Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daniel José Matos de Medeiros Lima

Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico

Rio de Janeiro
2014

Daniel José Matos de Medeiros Lima

Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L732 Lima, Daniel José Matos de Medeiros.
Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico / Daniel José Matos de Medeiros Lima. – 2014.
61 f.

Orientador: Cristiane Matsuura.
Coorientadora: Antônio Cláudio Mendes Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Eritrócitos – Teses. 2. Arginina - Teses. 3. Óxido nítrico sintase – Teses. 4. Exercícios físicos - Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Mastsuura, Cristiane. II. Ribeiro, Antônio Cláudio Mendes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.12-008.811.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Daniel José Matos de Medeiros Lima

Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2014.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Walace David Monteiro
Instituto de Educação Física e Desportos - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Cláudia de Mello Meirelles
Escola de Educação Física do Exército

Rio de Janeiro
2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, André e Ana Cláudia por sempre confiarem em minhas escolhas e decisões, as minhas queridas irmãs e a meus amigos que sempre me apoiaram nesse caminho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André Luis e Ana Cláudia, a quem devo minha existência, meus valores e princípios, meus heróis dos quais admiro muito, as minhas irmãs Lais e Mayara, por mesmo longe estarem sempre presentes na minha vida.

A uma pessoa especial que esteve do meu lado a maior parte do tempo, sendo paciente, carinhosa, compreensiva, prestativa e companheira tanto nos momentos de atribulações quanto em momentos afáveis, acompanhando essa jornada de muito trabalho e dedicação. Você me ensinou muitas coisas boas. Obrigado por ter feito parte da minha vida, obrigado por ser quem você foi.

À orientadora Profª. Drª. Cristiane Matsuura, por sempre estar ao meu lado, apoiando e acreditando em mim, depositando sua confiança e acreditando e estimulando meu potencial. Obrigado por toda atenção e dedicação empenhada.

Ao Coorientador Profº. Drº. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Transporte de Membrana, por todas contribuições feitas nesta dissertação. Agradeço sua confiança depositada em meu trabalho.

À Prof.ª Dra Tatiana Marlowe Cunha Brunini por sempre estar disposta a ajudar e sempre atenciosa comigo e com o grupo, do qual tenho orgulho de ter podido trabalhar com ela.

Aos Amigos queridos que sempre estiveram presentes não só nos momentos bons mas nos momentos de dificuldades enfrentados durante essa jornada. Wanda Vianna, sempre sorridente, alto astral, prestativa e paciente comigo, da qual me emprestou seus ouvidos e me ajudou muito durante muitos experimentos, OBRIGADO, sem você esse trabalho seria muito mais difícil.

À amiga Marcela Anjos, da qual admiro muito, apesar do pingo de gente é uma grande mulher com um grande coração, forte, humilde, caridosa e companheira, obrigado por toda ajuda que me dera.

À amiga Iara Karise, pelos conselhos, pelas broncas e pelos ouvidos sempre disposta a ajudar.

À amiga e segunda mãe Marcia Ferraz, pela paciência que tivestes desde o inicio quando cheguei ao laboratório, onde tudo era novidade e sempre foi prestativa e atenciosa. Obrigado por sempre me ouvir e me ajudar nos momentos difíceis.

Aos amigos que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Transporte de Membrana: Monique Oliveira, Daniele Abrantes, Ive Machareth, Prof. Marcos Ferraz. Você são o motivo de tornaram o meus dias mais felizes, mais prazerosos, eu simplesmente amo trabalhar com vocês!

Aos amigos companheiros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais: Graziele de Bem, Cristiane da Costa, Viviane Cordeiro e Prof.ª Angela. Sempre prestativos e pacientes, obrigado por toda ajuda de vocês!

E a todos que participaram de forma direta ou indireta desta caminhada, nessa fase da qual adquiri muita experiência profissional e pessoal.

Força, foco e fé.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

Cora Carolina

RESUMO

LIMA, Daniel José Matos de Medeiros. *Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico.* 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Evidências crescentes têm demonstrado que o exercício prejudica a estrutura da membrana eritrocitária, como consequência do aumento do estresse físico e químico. O óxido nítrico (NO) derivado dos eritrócitos afeta a fluidez da membrana e a sua biodisponibilidade depende do equilíbrio entre a sua síntese e eliminação por espécies reativas de oxigênio. Nós investigamos se o exercício realizado em diferentes intensidades afetaria biodisponibilidade do NO eritrocitário e se levaria a um quadro de estresse oxidativo. Dez homens (26 ± 4 anos, VO_{2pico} 44,1 ± 4,3 $mL.kg^{-1}.min^{-1}$) realizaram um teste cardiopulmonar máximo em esteira e um teste de exercício submáximo a 70% VO_{2pico} durante 30 min. O sangue foi coletado em repouso e imediatamente após os exercícios para isolamento dos eritrócitos. O exercício máximo aumentou a contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, sem levar a qualquer alteração na massa corporal que pudesse sugerir hemoconcentração devido a uma redução do volume plasmático. Observou-se uma diminuição do influxo de L-arginina depois do teste submáximo, mas não no teste máximo. No entanto, a atividade da óxido nítrico sintase, ou seja, a produção de NO, foi aumentada após o teste máximo. Os níveis de GMPc não se alteraram após ambos os teste de exercício. Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, o exercício submáximo reduziu a oxidação proteica e aumentou a atividade da catalase e a expressão da glutationa peroxidase, enquanto que o exercício máximo levou a uma maior peroxidação lipídica e diminuição da atividade da SOD. Nem a atividade glutationa peroxidase ou a expressão NADPH oxidase foram afetadas pelo exercício. Estes resultados sugerem que o exercício induziu alterações no estresse oxidativo de eritrócitos, que parecem estar mais associadas com a intensidade do que a duração do execicio. Além disso, nas intensidades recomendadas para a promoção da saúde, o exercício mostrou ser protetor, aumentando a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes importantes e reduzindo os danos oxidativos.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Eritrócitos. Arginina. Óxido nítrico sintase. Estresse oxidativo. Exercício.

ABSTRACT

LIMA, Daniel José Matos de Medeiros. *Erythrocyte changes induced by physical exercise.* 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Growing evidence has shown that exercise impairs erythrocyte membrane structure as a consequence of increased physical and chemical stress. Erythrocyte-derived nitric oxide (NO) affects membrane fluidity, and its bioavailiability depends on the balance between its synthesis and scavenging by reactive oxygen species. Here, we investigated whether aerobic exercise performed at different intensities would affect erythrocyte NO bioavailability and oxidative stress. Ten men (26 ± 4 years old, VO_{2peak} 44.1 ± 4.3 $mL.kg^{-1}.min^{-1}$) performed a treadmill maximal cardiopulmonary exercise test, and a submaximal exercise at 70% VO_{2peak} during 30 min. Blood was collected at rest and immediately after exercises for erythrocytes isolation. Maximal exercise increased erythrocytes count, haemoglobin and haematocrit levels, without any change in body mass that could suggest haemoconcentration due to a plasma volume reduction. It was observed a decrease in L-arginine influx after moderate, but not maximal exercise. Yet, nitric oxide synthase activity, and thus, NO production, was increased after maximal exercise. Cyclic GMP levels did not change after both exercise bouts. In relation to biomarkers of oxidative stress, moderate exercise reduced protein oxidation, and increased catalase activity and glutathione peroxidise expression; whereas maximal exercise led to greater lipid peroxidation, and diminished SOD activity. Neither glutathione peroxidase activity nor NADPH expression were affected by exercise. These findings suggest that exercise induced changes in erythrocyte oxidative stress are more associated with intensity than duration. Furthermore, at intensities recommended for health promotion, exercise was shown to be protective, increasing the activity and expression of important antioxidant enzymes and reducing oxidative damage.

Keywords: Reactive oxygen species. Red blood cells. Arginine. Nitric oxide synthase. Oxidative stress. Exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A via L-arginina-óxido nítrico em eritrócitos..... 20
Figura 2 - Metabolismo intravascular do NO..... 22
Figura 3 - Vias envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante..... 26
Figura 4 - Ilustração de um teste de fragilidade osmótica..... 34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Exemplo de uma curva de fragilidade osmótica..... 34
Gráfico 2 - Cinética do influxo de L-arginina e atividade da óxido nítrico sintase..... 42
Gráfico 3 - Níveis de expressão eritrocitária de iNOS, eNOS, SOD, CAT, GPx e Nox4..... 44
Gráfico 4 - Fragilidade osmótica dos eritrócitos no estado basal e em ambas as intensidades testadas..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados do teste máximo e submáximo..... 40
Tabela 2 - Dosagem de HPA, EPO, Na e Osm..... 40
Tabela 3 - Eritrograma..... 41
Tabela 4 - Estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Ácidos graxos poli-insaturados
CAT	Catalase
Cav-1	Caveolina-1
deoxiHb	Deoxihemoglobina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EPO	Eritropoietina
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
FCmax	Frequência cardíaca máxima
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPx	Glutationa Peroxidase
GTP	Guanosina trifosfato
HAP	Haptoglobina
Hb	Hemoglobina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K_m	Constante de afinidade de Michaelis-Menten
MDA	Malondialdeído
metHb	Metahemoglobina
NO	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
NOHb	Nitrosilhemoglobina
NOS	Óxido nítrico sintase
$^{\cdot}O_2^-$	Ânion superóxido
$^{\cdot}OH^-$	Radical hidroxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito
oxiHb	Oxihemoglobina

SNOHb	S-nitrosohemoglobina
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE SÍMBOLOS

µm	Micrometro
km	Quilômetros
kg	Kilograma
cm	Centímetro
mL/kg/min	Mililitro/quilo/minuto
VO_{2pico}	Volume de consumo de oxigênio de pico
VO_{2max}	Volume de consumo de oxigênio maximo
UI/mL	Unidade internacional/mililitro
mM	Milimolar
µL	micromolar
nm	nanomolar
°C	grau Celsius
rpm	Rotações por minuto
U/g	Unidade por grama
Km/h	Quilômetros por hora
mEq/L	Miliequivalente por litro
g/dL	Grama por decilitro
mm^3	Milímetros cúbicos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	19
1.1	**Óxido nítrico e sua importância no metabolismo dos eritrócitos**....	19
1.2	**Estresse oxidativo**.....	24
1.3	**Óxido nítrico, exercício e os eritrócitos**.....	27
2.	**OBJETIVOS**.....	30
2.1	**Objetivos gerais**.....	30
2.2	**Objetivos específicos**.....	30
3.	**MÉTODOS**.....	31
3.1	**Sujeitos**.....	31
3.2	**Delineamento experimental**.....	31
3.3	**Teste cardiopulmonar de esforço...**.....	32
3.4	**Sessão de exercício submáximo**.....	32
3.5	**Coleta de sangue e preparo das amostras de eritrócitos**.....	33
3.6	**Fragilidade osmótica**.....	33
3.7	**Transporte de L-arginina em eritrócitos**.....	34
3.8	**Análise da atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos**.....	35
3.9	**Analise da expressão de proteínas em eritrócitos por Western Blot**.....	35
3.10	**Níveis intraeritrocitários de GMPc**.....	36
3.11	**Estresse oxidativo**.....	37
3.11.1	Determinaçao da peroxidaçao lipidica.....	37
3.11.2	Determinação da carbonilação de proteínas.....	37
3.12	**Atividade das enzimas antioxidantes**.....	38
3.12.1	Atividade da enzima superóxido dismutase	38
3.12.2	Atividade da enzima catalase.....	38
3.12.3	Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx).....	38
3.13	**Análise estatística**.....	39
4	**RESULTADOS**.....	40
4.1	**Eritrograma**.....	40

4.2 **Via L-arginina-óxido nítrico-GMPc**..... 41
4.3 **Biomarcadores de estresse oxidativo** 42
4.4 **Fragilidade osmótica**..... 45
5 **DISCUSSÃO**..... 46
CONCLUSÃO..... 49
REFERÊNCIAS..... 50
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido..... 57
APÊNDICE B – Ficha de coleta..... 59
ANEXO A – Comissão de ética..... 60
ANEXO B – Submissão artigo..... 61

INTRODUÇÃO

Os eritrócitos são células bicôncavas e anucleadas, originados na medula óssea e responsáveis pelo transporte de oxigênio entre os pulmões e tecidos corporais, sendo, por esse motivo, essenciais para a prática do exercício físico. Sua importância pode ser clinicamente observada pela utilização de estratégias farmacológicas ou fisiológicas, lícitas ou ilícitas, que resultem em aumento em seu número. Há décadas, atletas de modalidades de resistência são submetidos a treinamento em altitude ou em hipóxia (1), ou fazem uso de eritropoeitina ou transfusão de sangue objetivando um melhor desempenho físico (2). Por outro lado, a sua deficiência resulta em baixa tolerância ao esforço, como observado em indivíduos com anemia (3), o que também reforça a sua importância para o desempenho físico.

