,51*	12,24 ± 3,36	18,56 ± 3,70*
T1	2,20 ± 1,46	2,90 ± 1,43 <sup>a</sup>	13,26 ± 3,57 <sup>a</sup>	17,56 ± 3,40 <sup>*a</sup>	14,34 ± 2,51	19,55 ± 3,46*
T2	2,24 ± 0,89	2,32 ± 0,82 <sup>a</sup>	5,84 ± 1,04 <sup>a,b</sup>	5,45 ± 2,07 <sup>a,b</sup>	6,93 ± 1,59 <sup>a,b</sup>	4,01 ± 1,18 <sup>*a,b</sup>
T3	1,26 ± 0,61	1,88 ± 0,94 <sup>a</sup>	7,01 ± 3,72 <sup>a,b</sup>	8,04 ± 2,54 <sup>a,b</sup>	6,67 ± 1,91 <sup>a,b</sup>	5,71 ± 0,72 <sup>a,b</sup>

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão e representam a atividade da superóxido dismutase em U/mg proteína. T0 = a fresco, T1 = 1 mês de congelamento, T2 = 3 meses de congelamento, T3 = 6 meses de congelamento, CON = controle, EX = exercício. \*Efeito do exercício. <sup>a, b</sup> Efeito do congelamento, em um mesmo grupo, comparado a T0 (<sup>a</sup>) ou T1 (<sup>b</sup>). Anova *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey (intragrupo e efeito principal do congelamento) e Sidak (intergrupo).

Na Tabela 5 estão representados os efeitos de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na capacidade antioxidante total dos tecidos em avaliação. A capacidade antioxidante total, medida pelo método FRAP, do gastrocnêmio, coração e cérebro foi menor nos animais exercitados ( $p < 0,0001$ , efeito principal do exercício) comparados aos controles, independente do tempo de congelamento da amostra. Houve interação entre o congelamento e o efeito do exercício nas amostras de coração ( $p < 0,0001$ ) e cérebro ( $p = 0,0486$ ). No gastrocnêmio não foi observado efeito do tempo de congelamento na capacidade antioxidante total ( $p = 0,65$ ). Já no coração e no cérebro a capacidade antioxidante total foi menor nas amostras avaliadas em 6 meses ( $p < 0,0001$ , T3 *versus* T0) e 3 meses ( $p < 0,05$ , T2 *versus* T0) de congelamento, respectivamente, independente da condição experimental. Apesar do efeito do congelamento nestes tecidos, a capacidade antioxidante total no coração e cérebro dos animais exercitados foi menor comparado ao controle.

Esses resultados mostram que o congelamento da amostra não compromete avaliação do efeito do exercício máximo na capacidade antioxidante total não enzimática do gastrocnêmio, coração e cérebro.



**Tabela 5. Efeito de uma sessão de exercício máximo e do tempo de congelamento na capacidade antioxidante total pelo método FRAP no gastrocnêmio, coração e cérebro.**

	Gastrocnêmio		Coração		Cérebro	
	CON	EX	CON	EX	CON	EX
T0	0,94 ± 0,26	0,49 ± 0,22*	2,54 ± 0,59	1,12 ± 0,35*	9,24 ± 2,39	4,79 ± 2,21*
T1	0,93 ± 0,16	0,49 ± 0,07*	2,60 ± 0,38	1,36 ± 0,20*	8,12 ± 2,08	4,41 ± 1,35*
T2	0,99 ± 0,33	0,56 ± 0,15*	2,49 ± 0,31	1,22 ± 0,19*	8,23 ± 2,68	3,16 ± 0,83*
T3	0,95 ± 0,29	0,53 ± 0,11*	1,13 ± 0,18 <sup>a,b,c</sup>	0,68±0,11 <sup>*,a,b,c</sup>	5,63 ± 1,26 <sup>a,b,c</sup>	2,97 ± 0,68 <sup>*,a</sup>

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão e representam a concentração de  $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$  de proteína. T0 = a fresco, T1= 1 mês de congelamento, T2 = 3 meses de congelamento, T3 = 6 meses de congelamento, CON = controle, EX = exercício. \*Efeito do exercício. <sup>a, b, c</sup> Efeito do congelamento, em um mesmo grupo, comparado a T0 (<sup>a</sup>), T1 (<sup>b</sup>) ou T2 (<sup>c</sup>). Anova *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey (intragrupo e efeito principal do congelamento) e Sidak (intergrupo).



## 6 DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou o efeito do tempo de congelamento da amostra na quantificação de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos *swiss* submetidos a uma sessão de exercício máximo. Esse é o primeiro estudo a investigar o efeito do tempo de congelamento em parâmetros redox de tecidos de animais em situação de desequilíbrio redox. O exercício máximo promoveu, como esperado, alteração do estado redox dos tecidos avaliados a fresco, evidenciado pelo aumento dos biomarcadores de dano oxidativo (TBARS e derivados carbonílicos em proteínas), acompanhado pelo aumento da atividade da SOD e CAT e diminuição da capacidade antioxidante total. O tempo de congelamento das amostras interferiu no efeito do exercício sobre a peroxidação lipídica e na atividade das enzimas antioxidantes e o efeito do congelamento mostrou-se dependente do parâmetro redox e do tecido avaliados (Tabela 6).

**Tabela 6. Efeito do tempo de congelamento na quantificação de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro na resposta ao exercício máximo.**

	TBARS			Derivados carbonílicos em Proteínas			CAT		SOD			FRAP		
	Gast.	Cor.	Cer.	Gast.	Cor.	Cer.	Gast.	Cor.	Gast.	Cor.	Cer.	Gast.	Cor.	Cer.
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1	-	-	-	-	-	-	†	†	†	-	-	-	-	-
T2	-	†	†	-	-	-	†	†	†	†	†	-	-	-
T3	†	†	†	-	-	-	†	†	†	†	†	-	-	-

T0 = a fresco, T1= 1 mês de congelamento, T2 = 3 meses de congelamento, T3 = 6 meses de congelamento. Gast. = Gastrocnêmio, Cor. = Coração, Cer = Cérebro. (†) = interferência do congelamento na resposta ao exercício máximo, (-) = ausência de efeito do congelamento.

