

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DE *Paullinia cupana* (Mart.) NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDO PELO NITROPRUSSIATO DE
SÓDIO EM CELÚLAS DE FIBROBLASTOS
EMBRIONÁRIOS NIH-3T3**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEONARDO DA SILVA BITTENCOURT

Santa Maria, RS, Brasil 2011

**EFEITO DE *Paullinia cupana* (Mart.) NO ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO EM CELÚLAS DE
FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS NIH-3T3**

Por

Leonardo da Silva Bittencourt

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof. Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil 2011.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado:

**EFEITO DE *Paullinia cupana* (Mart.) NO ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO EM CELÚLAS DE
FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS NIH-3T3**

elaborada por
Leonardo da Silva Bittencourt

**como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Comissão Examinadora:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Dr^a – UFSM

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr^a – UFSM

Santa Maria, 25 de abril de 2011

AGRADECIMENTOS

A professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz por esses vários anos de orientação, desde a iniciação científica quando a conheci, minha mãe científica. Agradeço a ela não só pelo aprendizado científico, mas pelo aprendizado ímpar no âmbito das relações humanas e trabalho em equipe. Obrigado pela oportunidade e confiança; não é fácil descrever o sentimento de gratidão e admiração em poucas palavras.

A Thaís, Greice, Maria Fernanda, Mara Rejane, Michel Mansur e a Profa. Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha pelas conversas científicas e não científicas. Com certeza todas serviram como orientação de trabalho ou vida. Também pela confiança, alegria e ensinamentos que levarei para vida toda.

A todo laboratório de Biogenômica, um ambiente de trabalho peculiar e divertidíssimo, palco de todos os acontecimentos.

Ao Instituto de Pesquisas Biomédicas, especialmente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular ambiente de trabalho peculiar e também divertidíssimo, onde foi possível realizar toda a fase experimental de cultura de células e parte das análises que foram pivotais neste trabalho.

A Professora Denise Cantarelli Machado por abrir as portas do seu laboratório e por me receber tão bem. Pela sua competência e disposição no desenvolvimento dos protocolos *in vitro* com a linhagem embrionária NIH 3T3, seus muitos ensinamentos, diversas correções no inglês dos trabalhos que foram para os congressos, pelas conversas divertidas nos *happy hours* do laboratório.

Aos colegas Daniel Marinowic pelos ensinamentos e discussões científicas que certamente enriqueceram o trabalho, Adilson Batista e Ricardo Zalewsky pela ajuda na execução das técnicas e pelas conversas também divertidíssimas. Enfim, a todos os colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular.

A Simone Salamoni pelos conselhos e discussões saborosas sobre estresse oxidativo e neurotransmissão glutamatérgica na hora do almoço.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me acolherem permitindo que eu realizasse grande parte das disciplinas junto ao seu grupo e aos professores pelos ensinamentos que me foram de uma valia inestimável.

Agradeço ao Prof.Dr. Euler Esteves Ribeiro da Universidade Aberta da Terceira Idade da Universidade do Estado do Amazonas pelo apoio e obtenção das amostras de guaraná junto a Embrapa Ocidental de Maués-AM.

Agradeço a Prof^a. Margareth Linde Athayde e ao Prof. Dr. Michel Mansur Machado pelas análises cromatográficas das amostras do guaraná utilizado neste estudo.

Ao meu pai e minha mãe por serem meu ponto de referência, pelo seu amor e carinho incondicionais; pelo apoio e pela proteção. Por tornar a nossa casa o melhor lugar do mundo, um refúgio dos problemas e tristezas e felicidades.

Eu amo vocês demais.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brasil)

EFEITO DE *Paullinia cupana* (Mart.) NO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO EM CELÚLAS DE FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS NIH-3T3

AUTOR: Leonardo da Silva Bittencourt

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 25 de abril de 2011

Os efeitos antioxidantes do extrato hidro-alcoólico de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) sobre o Óxido Nítrico (NO•) e outros compostos gerados a partir da decomposição do Nitroprussiato de Sódio (NPS) em cultura de fibroblastos embrionários (NIH 3T3) foram avaliados. Os compostos bioativos do guaraná foram inicialmente determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC): cafeína=12,240 mg/g, teobromina=6,733 mg/g e catequinas totais=4,336 mg/g. Para os experimentos as células foram inicialmente cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e incubadas em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37°C até chegar a uma confluência de 90%. As culturas de células foram expostas ao NPS na concentração de 10µM durante seis horas. Nesta concentração de NPS e tempo de exposição ocorre uma taxa de mortalidade celular >90%. O guaraná diluído em água foi adicionado em cinco diferentes concentrações (0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/mL). Os ensaios de viabilidade MTT e azul de tripan, de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e genotoxicidade (ensaio cometa) foram realizados. Adicionalmente, o estresse oxidativo celular foi avaliado através do ensaio da fluorescência do diacetato de 2,7 diclorofluoresceína (DCFDA) via microscopia confocal. O guaraná reverteu à toxicidade induzida pelo NPS principalmente em concentrações mais baixas (<5mg/mL), diminuindo a: mortalidade celular, peroxidação lipídica, dano de DNA e produção de espécies reativas a aumentou os níveis da enzima Super Óxido Dismutase (SOD). Entretanto, o guaraná não conseguiu reverter a inibição da catalase provavelmente desencadeada pela presença de cianeto que também são produzidos na decomposição do NPS. Os resultados sugerem que o guaraná tem efeitos na modulação das quantidades excessivas de NO• provavelmente através de suas propriedades antioxidantes. Estes resultados confirmaram estudos prévios que sugerem que o guaraná tem efeito protetor contra morbidades como obesidade e síndrome metabólica que são relacionadas ao metabolismo.

Palavras chave: *Paullinia cupana*, Óxido Nítrico, neutralizador de radicais livres, radicais livres

ABSTRACT

Master Dissertation

Post Graduate Course on Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Federal University of Santa Maria (RS, Brazil)

***Paullinia cupana* (Mart.) EFFECT ON OXIDATIVE STRESS SODIUM NITROPRUSSIDE INDUCED IN EMBRYONIC FIBROBLAST NIH-3T3 CELLS**

AUTHOR: Leonardo da Silva Bittencourt

ADVISER: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, april 25, 2011.

The antioxidant effects of the hydro-alcoholic guaraná extracts (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart.) on nitric oxide (NO•) and other compounds generated from degradation of Sodium Nitroprusside (SNP) in embryonic fibroblast culture (NIH-3T3 cells) were evaluated. The guaraná bioactive compounds were initially determined by a high-performance liquid chromatography (HPLC): caffeine=12.240 mg/g, theobromine=6.733 mg/g and total catechins= 4.336 mg/g. To the experiments, initially the cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 37°C until reach 90% confluence. Cell cultures were exposed to 10µM SNP during six hours since in this concentration the cells present >90% mortality. Guaraná diluted in water was added in the cultures in five concentrations (0.5, 1, 5, 10 and 20 mg/mL). MTT and Trypan blue viability, biochemical oxidative markers and genotoxicity (DNA Comet assay) analysis were performed. Additionally, the cell oxidative stress was evaluated by 2,7 dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescence assay by confocal microscopy. Guaraná reverted the SNP toxicity mainly in lower concentrations (<5 mg) decreasing cell mortality, lipid peroxidation, DNA damage and cell oxidative stress and increasing the SOD levels. However, guarana was unable to reverse the inhibition of catalase probably triggered by the presence of cyanide which is also produced in the decomposition of SNP. The results suggest that guarana has effects on the modulation of excessive amounts of NO• probably through its antioxidant properties. These results supported previous studies that suggest guarana have a protective effect against morbidity as obesity and metabolic syndrome that are related to metabolism.

Key Words: *Paullinia cupana*, Nitric Oxide, free radical scavengers, free radicals

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Biogenômica do Desenvolvimento e Envelhecimento localizado no Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde associado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria e nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Molecular localizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A redação desta dissertação fundamentou-se nas recomendações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica desta Universidade.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| ABSTRACT | 7 |
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 15 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 3.1 Conceito de radicais livres e espécies reativas | 16 |
| 3.2 Origem e produção de radicais livres e espécies reativas | 19 |
| 3.2.1 Espécies reativas de oxigênio | 20 |
| 3.2.2 Espécies reativas de nitrogênio | 23 |
| 3.3 Sistema de defesa antioxidante | 29 |
| 3.3.1 Sistema de defesa antioxidante endógeno enzimático | 31 |
| 3.3.2 Sistema de defesa antioxidante endógeno não-enzimático..... | 33 |
| 3.4 Estresse oxidativo e os seus efeitos biológicos | 33 |
| 3.4.1 Peroxidação lipídica..... | 35 |
| 3.4.2 Dano ao DNA (genotoxicidade) | 38 |
| 3.4.3 Carbonilação de proteínas e oxidação de carboidratos | 40 |
| 3.5 Cultura de células como modelo experimental | 42 |
| 3.6 Células-tronco na medicina regenerativa: o uso da linhagem embrionária de fibroblastos de camundongo Swiss NIH 3T3 como modelo experimental | 43 |
| 3.7 Paullinia cupana (Guaraná) Mat. Sapindaceae | 47 |
| 3.8 O guarana como potencial modulador dos efeitos oxidativos gerados pela exposição ao nitroprussiato de sódio | 49 |
| 4 RESULTADOS | 51 |
| 5. DISCUSSÃO | 87 |
| 6 CONCLUSÕES | 101 |
| 7 PERSPECTIVAS FUTURAS | 102 |
| 8 REFERÊNCIAS | 103 |

1 INTRODUÇÃO

Os organismos multicelulares interagem com o meio ambiente visando manter um ambiente interno que favoreça a sua sobrevivência, crescimento e reprodução. Para tanto existe necessidade de uma complexa maquinaria bioquímica que produza constantemente energia. O oxigênio molecular (O_2) obtido da atmosfera é vital para os organismos aeróbios uma vez que aumenta a eficiência na produção energética. Contudo, parte do oxigênio disponível produz espécies reativas de oxigênio (EROs) que são formadas intracelularmente. Por serem moléculas altamente reativas e, algumas destas moléculas estarem envolvidas em vias fisiológicas corporais, o controle entre a produção e degradação de EROS é de vital importância ao organismo.

Assim, o desequilíbrio na produção de EROs ameaça a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas podendo comprometer processos biológicos importantes ou mesmo a inibição não seletiva das EROS pode, por outro lado provocar distúrbios na homeostase corporal (AUGUSTO, 2006).

Existe um grande corpo de evidências que o estresse oxidativo causado pelo aumento na produção de EROS está relacionado com doenças crônicas não-transmissíveis incluindo as neoplasias, as morbidades cardiovasculares e neurodegenerativas entre outras. Por este motivo estudos relacionados à produção e catálise destas moléculas no organismo são de grande interesse científico e clínico. Em termos biológicos sabe-se que existe uma constante produção pelo metabolismo aeróbico de pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que está diretamente relacionado as cadeias mitocondriais produtoras de adenosina trifosfato (ATP) (EMERIT 1994, HALLIWELL, 2006).

Por serem moléculas de grande reatividade o organismo possui dois sistemas antioxidantes: endógeno e exógeno. O sistema endógeno se constitui por uma cadeia enzimática que tem como produto final a produção de água a partir da catálise do $O_2^{\cdot-}$. Por este motivo, este sistema é conhecido como sistema antioxidante enzimático. O organismo também produz antioxidantes endógenos que não são enzimas, como por exemplo, o tripeptídeo glutathiona (γ -

glutamilcisteinilglicina). Já o sistema exógeno é constituído por uma série de moléculas bioativas com atividade antioxidante que são obtidas a partir da alimentação.

Embora as defesas antioxidantes endógenas sejam efetivas, não são infalíveis, e constantemente há formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EROs/ERNs) que interagem em diferentes níveis com o ambiente celular antes de serem eliminadas, o que, à primeira vista, pode parecer uma falha evolutiva. Todavia, há evidências recentes de que também um certo nível destas espécies é imprescindível para muitas funções fisiológicas. Por exemplo, o enovelamento de proteínas nascentes no retículo endoplasmático ocorre em um meio mais oxidativo que o restante da célula sendo fundamental na formação das pontes dissulfeto (AUGUSTO, 2006). Também, muitos genes são transcritos após oxidação transitória e baixas concentrações de alguns oxidantes podem estimular a proliferação celular, como exemplificado pela adição de 1 μM de H_2O_2 à cultura de células (BURDON, 1996).

Nestes termos, o paradigma atual relacionado ao metabolismo oxidativo é de que o tipo de célula e tecido bem como o momento do desenvolvimento do organismo apresentam níveis de EROS diferenciados, que são altamente regulados pela maquinaria bioquímica da célula já que estão relacionados à determinadas funções biológicas. O desbalanço deste estado de regulação redox tecido-específico é o que potencialmente desencadeia disfunções celulares e morbidades associadas. Assim, o entendimento do balanço redox celular não é universal e deve ser entendido nos seus diferentes contextos incluindo o momento da diferenciação celular e de sua potencial taxa proliferativa (HALLIWELL, 2008).

Sabe-se que a dinâmica biológica e proliferativa de células-tronco e de células diferenciadas apresenta especificidades importantes e que parecem estar diretamente relacionadas à modulação do estado redox. (GUO et al.,2010).

Nos últimos anos, as célula-tronco, tanto de origem embrionária (CTE) quanto de linhagens adultas (CTA) tem atraído enorme atenção científica dada a sua potencial capacidade de diferenciação em vários tipos celulares que poderiam ser eventualmente utilizados em terapias clínicas regenerativas. Embora se reconheça o benefício potencial que o uso de células-tronco pode trazer a saúde humana, um

conjunto de pesquisas adicionais precisam ser conduzidas a fim de se verificar não só os indicadores de eficiência na regeneração celular, mas também de segurança no seu uso clínico.

Um dos questionamentos que precisa ser investigado com maior profundidade diz respeito aos mecanismos de proteção das células-tronco relacionados aos diversos tipos de estresse ambiental, com ênfase a regulação do estado redox e do estresse oxidativo (GUO et al.,2010).

Para alguns autores, o estresse oxidativo poderia ser um importante fator que afeta a propagação e a diferenciação das células-tronco embrionárias em condições *in vitro* (CHO et al., 2006). É muito importante o entendimento da resposta das células-tronco ao estresse oxidativo tanto relacionado à sua sobrevivência quanto a manutenção da pluripotência ou da indução e manutenção da diferenciação celular. Tais estudos servirão de base para o uso apropriado e seguro de técnicas de regeneração celular.