No entanto, agudamente, o exercício pode ter consequências deletérias para o próprio eritrócito. Foi demonstrado que o exercício físico pode levar a alterações na estrutura da membrana eritrocitária, podendo comprometer as suas características funcionais e consequente sobrevida. Tais alterações podem ser secundárias a estresses causados pelo exercício, sejam eles de ordem física (na marcha prolongada e corrida) ou química (aumento do estresse oxidativo) (4). Essas alterações conformacionais que o exercício físico promove na estrutura da membrana eritrocitária a tornam mais rígida e com uma capacidade de deformação alterada (5, 6), levando a uma senescência acelerada (4, 5) e comprometendo a perfusão da microvasculatura periférica. Dentro deste contexto, o óxido nítrico (NO) produzido endogenamente pelos eritrócitos é de grande importância, uma vez que é uma molécula fundamental para a manutenção da capacidade de deformação (7-10). Além disso, os eritrócitos são capazes de carrear o NO sintetizado por células adjacentes, como as endoteliais, e o liberar em situações de hipóxia (11, 12), o que permite a dilatação e a perfusão de capilares e consequentemente o fornecimento de oxigênio.

As alterações na estrutura da membrana eritrocitária podem ser, em parte, induzidas pelo estresse oxidativo produzido pelo exercício físico. Sentuk e colaboradores (6) observaram a presença de dano oxidativo em estruturas proteicas e lipídicas nos eritrócitos após um teste de esforço máximo. Sabe-se que o exercício acarreta um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

principalmente nos músculos esqueléticos ativos, decorrentes de um maior fluxo de oxigênio mitocondrial e ativação da enzima pró-oxidante NADPH oxidase localizada no retículo sarcoplasmático, túbulos transversos e sarcolema (13). Os eritrócitos, apesar de não possuírem mitocôndrias, são capazes de produzir EROs pela auto-oxidação da hemoglobina (Hb) e também pela ativação da NADPH oxidase (14). Não se sabe, no entanto, se durante o exercício físico, a produção de EROs pelos eritrócitos está aumentada e, portanto, se o dano oxidativo observado é consequência das EROs endógenas ou exógenas.

Para manter o balanço redox, ou seja, um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua remoção, os eritrócitos são dotados de um sistema enzimático de defesa antioxidante composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), que é a primeira linha de defesa antioxidante, catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) que degradam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Mas a atividade dessas enzimas antioxidantes durante e após o exercício ainda não está bem elucidada, com alguns estudos mostrando aumento (15-17), outros redução (16, 18, 19) e outros nenhuma alteração (17). A diferença entre os achados possivelmente deve-se aos diferentes protocolos experimentais e populações avaliadas, o que dificulta a comparação entre eles.

Diante desses fatos, esse estudo tem o intuito de tentar elucidar as lacunas que compõem as alterações induzidas pelo exercício físico na biodisponibilidade de NO e estresse oxidativo em eritrócitos.

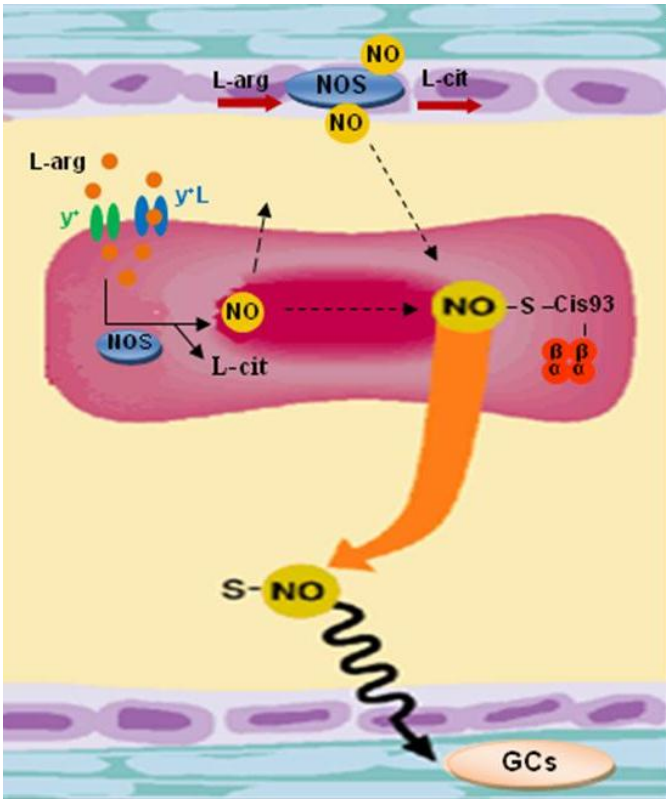
1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Óxido nítrico e sua importância no metabolismo dos eritrócitos

Os eritrócitos são elementos figurados do sangue anucleados de forma bicôncava, produzidos na medula óssea e que são responsáveis pelo carreamento de oxigênio entre os pulmões e tecidos. Para que os eritrócitos sejam capazes de atravessar a microvasculatura, eles devem ser capazes de se deformar, uma vez que o seu diâmetro (cerca de 7 µm) é maior que o diâmetro dos capilares (3 a 4 µm). Para esse fim, o NO parece ter um papel primordial.

O NO é um gás inorgânico, lipofílico que possui uma meia-vida muito curta (2 a 30 segundos), que tem como principal função a sinalização em diferentes tipos celulares. A produção de NO se dá pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina catalisada por uma enzima denominada óxido nitrico sintase (NOS) na presença de oxigênio (O_2) e nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida (NADPH). Essa reação produz quantidade equimolares de L-citrulina e NO (Figura 1). Outros cofatores são necessários para que a síntese de NO ocorra, como flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotideo (FAD) e a tetrahidrobiopterina (BH_4) (20-22). Apesar da existência de L-arginina no meio intracelular, e em concentrações superiores ao K_m da NOS, a ativação desta enzima parece depender do influxo de L-arginina extracelular, no que é chamado de “paradoxo da arginina” (23-25). Em eritrócitos, o transporte de L-arginina é dependente dos transportadores de aminoácidos y^+ e y^+L (Figura 1). Ambos transportam aminoácidos catiônicos de maneira independente da presença de Na^+, e o sistema y^+L é capaz também de transportar aminoácidos neutros na presença deste íon (24).

Figura 1 - A via L-arginina-óxido nítrico nos eritrócitos



Legenda: (L-arg, L-arginina; NOS, óxido nítrico sintase; L-cit, L-citrulina; NO, óxido nítrico; S-NOHb, S-nitrosohemoglobina; GCs, guanilato ciclase solúvel)Adaptado de Gladwin et al. (12).

São descritas três isoformas distintas da NOS. A primeira denominada NOS neuronal (nNOS) ou NOS I, que tem como principal função a produção de óxido nítrico como um neurotransmissor. A segunda isoforma, a NOS induzível (iNOS) ou NOS II, está presente predominantemente em células do sistema imune e participa principalmente em processos imunológicos, gerando grandes quantidades de NO para combater agentes agressores. E, por fim, a NOS endotelial (eNOS) ou NOS III, que está presente principalmente em células do endotélio vascular, produzindo NO que sinaliza para o relaxamento do músculo liso vascular. Essas enzimas são oriundas de genes diferentes, mas apresentam uma estrutura dimérica comum, composta por um domínio redutase e outro oxidase. Ambos os domínios estão ligados por um pequena sequência na qual está localizado o sitio de ligação com a calmodulina (CaM), uma proteína que está associada ao Ca^{++} (26). As isoformas possuem algumas peculiaridades que as diferenciam. A nNOS e eNOS são isoformas constitutivas e são reguladas pelo Ca^{++} intracelular e CaM; já a iNOS não

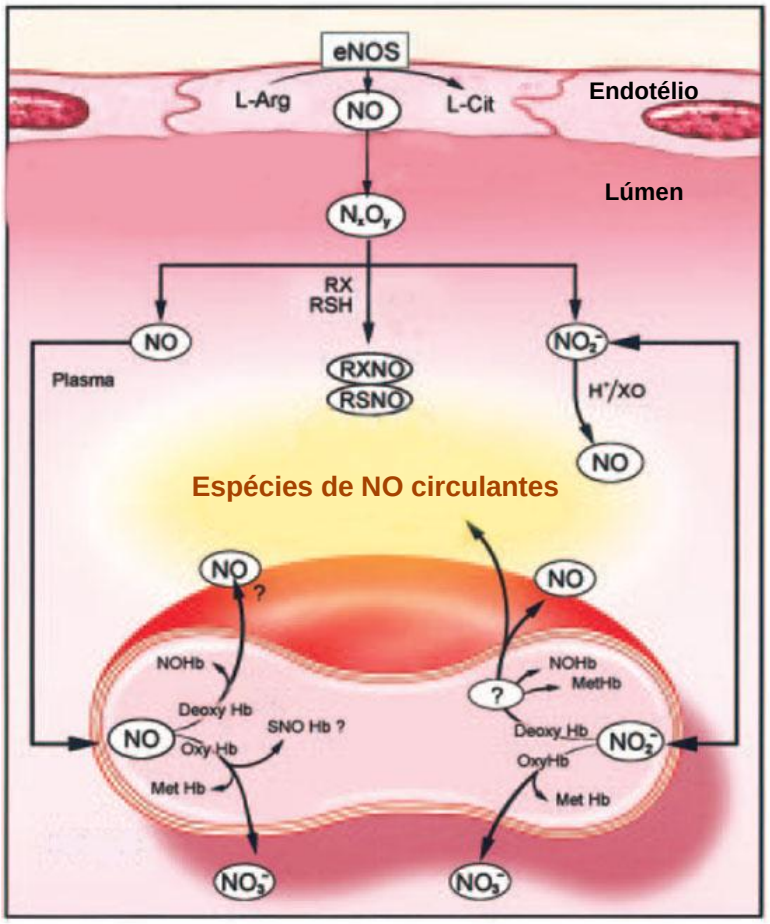
depende de Ca^{++} e CaM, e é induzida por citocinas e endotoxinas, levando a uma produção massiva de NO por um período prolongado(27).

Ao discutir a função do NO no eritrócito, deve ser ressaltado que ele é afetado pelo NO produzido também por células adjacentes. No sistema circulatório, sua produção ocorre em células endoteliais vasculares, células do sistema imune, plaquetas e pelos próprios eritrócitos. O NO derivado das células endoteliais pode difundir-se tanto para o músculo liso vascular, resultando no já bem estabelecido relaxamento, como também para o lúmen vascular. Na circulação, o NO derivado do endotélio pode se difundir para os eritrócitos, onde reage com a deoxihemoglobina (deoxiHb) formando a nitrosilhemoglobina (NOHb), ou com a oxihemoglobina (OxiHb) formando nitrato (NO_3^-) e metehemoglobina (metHb). Admite-se que o NO também reaja com o grupo sulfidrila da cisteína 93 na Hb formando S-nitrosohemoglobina (SNOHb) (12). Em adição, o NO endotelial pode reagir com constituintes plasmáticos formando espécies nitrosiladas (RXNO), incluindo S-nitrosotióis (RSNO) e nitrito (NO_2^-), que são capazes de transportar a bioatividade do NO para longe do seu local de formação (28).