O protocolo de exercício máximo resultou em peroxidação lipídica no gastrocnêmio, coração e cérebro, quando analisados a fresco. O gastrocnêmio foi o tecido com maior dano lipídico após o exercício (aumento percentual de 122% da concentração de MDA em relação ao controle), seguido pelo coração (61%) e cérebro (58%). O aumento acentuado do fluxo sanguíneo no músculo esquelético pode justificar o aumento da peroxidação lipídica pela ativação de vários sistemas geradores de ERO dentre eles o mecanismo de isquemia no exercício máximo. No coração, durante o exercício máximo o fluxo sanguíneo pode aumentar de 4 a 5 vezes, o que também contribui o aumento das concentrações de MDA pela ativação de sistemas geradores de ERO, no entanto o mecanismo de isquemia e reperfusão nesse tecido pode ter menor contribuição, já que o coração tem baixa concentração de xantina desidrogenase (EVANS, GRIFFITHS e LUNEC, 1997; JI, 2000). Enquanto no cérebro, que no estado basal já apresenta maior concentração de MDA em relação ao coração e ao músculo esquelético, como mostrado em nossos resultados, o moderado aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício é suficiente para contribuir com o aumento das concentrações de MDA devido à vulnerabilidade desse tecido à ação oxidativa das ERO, pela sua alta taxa de substratos facilmente oxidáveis e quantidade de lipídeos (ADIBHATLA e HATCHER, 2007; RADA, CHUNG e GOTO, 2007; SOMANI e HUSAIN, 2000).

As concentrações de MDA no gastrocnêmio, coração e cérebro não se mantiveram estáveis após o congelamento e, conseqüentemente, o efeito do exercício sobre a peroxidação lipídica não foi observado nas amostras congeladas. Esse efeito, porém, foi tempo e tecido específico. O gastrocnêmio foi o tecido que mostrou maior estabilidade da concentração de MDA com o tempo de congelamento, sendo que o efeito do exercício não foi observado apenas depois do terceiro mês de estocagem da amostra a -80 °C. Já o coração e o cérebro permaneceram viáveis para determinação do efeito do exercício somente até o primeiro mês de congelamento. Essa diferença na estabilidade do marcador de peroxidação lipídica entre o gastrocnêmio, que apresentou maior resposta ao exercício máximo, e os outros tecidos pode estar relacionada a alguma característica intrínseca desse tecido, que reduz a taxa de degradação do analito.

A estabilidade do MDA foi estudada por Siu *et al.* (1982). O MDA ( $3 \times 10^{-2}$  mM) foi incubado com homogenato de fígado de ratos *Wistar* e/ou mitocôndrias isoladas, a 37° C, sob agitação contínua por 2 horas. Após 70 min de incubação, 50% do MDA foi convertido em uma forma não reativa com o TBA. Foi mostrado que o MDA pode ser oxidado

completamente a dióxido de carbono ou ser metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase, além de reagir com grupos aminos e sulfidrilas de proteínas e, assim, diminuir sua reatividade com o TBA. É possível então que os resultados observados no presente estudo sejam decorrentes da degradação do MDA nas amostras congeladas, por oxidação do mesmo ou por ação da aldeído desidrogenase. O MDA pode sofrer oxidação, mesmo que as reações sejam lentificadas pelo congelamento (PARK *et al.* 1998; CROWE *et al.*, 1990). As reações de oxidação podem ocorrer durante o período de armazenamento em baixas temperaturas quando há altas concentrações de catalisadores, como o ferro (AYALA, MUÑOZ e ARGÜELLES, 2014). Da mesma forma, a enzima aldeído desidrogenase, mesmo que com suas taxas de reação muito baixas e possíveis alterações conformacionais desencadeadas pelo gelo (MORE, DANIEL e PETACH, 1995), pode degradar esse produto da peroxidação lipídica. Já a reação do MDA com grupos sulfidrílicos e aminos, pode ter tido uma menor contribuição para os resultados observados nesse estudo, uma vez que a técnica aqui empregada ocorre em meio ácido, e, nessa condição, complexos MDA-proteínas são hidrolisados e liberam o MDA para a reação com o TBA.

Há apenas um relato na literatura que relaciona o tempo de congelamento da amostra com a estabilidade do MDA. Kumar *et al.*, (2012) avaliaram a concentração de MDA em plasma de mulheres grávidas em suplementação oral de ferro congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por período que variou de 1-708 dias, pelo método de TBARS. Os autores observaram maior estabilidade das concentrações de MDA nas amostras testadas nas primeiras 3 semanas após o congelamento depois desse período houve aumento considerável da concentração desse biomarcador. Os resultados mostraram que as flutuações dos valores de concentração de MDA foram mínimas nos primeiros 28 dias de congelamento e, posterior a isso, aumentaram até 200 dias de armazenamento. Após esse período, a taxa de mudança das concentrações de MDA desacelerou e se manteve até 708 dias de congelamento. Esses resultados, porém, não podem ser comparados aos deste estudo, pois se trata de plasma, em que o analito em questão está em solução, e além disso, as amostras foram estocadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fatores estes que sabidamente interferem nas medidas (ASGHAR, 1988; MORE, DANIEL e PETACH, 1995). Outro fator importante desse estudo desenvolvido por Kumar *et al.* é que esses autores não tinham como objetivo inicial avaliar o efeito do tempo de congelamento nas concentrações de MDA, mas por problemas logísticos mantiveram as amostras estocadas por mais tempo que o

previsto o que faz com que esse estudo tenha uma importante limitação, que é a ausência da medida a fresco da amostra.

O outro biomarcador de dano oxidativo avaliado nesse estudo foi a formação de derivados carbonílicos nas proteínas em resposta ao exercício máximo. No gastrocnêmio e cérebro a concentração de proteínas com derivados carbonílicos aumentou em resposta ao exercício máximo, o que não foi observado no coração. O cérebro mostrou-se muito sensível ao dano oxidativo em proteínas após o exercício, tendo aumento de 268% do biomarcador em relação ao controle, enquanto no gastrocnêmio o aumento foi de 119%. Além das concentrações basais de derivados carbonílicos no cérebro superarem as do gastrocnêmio e do coração, o aumento do dano a proteínas observado nesse tecido pode ser resultado da grande quantidade de ferro livre. A catálise por metal é um dos principais fatores que contribuem com a formação de derivados carbonílicos na cadeia lateral das proteínas, o que pode tornar esse tecido mais suscetível ao dano em proteínas que os outros (STADTMAN e LEVINE, 2000). Tratando-se do gastrocnêmio, este mostrou baixa concentração basal de derivados carbonílicos nas proteínas. No entanto, o grande aumento da atividade metabólica desse tecido em resposta ao exercício máximo contribuiu para o aumento da carbonilação de proteínas, mas de forma bem menos pronunciada que no cérebro, devido a características intrínsecas de cada um desses tecidos, como o conteúdo de ferro livre. Nesse modelo de exercício de baixo impacto, há pouca ruptura de proteínas contendo ferro que possa catalisar formação de grupos carbonílicos no gastrocnêmio (JENKINS, KRAUSE e SCHOFIELD, 1993; LUI *et al*, 2000).