Uma vez que as condições de cultura de CTE *in vitro* são bastante diferenciadas das condições *in vivo* principalmente relacionadas aos níveis de oxigênio ambiental, uma questão emergente diz respeito à influência da suplementação do meio de cultura com compostos antioxidantes, sintéticos ou de extrato de plantas medicinais ou alimentos ricos nestas substâncias (HALLIWELL, 2008).

Como é sabido, os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, e é bem estabelecido que antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde.

Deste modo as plantas medicinais e os alimentos têm sido um importante recurso de obtenção de compostos antioxidantes não enzimáticos desde os primórdios da humanidade até os nossos dias.

O Reino Plantae, além de ser o maior reservatório de moléculas orgânicas conhecido, é um poderoso laboratório de síntese. A partir de plantas achadas e usadas pelo conhecimento popular, foram descobertos diversos medicamentos utilizados até os nossos dias pela medicina. Até hoje diversas moléculas com estrutura complexa, dependem de síntese biológica, pois a síntese em laboratório

não é possível ou economicamente inviável; por isso plantas medicinais são utilizadas como matéria-prima para a fabricação de medicamentos (ALVES & SILVA, 2002). Assim, o uso de plantas medicinais pela população mundial é muito significativo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população do planeta faz uso de algum tipo de planta fitoterápica na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% ocorre por indicação médica (ALVES & SILVA, 2002).

Além das propriedades fitoterapêuticas de algumas plantas, os alimentos consumidos na dieta também são fonte de compostos secundários ativos que atuam sobre a homeostase corporal. Os benefícios para a saúde associados ao consumo de frutas e hortaliças que foram descritos a partir de evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais devem-se, em parte, à presença de antioxidantes nestes alimentos, desta forma, é de grande importância a busca por novas fontes de compostos bioativos exógenos, que podem ser tanto de origem natural quanto sintética (BARREIRA et al, 2008).

Muitas moléculas provenientes dos alimentos além da atividade antioxidante podem apresentar outras propriedades importantes na regulação bioquímica e fisiológica do organismo como: atividade anti-inflamatória, anti-plaquetária, anti-proliferativa, moduladora da função endócrina, e dos mecanismos de apoptose, etc. Além do mais, grande parte dos alimentos apresenta mais de um tipo de compostos bioativos, que no seu conjunto podem agregar diversas propriedades biológicas importantes (BARREIRA et al, 2008).

Assim, muitos alimentos além das propriedades antioxidantes apresentam um conjunto de moléculas que atuam sobre diversas rotas metabólicas incluindo o metabolismo energético, a transmissão neural e a fisiologia cardiovascular e reprodutiva. Este é o caso do guaraná (*Paullinia cupana*) de origem amazônica. O seu uso tem se disseminado mundialmente principalmente nas bebidas energéticas. Adicionalmente um conjunto de estudos produzidos independentemente por diversos grupos de pesquisa sugerem ter o guaraná ação, antioxidante, anti-mutagênica, anti-carcinogênica, anti-obesogênica, anti-plaquetária, anti-microbiana, entre outras propriedades (BASILE et al., 2005; FUKUMASU et al., 2006; FUKUMASU et al., 2008; KREWER et al., 2011; BYDLOWSKI et al., 1988; BYDLOWSKI et al., 1991).

Deste modo, investigações complementares voltadas para o entendimento dos mecanismos causais associados à bioatividade do guaraná se fazem necessários. Neste sentido, o estudo aqui proposto tem como perspectiva aprofundar os estudos a respeito do potencial efeito protetor do extrato hidroalcolólico de *Paullinia cupana* (guaraná) contra danos induzidos por estresse oxidativo desencadeado pelo composto Nitroprussiato de Sódio (NPS) que gera níveis elevados de óxido nítrico utilizando como modelo celular linhagem de fibroblastos embrionários de camundongo NIH 3T3.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito protetor *in vitro* do extrato hidro-alcólico do guaraná (*Paullinia cupana*, Mart., variedade *Sorbilis*) em indicadores de estresse oxidativo induzidos pelo NPS na linhagem embrionária de fibroblastos de camundongos NIH 3T3.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar o efeito do extrato hidro-alcólico de *Paullinia cupana* na linhagem celular comercial de fibroblastos embrionário de camundongo (*Mus musculus*) NIH-3T3 expostos ao NPS:

- na taxa de viabilidade celular
- na lipoperoxidação lipídica
- na produção de espécies reativas
- na taxa de genotoxicidade (dano de DNA)
- na modulação de enzimas antioxidantes e componentes antioxidantes não enzimáticos

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Conceito de radicais livres e espécies reativas

Radical livre é qualquer molécula ou fragmento molecular capaz de existir de forma independente e que contenham um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; VALKO, et al., 2007). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a estas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela adição, pela perda de um elétron não radical ou pelo ganho de um elétron de um não radical. Radicais podem ser formados também por um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Entretanto, existem compostos igualmente reativos que não possuem elétrons desemparelhados, não sendo classificados quimicamente como radicais livres, ainda que sejam designados de maneira mais ampla como EROs ou de Nitrogênio (ERNs).

As EROs bem como as ERNs são produtos normais do metabolismo celular. Estas duas classes de moléculas são reconhecidas pelo seu papel tanto benéfico quanto negativo aos sistemas vivos (VALKO et al., 2006). Exemplos de efeitos benéficos ocorrem quando alguns tipos destas moléculas são gerados ou mantidos em concentrações baixas e ou moderadas. Esta condição está associada a diversas funções biológicas incluindo resposta mitogênica, um papel relevante nas rotas de sobrevivência e apoptose celular e na resposta imune (VALKO et al., 2006).

Por outro lado, efeitos nocivos dos radicais livres (em concentrações muito altas ou desbalanceadas) são genericamente conhecidos como “estresse oxidativo” e “estresse nitrosativo” (KOVACIC & JACINTHO, 2001; RIDNOUR et al., 2005; VALKO, et al., 2001). Em outras palavras, o estresse oxidativo resulta de reações metabólicas que utilizam oxigênio, afetando o equilíbrio entre as moléculas pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. O excesso de espécies reativas pode danificar componentes celulares importantes tais como lipídeos, proteínas e DNA,

prejudicando/abolindo a sua função. Esta é uma das premissas implicadas na gênese de várias doenças e o envelhecimento humano.

Assim, o equilíbrio delicado entre a produção e degradação de radicais livres é um aspecto muito importante nos organismos vivos, sendo que o mesmo é alcançado através de mecanismos denominados “regulação redox”. Estes processos protegem os organismos vivos do estresse oxidativo e mantêm a “homeostase redox” controlando o “estado redox” (DRÖGE, 2002).

EROs podem ser gerados tanto de forma endógena quanto exógena (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1 – Nomenclatura das espécies reativas (adaptado de HALLIWELL & WHITEMANN, 2004).

| Radicais livres | Não-radicais |
|---|--|
| Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) | |
| Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) | Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) |
| Hidroxil (OH^{\cdot}) | Ácido Hipobromoso ($HOBr$) |
| Hidroperoxila (HOO^{\cdot}) | Ácido Hipocloroso ($HOCl$) |
| Peroxila (ROO^{\cdot}) | Oxigênio Singlete |
| Alcoxila (RO^{\cdot}) | Peróxidos orgânicos ($ROOH$) |
| Carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) | Peroxinitrito ($ONOO^-$) |
| Dióxido de Carbono ($CO_2^{\cdot-}$) | Ácido Peroxinitroso ($ONOOH$) |
| Espécies Reativas de Cloro (RCS) | |
| Cloro atômico (Cl^{\cdot}) | Ácido Hipocloroso ($HOCl$) |
| | Cloreto de Nitrila (NO_2Cl) |
| | Cloraminas |
| | Gás Cloro (Cl_2) |
| Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) | |
| Óxido Nítrico (NO^{\cdot}) | Ácido Nitroso (HNO_2) |
| Dióxido de Nitrogênio (NO_2^{\cdot}) | Cátion Nitrosil (NO^+) |
| | Ânion Nitrosil (NO^-) |
| | Tetróxido de Dinitrogênio (N_2O_4) |
| | Trióxido de Dinitrogênio (N_2O_3) |
| | Peroxinitrito ($ONOO^-$) |
| | Ácido Peroxinitroso ($ONOOH$) |
| | Cátion Nitrônio (NO^+_2) |
| | Peroxinitritos de Alquila ($ROONO$) |
| | Cloreto de Nitrila (NO_2Cl) |

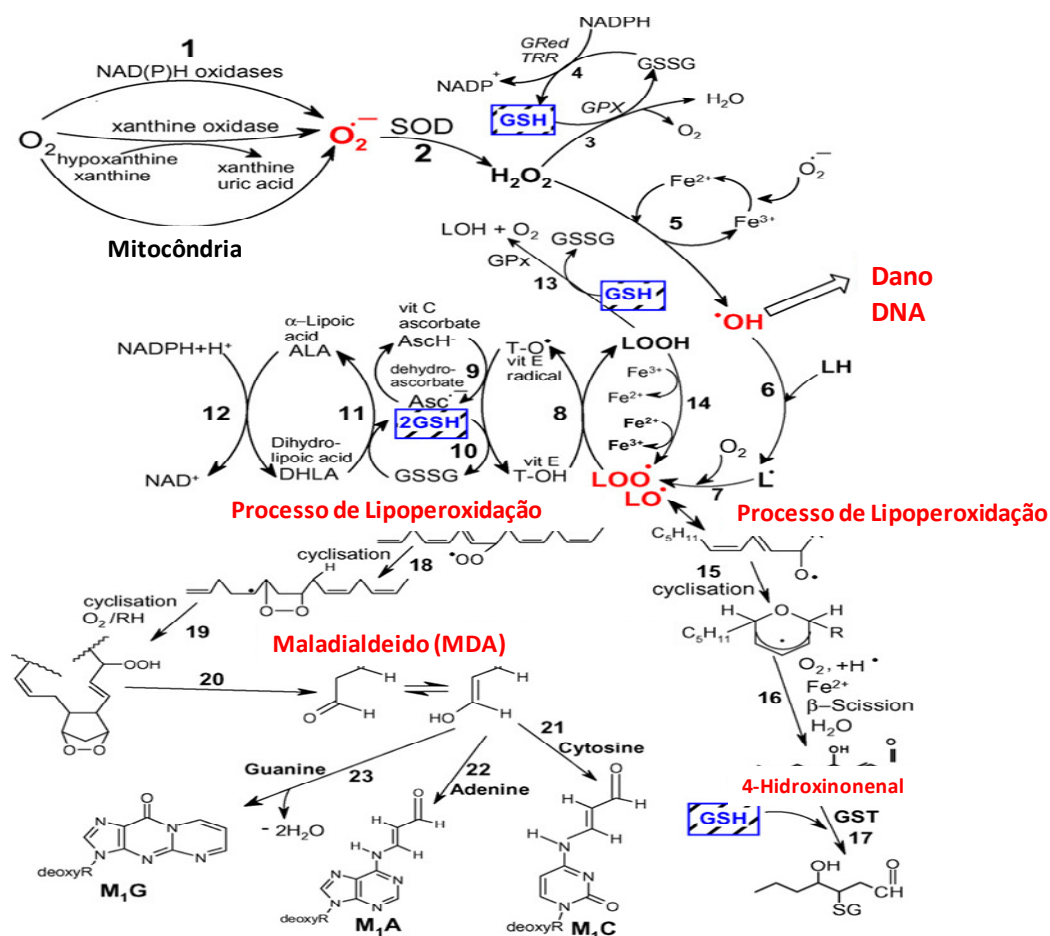


Figura 1 – Vias de formação de espécies reativas, processos de peroxidação e o papel da Glutathione (GSH) e outros antioxidantes (vitamina C, E, ácido lipóico) no gerenciamento do estresse oxidativo (equações não balanceadas). Reação 1: O radical ânion superóxido é formado pela redução molecular do oxigênio mediada pelo NAD(P)H oxidases e xantina oxidases ou não-enzimaticamente por compostos redox reativos tal como semi-ubiquinona da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Reação 2: ânion superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio. Reação 3: O peróxido de hidrogênio é removido mais eficientemente pela Glutathione peroxidase (Gpx) que requer GSH como doador de elétrons. Reação 4: A glutathione oxidada (GSSG) é reduzida novamente a glutathione pela enzima glutathione redutase que usa NADPH como doador de elétrons. Reação 5: Alguns metais de transição (Fe^{2+} , Cu^{2+} e outros) podem quebrar o peróxido de hidrogênio a radicais hidroxil (reação de Fenton). O radical hidroxil pode abstrair elétrons de ácidos graxos poliinsaturados e dar origem a radicais lipídicos centrados no carbono (L^{\bullet}). Reação 7: O radical lipídico (L^{\bullet}) pode interagir com o oxigênio molecular e dar origem ao radical peróxila (LOO^{\bullet}). Se este radical resultante não for reduzido por antioxidantes, ocorrerá o processo de peroxidação lipídica (reações 15-17 e 18-23). Reação 8: O radical peróxila é reduzido na membrana pela forma reduzida da vitamina E (T-OH) resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e um radical derivado da vitamina E (T-O \bullet). Reação 9: A regeneração da vitamina E pela vitamina C: o radical derivado da vitamina E é reduzido novamente a vitamina E pelo ácido ascórbico dando origem ao radical ascorbila (Asc \bullet). Reação 10: A regeneração do radical da vitamina E com GSH onde GSH reduz este radical. Reação 11: A glutathione oxidada (GSSG) e o radical ascorbila são reduzidos novamente a GSH e ácido ascórbico pelo ácido dihidrolipóico (DHLA) que é convertido a ácido α -lipóico (ALA). Reação 12: A regeneração do DHLA a partir do ALA usando NADPH. Reação 13: hidroperóxidos lipídicos são reduzidos a alcóis e dioxigênio pela Gpx usando GSH como doador de elétrons. *Processo de Peroxidação Lipídica*: Reação 14: Hidroperóxidos lipídicos podem reagir com Fe^{2+} para formar radicais lipídicos alcóxila (LO^{\bullet}), ou reagir de forma muito mais lenta com Fe^{3+} para formar radicais peróxila (LOO^{\bullet}). Reação 15: O radical lipídico alcóxila derivado, por exemplo, do ácido araquidônico, sofre ciclização para formar 6 membros contendo anéis hidroperóxidos. Reação 16:

Estes membros sofrem reações posteriores (β -Cissão) para formar 4-hidroxi-2-nonenal. Reação 17: 4-hidroxi-2-nonenal é processado no aduto glutatila que é inócuo. Reação 18: Um radical peroxila localizado na posição interna do ácido graxo pode reagir por ciclização e produzir um peróxido cíclico adjacente ao radical centrado no átomo de carbono. Reação 19: Este radical por ser ou reduzido para formar um hidroperóxido ou pode sofrer uma segunda reação de ciclização e formar um peróxido bicíclico que após acoplar ao oxigênio e a redução dá origem a uma molécula estruturalmente semelhante a um endoperóxido. Reação 20: O composto formado é um produto intermediário para a produção de Malondialdeído (MDA). Reações 21, 22 e 23: MDA pode reagir com as bases do DNA, adenina, guanina e citosina e formar os adutos M_1C , M_1A e M_1G , respectivamente. (Adaptado de VALKO et al., 2007).