O NO_2^- também tem a capacidade de atravessar a membrana dos eritrócitos, onde está mais concentrado do que no plasma. Nos eritrócitos, o NO_2^- reage com a deoxiHb formando MetHb e NO, que, por sua vez, pode difundir-se para fora do eritrócito diretamente ou por intermédio de metabólitos (28, 29). Há uma grande discussão sobre como ocorre o transporte de NO pelos eritrócitos. Uma hipótese é de que o NO_2^- e SNOHb sejam as principais formas de armazenamento e transporte do NO proveniente do endotélio pelos eritrócitos, preservando a bioatividade e dando-lhe características hormonais parácrinas (28).

Dessa forma, a capacidade de carrear NO e não degradá-lo por parte dos eritrócitos, demonstra sua importância tanto para os forma oxidadas (nitrito e nitrato) quanto nitrosiladas (SNOHb e NOHb) de transporte a armazenamento de NO na circulação. Assim, em regiões de baixa concentração de O_2 o NO é transportado, sendo capaz de se dissociar da SNOHb e do NO_2^- levando à vasodilatação em condições de hipóxia, e que irá garantir o suprimento de oxigênio e metabolitos aos tecidos(12, 28, 29) (Figura 2).

Figura 2 - Metabolismo intravascular do NO



Legenda: L-arg, L-arginina; NOS, óxido nítrico sintase; L-cit, L-citrulina; NO, óxido nítrico; NO_3^-, nitrato; NO_2^-, nitrito; SNOHb, S-nitrosohemoglobina; NOHb, nitrosilhemoglobina; Hb, hemoglobina, RXNO, espécies nitrosiladas; RSNO, S-nitrosotióis; metHb, metehemoglobina). Adaptado de Kim-Shapiro e Schechter (28).

Além dos mecanismos de formação do NO independente de enzimas, Jubelin e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que os eritrócitos possuem duas isoformas da NOS (eNOS e iNOS), como também a CaM, o que sugere que são capazes de sintetizar NO (30). Sua funcionalidade, no entanto, foi posteriormente questionada por alguns pesquisadores (31, 32), como Kang et al. que sugeriram que somente as formas imaturas dos eritrócitos possuem uma NOS ativa (32). Porém, Kleinbongard et al. observaram por microscopia confocal de imunofluorescência, que eritrócitos de seres humanos expressam uma NOS similar à endotelial, e que esta enzima é funcionalmente ativa, localizando-se no citoplasma ou na parte interna da membrana dependendo de seu estado de atividade (7). A NOS eritrocitária parece ser uma importante fonte de NO na circulação e o NO

produzido pode estar envolvido na regulação da função plaquetária e do fluxo sanguíneo (31, 33). Um das principais funções do NO eritrocitário, contudo, é a manutenção de propriedades reológicas dos eritrócitos e de sua capacidade de deformação, em um mecanismo dependente da sinalização por guanosina monofosfato cíclica (GMPc).

Os mecanismos envolvidos na modulação da atividade da NOS eritrocitária ainda não são completamente conhecidos. Uma das hipóteses é que esta isoforma da NOS seja ativada por um aumento no *shear stress* de modo similar a um dos processos de ativação da NOS endotelial (34). Foi demonstrado *in vitro* por microscopia de fluorescência invertida utilizando uma câmara de fluxo retangular, um aumento da ativação da enzima eNOS em eritrócitos dependente do fluxo (35). De acordo com o mecanismo de ativação pelo *shear stress*, a caveolina-1 (Cav-1) se liga a NOS eritrocitária e é transportada através de vesículas do citoplasma para a membrana, onde se localiza nos chamados *lipid rafts.* Após um estímulo, ocorre a fosforilação do resido serina e um influxo de Ca^{++} para o citoplasma. O Ca^{++} se associa à CaM que, por sua vez, se liga à NOS eritrocitária, enfraquecendo a ligação Cav-1-NOS. Assim, a NOS eritrocitária torna-se enzimaticamente ativa e é translocada para o citoplasma. Uma diminuição citoplasmática na concentração de Ca^{++} facilita a ligação da NOS eritrocitária à Cav-1 novamente e, por seguinte a inativação da enzima. Assim, a NOS eritrocitária seria inativada pela Cav-1 da mesma forma que a NOS endotelial (33, 36, 37). Assim, é possível especular que o aumento do fluxo sanguíneo promovido pelo exercício físico possa levar à ativação não somente da eNOS endotelial, como também da eNOS eritrocitária.

Dessa forma, cada vez mais, a geração de NO pelos eritrócitos tem sido considerada de grande importância fisiológica, não só para modulação de seus próprios mecanismos, como também nas plaquetas e no endotélio vascular. Assim, torna-se relevante o entendimento dessa via em diversas condições, sejam elas patológicas ou fisiológicas (7).

1.2 Estresse oxidativo

As células produzem EROs e ERNs de forma contínua como parte dos processos metabólicos. Através de agentes antioxidantes que estão presentes nas células, a concentração desses agentes oxidantes é equilibrada. Mas, se houver um desequilíbrio entre a geração e a remoção destes agentes oxidativos, decorrentes de uma diminuição de antioxidantes endógenos ou um aumento na geração dessas espécies reativas, observa-se um estado denominado estresse oxidativo (38).

Essas espécies reativas podem ser altamente tóxicas e provocar dano tecidual por meio de peroxidação lipídica, modificando as estruturas das proteínas celulares e de DNA, como também estar envolvidas em processos fisiopatológicos como câncer, envelhecimento, inflamação e aterosclerose (39, 40). Por outro lado, esses mesmos agentes podem participar de processos fisiológicos como a geração de eicosanoides, fagocitose e diversas vias de transdução de sinais (40-43)

Durante o processo de redução do oxigênio molecular na matriz mitocondrial até a formação de H_2O, várias EROs são geradas, como: ânion superóxido ($^{\cdot}O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($^{\cdot}OH^-$) (40) e estão presentes em inúmeros sistemas biológicos (41). Mesmo os eritrócitos não possuindo mitocôndrias, as EROs são continuamente produzidas pelos eritrócitos, devido ao seu conteúdo de ferro heme e à alta tensão de O_2 no sangue arterial (44). A principal fonte geradora de EROs nos eritrócitos é uma proteína característica dos eritrócitos, a Hb, que sofre autoxidação para produzir $^{\cdot}O_2^-$. A redução do O_2 é acompanhada pela oxidação da Hb em metHb, se tornando incapaz de se ligar e consequentemente transportar O_2. Além do estresse oxidativo oriundo de EROs produzidas pelos eritrócitos terem um potencial de danificar os mesmos, a produção em massa dessas EROs tem um grande potencial de causar danos em células e componentes adjacentes na circulação (45). Por causa de seu papel fisiológico, os eritrócitos são expostos a um estresse oxidativo constante.

O $^{\cdot}O_2^-$ é o primeiro radical produzido da redução monovalente do O_2 até H_2O_2, sendo formado a partir dele outras EROs. Em condições fisiológicas, ocorre a reação de dismutação com a formação do H_2O_2, mas se produzido em excesso, o $^{\cdot}O_2^-$ é capaz de reagir com o NO, produzindo o peroxinitrito ($ONOO^-$) (41).

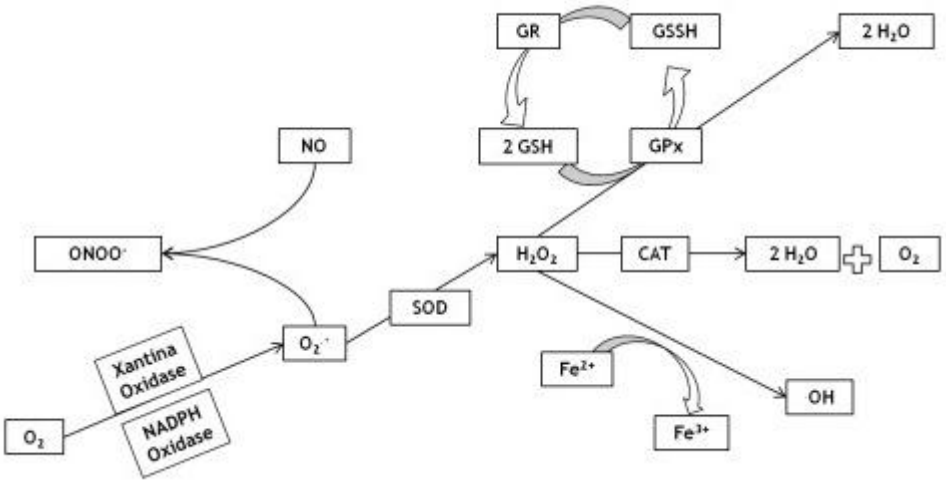
O H_2O_2 apesar de não ser um radical livre, por não conter elétrons desemparelhados, é extremamente deletério, pois na presença de Fe^{++} produz o $^{\cdot}OH$. Essa espécie reativa tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} (41, 46).

O $^{\cdot}OH^{-}$ é considerado o radical mais reativo nos sistemas biológicos, pois gera dano direto no local de formação. A reação extremamente rápida do $OH^{\cdot}$ com metais e outros radicais no sitio de geração, ressalta sua alta reatividade. Além disso, é capaz de levar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGP) das membranas plasmáticas produzindo um fenômeno denominado lipoperoxidação (40).

O NO contém um elétron desemparelhado, assim é considerado um radical livre, que é formado em diversos tecidos biológicos e tem um importante papel como molécula de sinalização, participando de vários processos fisiológicos. Entretanto, se produzido em grandes quantidades, pode gerar uma série de reações de nitrosilação, que levam a alterações nas estruturas proteicas, e consequentemente levando a perda de função destas (47). Contudo, quando há uma produção em excesso de $^{\cdot}O_2^{-}$, ele reage com o NO doando um elétron e formando $ONOO^{-}$ (41), que é um potente agente de oxidação, causando fragmentação de DNA e gerando oxidação de estruturas lipídicas e proteicas (48).

As células são providas de um poderoso sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático), que e capaz de neutralizar a ação das espécies reativas, de forma a evitar sua ação prejudicial (49). As defesas antioxidantes enzimáticas são constituídas pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (50, 51). A primeira linha de defesa antioxidante é formada pela SOD, uma enzima capaz de catalisar a dismutação do $^{\cdot}O_2^{-}$ em H_2O_2, onde posteriormente, é convertido em H_2O e O_2 pela ação da enzima CAT ou pela enzima GSH-Px (40, 52, 53). Outras substâncias com capacidade antioxidante, porém não enzimática, são as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α-tocoferol). A maior parte destes antioxidantes está contida no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural localizado na membrana plasmática (40) (Figura 3).

Figura 3 - Vias envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema antioxidante



Legenda: Glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPx), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSH), catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD), radical hidroxila (OH), peroxinitrito (ONOO), ânion superóxido (O_2.).

A membrana plasmática é constituída de AGP que desempenham um papel estrutural e funcional. Esses ácidos graxos possuem uma natureza flexível, o que resulta em uma maior fluidez da bicamada lipídica, o que é de extrema importância para inúmeras funções celulares. Porem, quando comparados aos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, os AGP são particularmente mais predispostos à peroxidação lipídica, tornando a membrana plasmática mais suscetível a danos em suas estruturas.