A presença de derivados carbonílicos nas proteínas leva à agregação destas, para minimizar sua interação com o ambiente aquoso, o que pode ser favorecido também pela formação de gelo, e ainda a maior concentração de proteínas danificadas favorece a formação de agregados (JUNG, HÖH e GRUNE, 2014). A formação dos agregados pode diminuir a eficiência do ensaio de quantificação do produto de dano oxidativo a proteínas em questão, por diminuir a quantidade de grupos carbonílicos acessíveis para a reação com a 2,4-dinitrofenilhidrazina. No cérebro parece haver, a fresco, uma maior quantidade de proteínas com dano oxidativo, isso somado ao congelamento pode explicar a redução desse marcador nesse tecido. Isso também demonstra e reforça a contribuição de características intrínsecas dos diferentes tecidos para a estabilidade dos marcadores em estudo.

O congelamento do cérebro, gastrocnêmio e coração não teve impacto na avaliação de derivados carbonílicos em proteínas induzida pelo exercício máximo, apesar da redução deste marcador em amostras de cérebro de animais exercitados que foram armazenadas em  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 meses ou mais e do aumento da concentração de derivados carbonílicos em proteínas no coração armazenado por tempo igual ou superior a 3 meses. A carbonilação é uma forma irreversível de modificação de proteínas e tem sido mostrado que esse marcador é muito estável, quando comparado a produtos da peroxidação lipídica (GRUNE, REINHECKEL e DAVIES, 1996; WEBER, DAVIES e GRUNE, 2015). Esse achado é de extrema relevância prática, pois demonstra, nos tecidos e na condição experimental em questão, que o marcador tem grande estabilidade e assim, quando a amostra não puder ser analisada a fresco, o seu congelamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por até seis meses não irá comprometer o resultado do estudo.

Tratando-se da resposta da capacidade antioxidante enzimática dos tecidos ao exercício máximo, este promoveu aumento da atividade da CAT e SOD em todos os tecidos avaliados. Essa resposta pode ser devido ao aumento da concentração dos substratos dessas enzimas, como indicado pelo aumento da peroxidação lipídica e do dano oxidativo as proteínas observados.

A atividade da CAT no tecido fresco aumentou com o exercício no gastrocnêmio e no coração, como já observado em outros estudos (BARRETO *et al.*, 2012 e SOMANI *et al.*, 1995). O aumento foi de 157% no gastrocnêmio e 91% no coração, em relação ao controle. A CAT teve sua atividade catalítica comprometida com o congelamento e conseqüentemente, a resposta ao exercício não foi mais observada nas amostras após 1 mês de congelamento. Estudos mostram que a atividade da CAT é criticamente comprometida com o congelamento, e que os mecanismos envolvidos podem estar relacionados à desnaturação irreversível da enzima por formação de cristais de gelo. Shikama e Yamazaki, (1961) observaram redução da atividade de CAT de homogenato de fígado de boi, em 20%, em amostras congeladas por 10 minutos entre  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  e descongeladas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esses autores justificaram a redução da atividade da enzima pela formação de uma crítica região de temperatura que leva à desnaturação da enzima por um processo de transição de cristais de gelo. Fishbein e Winkert (1978) também observaram perda da atividade da CAT, utilizando enzima purificada de fígado, quando a enzima em solução foi submetida a uma taxa de congelamento de 1 a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . os autores observaram que baixas taxas de resfriamento podem aumentar a acidez do



meio ou aumentar a solubilidade da enzima sem diluir significativamente os solutos tóxicos, ao contrário do que ocorre em altas taxas de resfriamento, ou congelamento rápido. Os autores propuseram que a inativação da CAT é irreversível, associado à desnaturação, decorrente da formação de cristais de gelo, e não por queda da temperatura. Isso foi sustentado por Chang *et al.*, (1983), no trabalho sobre secção de tecidos para microscopia eletrônica e avaliação dos efeitos estruturais do congelamento. Os autores observaram que os cristais de CAT utilizados no estudo definem, de forma exclusiva, a orientação dos cristais de gelo hexagonais que crescem neles, e dessa forma a estrutura da enzima é alterada. Além de tudo isso, baixas concentrações de CAT, tal como observada no coração e gastrocnêmio, têm relação com a diminuição da estabilidade da enzima durante o congelamento (FISHBEIN e WINKERT, 1979, WANG *et al.*, 2010).

Poucos estudos foram realizados para avaliar especificamente o efeito do tempo congelamento na estabilidade de enzimas antioxidantes em amostras biológicas. Recentemente, Bortolin *et al.* (2016) investigaram o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a atividade da CAT em amostras íntegras de cérebro de ratos. As amostras foram congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 dias. O estudo não mostrou alteração na atividade da CAT no cérebro ao congelamento por 2 meses a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , enquanto no presente estudo não foi encontrada atividade detectável de CAT pelo método utilizado. Diferentemente desse estudo, Bortolin *et al.* investigaram o efeito do congelamento em amostras apenas em condições redox basais.

Jung *et al.*, (1993) avaliaram o efeito da estocagem a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 28 dias na atividade da CAT em fígado e rim de ratos, armazenados íntegros. No rim e no fígado a atividade da CAT foi reduzida nas amostras estocadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 28 dias. O estudo mostrou que a sensibilidade da CAT ao congelamento foi a mesma nos tecidos avaliados. Os resultados apresentados no presente estudo reforçam esses achados e mostram que a atividade da CAT é rapidamente perdida também no gastrocnêmio, coração e cérebro congelados por 30 dias a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de maneira não específica para esses tecidos. Nesse contexto, a mensuração da CAT deve ser preferencialmente realizada a fresco.

O gastrocnêmio dos animais exercitados foi o tecido que apresentou maior aumento da atividade da SOD, de 180% em relação ao controle, enquanto no cérebro e no coração essa resposta ao exercício foi de 51% e 25%, respectivamente. A atividade basal de SOD é muito baixa no músculo esquelético de ratos, sendo a menor entre os três tecidos

estudados (GRANKVIST, MARKLUND e TÄLJEDAL, 1981), como mostrado em nossos resultados. O maior aumento da atividade da SOD no gastrocnêmio pode se justificar pelo aumento da concentração de ânion superóxido mais pronunciado nesse tecido, em resposta ao exercício (JI, 1994). Como mostrado em nossos resultados o coração é o tecido, dentre os investigados nesse trabalho, com maior atividade basal de SOD total (GRANKVIST, MARKLUND e TÄLJEDAL, 1981), o que pode explicar neste tecido o aumento menos pronunciado da atividade da SOD, comparado aos outros tecidos, após o exercício máximo

O congelamento afetou a resposta da SOD ao exercício máximo em todos os tecidos em avaliação, mas o gastrocnêmio foi o mais suscetível ao efeito do congelamento. A precoce deteriorização da atividade da SOD no gastrocnêmio pode ser decorrente de uma menor concentração dessa enzima, sugerida pela menor atividade basal comparada aos outros tecidos, pois a concentração enzimática parece ter uma relação indireta com o dano por congelamento (FISHBEIN e WINKERT, 1979, WANG, NEMA e TEAGARDEM, 2010). Entretanto, com o aumento do tempo de congelamento pode ter ocorrido desnaturação e consequente inativação dessas enzimas por proteases ou ainda formação de pontes dissulfetos intermoleculares que levam a perda da atividade (CROWE *et al.*, 1990; WANG, NEMA e TEAGARDEM, 2010), o que pode ter contribuído para a redução da atividade da SOD e alteração do efeito do exercício em 1 mês de congelamento no gastrocnêmio e em 3 meses no coração e cérebro.