3.2 Origem e produção de radicais livres e espécies reativas

Existe uma produção contínua pelas células de radicais livres, em especial do radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como subproduto da produção de ATP. Durante a fosforilação oxidativa, a redução do O_2 molecular para H_2O requer 4 elétrons e pode ocorrer por 2 vias. A primeira ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, tendo a reação catalisada pela citocromo oxidase como o passo final desse processo. Nesse caso, nenhum intermediário de O_2 é formado e a redução tetravalente do O_2 foi calculada em aproximadamente 95–98 % do total de O_2 consumido (SILVEIRA, 2004)

Na segunda via, a fração restante de 2–5 % pode dar origem à formação de EROs pela redução univalente do O_2 e como consequência ocorre a formação de intermediários altamente tóxicos tais como: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$).

Entre as espécies reativas de O_2 mais comuns, podemos citar o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (ΔGO_2) (SILVEIRA, 2004; CERQUEIRA et al., 2007; VASCONSELOS et al., 2007). O $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$ são classificados como radicais livres de O_2 devido à presença de um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica, enquanto as demais espécies coletivamente são classificadas como EROs. Deste modo, pode-se afirmar que os radicais livres de oxigênio são as espécies radicalares mais importantes geradas em organismos vivos.

3.2.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio molecular (dioxigênio) possui uma configuração eletrônica única e é considerado um radical por si próprio. A adição de um elétron ao dioxigênio possibilita a formação do $O_2^{\cdot-}$. A produção do $O_2^{\cdot-}$, decorrente de atividade metabólica ou “ativação” do oxigênio por fatores ambientais (como por exemplo, radiações ionizantes), é considerada produção primária de espécies reativas. Este radical pode interagir com outras moléculas (enzimas ou metais de transição) para gerar espécies reativas de oxigênio “secundárias” (VALKO, MORRIS, & CRONIN, 2005) (Figura 1 e 2).

Entretanto, uma produção contínua de $O_2^{\cdot-}$ ocorre na mitocôndria (complexos II e III) devido à transdução de energia, onde ocorre a falta prematura de um pequeno número de elétrons (aproximadamente 1-3 % do número total de elétrons na cadeia de transporte) ao oxigênio (KOVACIC, et al., 2005; VALKO, et al., 2004). Na sua forma aniônica, este radical é fortemente carregado e atravessa facilmente a membrana mitocondrial interna. Já foi demonstrado que o $O_2^{\cdot-}$ dependente do complexo I é exclusivamente liberado na matriz mitocondrial, estes resultados se enquadram bem a um dos sítios onde ocorre falta de elétrons no complexo I (grupo Ferro-enxofre na parte hidrofílica da crista mitocondrial). O complexo III contribui com menos de 50% dos elétrons faltantes (VALKO et al., 2007).

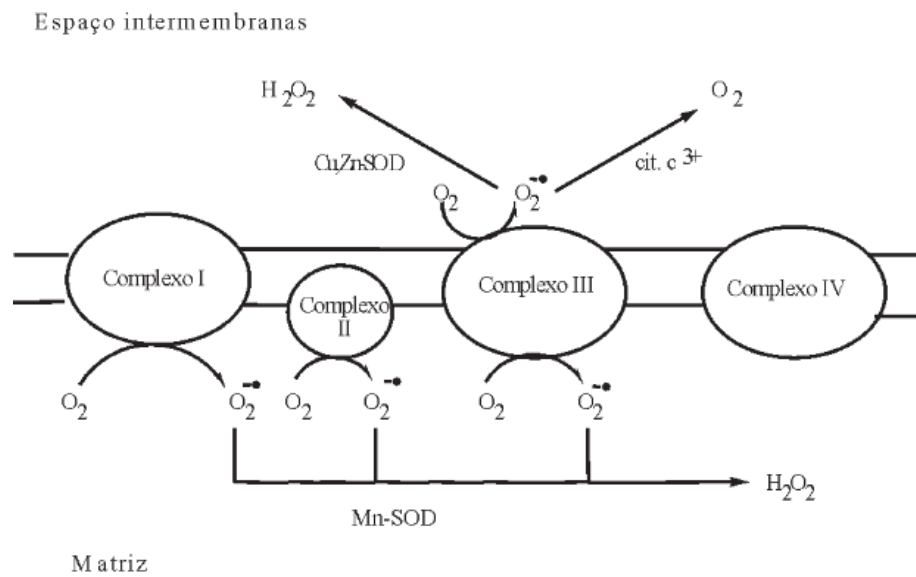


Figura 2 – Formação de espécies reativas na cadeia de transporte de elétrons. (Adaptado de Cerqueira, 2007).

O radical hidroxil, $^{\bullet}OH$, é a forma neutra do íon hidróxido, sendo considerado um radical altamente reativo e de meia vida muito curta, 10^{-9} segundos (PASTOR, et al., 2000). O estado redox da célula é amplamente relacionado ao par redox ferro (e cobre) e esses metais são mantidos em limites fisiológicos estritos, assegurando então que não haja ferro (e cobre) livres no ambiente intracelular.

No entanto, em condições de estresse, o excesso de $O_2^{\bullet-}$ atua como um agente oxidante liberando grande quantidade de ferro (Fe^{2+}) de moléculas que o contém (família de enzimas liases e desidratases contendo o núcleo [4Fe-4S]). O Fe^{2+} liberado participará da reação de Fenton formando o radical hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio (VALKO et al., 2005; LEONARD, et al., 2004).

O $O_2^{\bullet-}$ também participa da reação de Haber-Weiss que combinada com a reação de Fenton, regenera Fe^{2+} e O_2 livre, podendo dessa forma, este metal de transição participar de novas reações de Fenton (LIOCHEV & FRIDOVICH, 2002).

A maior parte da produção do radical $^{\bullet}OH$ via reação de Fenton se deve a disponibilidade dos seguintes metais de transição: ferro, cobre, cromo e cobalto, embora Rae e colaboradores, 1999 tenham demonstrado que o “pool” livre de cobre conte com menos de um átomo por célula.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um intermediário formado pela reação de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima SOD, pela redução de 2 e^- na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*, localizadas nos peroxissomas. É muito difusível dentro e entre as células *in vivo*. É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reagindo lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera $\cdot\text{OH}$, através da reação de Fenton (VASCONSELOS et al, 2007).

O oxigênio singlete, estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação. $^1\text{O}_2^*$ pode ser gerado, entre outras reações, por transferência de energia a partir de um sensibilizador S, no estado excitado tripleto ($^3\text{S}^*$) (porfirinas, clorofila e riboflavina) para o oxigênio. O sensibilizador S absorve energia e deixa o estado fundamental singlete (S), passando para o estado excitado singlete ($^1\text{S}^*$), a partir do qual é convertido, por cruzamento inter-sistema, para o estado excitado tripleto. (VASCONSELOS et al., 2007).

Outros radicais reativos que podem ser formados em sistemas biológicos são os radicais peroxila (ROO^{\cdot}) (Figura 1). O radical ROO^{\cdot} mais simples é a forma protonada do ânion superóxido (HOO^{\cdot}) e é usualmente chamado de radical hidroperoxila ($\text{pK}_a \sim 4,8$). Devido a este pK_a , $\sim 0,3\%$ do superóxido presente no citosol se encontra na forma protonada (De GREY, 2002). O radical hidroperoxila inicia processos de peroxidação lipídica em duas diferentes vias: via dependente de hidroperóxidos de ácidos graxos e via independente de hidroperóxidos de ácidos graxos.

A xantina oxidase (XO EC 1.1.3.22) e a xantina desidrogenase (XD EC 1.1.1.204) são formas interconvertíveis da enzima Xantina oxirredutase (XOR). Durante o catabolismo de purinas, a XOR catalisa a hidroxilação oxidativa da hipoxantina em xantina e subsequentemente da xantina para ácido úrico (um potente antioxidante), além disso, a forma oxidase da XOR, é uma importante geradora de espécies reativas (EROs e ERNs) tornando essa enzima muito

importante no sistema de defesa antioxidante e na regulação do potencial redox da célula (VALKO et al., 2007; VORBACH et al., 2003).

Os peroxissomos são considerados os maiores consumidores de oxigênio na célula e participam de muitas funções metabólicas onde existe consumo de oxigênio. O consumo de oxigênio por estas organelas leva a produção de H_2O_2 que é utilizado para oxidar diversas moléculas. Como mecanismo de defesa, o peroxissomo possui a catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogênio, e dessa forma sendo considerada uma organela vital para a manutenção da concentração ou atividade dessas enzimas e por conseqüência a geração de EROs.

É importante salientar que a produção de EROs nem sempre é conseqüência do metabolismo aeróbio, podendo ser gerada também pelas oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular e regulação gênica. Ou seja, moléculas de EROs nem sempre são negativas ao organismo já que em algumas células e tecidos podem funcionar como agentes reguladores e moduladores em diversas rotas fisiológicas (BARZILAI et al., 2004, VALKO et al., 2007).

3.2.2 Espécies reativas de nitrogênio

Entre as espécies reativas de nitrogênio destaca-se o Óxido Nítrico (NO^*). Esta molécula apresenta funções, citotóxicas e citoprotetoras. Citotóxicas uma vez que o NO^* tem grande capacidade de se combinar com outras espécies radicalares formando espécies reativas de nitrogênio. Por outro lado, conforme o tipo de celular e a sua concentração, o NO^* possui propriedades citoprotetoras, por ter ação antioxidante e outras funções biológicas nos quais a vasodilatação tem um papel de destaque.

O NO^* foi identificado em 1980 como sendo o Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (FRDE), onde já tinha sido previamente identificado como uma substância gerada no endotélio que induzia o relaxamento vascular. No caso,

também foi observado que o NO^{\bullet} era o principal composto produzido a partir de medicamentos nitrovasodilatadores como o NPS (VALKO et al., 2007).

Em termos químicos, o NO^{\bullet} é uma molécula que contém um elétron não pareado no orbital antiligante $2\pi^*_y$ e é conseqüentemente considerado um radical. O NO^{\bullet} é gerado através da ação de Óxido Nítrico Sintases específicas (ONSs), que degradam o aminoácido arginina a citrulina em um processo de oxidação envolvendo cinco elétrons (GHAFOURIFAR & CADENAS, 2005).

Esta molécula é abundante e atua como sinalizadora em uma variedade de processos fisiológicos incluindo regulação da pressão sanguínea, neurotransmissão, mecanismos de regulação do sistema imune, relaxamento do músculo liso (BERGENDI et al., 1999; VALKO et al., 2007), formação de memórias (MIRANDA et al., 2000). Além do seu papel de modulador, o NO^{\bullet} também é importante em condições fisiopatológicas estando envolvido em doenças neurodegenerativas, cardiovasculares até o câncer (THOMAS et al., 2003).

Embora as reações químicas que o NO^{\bullet} participa sejam variadas, as limitações impostas pelas condições locais estreitam as reações relevantes de forma expressiva. Estas reações podem ser sumarizadas em duas classes denominadas efeitos diretos e indiretos (Figura 3). Estes efeitos serão descritos com detalhes adiante.

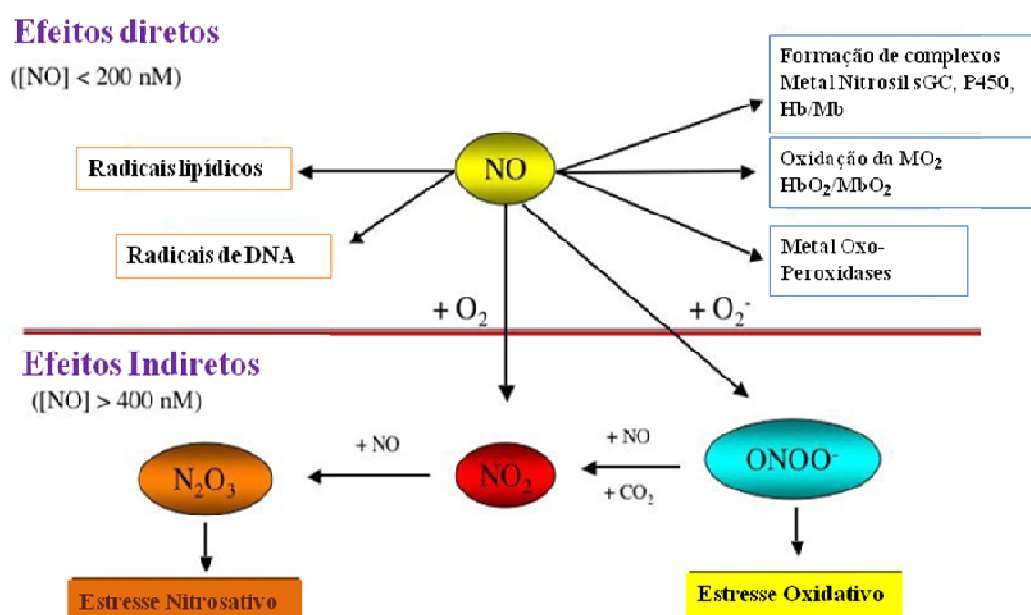


Figura 3 – Efeitos diretos e indiretos do óxido nítrico (adaptado de Thomas et al., 2008).