A peroxidação lipídica é composta por uma reação em cadeia composta por três fases; iniciação, propagação e terminação, pela ação de ROS, predominantemente sobre os lipídeos que compõem as membranas plasmáticas. Os AGP sofrem ataque de espécies reativas, que absorvem um átomo de hidrogênio a partir do grupo metileno (-CH_2-), formando um radical carbono. Os radicais produzidos nesta reação propagam a cadeia de peroxidação lipídica, onde ocorre uma repetida retirada de átomos de hidrogênio dos AGP para formação de hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando assim à oxidação de muitas moléculas e ácidos graxos (54). A fase de terminação consiste da combinação de dois radicais para formar um produto que não seja um radical.

A fase de terminação também é capaz de resultar da ação antioxidante da vitamina E, que é denominada de “antioxidante de interrupção de cadeia”, que doa um átomo de hidrogênio para os radicais lipídicos e assim interrompendo o processo de propagação e de peroxidação lipídica. A característica antioxidante da vitamina E é fundamental para prevenir a oxidação dos AGP presentes nos tecidos biológicos. Um estudo recente apresentou a hipótese de que o α-tocoferol está situado nos domínios da membrana plasmática, dos quais se encontra a maior parte dos AGP, aumentando assim sua concentração no local onde há maior demanda (39).

O processo de peroxidação resulta em perda de AGP estruturais e funcionais, o que consequentemente diminui a fluidez da membrana plasmática. Essas modificações observadas na membrana levam a distúrbios na permeabilidade, o que altera o fluxo iônico levando a perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, como também modificações na estrutura de DNA, perda da atividade enzimática e de receptores. Em condições extremas, a peroxidação dos lipídios pode acarretar a destruição da integridade da membrana plasmática, como observado a partir da hemólise associada à peroxidação lipídica nas membranas plasmáticas dos eritrócitos (55).

1.3 Oxido Nítrico, Exercício e os Eritrócitos

Apesar de constituir uma intervenção que resulta no aumento da massa eritrocitária cronicamente, o exercício pode ser deletério para o eritrócito agudamente. O exercício, quando realizado com duração prolongada e em atividades que incluam sustentação do peso corporal, pode causar hemólise intravascular por trauma mecânico, a chamada hemólise por “foot strike” (56).

Além do impacto físico, o exercício, seja ele de alta intensidade ou de longa duração, provoca alterações químicas nos locais em atividade. Pode haver aumento da acidez, alterações no equilíbrio iônico e, principalmente, alterações no estado redox. As reações de oxidação e redução são hoje reconhecidas como importantes para o processo de sinalização celular. É esperado que o exercício aumente a produção de EROs particularmente nos tecidos em que haja um aumento na demanda de oxigênio, como o coração e o músculo esquelético. Como ressaltado

anteriormente, há um extenso corpo de evidências (57) demonstrando uma produção aumentada de EROs pelo músculo esquelético devido ao maior fluxo de oxigênio mitocondrial e ativação de NADPH oxidases localizadas no retículo sarcoplasmático, túbulos transversos e sarcolema. É importante ressaltar que a formação de EROs é um processo fisiológico essencial para que as adaptações ao exercício ocorram (57). Como os eritrócitos atravessam os capilares que irrigam o músculo esquelético, os mesmos estão suscetíveis à ação dos EROs. Não se sabe, contudo, se a produção de EROs pelos próprios eritrócitos é alterada durante o exercício.

Os eritrócitos possuem um forte sistema de defesa antioxidante enzimático que usualmente se autorregula em uma tentativa de manter a homeostase eletrônica. Não há um consenso, contudo, sobre as alterações na atividade de enzimas antioxidantes eritrocitárias causadas pelo exercício. Sureda et al. observaram um aumento na atividade da SOD e CAT em ciclistas profissionais após uma prova de 171 km de distância. Já Tauler et al., em um estudo realizado com corredores e ciclistas profissionais e amadores, observaram um aumento da SOD e diminuição da CAT após teste submáximo (90 min em cicloergômetro a 80% $VO_{2máx}$) em amadores, e uma diminuição da atividade da GPx tanto no teste máximo quanto no submáximo realizado com atletas amadores e profissionais (15, 16). Outros estudos ainda observaram uma redução, como Neubauer et al. após uma prova de ironman em 42 atletas; assim como Vesovic et al. após um teste máximo em ciclo ergômetro (18, 19). Já Miyazaki et al. (17) não observaram nenhuma modificação na atividade de SOD, CAT e GPx após um teste máximo em indivíduos destreinados. Como pode-se observar, os resultados são controversos possivelmente devido a grande diversidade de protocolos experimentais e populações estudadas.

Algumas estruturas são mais propensas à oxidação pelas EROs, como as membranas celulares. Os AGP presentes na membrana plasmática, um ambiente rico em O_2, ferro e Hgb, constituem um forte alvo pela presença de duplas ligações entre os átomos de carbono (58). Assim, as EROs iniciam a reação de peroxidação lipídica levando a uma perda da integridade da membrana, o que pode resultar em aumento da permeabilidade e redução da seletividade celular, resultando em morte celular (44). Uma particularidade dos eritrócitos é a inexistência de um mecanismo de reparo eficiente. Assim, uma vez afetada, a célula tende a acelerar o seu processo de senescência e a sua remoção da circulação. Além disso, a alteração da

estrutura da membrana pode torná-la mais rígida, reduzindo a sua capacidade de deformação e perfusão da microvasculatura.

Nesse contexto, cabe ressaltar o papel do NO produzido pelos eritrócitos, que é de grande importância para a manutenção da capacidade de deformação e fluidez da membrana eritrocitária (7-10). Em um estudo realizado por Suhr e colaboradores com homens saudáveis não treinados, que correram a 70% do VO_{2max} por uma hora, foi observado um aumento da fosforilação do resíduo Ser1177 da NOS eritrocitária após o exercício físico, indicando ativação da enzima e aumento da produção de NO (9). Os mecanismos que envolvem a ativação da NOS eritrocitária durante o exercício ainda não são bem compreendidos. A principal hipótese, discutida anteriormente, envolve o aumento do *shear stress* secundário a um maior volume e fluxo sanguíneo pelos vasos, aumentando as tensões mecânicas impostas nos eritrócitos assim ativando mecanismos moleculares que estimulariam a fosforilação da NOS eritrocitária (7, 35).

Até o momento não temos conhecimento de outros estudos realizados sobre a produção de NO pelos eritrócitos durante o exercício físico, bem como sobre a produção de EROs pelo eritrócitos. Considerando a sua importância de ambos para a manutenção de suas propriedades reológicas, consideramos fundamental um melhor entendimento sobre o comportamento dessas biomoléculas durante o exercício.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos do exercício físico sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico e o estresse oxidativo em eritrócitos de homens saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

Comparar os efeitos de duas diferentes intervenções de exercício físico (teste cardiopulmonar de exercício e uma sessão de exercício de intensidade moderada) sobre:

- o eritrograma;
- a via L-arginina-NO-GMPc em eritrócitos;
- a atividade e expressão das enzimas antioxidantes catalase, glutationa peroxidade e superóxido dismutase em eritrócitos;
- o dano oxidativo em lipídios e proteínas em eritrócitos.

3 MÉTODOS

3.1 Sujeitos

A amostra foi constituída por 10 indivíduos jovens aparentemente saudáveis do sexo masculino, sedentários ou praticantes de atividade física recreativa (26 ± 4 anos; 68,5 ± 4,1 kg; 1,76 ± 0,07 m; 9,9 ± 4,5% gordura corporal; VO_{2pico} 44,1 ± 4,3 $mL.kg^{-1}.min^{-1}$). Os sujeitos que praticavam atividade física de forma recreativa tinham uma frequência irregular em torno de uma ou duas vezes por semana. Os sujeitos foram uma seleção por conveniência. A participação no estudo foi voluntária e somente se deu após o consentimento escrito dos participantes e aprovação do Comitê de Ética da instituição (#20047). Os critérios de exclusão considerados foram: lesão osteomioarticular, anemias, utilização de medicamentos e/ou suplementos alimentares que afetem o número e a função dos eritrócitos.

3.2 Delineamento experimental e coleta de sangue

O protocolo experimental consistiu de duas visitas. Na primeira visita, foram realizadas as medidas antropométricas de massa corporal, estatura e dobras cutâneas. A densidade corporal foi de acordo com a equação de três dobras de Jackson e Pollock (59) e o percentual de gordura foi estimado pela equação de Siri (60). Em seguida, os indivíduos foram submetidos a um teste cardiopulmonar de exercício (descrito em 3.3). A segunda visita foi realizada após um intervalo mínimo de uma semana e consistiu de uma sessão submáxima de exercício (descrita em 3.4).

3.3 Teste cardiopulmonar de exercício

Todos os indivíduos eram habituados ao trabalho em esteira rolante. O teste foi realizado em esteira modelo Super ATL® (Inbramed, Porto Alegre, Brasil), utilizando-se um protocolo de rampa individualizado (61). Durante o protocolo, a inclinação da esteira foi mantida em 1% e o teste, programado para ter duração média de dez minutos, oscilando entre oito e 12 minutos (62). Os testes foram conduzidos em temperatura ambiente de 20 a 22ºC e umidade relativa do ar de 50 a 70%, sendo precedidos por um período de 5 minutos de repouso para estabilização das variáveis ventilatórias (63). Para ser considerado máximo, ao menos três dos cinco critérios descritos a seguir tinham que ser atingidos: a) exaustão voluntária máxima; b) frequência cardíaca (FC) ≥ a 90% da FCmax estimada para idade ou ausência de elevação da FC mediante acréscimo de carga ao final do teste; c) presença de um platô no VO_2 (variação inferior a 150 mL O_2) com a evolução das cargas ao final do teste; d) razão de troca respiratória (R) > 1,1; e) equivalente ao valor da escala de Borg ≥ 18, considerando a escala de 0 a 10 (64). No entanto, para fins de análise e determinação da intensidade da sessão subsequente, o consumo de oxigênio de pico (VO_{2pico}) foi considerado. As variáveis ventilatórias foram coletadas continuamente, com frequência de saída a cada 20 segundos, por meio de analisador metabólico ULTIMA CardioO_2® (Medical Graphics Saint Louis, EUA). A FC foi aferida continuamente por monitor Polar RS-800® (Polar, Kempele, Finlândia). O analisador de gases foi previamente calibrado segundo especificações do fabricante.

3.4 Sessão de exercício submáximo

Nesta sessão, os indivíduos correram em uma esteira rolante à velocidade correspondente a 70% do VO_{2pico} obtido no teste cardiopulmonar de exercício durante 30 minutos. A parte principal foi precedida por cinco minutos de aquecimento e sucedida por cinco minutos de volta à calma, ambos realizados à velocidade correspondente a 55% do VO_{2pico}. O calçado utilizado na sessão de

exercício foi o mesmo da sessão destinada ao teste cardiopulmonar de exercício e as condições ambientais foram similares nas duas visitas ao laboratório.

3.5 Coleta de sangue e preparo das amostras de eritrócitos

O sangue foi coletado por venopunção em tubos contendo o anticoagulante heparina (15 UI/mL) para a realização dos experimentos com eritrócitos. A coleta foi realizada em três tempos: 1) repouso; 2) imediatamente após o teste máximo em esteira rolante e 3) imediatamente após o teste submáximo.

Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm para separação dos eritrócitos que, em seguida, foram lavados 3 vezes com uma solução contendo NaCl 0,9%, MOPS (10 mM) e glicose (5 mM) e ressuspendidos para a obtenção de uma suspensão com hematócrito em torno de 45-50% para todos os experimentos, exceto o transporte de L-arginina e a fragilidade osmótica.