Outro fator também muito importante que pode contribuir para a diferença na estabilidade enzimática nos tecidos é a concentração de lipídio, que no coração e principalmente no cérebro, são muito maiores que no músculo esquelético (ADIBHATLA e HATCHER, 2007, NIKOLAIDIS, PETRIDOU e MOUGIOS, 2006). Como relatado por diversos autores, ambientes mais apolares parecem contribuir para a estabilidade enzimática, por reduzir o risco de desdobramento da enzima, favorecendo a integridade molecular (JAENICK *et al.*, 1990; KAUL e MATTIASSON, 1993; ECHLIN, 2013).

Bortolin *et al.* (2016) também investigaram o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a atividade da SOD em amostras íntegras de cérebro de ratos, congeladas a -80 °C por 60 dias. Os resultados mostraram que o congelamento por 2 meses não alterou a atividade da SOD no cérebro intacto, o que, em conjunto com os nossos achados, sugere que estes marcadores são estáveis no cérebro congelado a -80 °C por tempo menor ou igual a dois meses.

No estudo de Jung *et al.*, (1993) também foi avaliado o efeito da estocagem a -70 °C por 28 dias na atividade da SOD em fígado e rim de ratos, armazenados íntegros. A atividade da SOD foi reduzida após o congelamento apenas no rim. Esses autores concluíram que a estabilidade da SOD ao tempo de congelamento depende do tecido em análise. Dessa forma, os resultados do presente estudo em conjunto com esses achados reforçam que o congelamento compromete a mensuração da SOD de maneira específica para os tecidos e, mais uma vez, características intrínsecas dos tecidos parecem se relacionar a estabilidade do analito.

Quanto à capacidade antioxidante não enzimática do gastrocnêmio, coração e cérebro, analisada pelo método de redução do ferro, o exercício máximo reduziu a capacidade antioxidante não enzimática desses tecidos, provavelmente pelo aumento da produção de ERO (DEKKERS *et al.*, 1996; JI, 1994; RADAK *et al.*, 2001). O ensaio FRAP mensura a capacidade de redução do ferro pelos antioxidantes não enzimáticos presentes na amostra, incluindo ácido úrico e ácido ascórbico, dentre outros presentes em menores concentrações. No coração, o conteúdo antioxidantes não enzimáticos é cerca de 2 a 3 vezes maior em relação ao músculo esquelético (JI, 2000), e essa diferença de concentração entre os tecidos pode ser observada em nossos resultados. De acordo com os resultados, o cérebro possui alta concentração de antioxidantes não enzimáticos, várias vezes maior que no gastrocnêmio e algumas vezes superior à do coração. Esse maior conteúdo de antioxidantes não enzimáticos no cérebro pode ser um mecanismo para compensar a sua baixa atividade antioxidante enzimática e já foi demonstrado que os antioxidantes não enzimáticos tem papel chave no cérebro para evitar lesões oxidativas (FREI, 1991).

A redução da capacidade antioxidante total não enzimática no gastrocnêmio, coração e cérebro em resposta ao exercício máximo não foi alterada com o congelamento das amostras, embora tenha ocorrido diminuição da capacidade antioxidante das amostras de cérebro e coração após 3 e 6 meses de congelamento, respectivamente. Portanto, a análise da capacidade antioxidante total não enzimática, medida pelo método FRAP, possui boa estabilidade para a análise de situações de desequilíbrio redox, como o exercício máximo, não alterando o efeito com o congelamento em qualquer um dos tecidos. Assim, caso seja necessário congelar a amostra, este é um bom marcador para ser avaliado, assegurando a confiabilidade dos resultados do estudo.

Firuzi *et al.* (2007) avaliaram o efeito da estocagem de amostras de plasma a -70 °C por 1, 7 e 30 dias em biomarcadores de estado redox de indivíduos saudáveis. Eles não viram alterações significativas na capacidade antioxidante total não enzimática, medida pelo método FRAP, após 1 mês de congelamento. Os resultados do presente estudo, em conjunto com os resultados de Firuzi e colegas, mostram que a capacidade antioxidante total não enzimática, mensurada por FRAP, é estável ao congelamento em outros tecidos, além do plasma.

Os resultados aqui apresentados mostraram que o efeito do congelamento, em alguns biomarcadores, se manifestou mais precocemente nos tecidos do grupo exercitado em relação aqueles do grupo controle. A interação entre o congelamento e o efeito do exercício, observada em todos os biomarcadores, pode ser decorrente das alterações fisiológicas sofridas pelos tecidos sob a condição de exercício máximo, que alteraram não apenas a homeostase redox, mas também de diversos outros componentes, incluindo alteração de homeostase metabólica e iônica. O exercício máximo leva, ainda, à desidratação, aumento da temperatura interna, inclusive do cérebro, e depleção de substratos (FULLER, CARTER e MITCHELL, 1998; MONTAIN e COYLE, 1992), o que pode ter contribuído para alterações importantes nos tecidos dos animais exercitados e, conseqüentemente para o efeito do congelamento especificamente sobre as amostras nessa condição.

É importante ressaltar alguns pontos desse estudo que contribuem para determinar que nossos achados estão, predominantemente, relacionados aos efeitos do congelamento nas amostras e não a outras condições pré-analíticas. As amostras foram cuidadosamente seccionadas em quatro partes iguais e submetidas a congelamento rápido e foram descongeladas apenas no momento dos ensaios. O congelamento das amostras íntegras, e não em solução, foi escolhido, a fim de minimizar alteração de pH e conseqüente cristalização seletiva, formação de interface gelo-água e cristalização eutética, fenômenos estes que podem afetar a estabilidade dos analitos em questão. Além disso, muitas proteínas não têm estabilidade de armazenamento a longo prazo quando em solução (CAO *et al.*, 2002; FAHY e WOWK, 2015; MURASE e FRANKS, 1989; WANG *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 1998). Além de não terem sido estocadas em solução, as amostras foram divididas, sob baixa temperatura, em apenas quatro fatias, necessárias aos experimentos. Quanto maior o fracionamento da amostra, bem como vários ciclos de congelamento e descongelamento, maior a probabilidade de ocorrer proteólise artefactual, já que proteases poderão ter contato com compartimentos

celulares que são normalmente mantidos separados *in vivo* e, conseqüentemente, ocasionar a degradação da amostra e perda de sua utilidade analítica (ERICSSON, FRANZÉN E NISTÉR, 2006). Uma vez que a atividade proteolítica só é cessada abaixo do ponto de congelamento da amostra, cuidados com o processamento devem ser tomados antes do armazenamento, para que não haja maiores erros analíticos em decorrência da presença de proteases livres (BORGES *et al.*, 2014). Dessa forma, no presente estudo buscou-se minimizar qualquer erro pré-analítico comum da manipulação de amostras para que todas as alterações observadas e descritas ao longo do tempo de armazenamento fossem, em sua maioria, decorrentes do processo de congelamento e não por problemas no preparo das amostras.