Embora o NO[•] tenha natureza radicalar, em sistemas biológicos o mesmo é relativamente inerte, interagindo inicialmente com grupamentos heme de proteínas e outros radicais (THOMAS et al, 2003).

3.2.2.1 Efeitos diretos do Óxido Nítrico

As interações diretas do NO[•] com metais de transição pode ser de três tipos. A) Formação de complexos nitrosil via reações covalentes com íons metálicos; B) Reações redox; C) Ligação do NO[•] aos núcleos Ferro-Enxofre de proteínas.

A reação mais bem caracterizada envolvendo o NO[•], é a ativação da enzima solúvel Guanilato Ciclase (sGC), levando a sua translocação para membrana. A ativação da sGC requer baixas concentrações de NO[•] (EC₅₀ 100 nM). A sGC catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) a guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que por sua vez ativa proteínas kinases dependentes de cGMP, fosfodiesterases reguladas por cGMP e canais iônicos regulados por cGMP. De uma forma geral a ativação da CGC por NO[•], constitui a principal via de ação do mesmo envolvendo uma vasta rede de funções fisiológicas incluindo relaxamento da musculatura lisa vascular e não vascular, inibição da agregação plaquetária, inibição da adesão de leucócitos ao endotélio, transdução de sinal no sistema nervoso central.

Outra heme proteína que é alvo do NO[•] é a ciclooxigenase (COX), que converte ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano A₂. Existem duas isoformas, a constitutiva COX1 e a induzível (COX2). É bem estabelecido que as vias relacionadas ao NO[•] e COX estão inter-relacionadas, fornecendo uma ligação muito importante na resposta inflamatória. O ferro que se encontra no núcleo heme desta enzima está no estado férrico, a redução para o estado ferroso inibe a COX e isto pode acontecer na presença do superóxido. Em baixas concentrações o NO[•] modula a forma redox da COX mudando o estado do ferro de ferroso para férrico ativando a enzima, bem como seqüestrando o superóxido aumentando a atividade da enzima. Em altas concentrações, o NO[•]

forma um aduto nitrosil com o ferro no estado férrico o que causa a inibição da enzima. A formação de peroxinitrito inibe irreversivelmente a síntese de prostaciclina. NO^{\bullet} também inibe a lipoxigenase, que converte ácido araquidônico em leucotrienos. As interações entre o NO^{\bullet} e os metabólitos do ácido araquidônico ainda não são bem compreendidas, mas as evidências apontam para processos tais como vasoreatividade, agregação plaquetária, interação entre leucócitos e endotélio e quimioatração em processos inflamatórios.

O NO^{\bullet} também interage com a região heme do citocromo P450, resultando em inibição reversível da enzima inibindo a ligação do oxigênio ao sítio ativo, interferindo desta forma de forma direta no metabolismo de vários compostos, como hormônios, eicosanóides e drogas influenciando assim a eficácia de diversos fármacos.

NO^{\bullet} se liga ao grupo prostético heme das óxido nítrico sintases inibindo a ligação do oxigênio e ativação da L-arginina, resultando em inibição da enzima. O estado de oxidação do ferro no grupo heme parece ser crítico na magnitude da inibição da enzima pelo NO^{\bullet} . O estado férrico contribui de forma expressiva para esta retroalimentação negativa. As isoformas constitutivas da cNOs são mais sensíveis a inibição por NO^{\bullet} do que a isoforma induzível, iNOs.

Em altas concentrações (>400 nM), foi demonstrado que o NO^{\bullet} inibe a catalase através da formação de aduto férrico nitrosil na porção heme da enzima reduzindo assim a degradação de H_2O_2 aumentando assim a produção de espécies reativas. Alternativamente, em concentrações muito baixas de NO^{\bullet} , a catalase e H_2O_2 consomem o NO^{\bullet} , através da formação de um intermediário denominado complexo I, reagindo com NO^{\bullet} dando origem a ácido nitroso (HNO_2). Esta evidência sugere que, em condições fisiológicas, a catalase e o peróxido de hidrogênio servem como reguladores da disponibilidade de NO^{\bullet} , exercendo desta forma papel pivotal nos efeitos diretos mediados por esta molécula.

As mitocôndrias são bastante sensíveis ao NO^{\bullet} e espécies reativas de nitrogênio. Considerando os efeitos diretos, o NO^{\bullet} inibe de forma reversível a citocromo oxidase. Esta enzima contém duas regiões heme (citocromo a e citocromo a_3) e dois centros contendo cobre. O NO^{\bullet} forma um aduto nitrosil com o ferro reduzido na região a_3 , sítio de ligação do O_2 nesta enzima. Estudos *in vitro* com a

citocromo oxidase isolada, mitocôndrias isoladas e culturas celulares, mostraram que a inibição da citocromo oxidase pelo NO^{\bullet} é extremamente rápida e competitiva com o oxigênio, sugerindo que o papel do NO^{\bullet} na mitocôndria poderia ser o de aumentar a K_m por oxigênio. Recentemente foi demonstrado que existe a expressão de uma isoforma mitocondrial da NOs (mtNOs), sugerindo que a produção de óxido nítrico é muito bem regulada nesta organela.

O principal efeito direto do NO^{\bullet} é a sua reação com metais com alto estado de oxidação e complexos de metais com oxigênio, formando espécies extremamente danosas em várias situações tais como isquemia e reperfusão ou choque circulatório. A reação de heme proteínas, como as discutidas até agora, com peróxido de hidrogênio dá origem ao complexo de oxigênio com o cátion altamente tóxico, ferril (Fe^{4+}). Na presença de NO^{\bullet} , esse complexo hipervalente é reduzido (Fe^{3+} e NO_2^-), diminuindo seu potencial de oxidação. NO^{\bullet} também inibe a formação do radical hidroxil resultante da reação de Fenton.

A ligação direta do NO^{\bullet} a grupos ferro-enxofre (4Fe-4S) em diversas proteínas dando origem a um complexo ferro-enxofre nitrosil, tendo como resultado a inibição enzimática. Isto é relevante durante a inibição mediada por NO^{\bullet} de aconitases citosólicas e mitocondriais. A inibição da aconitase mitocondrial constitui um efeito citotóxico do NO^{\bullet} sozinho. Este efeito é mais pronunciado em condições que geram acidose, tais como choque de diferentes etiologias, indicando um efeito negativo do NO^{\bullet} em algumas situações. O NO^{\bullet} também interage com o grupo 4Fe-4S das aconitases citosólicas, também conhecida como proteína responsiva a ligação do ferro. A dissociação do grupamento 4Fe-4S nestas enzimas resulta na diminuição da síntese de ferritina e aumenta a síntese do receptor transferrina, tendo como consequência o aumento da captação de ferro pela célula. Alternativamente, o NO^{\bullet} pode reduzir a concentração de ferro intracelular, pela diminuição da liberação de ferro a partir da ferritina via inibição do complexo da NADPH Oxidase, enzima chave na liberação de ferro a partir da ferritina.

3.2.2.2 Efeitos indiretos do Óxido Nítrico

Em um ambiente aquoso, o NO^\bullet tem uma meia-vida de poucos segundos, meia-vida esta que fica consideravelmente aumentada em uma atmosfera com baixa concentração de oxigênio ($>15\text{s}$). O NO^\bullet se difunde rapidamente em meio aquoso e lipídico, significando que o mesmo atravessa facilmente membranas celulares se difundindo no citosol sem a necessidade de receptores específicos podendo reagir com o oxigênio formando nitratos e nitritos. (CHIUEH, 1999; VALKO et al., 2007; MIRANDA et al., 2000).

A superprodução de espécies reativas de nitrogênio é denominada estresse nitrosativo (RIDNOUR et al., 2004; MIRANDA et al., 2000). O estresse nitrosativo pode levar a reações de nitrosilação podendo alterar a estrutura de proteínas (aminoácidos aromáticos como a tirosina) alterando a sua função, alterações semelhantes às produzidas por espécies reativas de oxigênio, porém, via mecanismos diferentes (MIRANDA et al., 2000). O estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio ocorre principalmente via reação de Fenton e Haber-Weiss, já o estresse oxidativo provocado por espécies reativas de nitrogênio se dá pela formação de peroxinitrito (ONOO^-) e ânions nitroxil (NO^-).

Nestas condições, o NO^\bullet reage com o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar um radical muito mais reativo, o ONOO^- , que é um agente oxidante muito potente que pode causar fragmentação de DNA, principalmente reações com a base guanina (formando 8-nitroguanina) e oxidação de lipídios (HALLIWELL, 2004). Ao contrário de outras EROs e a exemplo do $^\bullet\text{OH}$, o NO^\bullet , bem como o ONOO^- , não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e, principalmente, pelas concentrações de $\text{O}_2^{\bullet-}$ disponíveis (SILVEIRA, 2004, VALKO et al., 2007).

Esta reação possui uma das maiores constantes conhecidas para reações envolvendo o NO^\bullet ($7.0 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), então os meios por onde este radical exerce sua toxicidade é através de suas habilidade de se combinar com ânions superóxido.

O NO^\bullet também se liga prontamente a metais de transição como grupamentos Fe^{2+} -HEME na enzima guanilato ciclase (sGC).

O produto representado como $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}^{\bullet}$, mas o complexo $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}^{-}$ também é usualmente visto (VALKO et al., 2007).

3.3 Sistema de defesa antioxidante

Segundo Halliwell (2004), antioxidante é qualquer composto que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis de proteção dos organismos: o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e com o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque aos diferentes alvos celulares evitando a perda de integridade celular. Conforme sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Os principais componentes do sistema antioxidante enzimático são a Super Óxido Dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona peroxidase (GPx), que agem no início da cadeia de formação das espécies reativas, evitando o acúmulo dos radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos produzidos *in vivo*, tais como a glutathiona reduzida (GSH), a ubiquinona, o ácido úrico e as proteínas de transporte de metais de transição (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), e compostos obtidos diretamente da dieta, tais como os carotenóides, flavonóides e as vitaminas C e E (VASCONSELOS et al., 2007; CERQUEIRA et al., 2007; SILVEIRA, 2004). Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Nos alimentos são encontrados uma grande variedade de compostos que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (VASCONSELOS et al., 2007; CERQUEIRA et al., 2007).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses

radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção (CERQUEIRA et al., 2007). Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos (HALLIWELL, 2004).

A exposição a variadas fontes de espécies reativas e suas espécies radicalares, fez com que ao longo do curso principal de evolução, os organismos desenvolvessem uma série de mecanismos de defesa, os quais podemos dividi-los em 4 grandes classes: 1- mecanismos preventivos, 2- mecanismos de reparo, 3- defesas físicas e 4- defesas antioxidantes.

O sistema de defesa antioxidante está dividido em: Exógeno e Endógeno conforme esquema geral apresentado na Figura 4.

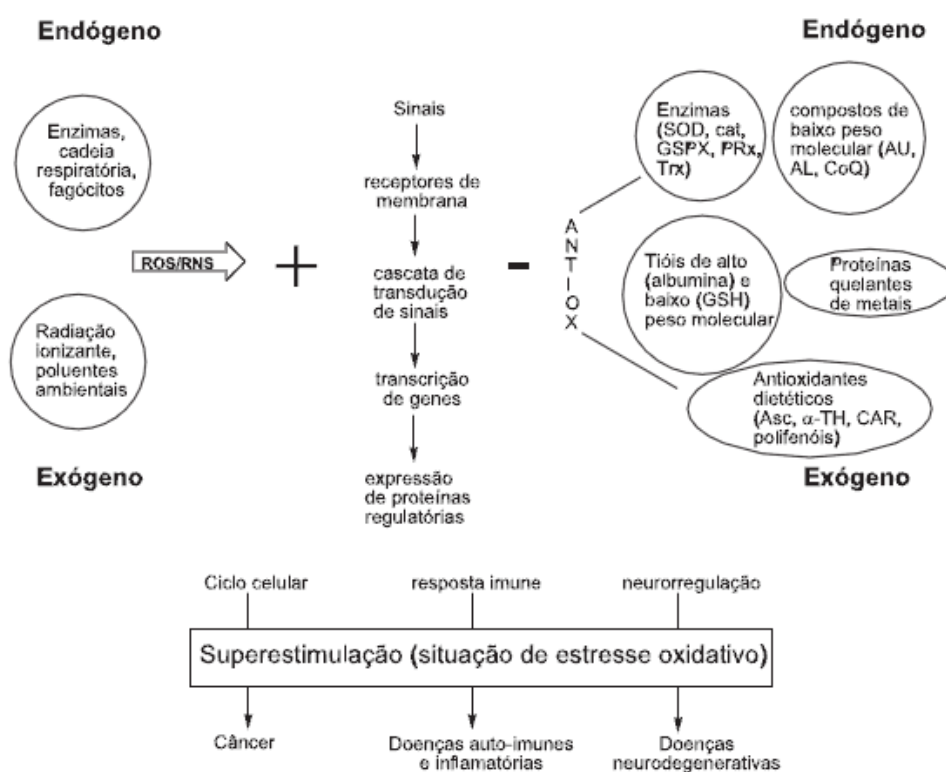


Figura 4 – Os antioxidantes (ANTIOX) endógenos incluem enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSPX), peroxirredoxinas (PRX) e tioredoxinas (Trx); compostos de baixo peso molecular: ácido úrico (AU); ácido lipóico (AL); coenzima Q (CoQ) e glutatona (GSH); tiol proteínas, como albumina, peroxirredoxinas e tioredoxinas, e proteínas armazenadoras/ transportadoras de íons de metais de transição. As defesas antioxidantes exógenas referem-se aos antioxidantes obtidos por meio da alimentação, sendo os mais estudados o ácido ascórbico (Asc), α-tocoferol (α-TH), carotenóides (CAR) e polifenóis. (Adaptado de CERQUEIRA et al., 2007).

3.3.1 Sistema de defesa antioxidante endógeno enzimático

O sistema de defesa antioxidante enzimático envolve as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), e catalase (CAT).

3.3.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido Dismutase (SOD) são enzimas que catalisam a dismutação do O_2^- em H_2O_2 (Equação 9). A reação de dismutação do superóxido acontece espontaneamente em condições fisiológicas, porém quando catalisada pela SOD, a sua velocidade é 10^4 vezes maior (MONTAGNER et al., 2010).