3.6 Fragilidade osmótica

Foi determinada pela adição de 10 µL do pellet de eritrócitos em tubos com concentrações crescentes de uma solução com NaCl (pH 7,4; 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,475; 0,5; 0,525; 0,55; 0,6; 0,65; 0,75; 0,9; 1%). As amostras foram gentilmente homogeneizadas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante formado, 200 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura da densidade óptica a 540 nm. A densidade óptica do poço contendo somente água destilada foi considerada como 100% de hemólise e a partir daí foram calculados as porcentagens de hemólise das demais concentrações de NaCl. Após o cálculo, foram plotadas as curvas de fragilidade com os valores de hemólise e suas concentrações de NaCl correspondentes (gráfico 1). Foi utilizado o software de

análise estatística GraphPad Prism 6.0 (Graphpad Inc. CA, EUA) para realizar os cálculos de concentração de NaCl responsável por levar a 50% de hemólise (IC50).

Gráfico 1 **-** Exemplo de uma curva de fragilidade osmótica

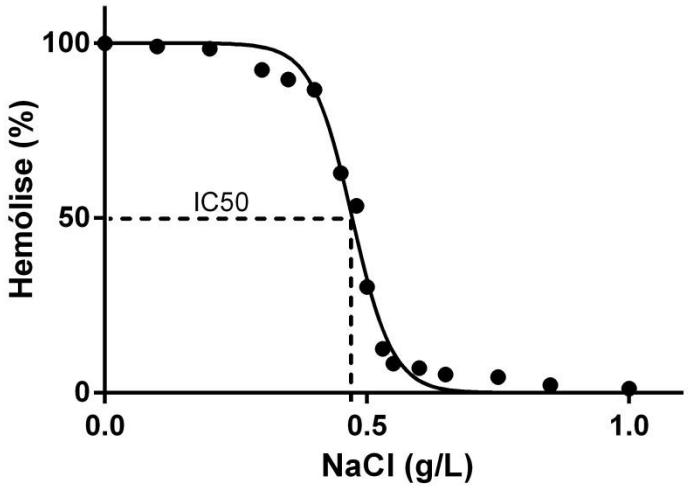
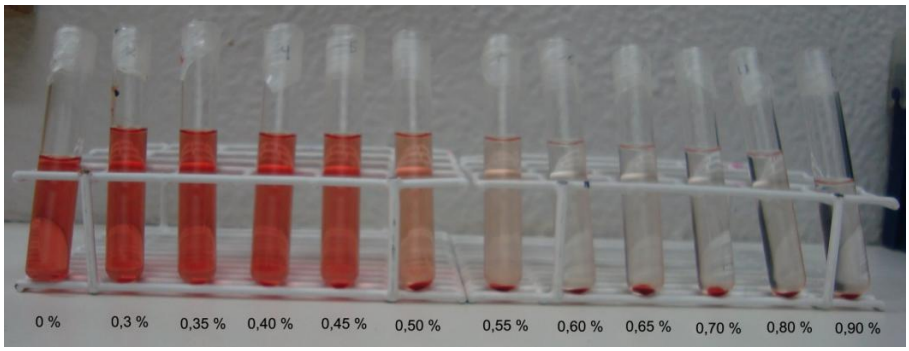


Figura 4 - Ilustração de um teste de fragilidade osmótica



3.7 **Transporte de L-arginina em eritrócitos**

A suspensão de eritrócitos foi incubada por três horas a 37°C para eliminar a transestimulação. Após esta etapa, os eritrócitos foram lavados novamente com solução salina por três vezes e ressuspendidos para se obter um hematócrito de 5-10%. Em seguida, L-arginina tritiada (5-500 µM) foi adicionada em alíquotas da

suspensão, que foram incubadas por 5 minutos a 37°C que então resfriadas rapidamente para que se interrompesse o transporte de L-arginina. Os eritrócitos foram então lavados com $MgCl_2$ e centrifugados. Por fim, foram lisados com Triton X-100 (0,1 %) e as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA 5%). Após centrifugação das alíquotas, o sobrenadante foi transferido para tubos de cintilação e a radioatividade foi contada através da β-cintilação (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

3.8 Análise da atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos

A atividade da óxido nítrico sintase foi quantificada através da conversão de L-[^{3}H]-arginina em L-[^{3}H]-citrulina (protocolo adaptado Martins et al.) (65). A suspensão de RBC foi incubada a 37°C com L-[^{3}H]-arginina (500 µM) por uma hora. As reações foram interrompidas por rápida centrifugação e duas lavagens com $MgCl_2$. Os eritrócitos foram lisados com Triton X-100 e a hemoglobina precipitada com TCA 5%. O lisado foi transferido para uma coluna contendo uma resina catiônica Dowex e o eluato foi coletado em tubos de cintilação. A radiação foi medida pela contagem com líquido de cintilação através do contador de β-cintilação (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

3.9 Análise da expressão de proteínas em eritrócitos por Western Blot

A expressão das proteínas NOS endotelial e induzível, catalase, glutationa peroxidase, superóxido dismutase e NADPH oxidase em eritrócitos foi quantificada pela técnica Western Blotting. A suspensão de eritrócitos foi homogeneizada com tampão de lise. As amostras com 30 µg de proteína foram preparadas em volume igual com tampão NuPAGE SDS e separadas por eletroforese em gel (Gel de Poliacrilamida NuPAGE® Novex Bis-Tris 10% Invitrogen, Califórnia, EUA) e transferidas para membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA).

As membranas foram incubadas com anticorpos primários monoclonais anti-mouse eNOS ou iNOS (1:1000, BD Biosciences, Califórnia, EUA) e policlonais anti-rabbit Catalase, Glutationa Peroxidase, Superóxido Dismutase 1 e NADPH oxidase (Nox4) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), seguindo uma segunda incubação com anticorpo secundário anti-mouse para iNOS e eNOS e anti-rabbit para os demais, conjugado à peroxidase (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). A proteína β-tubulina anti-rabbit (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) foi usada como controle de quantidade de proteína nas amostras de RBC. Utilizamos como padrão de peso molecular o Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Utilizamos o sistema de quimioluminescência aumentada (ECL Primer, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, UK) para detectar as proteínas nas amostras. A detecção do sinal luminescente foi feita através do aparelho *Molecular Imaging ChemiDoc XRS Systems* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) com posterior análise quantitativa das imagens através do programa Image J (ImageJ1.43, National Institutes of Health, EUA). Utilizamos a densidade da β-tubulina para corrigir com as outras proteínas marcadas e os resultados foram expressos como %.

3.10 **Níveis intraeritócitário de GMPc**

Incubamos o concentrado de RBC com 500 μM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). Em seguida, adicionamos ácido perclórico à suspensão de RBC, congelamos as amostras em nitrogênio líquido e lisamos as alíquotas no ultrassom (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. O lisado de RBC foi centrifugado à 14000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C. Os níveis de GMPc foram detectados utilizando o método de ensaio imunoenzimático (Cyclic GMP EIA kit, Cayman Chemical Company, MI, EUA).

3.11 **Estresse oxidativo**

3.11.1 Determinação da peroxidação lipídica

Os danos nas estruturas lipídicas de membrana foram quantificados pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, gerando uma substancia rósea e posteriormente analisada por espectrofotometria. Este experimento em RBC foi uma adaptação da técnica de Draper e colaboradores (66).

Foram adicionados 50 µL da suspensão de eritrócitos em 1000 µL de ácido tricloroacético 10%. As amostras foram sônicadas e centrifugadas a 10000 rpm, 4ºC, por 30 segundos. O sobrenadante foi misturado com ácido tiobarbitúrico a 0,67% e aquecido durante 30 minutos em banho seco a 100°C. Os níveis de TBARS foram determinados através da leitura do subproduto por absorbância a 532 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany), utilizando 1,1,3,3- tetrametoxi propano como padrão e concentração de TBARS foi expressa como nmol/g de hemoglobina.

3.11.2 Determinação da carbonilação de proteínas

A determinação da oxidação de proteínas foi realizada pelo método de Levine (67) que se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas produzindo produtos com o grupo carbonila, que podem ser medidos através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Os grupos carbonila formados são determinados por espectrofotometria com comprimento de onde de 370 nm utilizando um coeficiente 22.000 $Molar^{-1}$ em nmol/mg Hb.

3.12 **Atividade das enzimas antioxidantes**

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase foram realizadas no concentrado de RBC. Os resultados foram expressos por U/g de hemoglobina.

3.12.1 Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi realizada por um ensaio colorimétrico (Cayman Chemical Company, MI, USA) e a leitura foi realizada por espectrofotometria com o comprimento de onda de 440 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

3.12.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A catalase é uma hemeproteína que catalisa a degradação do H_2O_2. Na reação, uma das moléculas do H_2O_2 é oxidada a oxigênio molecular e a outra é reduzida à água (68). Foram utilizados 50 µL do lisado de RBC em cubetas de quartzo, onde foi adicionado 1 mL de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (25 mL de tampão para 40 µL de H_2O_2). A leitura foi feita nos tempos 0, 30 e 60 segundos no comprimento de onda 240 nm (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA).

3.12.3 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)

A enzima glutationa peroxidase oxida a glutationa reduzida (GSH), um tripeptídeo, na redução acoplada de H_2O_2 a H_2O. Utilizamos o reagente de Drabkins para converter a hemoglobina em sua forma estável, cianometahemoglobina de acordo com o protocolo de Paglia e Valentine (69). Adicionamos 200 µL do lisado

preparado de RBC em uma solução (PBS) e incubamos por 10 minutos. Em seguida, adicionamos 200 µL NADPH mais 200 µL de H_2O_2, homogeneizamos e realizamos a leitura por espectrofotometria em 340 nm de comprimento de onda por 5 min com intervalos de 10 segundos (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA).

3.13 **Analise estatística**

Os dados foram apresentados em média ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos nos experimentos de atividade das enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, western blotting e fragilidade osmótica foram testadas pela análise de variância de uma entrada com medidas repetidas, após testar a premissas de normalidade e a esfericidade pelos testes de Shapiro Wilk e Mauchly, respectivamente. Uma exceção foi à comparação entre os resultados obtidos no teste máximo e submáximo de velocidade, FC e massa corporal, que foi feita através do teste-t pareado. O nível de significância foi fixado em 5% e a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., CA, USA).

4 RESULTADOS

Os dados relacionados ao teste de exercício máximo (100%) e submáximo (70% VO_{2pico}) estão representados na tabela 1. O teste máximo durou em torno de 10 minutos o que está de acordo com as recomendações do teste que tem o objetivo de durar em torno de 8 a 12 minutos. O teste submáximo induziu a uma maior perda de massa corpórea do que o teste máximo.

Tabela 1 – Dados do teste máximo (100%) e submáximo (70% VO_{2pico})

	Duração (min)	Velocidade ($km.h^{-1}$)	FC (bpm)	Δ Massa Corporal (%)
70%	30,0 ± 0	10,5 ± 1,1	167,0 ± 13,0	- 1,2 ± 0,6
100%	10,10 ± 2,1*	14,8 ± 1,6*	194,0 ± 2,0*	- 0,5 ± 0,3*

Legenda: FC, frequência cardíaca. * diferente de 70% ($p \leq 0,05$)

O exercício máximo levou a um aumento significativo na concentração sérica de haptoglobina e de eritropoietina (Tabela 2). Nenhuma diferença foi observada nos níveis séricos de sódio nem na osmolaridade, sugerindo que não tenha havido desidratação durante ambas as sessões de exercício.

Tabela 2 – Dosagens de haptoglobina (HAP), eritropoietina (EPO), sódio (Na^+) e osmolaridade (Osm).

	HAP (mg/dL)	EPO (mUI/mL)	Na^+ (mEq/L)	Osm. (mOsm/Kg)
Basal	99,6 ± 17,0	7,3 ± 0,6	139,0 ± 0,5	283,0 ± 1,0
70%	98,8 ± 16,0	7,5 ± 0,5	138,0 ± 1,1	288,0 ± 1,6
100%	105,6 ± 18,8*	8,8 ± 0,9*	141,0 ± 1,4	283,0 ± 2,2

Legenda: Os valores estão expressos em média ± EP. * diferente do basal ($p < 0,05$)

4.1 Eritrograma

O teste cardiopulmonar de exercício máximo levou a um aumento significativo de aproximadamente 7% na contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito. No entanto, não foram observadas alterações significativas após uma sessão submáxima de exercício (tabela 3).