Assim, podemos observar, de maneira geral, que biomarcadores de estado redox podem ter sua estabilidade comprometida pelo congelamento da amostra, dependendo do estado redox, do tecido avaliado e do tempo de armazenamento. Isso representa um grande problema do ponto de vista da pesquisa científica, uma vez que o congelamento de amostras é uma prática comum. A detecção e/ou quantificação dos biomarcadores em questão é certamente um elemento importante para avanços nos estudos da fisiologia do exercício, bem como de doenças associadas a alterações de condições redox.



## **7 CONCLUSÃO**

Na avaliação do efeito do exercício máximo sobre o estado redox a escolha dos biomarcadores a serem investigados deve considerar o tecido em avaliação e o tempo previsto para a estocagem da amostra.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIHETTY, P. J.; LJUBICIC, V.; MENZIES, K. J.; HOOD, D. A. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. v. 289, n. 4, p. C994-C1001, 2005.
- ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F. Role of lipids in brain injury and diseases. *Future lipidology*. v. 2, n. 4, p. 403-422, 2007.
- AGARWAL, R.V.; CHASE, S.D. Rapid, fluorimetric–liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B*. v. 775, n. 1, p. 121-126, 2002.
- ALLEN, R.G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 28, n. 3, p. 463–499, 2000.
- ANDRUSHKIW, R. I. Mathematical modeling of freezing front propagation in biological tissue. *Mathematical and Computer Modelling*. v. 13, n. 10, p. 1-9, 1990.
- ARNÉR, E.S.J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*. v. 267, n. 20, p. 6102-6109, 2000.
- ASGHAR, A.; GRAY, J.I.; BUCKLEY, D.J.; PEARSON, A.M.; BOOREN, A.M. Perspectives on warmed-over flavor. *Food Technology*. v. 42, n. 6, p. 102-108, 1988.
- AUGUSTO, O. Radicais livres: bons, maus e naturais. Série: Inventando o Futuro. *Oficina de Textos*, São Paulo, 2006.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.
- AYDIN, C.; SONAT, F.; SAHIN, S.K.; CANGUL, I.T.; OZKAYA, G. Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat. *Indian Journal of experimental biology*, v. 47, n. 1, 2009.

BAILEY, D.M.; LAWRENSEN, L.; McENENY, J. et al. Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free radical research*. v. 41, n. 2, p. 182-190, 2007.

BANERJEE A.K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v. 253, p. 307-312, 2003.

BARRETO, T.O.; CLETO, L.S.; GIODA, C.R. et al. Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. *European Journal of Applied Physiology*. v. 112, n. 7, p. 546–552, 2012.

BASTARD, N.; DE DEYN, P.P.; ENGELBORGH, S. Importance and impact of preanalytical variables on Alzheimer disease biomarker concentrations in cerebrospinal fluid. *Clinical chemistry*. v. 61, n. 5, p. 734-743, 2015.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. v.239, p.70-76, 1996.

BERNHEIM, F. Biochemical implications of pro-oxidants and antioxidants. *Radiation Research Supplement*. v. 3, p. 17-32, 1963.

BETSOU, F.; BARNES, R.; BURKE, T. et al. Human biospecimen research: experimental protocol and quality control tools. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. v. 18, n. 4, p. 1017-1025, 2009.

BIENERT, G.P.; CHAUMONT, F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1840, n. 5, 1596-1604, 2014.

BIENERT, G.P.; MØLLER, A.L.; KRISTIANSEN, K.A. et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*. v. 282, n. 2, p. 1183-1192, 2007.

BJÖRNSTEDT, M.; KUMAR, S.; BJÖRKHEM, L.; SPYROU, G.; HOLMGREN, A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomedical and environmental sciences: BES*. v. 10, p. 271-279, 1997.

BLEIER, L.; WITTIG, I.; HEIDE, H.; STEGER, M.; BRANDT, U.; DRÖSE, S. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 78, p. 1-10, 2015.

BLOOMER, R.J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. *Advances in clinical chemistry*. v. 46, p. 1-50, 2008.

BODE, C.; MEINEL, A. The Effect of Storage at - 80° C on the Activities of Cytoplasmic, Mitochondrial and Microsomal Enzymes in Rat Liver. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. v. 20, n. 1, p. 9-14, 1982.

BORGES, C.R.; REHDER, D.S.; JENSEN, S. et al. Elevated plasma albumin and apolipoprotein A-I oxidation under suboptimal specimen storage conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*. v. 13, n. 7, 1890-1899, 2014.

BORTOLIN, R.C.; GASPAROTTO, J.; VARGAS, A.R. et al. Effects of Freeze-Thaw and Storage on Enzymatic Activities, Protein Oxidative Damage, and Immunocontent of the Blood, Liver, and Brain of Rats. *Biopreservation and biobanking*. v. 15, n. 3, p. 182-190, 2016.

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

BRAND, M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*. v.45, p.466-472, 2010.

BRAND, M.D.; AFFOURTIT, C.; ESTEVES, T.C. et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 37, n. 6, p. 755-767, 2004.

BRAND, M.D.; ESTEVES, T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell metabolism*. v. 2, n. 2, p. 85-93, 2005.

BREITENBACH, M.; ECKL, P. Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. *Biomolecules*. v. 5, n.2, p. 1169-1177, 2015.

BUTTERFIELD, D.A.; KOPPAL, T.; HOWARD, B. et al. Structural and Functional Changes in Proteins Induced by Free Radical-mediated Oxidative Stress and Protective Action of the Antioxidants N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron and Vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 854, p. 448-462, 1998.

CAO, E.; CHEN, Y.; CUI, Z.; FOSTER, P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and bioengineering*. v. 82, n. 6, 684-690, 2003.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*. v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHANG, J. J.; MCDOWALL, A.W.; LEPAULT, J. et al. Freezing, sectioning and observation artefacts of frozen hydrated sections for electron microscopy. *Journal of Microscopy*. v. 132, n. 1, p. 109-123, 1983.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences*. v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CLOSE, G.L.; KAYANI, A.C.; ASHTON, T.; McARDLE, A.; JACKSON, M.J. Release of superoxide from skeletal muscle of adult and old mice: an experimental test of the reductive hotspot hypothesis. *Aging cell*. v. 6, n. 2, 189-195, 2007.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G.E. Free radicals in biological materials. *Nature*. v. 174, n. 4432, p. 689-691, 1954.