As principais formas de superóxido dismutases (EC 1.15.1.1), encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD localizada no citosol (dimérica), além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica) e a MnSOD localizada na mitocôndria (VASCONSELOS, et al., 2007), além de alguns procariotos e cloroplastos (CEMELI et al, 2009)

3.3.1.2 Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6), cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete (VASCONSELOS, et al, 2007). A catalase é, também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco.

Esta enzima é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água a uma velocidade extremamente alta, correspondendo a uma atividade no sítio catalítico de aproximadamente 10^7 min^{-1}

3.3.1.3 Glutathione peroxidase (GPx)

A família das glutathione peroxidases (GPx) (EC 1.11.1.9) reduz H_2O_2 e outros peróxidos a água ou álcool. Apresenta-se sob 4 formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA. A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo, o selênio (Se), obtido da dieta ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenometionina) e, ligado à cisteína, em alimentos de origem animal (selenocisteína).

3.3.1.4 Glutathione reductase (GR)

A glutathione reductase (EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína dependente de NADPH e da integridade da via das pentoses. É a enzima necessária para manter a glutathione em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível. A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo.

3.3.2 Sistema de defesa antioxidante endógeno não-enzimático

.

3.3.2.1 Glutathione

A glutathione (GSH) ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$, M.M 307g mol^{-1}) é um tripeptídeo (*L*- γ -glutamyl-*L*-cysteinylglycine) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas glutathione peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathione (GSSG) ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$, Mr $612,6\text{ g/mol}$). É um tampão redox sulfidrílico que mantém os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito, no estado reduzido.

A GSH é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de EROs.

3.4 Estresse oxidativo e os seus efeitos biológicos

Em altas concentrações, as EROs podem ser importantes mediadores de danos a diversas estruturas celulares como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (VALKO et al., 2006, 2007; HALLIWELL & WHITEMAN, 2004), condição esta conhecida como estresse oxidativo. Em essência, o estresse oxidativo pode ser definido como um desbalanço grave entre a produção de espécies reativas e o sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Entretanto, a natureza do dano celular induzido pelas EROs depende do local da formação das EROs (GOETZ et al., 2008).

Estresse oxidativo pode ser resultado de:

1. Concentração diminuída de antioxidantes: Mutações que afetem a atividade das enzimas antioxidantes como CuZn ou MnSOD (MONTAGNER et al., 2010), ou GPx, ou toxinas que afetem o sistema de defesa antioxidante (xenobióticos que são metabolizados junto com GSH causando sua depleção). Deficiência nos minerais obtidos na dieta (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se) e ou antioxidantes obtidos também da dieta (CERQUEIRA et al., 2007);
2. Produção aumentada de espécies reativas: Exposição de células a altas concentrações de O_2 ou a outras moléculas que são por si próprias altamente reativas. A ativação excessiva dos sistemas existentes nas células (resposta inflamatória) que produzem naturalmente espécies reativas (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

O dano oxidativo decorrente de estresse oxidativo inclui as seguintes conseqüências:

1. Adaptação da célula ou organismo através de uma sobre regulação (“up-regulation”) dos sistemas de defesa endógenos, que podem: (a) defender o organismo completamente; (b) proteger o organismo em parte e (c) superproteger (as células se tornam resistentes a altos níveis de estresse oxidativo) (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004);
2. Injúria celular envolve dano oxidativo a todos os alvos celulares: lipídios, proteínas, ácidos nucleicos (principalmente o DNA) e carboidratos. O dano oxidativo pode ocorrer durante a fase de adaptação (item 1). Segundo HALLIWELL & WHITEMAN, 2004, *nem todo dano causado por estresse oxidativo é considerado dano oxidativo*; danos a biomoléculas podem ser causados por mudanças relacionadas ao estresse oxidativo, como alterações nos níveis de Ca^{2+} ou ativação de proteases.
3. Morte celular que pode ser desencadeada devido ao extenso dano ao DNA acionando mecanismos de morte celular. A pressão oxidativa

extremamente alta pode causar dano generalizado à célula, provocando necrose.

3.4.1 Peroxidação lipídica

A membrana plasmática é basicamente formada por uma dupla camada lipídica no qual se encontram proteínas integrais e periféricas associadas a mesma. As EROs podem prejudicar a função das membranas pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nos lipídios e indiretamente pela inibição da síntese dos lipídios, dessaturação de ácidos graxos ou ativação das lipases (GOETZ et al.,2008).

Devido à sua abundância nas células e a susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações (Figuras 1 e 5), os ácidos graxos poliinsaturados são, para os oxidantes, alvos mais prováveis do que o DNA (LOUREIRO, 2002). É estimado que aproximadamente 60 moléculas de ácido linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) e 200 de ácido araquidônico (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) (os ácidos graxos poliinsaturados mais abundantes em nossas células) são consumidas por oxidante que reage com a bicamada lipídica (LOUREIRO, 2002).

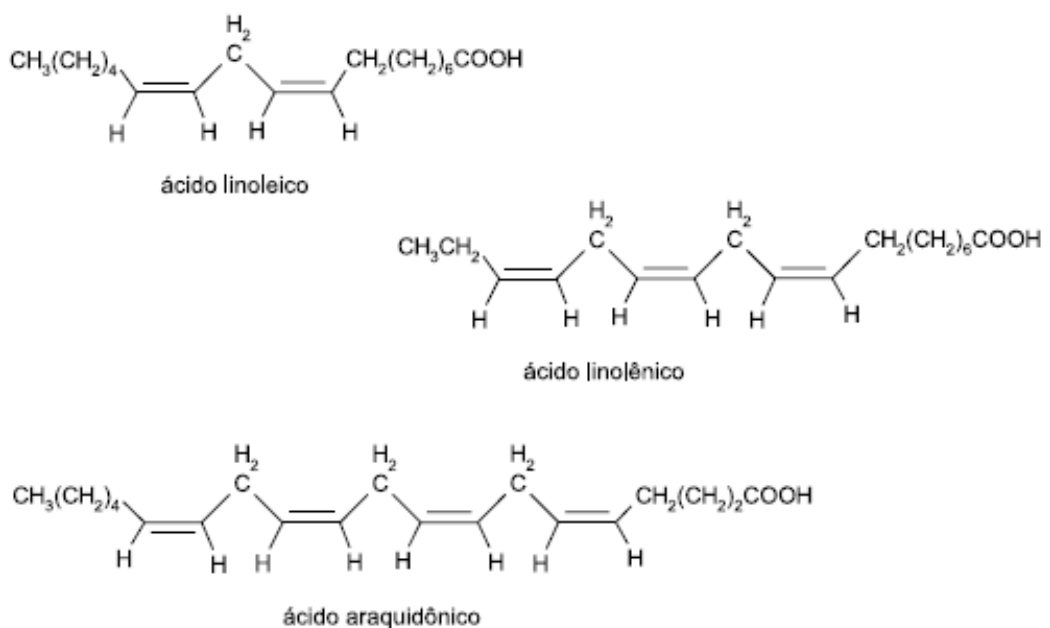


Figura 5 – Alguns ácidos graxos presentes em membranas celulares. (Adaptado de Loureiro, 2002).

A peroxidação lipídica se inicia pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-álíco de um ácido graxo poliinsaturado. Foi verificado que espécies tais como $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$, $\cdot\text{NO}_2$, $\text{RO}\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$ podem realizar essa oxidação. Após iniciado, o processo se torna autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundários. As Figuras 6 e 7 resumem as três fases do processo. É importante mencionar que a oxidação enzimática do ácido araquidônico, que ocorre durante a síntese de eicosanóides, é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio. Além dos eicosanóides envolvidos na sinalização intra e intercelular, radicais de oxigênio e hidroperóxidos lipídicos são gerados durante as reações catalisadas por ciclooxigenases ou lipoxigenases (LOUREIRO et al., 2002).

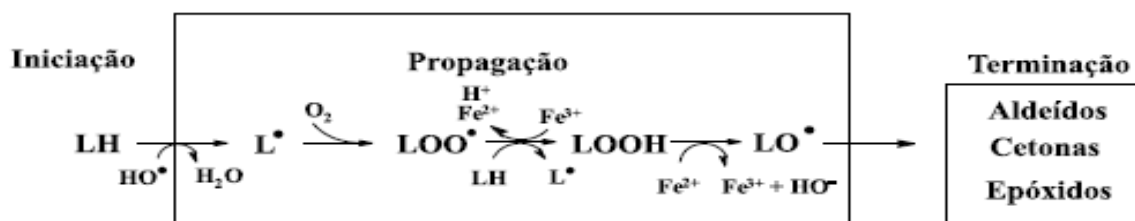


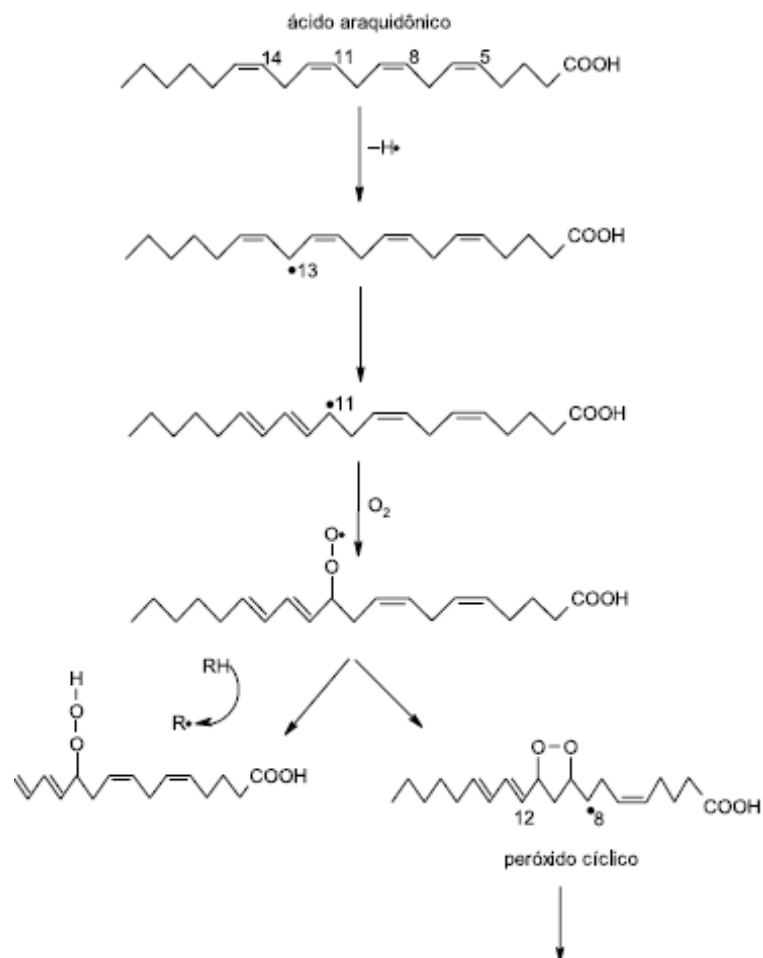
Figura 6 – Representação geral das fases da peroxidação lipídica. (Adaptado de Loureiro, 2002.).

Após a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) levando à formação de um radical lipídico centrado no carbono ($\text{L}\cdot$), este é estabilizado por um rearranjo molecular, adquirindo a estrutura de dieno conjugado. A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$) (FERREIRA et al, 1997). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico ($\text{L}\cdot$) (fase de propagação). O radical $\text{LOO}\cdot$ combina-se com o átomo de hidrogênio abstraído e forma um hidroperóxido lipídico (LOOH). Alternativamente, os radicais $\text{LOO}\cdot$ podem formar peróxidos cíclicos (Figura 7) pelo ataque a uma dupla ligação na mesma cadeia. Esses peróxidos cíclicos também podem propagar a peroxidação lipídica e, no caso da oxidação dos ácidos araquidônico, docosahexaenóico ($22:6 \Delta^{4,7,10,13,16,19}$) e eicosapentaenóico ($20:5 \Delta^{5,8,11,14,17}$), podem levar à formação de isoprostanos (LOUREIRO et al., 2002;

HALLIWELL & WHITEMAN, 2004) que podem ser medidos no plasma e urina humanos (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura tanto da membrana plasmática que circunda a célula quanto das membranas que delimitam as organelas. Estas rupturas podem levar a morte celular (VASCONCELOS et al., 2007).

Os hidroperóxidos lipídicos são instáveis na presença de metais de transição, tais como ferro ou cobre, e formam radicais alcoxil (LO \cdot) e peróxil (LOO \cdot) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



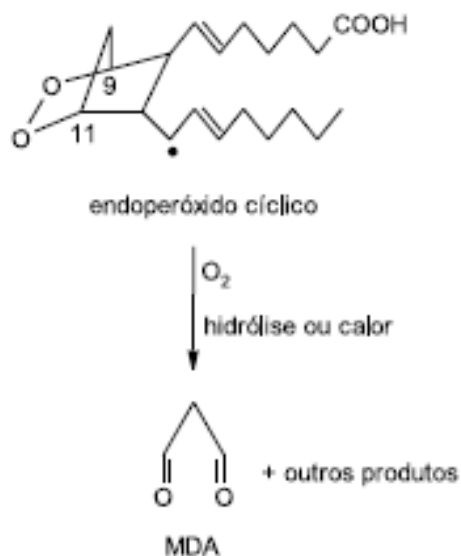


Figura 7 – Esquema proposto para formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico. (Adaptado de LOUREIRO, 2002).

3.4.2 Dano ao DNA (genotoxicidade)

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir de sua reação com EROs (GOETZ et al., 2008). Em condições fisiológicas, a quantidade absoluta de oxidações no DNA é estimada em aproximadamente uma modificação a cada 130000 nucleotídeos no DNA nuclear. Em compensação, de cada 8000 nucleotídeos um é modificado por EROs no DNA mitocondrial (GOETZ et al., 2008).

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com as EROs. Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB "single strand break") ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (quebras duplas - DSB "double strand break"). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular. Mais de 20 diferentes tipos de danos nas bases do DNA foram identificados após a exposição dessa biomolécula às diversas formas de estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SLUPPHAUG et al., 2003, BERRA et al., 2006).