Tabela 3 – Eritrograma

	Basal	70%	100%
RBC (10^6/mm^3)	5,0 ± 0,10	5,10 ± 0,10	5,30 ± 0,10*
Hb (g/dL)	15,20 ± 0,30	15,50 ± 0,40	16,30 ± 0,40*
Ht (%)	44,20 ± 1,10	46,10 ± 1,10	47,50 ± 1,30*
RET (%)	1,06 ± 0,20	0,96 ± 0,17	1,09 ± 0,21
RET (10^3/mm^3)	52,70 ± 13,40	49,0 ± 11,20	55,50 ± 11,70

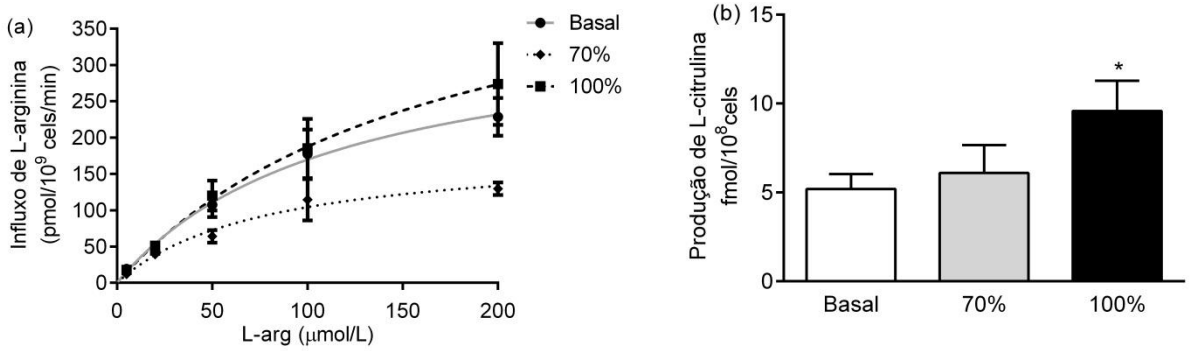
Legenda: RBC, Red Blood Cells (Eritrócitos); Hb, Hemoglobina; Ht, Hematócrito; RET, Reticulócitos. Os valores estão expressos em média ± EP. * diferente do basal ($p \leq 0,05$)

4.2 **Via L-arginina-óxido nítrico-GMPc**

Realizamos uma análise cinética do influxo de L-arginina e uma significante redução no V_{max} (quantidade de L-arginina necessária para saturar o transportador) foi observado após o exercício submáximo (187,5 ± 10,2 µmol.L cel^{-1}.h^{-1}) em relação ao estado basal dos sujeitos (353,2 ± 45,5 µmol.L cel^{-1}.h^{-1}). Não foram observadas alterações significativas no V_{max} após do teste de esforço máximo (417,0 ± 62,8 µmol.L cel^{-1}.h^{-1}) ou no Km (constante de Michaelis-Menten, representa a afinidade do transportador) depois de ambas as intervenções de exercício (Basal: 123,6 ± 21,2; 70%: 87,2 ± 8,2; 100%: 158,3 ± 32,6 mol/L) (Gráfico 2a), o que demonstra uma redução máxima no transporte de L-arginina sem provocar mudanças em sua afinidade após o exercício submáximo.

Apesar de nenhuma mudança ter sido observada no influxo de L-arginina, a atividade da NOS eritrocitária, avaliada pela produção de L-[^{3}H]-citrulina a partir da L-[^{3}H]-arginina, demonstrou-se aumentada após o teste máximo de exercício comparado com o basal, porém a atividade da NOS eritrocitária não foi afetada pelo teste submáximo de exercício (Gráfico 2b). Além disso, não foram observadas diferenças significativas na expressão das isoformas endotelial e induzível da NOS (Gráfico 3a e 3b) e nem nos níveis de GMPc intraeritrocitário após ambos os testes de exercícios, máximo e submáximo (Tabela 4).

Gráfico 2 - (a) Cinética do influxo de L-arginina nos eritrócitos. (b) Atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos



Legenda:* diferente do basal ($p \leq 0,05$).

4.3 Biomarcadores de estresse oxidativo

O teste máximo induziu um aumento na peroxidação lipídica comparado ao basal, avaliado através do teste TBARS, mas o teste submáximo não promoveu tais alterações. Por outro lado, observou-se uma diminuição produção de grupos carbonila após o teste submáximo de exercício, mas o mesmo não foi o observado no teste máximo de exercício (Tabela 4).

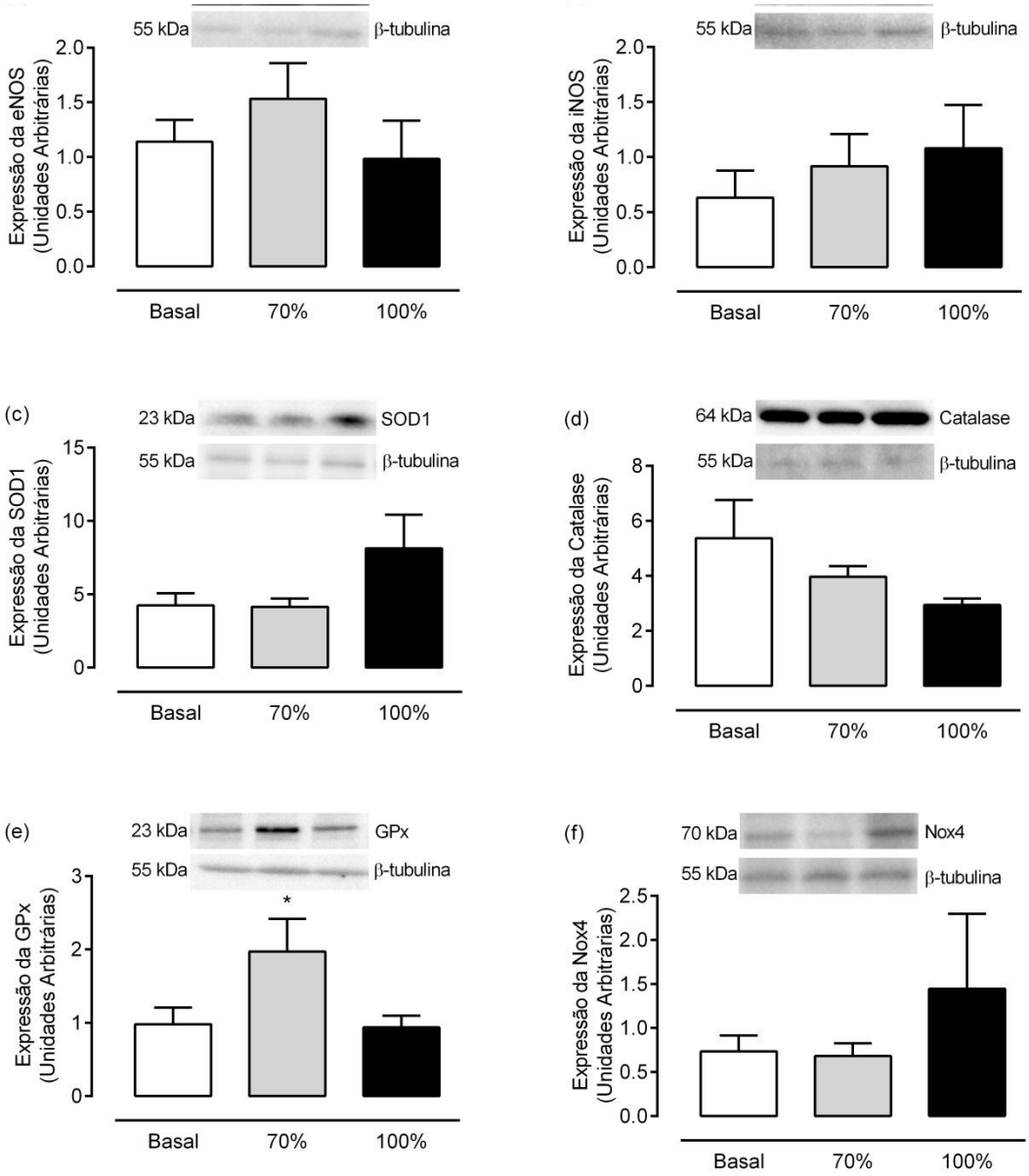
Tabela 4 – Estresse oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes e segundo mensageiro GMPc

	Basal	70%	100%
TBARS (pmol MDA/mg Hb)	3,8 ± 0,2	5,6 ± 0,8	7,8 ± 1,2*
Grupos carbonila (nmol/mg Hb)	7,4 ± 0,6	5,8 ± 0,4*	7,0 ± 0,5
GPx (mmol/min/mg Hb)	1,13 ± 0,03	1,21 ± 0,02	1,16 ± 0,1
CAT (U/mg Hb)	6,9 ± 0,4	8,2 ± 0,3*	7,3 ± 0,4
SOD (U/ml)	241,0 ± 50,1	273,0 ± 41	90,3 ± 28,2*
cGMP (fmol/10^8cells)	14,1 ± 0,4	24,4 ± 6,3	39,5 ± 15,2

Legenda: TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico; GPx, glutationa peroxidase; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; cGMP, guanosina monofosfato cíclica. Valores estão expressos em média ± EP. * diferente do basal ($p \leq 0,05$)

O menor dano oxidativo a proteínas após o teste submáximo de exercício pode ser devido a um aumento na atividade da enzima antioxidante catalase (Tabela 4), bem como a uma maior expressão da expressão da enzima antioxidante GPx (Gráfico 3e), que não foi observado no teste máximo de exercício. Dessa forma, a atividade reduzida da SOD pode ter contribuído para um aumento na peroxidação lipídica desencadeada pelo teste máximo. Nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da GPx (Tabela 4), e na expressão da SOD e da catalase (Gráfico 3c e 3d, respectivamente). A expressão de uma das principais enzimas pró-oxidantes, a NADPH oxidase 4, não sofreu alteração por nenhuma das intensidades testadas de exercício (Gráfico 3f). Talvez o dano oxidativo observado induzido pelo teste de exercício máximo, seja provavelmente por uma maior produção de EROs por células vizinhas e não pelos eritrócitos.

Gráfico 3 - Níveis de expressão proteica eritrocitária



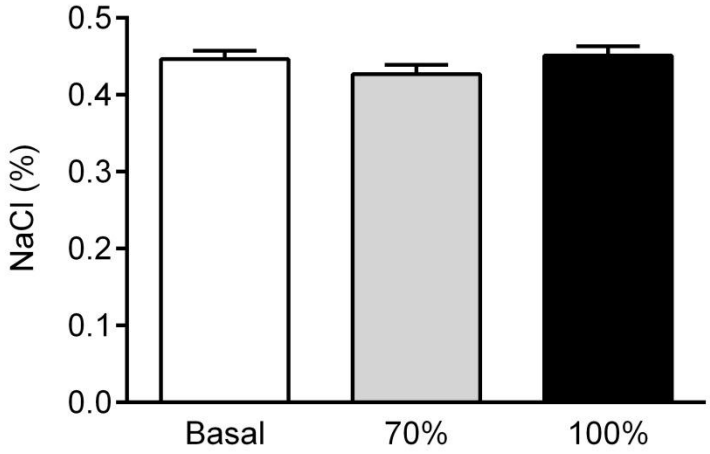
Legenda: (a) NOS endotelial (eNOS), (b) NOS induzível, (c) superóxido dismutase (SOD1), (d) catalase, (e) glutationa peroxidase (GPx) e (f) NADPH oxidase 4 (Nox4)

Nota: * diferente do basal ($p \leq 0,05$).