CRISWELL, D.; POWERS, S.; DODD, S.; LAWLER, J.; EDWARDS, W.; RENSHLER, K.; GRINTON, S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant activity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v. 25, n. 10, p. 1135-1140, 1993.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; ANCHORDOGUY, T.J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*. v. 27, n. 3, p. 219-231, 1990.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R. et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine*. v. 9, n.4, p. 169-176, 2003.

DAVIES, K. J.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*. v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. v. 2, n. 3, p. 278-291, 2003.

DELMAESTRO, R.; McDONALD, W. Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Mechanisms of ageing and development*. v. 41, n. 1, p. 29-38, 1987.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DEKKERS, J.C.; Van DOORNEN, L.J.; KEMPER, H.C. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports medicine*. v. 21, n. 3, p. 213-238, 1996.

DILLARD, C.J.; LITOV, R.E.; SAVIN, W.M. et al. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology*. v. 45, n. 6, p. 927-932, 1978.

ECHLIN, P. Low-temperature microscopy and analysis. *Springer Science & Business Media*, New York, 2013.

ESPINA, V.; MUELLER, C.; EDMISTON, K. et al. Tissue is alive: New technologies are needed to address the problems of protein biomarker pre-analytical variability. *Proteomics. Clinical Applications*. v. 3, n.8, p. 874-882, 2009.

ESPINOSA, A.M.; MERÁS, I.D.; LÓPEZ, F.S. Kinetic behaviour of the malonaldehyde-thiobarbituric acid reaction. kinetic-fluorimetric determination of malonaldehyde in human serum. *Analytica chimica acta*. v. 320, n. 1, p. 125-132, 1996.

ERICSSON, C.; FRANZÉN, B.; NISTÉR, M. Frozen tissue biobanks. Tissue handling, cryopreservation, extraction, and use for proteomic analysis. *Acta Oncologica*. v. 45, n. 6, 643-661, 2006.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*. v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M.S..Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*. v. 567, n. 1, p. 1-61, 2004.

EVANS, M.D.; GRIFFITHS, H.R.; LUNEC, J. Reactive oxygen species and their cytotoxic mechanisms. *Advances in Molecular and Cell Biology*. v. 20, p. 25-73, 1997.

FAHY, G.M.; WOWK, B. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods in Molecular Biology*. v. 1257p. 21-82, 2015.

FATTMAN, C.L.; SCHAEFER, L.M.; OURY, T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 35, n. 3, p. 236–256, 2003.

FERRER, M.D.; TAULER, P.; SUREDA, A. et al..Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *Journal of sports sciences*. v. 27, n. 1, p. 49-58, 2009.

FINAUD J; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Medicine*.v. 36, n. 4, p. 327–358, 2006

FIRUZI, O.; MLADĚNKA, P.; RICCIERI, V. et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. *Journal of clinical laboratory analysis*. v. 20, n. 4, p. 139-148, 2006.

FISHBEIN, W.N.; WINKERT, J.W. Parameters of freezing damage to enzymes. *Advances in Chemistry*. v. 180, p. 55-82, 1979.

FISHBEIN, W.N.; WINKERT, J.W. Parameters of biological freezing damage in simple solutions: catalase. I. The characteristic pattern of intracellular freezing damage exhibited in a membraneless system. *Cryobiology*. v. 14, n. 4, 389, 1977.

FISHBEIN, W.N.; WINKERT, J.W. Parameters of biological freezing damage in simple solutions: Catalase: II. Demonstration of an optimum-recovery cooling-rate curve in a membraneless system. *Cryobiology*. v. 15,n. 2, p. 168-177, 1978.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic medicine*. v. 8, 2009.

FLOHE, L.; GÜNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS letters*. v. 32, n. 1, p. 132-134, 1973.

FORMAN, H.J.; AUGUSTO, O.; BRIGELIUS-FLOHE, R. et al. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 78, p. 233-235, 2015.

FREI, B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *The American journal of clinical nutrition*. v. 54, p. 1113S-1118S, 1991.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*. v. 44, p. 147-159, 1975.

FULLER, A.; CARTER, R.N.; MITCHELL, D. Brain and abdominal temperatures at fatigue in rats exercising in the heat. *Journal of Applied Physiology*. v. 84, n. 3, p. 877-883, 1998.

GAETANI, G.F.; FERRARIS, A.M.; ROLFO, M.; et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, v. 87, n. 4, p. 1595-1599, 1996.

GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G.N.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 53,n. 4, p. 169-180, 1999.

GOMEZ-CABRERA, M.C.; VIÑA, J.; JI, L.L.. Interplay of Oxidants and Antioxidants During Exercise: Implications for Muscle Health. *The physician and sportsmedicine*. v. 37, n. 4, 116-123, 2009.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.L.; TÄLJEDAL, I.B. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *The Biochemical Journal*. v. 199, n. 2, p. 393-398, 1981.

GRUNE , T.; REINHECKEL, T.; DAVIES, K.J. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*.v. 271, n. 26, p. 15504-15509, 1996.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*, v. 9, n. 1, p. 1-32, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*. v.91, n.3C, p.14S-22S, 1991.

HALLIWELL, B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*.v. 61, p. 73-101, 1995.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*. v. 102, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine.*Clarendon Press*, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.*The Biochemical Journal*, v. 219, p. 1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine.4<sup>a</sup> ed.*Oxford University Press*.2007.

HANSFORD, R.G.; HOGUE, B.A.; MILDAZIENE, V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. v. 29, n. 1, p. 89-95, 1997.

HECKER, M.; ULLRICH, V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. v. 264, n. 1, p. 141-150, 1989.

HEHNER, S.P.; BREITKREUTZ, R.; SHUBINSKY, G. et al. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *Journal of Immunology*. v.165, n.8, p.4319-4328, 2000.



HELLSTEN, Y.; AHLBORG, G.; JENSEN-URSTAD, M.; SJÖDIN, B. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*. v. 134, n. 1, 159-160, 1988.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P. *et al.* Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 28, n. 10, p. 1456–1462, 2000.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*. v. 57, n. 1, p. 43-56, 2001.

HERRERO, A.; BARJA, G. ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I-or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. v. 29, n. 3, p. 241-249, 1997.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. *Annual review of biochemistry*. v. 54, n. 1, p. 237-271, 1985.

JAENICKE, R.; HEBER, U.; FRANKS, F. *et al.* Protein structure and function at low temperatures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. v. 326, n. 1237, 535-553, 1990.

JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *International journal of sport nutrition*. v. 3, n. 4, p. 356-375, 1993.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Medicine*. v. 5, p. 156–170, 1988.