A guanina, que exibe o menor potencial de ionização entre as bases nitrogenadas, tem sido a escolha preferencial dos estudos das reações de oxidação

das purinas, uma vez que existem metodologias eficientes para a sua detecção. Desta forma, a guanina vem sendo utilizada como um bom exemplo de oxidação de bases nitrogenadas. O radical hidroxila (OH) é bastante empregado na geração de reações radicalares com a guanina presente tanto no "pool" de nucleosídeos (2'-deoxiguanosina, dGuo) formando 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo), quanto na sua forma nucleotídica (formando 8-oxoGuo) (CADETT et al., 2003; BERRA et al., 2006). Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) também é capaz de reagir significativamente com a guanina em pH neutro (RAVANAT et al., 2004), sendo bastante empregado em estudos que envolvem oxidação de purinas. A formação de 8-oxodGuo pela exposição a elétrons livres é um processo que ocorre em uma menor escala, contudo, a hidratação de radicais catiônicos da guanina leva, predominantemente, à formação de 8-oxodGuo (CADETT et al., 2003; RAVANAT et al., 2004, VALKO et al., 2007) (Figura 8).

A guanina oxidada tem grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo com a adenina (A), gerando uma transversão de GC para TA. Além disso, aparentemente 8-oxodGuo é capaz de bloquear a transcrição (BERRA et al., 2006; LE PAGE et al., 2000).

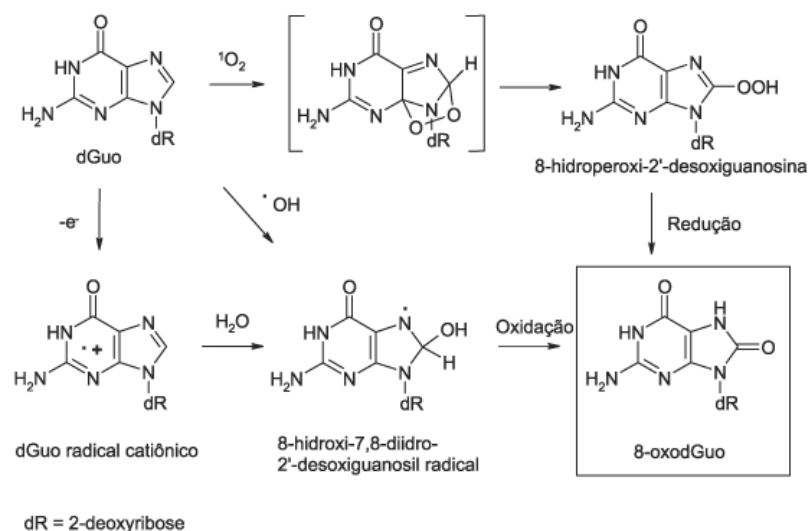


Figura 8 – Reações de oxidação da 2-desiguanosina (2-dGuo) com o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), elétron livre ($-e^-$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na formação da 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo). (Adaptado de BERRA et al., 2006).

3.4.3 Carbonilação de proteínas e oxidação de carboidratos

Os grupos carbonilas (aldeídos e cetonas) são gerados nas cadeias laterais de diversos aminoácidos componentes de proteínas quando são oxidados, especialmente resíduos de prolina, lisina, arginina e treonina. Derivados de carbonilas protéicas também podem ser gerados via clivagem oxidativa de proteínas (α -amidação ou oxidação de grupos glutamyl) levando a formação de um peptídeo cujo domínio N-terminal é bloqueado por um derivado cetoacil. Além disso, grupos carbonila podem ser inseridos em proteínas através de uma reação de grupamentos laterais nucleofílicos de lisina, cisteína e histidina com aldeídos tais como, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), malondialdeído (MDA), 2-propenal (acroleína) produzidos durante a peroxidação lipídica ou com cetoaminas, cetaldeídos, produtos de reações de redução com açúcares (DALLE-DONE et al., 2003). Os principais mecanismos da produção de grupos carbonílicos incluem a oxidação de lipídios, a glicação ou glicoxidação de carboidratos estão representados na Figura 9.

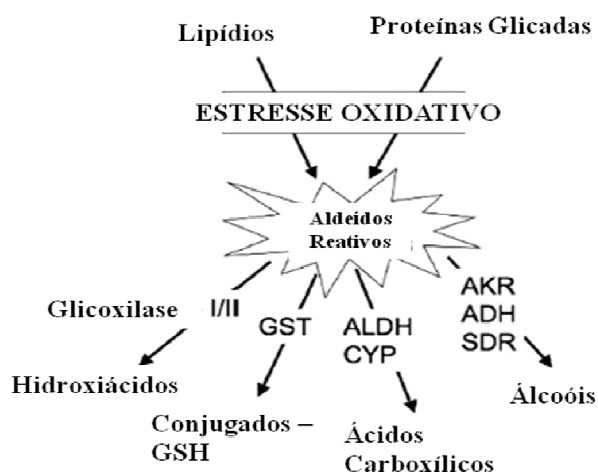


Figura 9 – Metabolismo de aldeídos reativos como consequência de estresse oxidativo, Aldeídos reativos produzidos através de lipoperoxidação, glicação ou glicoxidação, podem ser convertidos em hidroxiácidos através da ação da glioxilase I e II, oxidados a ácidos carboxílicos pela Aldeído Desidrogenase e Citocromo P450 (CYP), reduzidos a alcoóis pela Álcool Desidrogenase (ADH), Aldoceto redutases (AKR) ou SDR ou conjugados com GSH pela GST. (Adaptado de ELLIS, et al.,2007).

Decorrente dos processos de oxidação de lipídios de membrana, a maioria dos produtos formados são derivados do ácido graxo poliinsaturado ω -6, como o malondialdeído (MDA) (70%), hexanal (15%), acroleína, glioxal, crotonaldeído, trans-2-nonenal, 4-oxo-2-nonenal, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE).

Os carboidratos como a glicose, reagem com grupamentos amina de aminoácidos lisina e arginina formando bases de *schiff*, reação conhecida como “reação de Maillard”. Esta reação produz uma série de re-arranjos, dando origem a produtos avançados de glicação. A oxidação destes produtos dá origem a dicarbonilas, tais como α -oxaldeídos metil glioxal (MG), glioxal, e 3-deoxiglicosona; aldeídos de cadeia curta tais como diacetil acetol, acroleína e piruvaldeído (THORNALLEY, 2005). Este processo ocorre quando existem altas concentrações de glicose juntamente com altas concentrações de compostos pró-oxidantes (ELLIS, 2007). As concentrações de MG e glioxal podem aumentar devido a outros mecanismos tais como o fluxo metabólico aumentado na via glicolítica e todos esses compostos podem reagir com proteínas (ELLIS, 2007) (Figura 9).

Os alcanais tais como o hexanal, são menos reativos e causam menos efeitos comparados aos aldeídos insaturados. Alquenais contendo duplas ligações entre carbonos (C=C), tal como a acroleína, são mais reativos que os alcanais. Estas moléculas se tornam mais reativas se as ligações duplas ocorrem entre C2-C3, tornando o carbono C3 extremamente eletrofílico, podendo reagir com compostos nucleófilos de proteínas, DNA e lipídios, danificando estas moléculas. (ELLIS, 2007). A reatividade nestas regiões fica aumentada pela proximidade com o grupamento hidroxil em C4 que é seqüestrador de elétrons e o grupo carbonil e C1. O HNE se enquadra neste tipo de situação.

Os aldeídos extremamente reativos como o HNE, interagem diretamente com proteínas e membranas causando perda significativa de função de transportadores, enzimas, componentes sinalizadores, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto e outras proteínas, tais como a TAU (PICKLO et al., 2002). A acroleína também é citotóxica, e no caso de células nervosas, altera as concentrações de Ca^{2+} alterando desta forma, o transporte de Ca^{2+} e o transporte de glutamato. O MG também é citotóxico para células neuronais por formar bases de *schiff* com aminoácidos muito mais rapidamente do que com açúcares (LOVELL et al., 2001).

Os aldeídos citados, também causam necrose e apoptose em baixas concentrações, principalmente via ativação de caspases (JI et al., 2001; Li et al., 2006).

Como defesa, o organismo dispõe de um sistema enzimático que age sobre estes aldeídos reativos, composto por enzimas da classe das aldeído desidronases (ALDHs) (TOWNSEND et al., 2001; MURPHY et al., 2003; ESTEY et al., 2007), citocromo P450 (CYP3A, CYP4A) (GUENGERICH, 2001; AMUNOM et al., 2005; ELLIS, 2007), ADH (álcool desidrogenases) (DICK et al., 2001; SHORT et al., 2006; ELLIS, 2007;) desidrogenases redutases de aldeídos de cadeia curta (CBR-1, CBR3, 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase, HRS4, DHRS2, L-xilulose redutase) (MASER, 2006; OPPERMANN, 2007), aldo ceto-redutases (família AKR de enzimas NADPH dependentes) (BURCZYNSKI et al., 2001; HINSHELWOOD et al., 2003; LI et al., 2006; JIN & PENNING, 2007;) glutationa S-transferases, glioxilases I e II (PRABHU et al., 2004; HAYES et al., 2005;; GALLAGHER et al., 2006; ELLIS, 2007).

3.5 Cultura de células como modelo experimental

O cultivo de células constitui uma ferramenta de valor inestimável para pesquisa em diversos campos da área biomédica, facilitando a análise de propriedades biológicas e processos que não seriam facilmente realizados ao nível de um organismo intacto. A manutenção de células em cultura sejam linhagens primárias ou imortalizadas que cresçam aderidas em substratos plásticos ou em suspensão, requer conhecimentos e prática de algumas poucas técnicas essenciais, ou seja, é um procedimento relativamente simples. Devido a esta praticidade, segurança, e efetividade dos ensaios, milhares e trabalhos utilizam esses sistemas experimentais (DOYLE & GRIFFITHS 1999; HELGASON & MILLER 2004; ZUCCO et al., 2004).

Até a metade dos anos 80, a tecnologia da cultura de células não era extensivamente empregada na área da toxicologia. Entretanto, Grisham & Smith em 1984 fizeram uma observação interessante "*Todo o potencial do sistema de cultivo*

de células de mamíferos para análises de toxicidade química ainda não está sendo executado na prática". Em verdade, somente após a segunda metade da década de 80, a toxicologia *in vitro*, como área científica emergiu com mais força.

A toxicologia *in vitro* investiga os efeitos nocivos e deletérios e os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos utilizando células em condições controladas de cultura. Essa área do conhecimento desenvolveu diversas estratégias para abordagem mecanística dos efeitos de drogas ou compostos naturais em células cultivadas, o que melhorou consideravelmente os testes e procedimentos de avaliação toxicológica de diversas substâncias. Tais protocolos permitem explorar a base celular e molecular da toxicidade estudando as modificações dos xenobióticos no ambiente celular (DOYLE & GRIFFITHS, 2004; HELGASN & MILLER, 2004; ZUCCO et al., 2004; DEBNATH & BRUGGE, 2005).

3.6 Células-tronco na medicina regenerativa: o uso da linhagem embrionária de fibroblastos de camundongo Swiss NIH 3T3 como modelo experimental

As últimas duas décadas foram pródigas na identificação e caracterização de linhagens de células-tronco no organismo adulto. Assim, hoje células-tronco são denominadas de: (1) células-tronco embrionárias (CTEs), presentes no embrião entre o 4º e o 5º dia após a fertilização que tem a capacidade de regenerar todo o corpo do embrião; (2) células-tronco a partir de tecidos fetais, como por exemplo, células do cordão umbilical ou de linhagens isoladas de tecidos fetais entre a 5ª e a 10ª semana de vida fetal intra-uterina e (3) finalmente células-tronco adultas que são definidas como linhagens celulares não diferenciadas que se auto-renovam ao longo do tempo produzindo progêneses celulares que irão amadurecer e se tornar células especializadas órgão-específicas (MORRISON & SHAH, 1997, HARFOUCHE & MARTIN, 2010). Em condições normais a maior parte das células-tronco possui um ciclo celular mais lento, na maior parte das vezes permanecendo em repouso na fase G0 (fase quiescente, onde não ocorre divisão).

Quando ocorre divisão destas células, é através de processos assimétricos que produzem uma célula-filha que mantém as propriedades de célula-tronco e outra célula-filha que terá um número limitado de proliferação antes de se tornar diferenciada. O interesse clínico envolve estudos tanto para o uso de células-tronco embrionárias e fetais quanto de células-tronco adultas (MORRISON & SHAH, 1997, HARFOUCHE & MARTIN, 2010).

Em relação às CTEs, quando derivadas de cultura de tecidos produzem linhagens que se proliferam rapidamente, se auto-renovam e são pluripotentes. Estas células nunca sofrem divisão assimétrica, similar a observada nas células-tronco adultas. Quando estão em condições de cultura tais células também se mantêm em um estado indiferenciado (MORRISON & SHAH, 1997, HARFOUCHE & MARTIN, 2010).

Estudos com células embrionárias de camundongos mostram que tais células possuem uma fase G0 muito curta (de aproximadamente uma hora e meia) indicando que novas células serão produzidas já que na fase S do ciclo celular, fase onde ocorre a duplicação do material genético (DNA). Deste modo, os ciclos mitóticos das CTEs são muito curtos. As CTEs têm sido amplamente estudadas dado o seu uso potencial na terapia gênica e celular (MORRISON & SHAH, 1997, HARFOUCHE & MARTIN, 2010).

Camundongos têm servido para a obtenção de diversos tipos de células pluripotentes utilizadas em pesquisas biológicas (Figura 10). Entre as linhagens amplamente utilizadas nas pesquisas científicas destaca-se a NIH 3T3.