4.4 Fragilidade osmótica

A hemólise foi expressa em percentual, considerando como 100% a absorbância da água destilada (0% NaCl). A concentração de NaCl que levou a 50% de hemólise foi calculada utilizando o software GraphPad Prism 6 para a identificação das diferenças entre os grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada na fragilidade osmótica nas condições testadas (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Fragilidade osmótica dos eritrócitos no estado basal e em ambas as intensidades testadas



5 DISCUSSÃO

Neste estudo, o objetivo foi investigar se o exercício aeróbio máximo e submáximo seria capaz de promover alterações na biodisponibilidade de NO e levar a um quadro de estresse oxidativo nos eritrócitos de jovens saudáveis. Um dos principais achados deste estudo foi que o exercício submáximo realizado a uma intensidade de 70% do VO_{2pico} parece conferir uma proteção contra os danos oxidativos ocasionados pelo exercício, enquanto o exercício máximo resultou em uma redução na capacidade de eliminação de $^{\cdot}O_2^-$ e em dano oxidativo. É importante ressaltar que em nenhuma das intervenções de exercício testadas houve um aumento na expressão da NADPH oxidase, sugerindo não ter ocorrido um aumento na produção de $^{\cdot}O_2^-$ pelo eritrócito. Assim, é possível que o dano oxidativo tenha sido causado por EROs exógenas. Os eritrócitos são suscetíveis ás EROs produzidas por outras células vizinhas, particularmente as células do músculo esquelético em atividade. Está bem definido que o exercício físico aumenta a produção EROs no musculo esquelético devido (13); 1) ao aumento do fluxo de oxigênio através da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria; e 2) a ativação da NADPH oxidase localizada no retículo sarcoplasmático, túbulos transversos e no sarcolema. Além disso, a redução da atividade da SOD eritrocitária induzida pelo exercício máximo pode ter contribuído parcialmente para um dano oxidativo ás estruturas lipídicas nessa intensidade. Esses resultados podem resultar em uma diminuição da capacidade de deformação do eritrócito secundária ao exercício agudo intenso (70), assim como a oxidação lipídica pode provocar alterações que desestabilizem a bicamada lipídica e o citoesqueleto da membrana dos eritrócitos. Os AGP presentes na membrana plasmática são mais suscetíveis à oxidação devido à presença de duplas ligações entre os átomos de carbono (71).

Uma das consequências da redução da deformação mecânica é uma menor liberação de ATP pelo próprio eritrócito e a consequente diminuição na síntese de NO pelo endotélio.

Além disso, foi demonstrado que os eritrócitos possuem um grande conteúdo de ATP (72), que, quando liberado, estimula o influxo de L-arginina, resultando assim a síntese de NO pelas células endoteliais (73) e consequente relaxamento do músculo liso vascular (74). Os eritrócitos não são capazes de liberar

ATP espontaneamente, mas mediante deformação mecânica (72). Tais hipóteses vão de encontro aos achados de Wan et al, que demonstraram uma retração da rede de espectrina-actina no citoesqueleto do eritrócito levando a uma liberação de ATP, demonstrando um mecanismo sensível a estímulos mecânicos (75). Portanto, a deformação dos eritrócitos demonstra um mecanismo de suma importância para sua passagem através da microcirculação, como também para o controle do calibre vascular.

Ambas as alterações estruturais ou funcionais na membrana eritrocitária podem comprometer a sobrevivência da célula, uma vez que os eritrócitos possuem um mecanismo de reparo muito precário. Dessa forma, qualquer estresse imposto, sejam químico ou físico, podem levar a hemólise, acelerar o processo de senescência ou uma remoção prematura da circulação (76).

O teste máximo, mas não submáximo, de exercício resultou em um aumento na contagem de eritrócitos, no conteúdo de hemoglobina e hematócrito. A explicação mais esperada para tais alterações seria uma hemoconcentração secundária à desidratação. Entretanto, a sessão de exercício durou cerca de dez minutos e a redução de massa corporal, um indicador de desidratação e redução do volume plasmático, foi de apenas 0,5%; enquanto o teste de exercício submáximo com duração de 30 minutos resultou em uma redução de 1% na massa corporal e a um aumento não significativo de apenas 2% nos valores do eritrograma. Além disso, nenhuma modificação foi observada na osmolaridade e nem nos níveis de sódio séricos, que são indicadores do estado de hidratação. Assim, esses valores não parecem ser secundários a uma hemoconcentração por perda de água induzida pelo exercício físico. Não podemos, contudo, descartar a hipótese de ter havido troca de fluidos entre os compartimentos corporais, mas a causa mais provável de aumento na contagem de eritrócitos após o exercício máximo é o aumento na síntese e liberação de eritropoietina pelos rins. Possivelmente, o exercício provoca uma redução transiente no fluxo sanguíneo renal, talvez por uma maior atividade simpática e concentração de catecolaminas, de modo dependente da intensidade.

A principal limitação apresentada pelo estudo foi a ausência de coleta sanguínea na situação de repouso anterior ao teste submáximo. Para minimizar possíveis efeitos da dieta e de efeitos subagudos do exercício, os sujeitos foram orientados a manter o mesmo padrão dietético, a não ingerir nenhum tipo de

suplemento a base de aminoácidos ou antioxidantes ou medicamentos, e a não realizar qualquer tipo de atividade física nas 48 h anteriores às visitas.

Outra hipótese testada neste estudo foi que a redução da fluidez da membrana eritrocitária após o teste de exercício máximo (77), pode ser em consequência a uma diminuição da biodisponibilidade de NO. Com os dados que obtivemos, não é possível suportar esta hipótese, uma vez que não observamos diferença significativa nos níveis de GMPc intraeritrocitário. A diminuição da eficiência dos transportadores de L-arginina induzido pelo teste de exercício submáximo requer mais investigações, mas acreditamos que isso não levaria a qualquer limitação na atividade da NOS eritrocitária, e a produção subsequente de NO, assim como novamente, não houve diferença significativa nos níveis de GMPc entre os grupos e não observamos nenhum aumento no dano oxidativo. Achados divergentes foram recentemente relatados por Suhr e colaboradores (9). Os autores demonstraram que o exercício ocasionou um aumento da fosforilação do resíduo Ser_{1177} da eNOS por meio de ativação da Akt quinase, e também o aumento da produção de NO avaliada por fluorescência com DAB, assim como os níveis de GMPc (9). As conclusões divergentes podem ser devido à maior duração (60 VS 30 minutos) e menor intensidade (70% da velocidade com 4 mmol/L de lactato sanguíneo atingido *vs*. 70% do VO_{2pico}, que estava acima do primeiro limiar ventilatório em nosso estudo) do protocolo de exercício em seu estudo. De fato, a intensidade de exercício parece ser uma variável importante associada com alterações tanto na síntese de NO quanto no estresse oxidativo. Um estudo anterior do mesmo grupo demonstrou que o exercício intenso esteve associado com uma redução da fosforilação do resíduo Ser_{1177} na eNOS, o que sugere um decréscimo na produção de NO (10). Este estudo, entretanto, apresenta grandes limitações, principalmente devido a falta de controle das variáveis independentes, uma vez que o estudo foi conduzido durante um treinamento de campo de hockey.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados que obtivemos demonstram que as alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício máximo levaram a um quadro de estresse oxidativo. Uma vez que os eritrócitos são desprovidos de mecanismos de reparo celular, tais alterações podem induzir uma aceleração da senescência e consequente retirada dessas células da circulação. Por outro lado, o teste submáximo não levou a alterações hemodinâmicas e ainda conferiu uma proteção ao dano oxidativo, uma vez que aumentou a atividade e expressão de importantes enzimas antioxidantes e reduziu a oxidação de proteínas eritrocitárias. Além do mais, em uma intensidade recomendada para promoção da saúde por entidades importantes como American College of Sports Medicine (78) e European Society of Cardiology (79), o exercício se mostrou protetor, aumentando tanto a atividade como a expressão de importantes enzimas antioxidantes e reduzindo o dano oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Fudge BW, Pringle JS, Maxwell NS, Turner G, Ingham SA, Jones AM. Altitude training for elite endurance performance: a 2012 update. Current sports medicine reports. 2012 May-Jun;11(3):148-54.

2. Jelkmann W, Lundby C. Blood doping and its detection. Blood. 2011 Sep 1;118(9):2395-404.

3. Gardner GW, Edgerton VR, Barnard RJ, Bernauer EM. Cardiorespiratory, hematological and physical performance responses of anemic subjects to iron treatment. The American journal of clinical nutrition. 1975 Sep;28(9):982-8.

4. Brovelli A, Castellana MA, Minetti G, Piccinini G, Seppi C, De Renzis MR, et al. Conformational changes and oxidation of membrane proteins in senescent human erythrocytes. Adv Exp Med Biol. 1991;307:59-73.

5. Santos-Silva A, Rebelo MI, Castro EM, Belo L, Guerra A, Rego C, et al. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. Clin Chim Acta. 2001 Apr;306(1-2):119-26.

6. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, et al. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. J Appl Physiol. 2005 Oct;99(4):1434-41.

7. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. Blood. 2006 Apr 1;107(7):2943-51.

8. Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2003 May;284(5):H1577-84.

9. Suhr F, Brenig J, Muller R, Behrens H, Bloch W, Grau M. Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. PloS one. 2012;7(9):e45982.

10. Suhr F, Porten S, Hertrich T, Brixius K, Schmidt A, Platen P, et al. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. Nitric Oxide. 2009 Mar;20(2):95-103.

11. Doyle MP, LePoire DM, Pickering RA. Oxidation of hemoglobin and myoglobin by alkyl nitrites inhibition by oxygen. The Journal of biological chemistry. 1981 Dec 10;256(23):12399-404.

12. Gladwin MT, Lancaster JR, Jr., Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. Nat Med. 2003 May;9(5):496-500.

13. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. Free radical biology & medicine. 2011 Sep 1;51(5):942-50.

14. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clin Chim Acta. 2008 Apr;390(1-2):1-11.

15. Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, et al. Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. Free Radic Res. 2005 Dec;39(12):1317-24.

16. Tauler P, Aguilo A, Guix P, Jimenez F, Villa G, Tur JA, et al. Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. J Sports Sci. 2005 Jan;23(1):5-13.

17. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J Appl Physiol. 2001 Jan-Feb;84(1-2):1-6.

18. Neubauer O, Konig D, Kern N, Nics L, Wagner KH. No indications of persistent oxidative stress in response to an ironman triathlon. Medicine and science in sports and exercise. 2008 Dec;40(12):2119-28.

19. Vesovic D, Borjanovic S, Markovic S, Vidakovic A. Strenuous exercise and action of antioxidant enzymes. La Medicina del lavoro. 2002 Nov-Dec;93(6):540-50.

20. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. British journal of pharmacology. 2006 Jan;147 Suppl 1:S193-201.

21. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. The Journal of nutrition. 2004 Oct;134(10 Suppl):2752S-9S; discussion 65S-67S.

22. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM. L-Arginine transport in disease. Current medicinal chemistry Cardiovascular and hematological agents. 2004 Apr;2(2):123-31.

23. Brunini TM, Yaqoob MM, Novaes Malagris LE, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system y(+)L. Pflugers Archiv : European journal of physiology. 2003 Feb;445(5):547-50.

24. Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. Physiol Rev. 1998 Apr;78(2):487-545.

25. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. Physiol Rev. 2003 Jan;83(1):183-252.

26. Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. The Journal of biological chemistry. 2004 Aug 27;279(35):36167-70.

27. Gross R, Roye M, Manteghetti M, Broca C, Hillaire-Buys D, Masiello P, et al. Mechanisms involved in the effect of nitric oxide synthase inhibition on L-arginine-induced insulin secretion. British journal of pharmacology. 1997 Feb;120(3):495-501.