JL, L.L. Exercise-induced oxidative stress in the heart. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. p. 689-711, 2000.

JL, L.L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 18, n. 6, p. 1079-1086, 1995.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxidants e redox signaling*, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

JUNG, K.; KÜHLER, S.; KLOTZEK, S. et al. Effect of storage temperature on the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase in rat liver and kidney homogenates. *Enzyme & protein*. v. 47, n. 3, p. 149-155, 1993.

JUNG, T.; HÖHN, A.; GRUNE, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox biology*. v. 2, p. 99-104, 2014.

KAUL, R.; MATTIASSON, B. Improving the shelf life of enzymes by storage under anhydrous apolar solvent. *Biotechnology techniques*. v. 7, n. 8, p. 585-590, 1993.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*. v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F.. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in biochemical sciences*. v. 32, n. 1, p. 44-50, 2007.

KÖNIG, D.; WAGNER, K.H.; ELMADFA, I.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. *Exercise immunology review*. v. 7, p. 108-133, 2001.

KOZYREV, D.; SLUTSKY, V. Handbook of free radicals: formation, types and effects. *Nova Science Publishers*, série: Cell biology research progress, 2010.

KOZLOV, A.V.; SZALAY, L.; UMAR, F. et al. Skeletal muscles, heart, and lung are the main sources of oxygen radicals in old rats. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1740, n. 3, p. 382-389, 2005.

KUMAR, A.; DHILLON, B.S.; RAO, D.N. et al. Temporal trends of malondialdehyde in stored human plasma. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. v. 27, n. 4, p. 405-409, 2012.

LARSEN, S.; WRIGHT-PARADIS, C.; GNAIGER, E. et al. Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function. *CryoLetters*. v. 33, n. 3, p. 169-175, 2012.

LIU, J.; YEO, H.C.; ÖVERVIK-DOUKI, E. et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of Applied Physiology*. v. 89, n. 1, p. 21-28, 2000.

LIU, W.Y.; HE, W.; LI, H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxidative medicine and cellular longevity*. v. 2013, 780719, 2013.

LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*. v. 36, n. 9, p. 1495-1502, 2000.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. v. 233, p. 346-357, 1994.

LUO, S.; WEHR, N.B. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2, 4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*. v. 14, n. 4, p. 159-166, 2009.

MARKLUND, S.L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta*. v. 126, n. 1, p.41-51, 1982.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. v. 47, p. 469-474, 1974.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*. v. 424, n. 1, 83-95, 1999.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutrition Biochemistry*. v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*. v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *The Journal of Biological chemistry*. v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

McINTOSH, L.J., HONG, K.E.; SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain research*. v. 791, n. 1, p. 209-214, 1998.

McINTOSH, L.J.; SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Experimental neurology*. v. 141,n. 2, p. 201-206, 1996.

MEYER, A.; CHARLES, A.L.; ZOLL, J. et al. Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration. *Biochimie*, v. 100, p. 227-233, 2014.

MONTAIN, S.J.; COYLE, E.F. Fluid ingestion during exercise increases skin blood flow independent of increases in blood volume. *Journal of Applied Physiology*. v. 73, n. 3, p. 903-910, 1985.

MORE, N.; DANIEL, R.M.; PETACH, H.H. The effect of low temperatures on enzyme activity. *The Biochemical Journal*. v. 305, n.1,p. 17-20, 1995.

MOREL, F.; DOUSSIERE, J.; VIGNAIS, P. V.The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *The FEBS Journal*. v. 201, n. 3, p. 523-546, 1991.

MUELLER, S.; RIEDEL, H.D.; STREMMEL, W. Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*. v. 90,n. 12, p. 4973-4978, 1997.

MULLER, F.L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*. v. 279, n. 47, p. 49064-49073, 2004.

MURASE, N.; FRANKS, F. Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solutions. *Biophysical chemistry*. v. 34, n. 3, p.293-300, 1989.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with Molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV).*Analytical Biochemistry*. v.49, p.474-478, 1972.

NIE, J.; CLOSE, G.; GEORGE, K.P.; TONG, T.K.;SHI, Q. Temporal association of elevations in serum cardiac troponin T and myocardial oxidative stress after prolonged exercise in rats. *European journal of applied physiology*. v. 110,n. 6, p. 1299-1303, 2010.

NIKOLAIDIS, M.G.; PETRIDOU, A.; MOUGIOS, V. Comparison of the phospholipid and triacylglycerol fatty acid profile of rat serum, skeletal muscle and heart. *Physiological research*, v. 55, n. 3, 259-265, 2006.

NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H.B.; PIANTADOSI, C.A. Extracellular superoxide dismutase. *The international journal of biochemistry & cell biology*. v. 37, n. 12, p. 2466-2471, 2005.

OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; YAMASHITA, H. et al. Alterations of superoxide dismutase isoenzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle. *Mechanisms of ageing and development*, v. 84, n. 1, p. 65-76, 1995.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*. v. 95, p. 351-358, 1979.

OOKAWARA, T., IMAZEKI, N.; MATSUBARA, O. et al. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. v. 275, n. 3, p. C840-C847, 1998.

PARK, J.I.; GRANT, C.M.; DAVIES, M.J.; DAWES, I.W. The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress Generation of free radicals during freezing and thawing. *Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 36, p. 22921-22928, 1998.

PATWELL, D.M.; McARDLE, A.; MORGAN, J.E.; PATRIDGE, T.A.; JACKSON, M.J. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 37, n. 7, p. 1064-1072, 2004.

PEDREANEZ, A.; ARCAYA, J.L.; CARRIZO, E.; MOSQUERA, J. Forced swimming test increases superoxide anion positive cells and angiotensin II positive cells in the cerebrum and cerebellum of the rat. *Brain research bulletin*. v. 71, n. 1, p. 18-22, 2006.

PEREZ, A.C.; CABRAL DE OLIVEIRA, A.C; ESTEVEZ, E.; MOLINA, A. J.; PRIETO, J.G.; ALVAREZ, A.I. Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*. v. 134, n. 2, p. 199-206, 2003.

PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in reproductive medicine*. v. 20, n. 1, p. 5-13, 2002.

PEGG, D.E. Principles of cryopreservation. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*.v. 1257, p. 3-19, 2015.

POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J. *et al.* Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*. v. 266, n. 2, p. R375-R380, 1994.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. v. 88n. 4, p. 1243-1276, 2008.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*. v. 58, n. 4, p. 1025-1033, 1999.

POWERS, S.K.; TALBERT, E.E.; ADIHETTY, P.J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology*. v. 589, n. 9, p. 2129-2138, 2011.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annual Review of Physiology*. v. 48, p. 657- 667, 1986.

QUINDRY, J.C.; STONE, W. L.; KING, J.; BROEDER, C.E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v. 35, n. 7, p. 1139-1145, 2003.