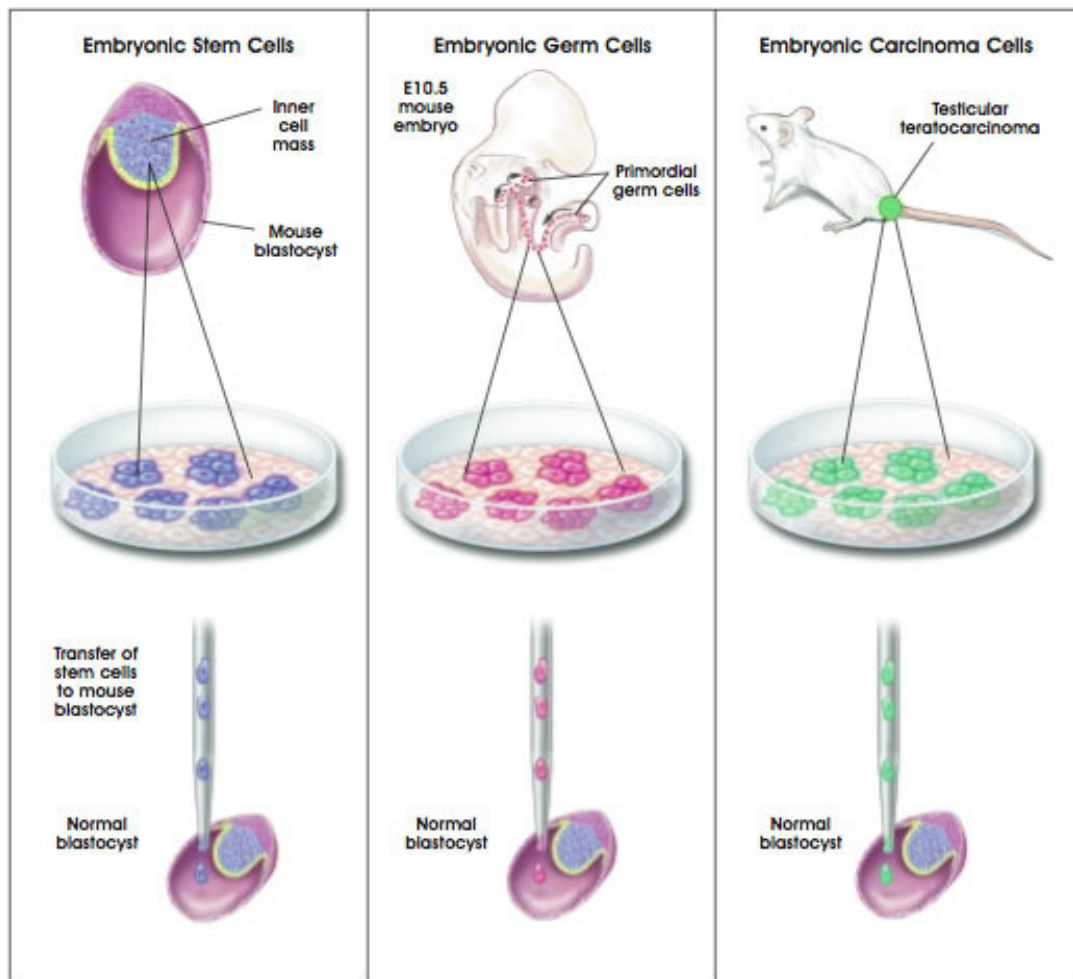


Figura 10 – Origem de células-tronco de camundongos pluripotentes (Adaptado de Winslow, 2001).

A linhagem NIH 3T3 foi estabelecida a partir de células fibroblásticas embrionárias desagregadas de culturas de embriões de camundongos (Swiss) por JAINCHIL et al. (1969). A linhagem original foi estabelecida nos anos 60 por George Todaro e Howard Green (TODARO & GREEN, 1967). Atualmente são obtidas comercialmente e assim utilizadas por um grande número de laboratórios no mundo todo.

As células NIH 3T3 são geralmente utilizadas para mostrar diferenças entre a mortalidade celular e a capacidade das células de sofrerem transformação oncogênica. Isto porque, a sua principal qualidade é não entrar em senescência replicativa (como ocorre com as linhagens celulares primárias e com grande parte de outras linhagens embrionárias), mas ao mesmo tempo em que exibe um fenótipo imortal, se inoculada em um camundongo não desencadeia crescimento tumoral.

Algumas características importantes na cultura destas células podem ser destacadas: (1) elas duplicam a cada 18-24 horas (crescem rapidamente; formam monocamadas confluentes que, em contato inibem a motilidade celular; podem ser mantidas num estado de não proliferativo em meio de cultura nutritivamente pobre sendo ativadas por fatores específicos de crescimento; são geralmente utilizadas em estudos de virologia e de outros tipos de experimentos biológicos.

As células NIH 3T3 também começaram a ser utilizadas em ensaios toxicológicos. Na revisão bibliográfica realizada onde as palavras chaves “NIH 3T3 and toxic” foram utilizadas com o instrumento de busca foram identificados 207 trabalhos. O mais antigo foi o realizado por Gilliland & Collier (1980), onde os autores testaram efeitos citotóxicos de uma toxina da difteria nesta linhagem celular.

Considerando especificamente o estresse oxidativo nas células NIH 3T3 o estudo de LIU e colaboradores. (2010) se destaca. Estes autores utilizando esta linhagem celular exposta ao peróxido de hidrogênio observaram que alteração no perfil das proteínas nucleares como um potencial mecanismo de proteção do material genético (DNA) contra o estresse oxidativo.

Do mesmo modo, já existem estudos investigando o potencial antioxidante de plantas medicinais e alimentos utilizando a linhagem celular NIH 3T3. Um destes estudos recentes foi conduzido por Solomon e colaboradores. (2010) que analisou as propriedades antioxidantes da antocianina cianidina-3-ramanoglucoside, C3R proveniente do figo em fibroblastos NIH 3T3 expostos ao peróxido de hidrogênio e mostrou sua capacidade protetora.

Outro estudo, também recente avaliou a influencia de diversos compostos fenólicos (genesteína, resveratrol, naringenina, quercitina, epicatequina e epigallocatequina) presentes na dieta na ativação da proteína p53 de linhagens NIH 3T3 expostas ao peróxido de hidrogênio. Os resultados mostraram que conforme o produto e a concentração estes compostos poderiam ter atividade pró ou antioxidante (RADEWICZ et al., 2010).

Estudos com outros compostos como o selênio também já estão sendo investigados nesta linhagem. O estudo de Sengupta e colaboradores em 2009 mostrou que a deficiência de selênio na linhagem NIH 3T3 altera adesão celular

sugerindo envolvimento das selênio-proteínas na ancoragem das células nos tecidos.

Com base nestas evidências estudos toxicológicos relacionados à capacidade antioxidante de plantas medicinais e alimentos na linhagem embrionária NIH 3T3 podem fornecer informações importantes relacionadas com a eficácia e a segurança do uso de células-tronco em terapias regenerativas. Este é o caso das investigações relacionadas com os efeitos bioativos do guaraná.

3.7 *Paullinia cupana* (Guaraná) Mat. Sapindaceae

O guaraná é um produto oriundo da Amazônia que atualmente é consumido como um suplemento alimentar aprovado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA-Ministério da Saúde).

Entretanto, segundo a medicina popular e os estudos realizados nas três últimas décadas o guaraná possui compostos bioativos que agem no diretamente no metabolismo corporal. As propriedades funcionais do guaraná (*Paullinia cupana* Mart. Sapindaceae) têm sido investigadas em estudos envolvendo cultura de células, modelos experimentais animais e ensaios clínicos em seres humanos (BARBOSA et al., 2004). Tais propriedades estão baseadas nos compostos bioativos presentes na sua composição: metil xantinas, tais como a cafeína (FOUNI et al., 2007), teobromina (BELLIARDO et al., 1985; SALVADORE et al., 1994), teofilina, taninos, saponinas, catequinas, epicatequinas, pró-antocianinas e outros compostos traço (SALVADORE et al., 1994; CARLSON & TOMPSON, 1998; SOMBRA et al., 2005; PELLOZO et al., 2008).

Os primeiros estudos foram conduzidos na década de 60. No caso, quatro investigações foram conduzidas demonstrando a atividade cardiogênica do guaraná. Nas décadas de 70 e 80, foram realizados estudos que determinaram os compostos bioativos presentes na planta.

A partir da década de 90 as investigações foram intensificadas e uma série de propriedades funcionais começou a ser observada a partir de estudos

independentes: cardiotônica e cardioprotetora (PONTIERI et al., 2007), atividade anti agregadora de plaquetas (BYDLOWSKI et al., 1988; BYDLOWSKI et al., 1991; RAVI SUBBIAH & YUNKER, 2008), energética (BEMPONG & HOUGHTON, 1992), atividade anti-bacteriana (FONSECA et al., 1994; BASILE et al., 2005), melhora cognitiva (ESPINOLA et al., 1997; KENNEDY et al., 2004; HASKELL et al., 2007; KENNEDY et al., 2007), antioxidante (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; RAY et al., 2006; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007), efeito anti-obesidade, termogênico e no aumento da taxa metabólica (ANDERSEN et al., 2001; BOOZER et al., 2001; BERUBE-PARENT et al., 2005; ROBERTS et al., 2005; RAVI SUBBIAH et al., 2008), atividade gastroprotetoras (CAMPOS et al., 2003), quimiopreventivo na hepatocarcinogênese (FUKUMASU et al., 2006), anti-depressivo (FONSECA et al., 1994), efeito no metabolismo lipídico, através do aumento da lipólise por ativação dos receptores de adenosina, aumento da taxa de β -oxidação através do aumento da atividade da CPT-I (LIMA et al., 2005), anti-mutagênico (FUKUMASU et al., 2008). No caso de estudos envolvendo o efeito antioxidante e antimutagênico do guaraná em células NIH 3T3, não foi encontrado nenhum trabalho específico envolvendo o guaraná.

Foi demonstrado que muitos agentes fitoquímicos podem modular o processo de carcinogênese bloqueando os efeitos adversos dos agentes mutagênicos, ou através de ação anti-mutagênica em células pré-neoplásicas (FUKUMASU et al., 2006; FUKUMASU et al., 2008). Recentemente foi observado que a administração de guaraná reduz a incidência e a multiplicidade de lesões pré neoplásicas induzidas por ditilnitrosamina em fígado de ratos (FUKUMASU et al., 2006). As vias de sinalização ATM/ATR, relacionadas com a resposta ao dano no DNA, são um possível alvo de ação de compostos bioativos presentes no guaraná. Estudos mostraram que uma combinação de drogas antitumorais com cafeína (um dos compostos bioativos em maior concentração no guaraná) possuem alta eficácia contra a proliferação de células cancerosas (incluindo células tronco cancerosas), mantendo-as em estado senescente através da inibição das vias de reparo de DNA (SABIAZ & SKLADANOWSKI, 2009). As saponinas e taninos encontrados em altas concentrações no guaraná, além de protegerem o DNA contra danos (FUKUMASHU

et al., 2008), exercem sua ação antioxidante através da inibição lipoperoxidação (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; USHIROBIRA et al., 2010).

Com relação aos limites de segurança no consumo do guaraná, MATTEI e colaboradores.,1998, discutem em seu trabalho que o guaraná não exerceu efeitos tóxicos em ratos e camundongos que sofreram administração (MATTEI et al., 1998). Fonseca e colaboradores.1994 relataram que na concentração de 30 mg/mL reduziu a sobrevivência de células bacterianas em 33 %, mostrando efeito genotóxico da planta nesta concentração (FONSECA et al., 1994). Outro estudo também corroborou o trabalho dos autores citados anteriormente (SANTA MARIA et al., 1998).

Recentemente foi realizado um estudo epidemiológico em idosos ribeirinhos que vivem no Município de Maués, Amazonas que comparou o perfil epidemiológico e de alguns marcadores do metabolismo oxidativo entre idosos que consomem habitualmente guaraná e idosos que não consomem este produto. A investigação conduzida por KREWER e colaboradores., (2010) observou que consumidores habituais do guaraná apresentavam menor prevalência de alguns distúrbios metabólicos como obesidade, níveis pressóricos e de LDL-colesterol, além de apresentarem também níveis plasmáticos menores de produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPPs).

O conjunto destes resultados corroborou estudos prévios que sugerem ter o guaraná atividade anti-obesogênica, termogênica e anti-plaquetária.

3.8 O guarana como potencial modulador dos efeitos oxidativos gerados pela exposição ao nitroprussiato de sódio

Evidências científicas sugerem que o guaraná tem ação no metabolismo relacionada à saúde cardiovascular via modulação de estados obesogênicos e da síndrome metabólica (ANDERSEN et al., 2001; BOOZER et al., 2001; BERUBE-PARENT et al., 2005; ROBERTS et al., 2005; RAVI SUBBIAH et al., 2008; KREWER et al., 2011). Adicionalmente, na cultura popular o guaraná é ingerido devido

algumas propriedades também relacionadas à fisiologia vascular como é o caso da potência sexual. Entretanto, esta propriedade é menos investigada, ainda que um estudo realizado por Antunes e colaboradores. (2001) que analisou uma bebida chamada de catuama, que contem quatro plantas em sua formulação (*Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Zingiber officinalis* e *Ptychopetalum olacoides*), mostrou efeitos fisiológicos nos tecidos cavernosos de coelhos devido especificamente ao guaraná. Com base nos resultados tal estudo sugeriu que o guaraná poderia ter compostos bioativos que atuam sobre o relaxamento vascular (ANTUNES et al., 2001).

Os efeitos relaxantes no tecido vascular são mediados diretamente por ação do NO•. Esta molécula, como foi descrito anteriormente, está implicada em muitos processos fisiológicos e sua concentração intracelular é relativamente baixa (THOMAS et al., 2008). Deste modo, alterações na sua produção ou degradação aumentando desta forma a sua concentração (efeitos diretos ou indiretos do NO•), pode determinar disfunções celulares relacionadas com diversas doenças.

Para investigar os efeitos *in vitro* do NO•, muitos estudos têm utilizado reagentes que são potentes geradores de NO•, como o Nitroprussiato de Sódio (NPS) (RAUHALA et al., 1998; WAGNER et al., 2006). Então para entendermos como o guaraná age sobre a modulação dos efeitos pró-oxidantes do óxido nítrico nas células, foi utilizado no presente estudo este reagente.

Com base na revisão da literatura, não foram identificados trabalhos prévios relacionados aos efeitos do guaraná sobre os efeitos citotóxicos relacionados a altos níveis de NO• em fibroblastos NIH 3T3.

Uma vez que os fibroblastos são elementos celulares importantes na composição dos vasos sanguíneos e na vasomodulação já que o tecido conjuntivo é o elemento de ligação entre o endotélio produtor de NO• e as células musculares lisas onde o NO• atua, estudos sobre a modulação do NO• pelo guaraná em fibroblastos são bioquimicamente relevantes. Assim, o estudo aqui desenvolvido e apresentado sob a forma de artigo tem como foco principal a obtenção de evidências da ação do guaraná sobre células fibroblásticas expostas a níveis elevados de NO• gerados pelo NPS.