28. Kim-Shapiro DB, Gladwin MT, Patel RP, Hogg N. The reaction between nitrite and hemoglobin: the role of nitrite in hemoglobin-mediated hypoxic vasodilation. J Inorg Biochem. 2005 Jan;99(1):237-46.

29. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, et al. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. Blood. 2005 Jul 15;106(2):734-9.

30. Jubelin BC, Gierman JL. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. American journal of hypertension. 1996 Dec;9(12 Pt 1):1214-9.

31. Chen LY, Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. J Cardiovasc Pharmacol. 1998 Jul;32(1):57-61.

32. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. The Journal of laboratory and clinical medicine. 2000 Jun;135(6):444-51.

33. Ozuyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. Trends Mol Med. 2008 Jul;14(7):314-22.

34. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. Acta physiologica Scandinavica. 2000 Jan;168(1):81-8.

35. Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, et al. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. Nitric Oxide. 2011 May 31;24(4):184-91.

36. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Renal Physiol. 2001 Feb;280(2):F193-206.

37. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. The Journal of biological chemistry. 1997 Oct 10;272(41):25437-40.

38. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? Hypertension. 2004 Sep;44(3):248-52.

39. Catala A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "Fluid Mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model". Biochimie. 2012 Jan;94(1):101-9.

40. Ferreira AL, Matsubara LS. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. Rev Assoc Med Bras. 1997 Jan-Mar;43(1):61-8.

41. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol. 2004 Oct;122(4):339-52.

42. Zafari AM, Wenger NK. Secondary prevention of coronary heart disease. Arch Phys Med Rehabil. 1998 Aug;79(8):1006-17.

43. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm. 1994 Sep;NS34(9):26-35.

44. Baynes JW, Dominiczak MH. Medical biochemistry: Elsevier mosby Philadelphia:; 2005.

45. Johnson RM, Goyette G, Jr., Ravindranath Y, Ho YS. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H2O2 levels in erythrocytes. Free radical biology & medicine. 2005 Dec 1;39(11):1407-17.

46. Fridovich I. Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. The Journal of biological chemistry. 1997 Jul 25;272(30):18515-7.

47. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007;39(1):44-84.

48. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Jul;20(7):1716-23.

49. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. Heart. 2007 Aug;93(8):903-7.

50. Nakamura YK, Omaye ST. Alpha-tocopherol modulates human umbilical vein endothelial cell expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation. Nutrition research. 2008 Oct;28(10):671-80.

51. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biological chemistry. 2009 Mar;390(3):191-214.

52. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. Mol Aspects Med. 2005 Feb-Apr;26(1-2):3-31.

53. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. Aust Dent J. 2010 Mar;55(1):70-8.

54. Jialal I, Grundy SM. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences. 1992 Sep 30;669:237-47; discussion 47-8.

55. Jones PJH, Kubow S. Lipídios, esteróis e seus metabólitos. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 1. 9 ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 71-101.

56. Janakiraman K, Shenoy S, Sandhu JS. Intravascular haemolysis during prolonged running on asphalt and natural grass in long and middle distance runners. J Sports Sci. 2011 Sep;29(12):1287-92.

57. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. Comprehensive Physiology. 2011 Apr;1(2):941-69.

58. Claster S, Chiu DT, Quintanilha A, Lubin B. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. Blood. 1984 Nov;64(5):1079-84.

59. Jackson A, Pollock M. Generalized equations for predicting body density of men. 1978. The British journal of nutrition. 2004;91(1):161.

60. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. Techniques for measuring body composition. 1961;61:223-44.

61. da Silva SC, Monteiro WD, Cunha FA, Myers J, Farinatti PT. Determination of Best Criteria to Determine Final and Initial Speeds within Ramp Exercise Testing Protocols. Pulmonary medicine. 2012;2012:542402.

62. Buchfuhrer MJ, Hansen JE, Robinson TE, Sue DY, Wasserman K, Whipp BJ. Optimizing the exercise protocol for cardiopulmonary assessment. Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology. 1983 Nov;55(5):1558-64.

63. American Thoracic S, American College of Chest P. ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing. American journal of respiratory and critical care medicine. 2003 Jan 15;167(2):211-77.

64. Howley ET, Bassett DR, Jr., Welch HG. Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. Medicine and science in sports and exercise. 1995 Sep;27(9):1292-301.

65. Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB, Brunini TC, Mendes-Ribeiro AC. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice. Archives of biochemistry and biophysics. 2010 Jul;499(1-2):56-61.

66. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free radical biology & medicine. 1993 Oct;15(4):353-63.

67. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in enzymology. 1990;186:464-78.

68. Aebi H. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 1984;105:121-6.

69. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1967 Jul;70(1):158-69.

70. Szygula Z. Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training. Sports Med. 1990 Sep;10(3):181-97.

71. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. The American journal of clinical nutrition. 1993 May;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S.

72. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. The American journal of physiology. 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2717-22.

73. Bogle RG, Coade SB, Moncada S, Pearson JD, Mann GE. Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. Biochemical and biophysical research communications. 1991 Oct 31;180(2):926-32.

74. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

75. Wan J, Ristenpart WD, Stone HA. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Oct 28;105(43):16432-7.

76. Brzeszczynska J, Pieniazek A, Gwozdzinski L, Gwozdzinski K, Jegier A. Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise. Appl Physiol Nutr Metab. 2008 Dec;33(6):1223-31.

77. Berzosa C, Gomez-Trullen EM, Piedrafita E, Cebrian I, Martinez-Ballarin E, Miana-Mena FJ, et al. Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. Eur J Appl Physiol. Jun;111(6):1127-33.

78. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and

neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. Medicine and science in sports and exercise. 2011 Jul;43(7):1334-59.

79. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012) : the fifth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). International journal of behavioral medicine. 2012 Dec;19(4):403-88.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Identificação do projeto de pesquisa

Título do projeto: Alterações Eritrocitárias Induzidas pelo Exercício Físico

Pesquisadores participantes: Prof. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, Prof. Cristiane Matsuura e Daniel José Matos de Medeiros Lima (aluno de mestrado)

Instituição onde será realizado: Laboratório de Transporte de Membrana, Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, UERJ

O senhor está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima identificado. O texto abaixo contém todas as informações sobre o mesmo.

Natureza da pesquisa. O estudo tem como finalidade verificar as alterações que o exercício físico pode provocar nos eritrócitos, que são células presentes no sangue responsáveis pelo transporte de oxigênio.

Envolvimento na pesquisa. A sua participação no estudo envolverá dois encontros com os pesquisadores para realização do protocolo experimental descrito a seguir. O senhor tem liberdade de se recusar a participar ou de retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade ou prejuízo. Sempre que quiser, poderá pedir informações adicionais sobre a pesquisa diretamente à pesquisadora ou ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Protocolo experimental. Os procedimentos que realizaremos irão ocorrer em dois dias diferentes, de acordo com a sua disponibilidade.

Dia 1. Será realizada uma coleta de sangue após 12 h de jejum para exames laboratoriais de rotina, seguida por medida da sua massa corporal, estatura e dobras cutâneas. Duração aproximada: 30 minutos.

Dia 2. Realização de um teste cardiopulmonar de exercício. Neste teste, o senhor terá que correr em uma esteira rolante com aumento contínuo da velocidade até a sua exaustão. Durante o teste, os seus batimentos cardíacos serão monitorados por eletrocardiografia e a sua respiração e os gases expirados serão analisados por um analisador metabólico de gases. Neste dia, haverá duas coletas de sangue, uma em repouso, antes do início do exercício; e outra imediatamente após o exercício. Duração aproximada: 60 minutos.

Riscos e desconfortos. Todos os procedimentos serão realizados sob supervisão médica em ambiente com controle de temperatura e com todos os equipamentos e materiais necessários para qualquer tipo de intercorrência. O teste em esteira envolve um risco muito baixo (< 1 para cada 10.000 testes) de eventos adversos (ortopédicos e cardiovasculares). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Confidencialidade. Todas as informações coletadas neste estudo serão confidenciais; porém, poderão ser utilizadas para fins educacionais e/ou de pesquisa sem que seu nome seja identificado.

Informações adicionais

1. Para o teste mencionado, você não deverá realizar qualquer exercício físico nas 24 h anteriores ao mesmo, estando liberado em seguida para suas atividades rotineiras.

2. Todos os procedimentos são inteiramente gratuitos e não exigirão vínculo da sua participação até o término das visitas, não prevendo também qualquer tipo de remuneração ou recompensa pela sua participação no estudo.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 201_.

_____	_____
Nome do Participante	Nome do Pesquisador
_____	_____
Assinatura do Participante	Assinatura do Pesquisador

Pesquisador responsável: Prof. Cristiane Matsuura
Endereço: Blvd. 28 de setembro, 87, fundos, 5º andar, sala 1, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20551-030
Telefone: (21) 2868-8021; Celular (21) 9855-5278
E-mail: crismatsuura@yahoo.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto
Endereço: Blvd. 28 de setembro, 77, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ - Cep 20551-030
Telefone: (21) 2868-8253; Fax: (21) 2264-0853
E-mail: cep-hupe@uerj.br

APÊNDICE B - Ficha de coleta de dados

Projeto 'Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico'

Nome: _____ Data: _____ ID:_____

Tel.: _____ E-mail:_____ Nasc: _____

Pratica atividade física: ☐ SIM ☐ NÃO

Breve descrição treinamento (tipo, frequência semanal, duração, volume)

Dados antropométricos

MC (kg)	Estatura (m)	Peitoral (mm)	Abdômen (mm)	Coxa (mm)	% G

TCPE

Repouso

PA: _____ FC: _____

Pico

VO_2	FC	RER	Velocidade	Duração

ANEXO A - Comissão de ética

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro

PROJETO DE PESQUISA

Título: Alterações eritrocitárias induzidas pelo exercício físico

Pesquisador: Cristiane Matsuura **Versão:** 1

Instituição: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ **CAAE:** 02521212.3.0000.5259

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer:20047

Data da Relatoria:09/05/2012

Apresentação do Projeto:

OK

Objetivo da Pesquisa:

Claro

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhuma

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nenhuma

Recomendações:

Deixar claro que o paciente não terá nenhum custo

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 10 de Maio de 2012

Assinado por:
WILLE OIGMAN

ANEXO B - Submissão artigo

Outlook - danieljmmlima | danieljmmlima - Yahoo! | metahemoglobina - Pesq | Clinical Science my submi

sirius.portlandpress.com/submit/cs/mysubmissions.aspx

Aplicativos Para acessar rapidamente, coloque os seus favoritos aqui na barra de favoritos. Importar favoritos agora...

Sirius CLINICALSCIENCE

Home | Guidance for Authors | Journal website | My correspondence | My submissions | New submission | Profile | Log out | Feedback | Help

My recent submissions

Submission home

The table below lists your electronic submissions currently on file, along with their status.

If you need to check a converted PDF, please use the "Review" link provided.

If you want to continue an incomplete submission, please use the "Continue" link provided.

Note: only electronic submissions are listed here. Old submissions may have been archived and removed from the list.

Date submitted	MS no. (Ver no.)	Title	Status
04 Jan 2014	CS2014/0017 (1)*	Erythrocyte nitric oxide availability and... + Show correspondence	In review
28 Sep 2012	CS2012/0530 (1)*	CHRONIC EXERCISE LEADS TO ANTIAGGREGANT,... + Show correspondence	Declined outright

« ‹ › » Page 1 of 1

* Denotes that you were the submitting author
Numbers in brackets indicate the version number of manuscript submitted, (1) = first version (2) = revised version etc.

Submission status help (You must allow pop-ups for this site on your browser)
Note: you must have Adobe Acrobat Reader installed to view PDF files. If you do not have it installed, you can download it for free from Adobe

Get ADOBE® READER®