RADÁK, Z.; ASANO, K.; INOUE, M. *et al.* Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. v. 72, n. 3, p. 189-194, 1996.

RADAK, Z.; KUMAGAI, S.; TAYLOR, A.W.; NAITO, H.; GOTO, S. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. v. 32, n. 5, p. 942-946, 2007.

RADAK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, v. 7, p. 90-107, 2001.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 38, n. 12, p. 1543-1552, 2005.

ROSSI, F. The O<sub>2</sub>- forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 853, n. 1, 65-89, 1986.

SAUTIN, Y.Y. ;JOHNSON, R.J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. v. 27, n. 6, p. 608-619, 2008.

SEN, C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology*. v. 79, n. 3, p. 675-686, 1995.

ŞENTÜRK, Ü.K.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; AKTEKİN, M.R.; KIPMEN, D.; YALÇIN, Ö.; BAŞKURT, O.K. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *Journal of Applied Physiology*. v. 91, n. 5, 1999-2004, 2001.

SEWARD, S.W.; SEILER, K.S.; STARNES, J.W. Intrinsic myocardial function and oxidative stress after exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology*. v. 79, p. 251-255, 1995.

SHABIHKHANI, M.; LUCEY, G.M.; WEI, B. et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clinical biochemistry*. v. 47, n. 4, p. 258-266, 2014.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism reviews*. v. 32, p. 307-326, 2000.

SHIKAMA, K.; YAMAZAKI, T. Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature*. v. 190, p. 83-84, 1961.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 27, n. 9, p. 916-921, 1999.

SIES, H. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. *Oxidative stress*. v. , p. 73-90, 1985

SIES, H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation Redox signaling and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 289, n. 13, p.8735-8741, 2014.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. v. 4, p. 180-183, 2015.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress. *Encyclopedia of Stress*, 2<sup>a</sup> ed, p.45-48, 2007.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*.v.62, p.1315S-1321S, 1995.

SIMIC, M.; JOVANOCIV, S. Antioxidant mechanisms of uric acid. *Journal of American Chemical Society*.v. 111, n. 15, 5778-5782, 1989.

SIMON H.U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*.v. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.

SINGH, S.; KUMAR, S. A study on the effect of metabolic heat generation on biological tissue freezing. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 2013.

SIU, G.M.; DRAPER, H.H. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*. v. 17, n. 5, p. 349-355, 1982.

SOMANI, S.M.; ARROYO, C.M. Exercise training generates ascorbate free radical in rat heart. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 39, n. 4, p. 323-329, 1995.

SOMANI, S.M.; FRANK, S.; RYBAK, L.P. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v. 51, n. 4, p. 627-634, 1995.

SOMANI, S.M.; HUSAIN, K. Influence of exercise induced oxidative stress on the central nervous system. *Exercise and oxygen toxicity*. p. 463-479, 1994.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. v. 25, p. 207-218, 2003.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 899.1, p. 191-208, 2000.



STÉPHENNE, X.; NAJIMI, M.; NGOC, D.K.; SMETS, F.; HUE, L.; GUIGAS, B.; SOKAL, E.M. Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1. *Cell transplantation*. v. 16, n. 4, p. 409-419, 2007.

ST-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J.A.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n. 47, p. 44784-44790, 2002.

STRECK, E.L.; CZAPSKI, G.A.; GONÇALVES DA SILVA, C. Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. v. 2013, 2013.

SU, S.C.; GARBERS, S.; RIEPER, T.D.; TONIOLO, P. Temperature variations in upright mechanical freezers. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. v. 5, n. 2, p. 139-140, 1996.

SUREDA, A.; TAULER, P.; AGUILÓ, A. *et al.* Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free radical research*, v. 39, n. 12, p. 1317-1324, 2005.

SZYMONIK-LESIUK, S.; CZECHOWSKA, G.; STRYJECKA-ZIMMER, M.; SŁOMKA, M.; MAĐRO, A.; CELIŃSKI, K.; WIELOSZ, M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. v. 10, n. 4, p. 309-315, 2003.

TOSSIGE-GOMES, R.; COSTA, K.B.; OTTONE, V.O.; MAGALHÃES, F.C.; AMORIM, F.T.; ROCHA-VIEIRA, E. Lymphocyte Redox Imbalance and Reduced Proliferation after a Single Session of High Intensity Interval Exercise. *PloS one*. v. 11, n.4, e0153647, 2016.

TAKAHASHI, M.; SUZUKI, K.; MATOBA, H.; SAKAMOTO, S.; OBARA, S. Effects of different intensities of endurance exercise on oxidative stress and antioxidant capacity. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*. v. 1, n. 1, p. 183-189, 2012.

TAMIYA, T.; OKAHASHI, N.; SAKUMA, R.; AOYAMA, T.; AKAHANE, T.; MATSUMOTO, J.J. Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*. v. 22, n. 5, 446-456, 1985.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSNER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*. v. 266, n. 1, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VEAL, E.A.; DAY, A.M.; MORGAN, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*. v. 26, n. 1, p. 1-14, 2007.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. v. 331, n. 1, p. 63-68, 1996.

VESKOUKIS, A.S.; NIKOLAIDIS, M.G.; KYPAROS, A.; KOURETAS, D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 47, n. 10, 1371-1374, 2009.

VIÑA, J.; GIMENO, A.; SASTRE, J. et al. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB life*. v. 49, n. 6, p. 539-544, 2000.

VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; LLORET, A. et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB life*. v. 50, p. 271-277, 2000.

WANG, W.; NEMA, S.; TEAGARDEN, D. Protein aggregation--Pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceuticals*. v. 390, n. 2, p. 89-99, 2010.

WATANABE, S.; MONIAGA, C.S.; NIELSEN, S.; HARA-CHIKUMA, M. Aquaporin-9 facilitates membrane transport of hydrogen peroxide in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. v. 471, n. 1, p. 191-197, 2016.

WAYNER, D.M.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARCLAY, L.R.C.; LOCKE, S. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping anti-oxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.924, n.3, p.408-419, 1987.

WEBER, D.; DAVIES, M.J.; GRUNE, T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox biology*. v. 5, p. 367-380, 2015.

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*. v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010.

WOOD, Z.A.; SCHRÖDER, E.; HARRIS, J.R.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences*. v. 28, n. 1, p. 32-40, 2003.

WU, M.X.; BIAN, Q.N.; LIU, Y.Z.; FERNANDES, A.F.; TAYLOR, A.; PEREIRA, P.; SHANG, F. Sustained oxidative stress inhibits NF- $\kappa$ B activation partially via inactivating the proteasome. *Free radical Biology and Medicine*. v. 46, n. 1, p. 62-69, 2009.

YOUNG, I.S.; TRIMBLE, E.R. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Annals of clinical biochemistry*. v. 28, n. 5, p. 504-508, 1991.