4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito apresentado a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Referencias Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito esta baseada na versão submetida à revista *Food Chemistry* cujo titulo é “THE *IN VITRO* PROTECTIVE EFFECTS OF GUARANA (*Paullinia cupana*) ON FIBROBLAST NIH-3T3 CELLS EXPOSED TO SODIUM NITROPRUSSIDE”

THE *IN VITRO* PROTECTIVE EFFECTS OF GUARANA
(*Paullinia cupana*) ON FIBROBLAST NIH-3T3 CELLS
EXPOSED TO SODIUM NITROPRUSSIDE

Leonardo S. Bittencourt¹, Denise Cantarelli Machado², Michel Mansur Machado³, Greice Franciele F. dos Santos¹, Thais Doeler Algarve¹, Daniel Rodrigo Marinowic², Euler Esteves Ribeiro⁴, Felix Alexandre Antunes Soares¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,4}.

- 1- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, 97105900 Santa Maria, RS, Brazil.
- 2- Instituto de Pesquisas Biomédicas/Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- São Lucas Hospital, Av Ipiranga, 6690 - 2º andar Caixa Postal 1429 Porto Alegre/RS – 90610-000, Brazil
- 3- Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472 - Km 592 – Mail Box 118, 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil
- 4- Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Av. Carvalho Leal, 1777 Cachoeirinha 69065-001, Manaus, Amazonas Brazil

Abstract

The antioxidant effects of the hydro-alcoholic guaraná extract (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart.) on nitric oxide and other compounds generated from degradation of Sodium Nitroprusside (SNP) in embryonic fibroblast culture (NIH-3T3 cells) were evaluated. The guaraná bioactive compounds were initially determined by a high-performance liquid chromatography (HPLC): caffeine=12.240 mg/g, theobromine=6.733 mg/g and total catechins= 4.336 mg/g. Cell cultures were exposed to 10 μ M SNP during six hours since in this concentration the cells present > 90% mortality. Guaraná was added in the cultures in five concentrations (0.5, 1, 5, 10 and 20 mg/mL). The guaraná antioxidant effect was evaluated by MTT and Trypan blue viability assays, biochemical oxidative [lipid peroxidation, catalase and superoxide dismutase (SOD) activity], genotoxicity (DNA Comet assay) analysis. Additionally, the cell oxidative stress was evaluated by 2,7 dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescence assay. Guaraná reverted the SNP toxicity mainly in lower concentrations (< 5 mg) decreasing cell mortality, lipid peroxidation, DNA damage and cell oxidative stress and increasing the SOD levels. The results support that guaraná have antioxidant effect on NO metabolism mainly in situation that occur higher cell NO levels. This biological effect can to contribute to guaraná protective effect of metabolic diseases that are associated to NO imbalance.

Key words: *Paullinia cupana*, Nitric Oxide, free radical scavengers, free radicals.

1. Introduction

Guaraná, an Amazonian Brazilian fruit, is an energetic beverage recognized as safe food by the Food Drug Administration (FDA) (Smith & Atroch, 2007; Ducan et al., 2010) and by Brazilian agency that regulates and register medicines and foods, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Unfortunately, when compared to other foods stimulants such as coffee and ginseng number of scientific studies of guaraná proprieties published in the literature is quite small, suggesting the need for additional studies.

The guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart., Sapindaceae) seed roasted extracts has long been esteemed for its energetic and curative properties since pre Colombian times (Smith & Atroch, 2007). Previous investigations suggested several biological proprieties of guaraná including antioxidant (Mattei *et al.*, 1998; Basile et al., 2005;), antimicrobial (Basile et al., 2005; Fonseca *et al.*, 1994; Yamaguti-Sasaki *et al.*, 2007), anti-allergen (Jippo et al., 2009), antiplatelet aggregation (Haller et al., 2005; Ravi et al., 2008), anti-obesogenic (Morelli & Zoorob, 2000; Boozer et al., 2001, Berubé-Parent et al., 2002; Opala et al., 2006.), antimutagenics and anticarcinogenics (Fukumasu et al., 2006a, Fukumasu et al., 2006b, Fukumasu et al., 2008, Fukumasu et al., 2011) effects.

Studies have also described that guaraná protect against testicular damage caused by cadmium exposition (Leite et al., 2010), gastric protection action (Campos et al., 2003), memory improvement (Kennedy et al., 2004), anti-depressive action (Campos et al., 2005), anti-fatiguing and energetic proprieties (Miura et al., 1998; Sale et al., 2006; Haskell et al., 2007). On the other hand safe studies have indicated low toxicity of guaraná ingestion (Santa Maria et al., 1998; Mattei et al., 1998).

Recently, our research team described for the first time a case-control study related to habitual ingestion of guaraná (*Paullinia cupana*, Mart. Var. *sorbilis*) by an elderly population sample (n=637) residing in the Amazon Riverine region of the Maués municipality (Brazil). The study evaluated the effect of habitual guaraná ingestion on variables related to cardiometabolic functions as anthropometry, biochemical biomarkers of lipid, glycemic, and oxidative metabolism. The subjects

were classified as either those who habitually drank guaraná (GI) or those who never drank guaraná (NG) based upon their self-reported intake of guaraná. We observed that prevalence of hypertension, obesity and metabolic syndrome in the GI group was lower than the prevalence found in the NG group. Additionally, a significant association between lower levels of advanced oxidative protein product (AOPP) and habitual guaraná consumption were observed (Krewer et al., 2011).

In the popular culture the guaraná is also considered to present aphrodisiac proprieties proprieties. Antunes et al., (2001) when studied the beverage named Catuama that contain four plants in its (*Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Zingiber officinalis* and *Ptychopetalum olacoides*) showed that guaraná independent of the other plants have physiological effects on rabbit cavernosal tissue. This study suggested that guaraná would have bioactive compounds responsible for this relaxing vascular effect.

In vascular tissue the relaxant effects are modulated directly by nitric oxide (NO) action. The NO molecule is virtually produced by all cells and is implicated in many physiological processes such as neurotransmission, smooth muscle relaxation, immune regulation and host defense against microbes (Thomas et al., 2008).

Due to the fact that NO participates in such highly active metabolic and regulatory processes as hemostasis, fibrinolysis in platelets, vascular tone modulation, and blood pressure homeostasis, the potential action of guaraná on NO modulation need to be elucidated.

This molecule is highly reactive and previous investigations showed that from >10 nM to 100 nM the NO concentration have effect in several metabolic pathways (Thomas et al., 2008). Low doses (<1-30 nM) NO can mediate proliferative and protective effects (Isenberg et al., 2005) presenting pro-growth and anti-apoptotic responses where favor pathways that induces oxidative stress (< 200 nM), cell cycle arrest, senescence or apoptosis (<400 nM) (Thomas et al., 2008).

On the other hand, the NO concentrations >4 μ M generates a variety of secondary products as nitrosonium ion (NO⁺), peroxyxynitrite (ONOO⁻), nitroxyl anion (NO⁻) and nitrosothiols. These molecules, including NO interact with several biomolecules causing lipid oxidation, mitochondria and DNA damage, protein

modification and alteration in enzyme activity, ultimately leading to apoptosis (Thippeswamy et al., 2006).

As NO is a molecule that present a high degradation rate, to test the NO *in vitro* and *in vivo* effects several investigation used chemicals that potentially generate NO molecules as Sodium Nitroprusside (SNP) have been performed. SNP causes cytotoxicity via the release of cyanide and/or nitric oxide (Rauhala et al., 1998). It is known that light exposure promotes the release of NO from SNP through a photodegradation process (Arnold et al., 1984; Singh et al., 1995). Data from the literature have demonstrated that after the release of NO, SNP or $[\text{NO-Fe-(CN)}_5]^{2-}$ is converted to iron containing $[(\text{CN})_5\text{-Fe}]^{3-}$ and $[(\text{CN})_4\text{-Fe}]^{2-}$ species. After the release of NO, the iron moiety may react with SNP, which could lead to the formation of highly reactive oxygen species, such as hydroxyl radicals via the Fenton's reaction (Graf et al., 1984, Wagner et al., 2006).

To understand if the guaraná have a potential action on NO modulation we studied here the potential guaraná protective effect on cytotoxicity caused by SNP exposition using the embryonic fibroblast culture (NIH-3T3 cells) as experimental *in vitro* model.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

All chemicals used in this study were purchased from Gibco® Life Technologies Inc, Grand Island, NY, USA and Sigma® St. Louis, MO, USA

2.2 Plant Material

Paullinia cupana powder produced and supplied by EMBRAPA Oriental (Agropecuary Research Brazillian Enterprise) located Western Amazon in Maués, Amazonas-Brazil was obtained for the experiments. The guaraná powder was

conserved in dry conditions at $\pm 4^\circ\text{C}$, protected against light action until the extracts preparations.

2.3 Hydro-alcoholic guaraná extraction and bioactive compounds determination

Initially, a hydro-alcoholic extract of *Paullinia cupana* was produced due small solubility of guaraná powder from standard means of alcohol and water (70:30) to 100 mL of extraction fluid prepared at a concentration of 300 mg/mL. After 21 days of extraction the preparation was centrifuged for 3000 rpm during 10 min and the supernatant was isolated. The solution obtained was lyophilized for determination of xanthines and catechins composition as well as in experimental procedures.

The chromatographic analysis was performed on a HPLC system based in Andrews et al. (2007) with detection by UV absorbance at 272 nm consisting of a Shimadzu Prominence LC – 20A, with an LC-20AT quaternary pump, a SIL 20 auto sampler– A, a DGU-20A5 on-line degasser, a CBM-20A integrator and a SPD-20AV DAD detector. A 150 mm \times 4.6 mm i.d. ODS-3 column (Phenomenex Prodigy ODS-3 100A, 5- μm particle size; Torrance, CA, USA) was used for the separation.

The Bempong & Houghton (1992) guaraná bioactive compounds analysis was used as reference. A stock solution of caffeine (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared and stored at 5°C . Working level standards were prepared by diluting the stock solution in mobile phase at the following ratios: 200 μL to 100 mL, 400 μL to 100 mL, 2 mL to 100 mL, 4 mL to 100 mL, 8 mL to 100 mL. The least concentrated standard was designed to achieve a limit of detection of 0.005% based on a 1g sample diluted to 100 mL (LOD=0.05 mg/g). The guaraná sample extract was filtered through 0.45- μm filter into an autosampler vial for analysis. The HPLC conditions were: flow rate, 1 mL/minute; mobile phase A, 0.1 % H_3PO_4 in water; mobile phase B, 100 % ACN. The chromatographic system was calibrated with at least a five-point standard curve for each set of samples analyzed. Standards were run after every fourth sample. Excellent reproducibility was seen in the standards; typically the R value for the calibration curve was 0.9999 or better. From this analysis was found caffeine=12.240 mg/g, theobromine=6.733 mg/g and total catechins= 4.336 mg/g.

From these results we prepared the guaraná compound to add in medium culture based in Santa Maria et al. (1998) protocol. The extract obtained and lyophilized was diluted in a distilled water prepared at a concentration of 200 mg/mL. The mixture was infused for 7 min in boiling water, and centrifuged (1500 rpm, 15 min) and filtered. The solution was sterilized by filtration (0.20 μ M) before to be added in the culture medium.

2.4 Cell Line and culture conditions

Embryonic fibroblast NIH-3T3 cell line was obtained from ATCC (ATCC[®] Number: CRL-1658[™]) and maintained in DMEM supplemented with 10 % FBS and 0.1 % gentamicin, 1 % penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere.

2.5 Treatment procedure

2.5.1 Determination of culture cell SNP concentration and exposure time

Before we performed the experimental protocol, an assay to determine the concentration and the total time exposure to SNP was carried out. We tested the SNP in cell culture following concentrations, 2.5 μ M, 5 μ M and 10 μ M and the follow exposition times, 2 h, 4 h and 6 h. A total of eight replicates were made for each treatment. The cell viability frequency compared to cell culture control group was dose and time dependent (data not shown). We opted to incubate the cell culture in a high toxic SNP exposure (10 μ M SNP for 6 hours) where the cell viability presented a range from 5.584 to 9.162 % when compared to cell control group.

2.5.2 Treatment groups

The cells were distributed in 25 cm² culture flasks at initial densities of 2x10⁵ cells and maintained in the same incubation conditions until 90 % confluence. The flasks were identified according to treatment as follow: (C) sample cell culture without SNP and guaraná used as negative control, (SNP) sample with 10 µM SNP, as toxicity positive control. The groups supplemented with guaraná plus SNP were identified by concentrations of the compound added in the culture medium. Five concentrations (0.5, 1, 5, 10 and 20 mg/mL) of aqueous solution plus 10 µM SNP were added in culture medium to test the guaraná protective effect. These concentrations of *P.cupana* extracts (0.5-20 mg/mL) were selected based upon that concentrations previously reported in literature (Espinola et al., 1997; Mattei et al., 1998; Santamaria et al., 1998; Basile et al., 2005). After 6 hours incubation time, the cell viability was analyzed. Cell aliquots were harvested, counted and frozen to biochemical analysis. Additionally, cell aliquots of each treatment were separated and used to genotoxicity assay. The replicate tests ranged from three to eight according to protocol performed.

2.6 Cytotoxicity assays

Initially, we tested the protective effects of guaraná over the challenge induced by nitric oxide on NIH-3T3 embryonic fibroblasts by monitoring cell survival using MTT and Trypan blue assays. The MTT-based system is a reliable index of mitochondrial activity and thus cell viability. Briefly, the cells were harvested and seeded in octuplicates at a density of 2x10⁴ cells/well in DMEM medium. The cell suspension was shaken and then 200 µL aliquots were added to each well of 96-well tissue culture microplates. Plates were incubated 24 h at conditions described previously to cellular adherence. The next day, medium was replaced by 200 µL aliquots of the extract solutions plus SNP as follow: Control, 10 µM SNP, 0.5 mg/mL (*P. cupana* extract) plus 10 µM SNP, 1 mg/mL plus 10 µM SNP, 5 mg/mL plus 10 µM SNP, 10 mg/mL plus 10 µM SNP and 20 mg/mL plus 10 µM SNP followed by incubation for 6 hours period.

After the exposition period, cells were stained for 4 hours at 37°C with 10 µL/well MTT reagent (10 % concentration), 5 mg/mL in DPBS. At the end of this period, 100 µL/well DMSO was added to solubilize the purple formazan crystals produced. The absorbance of each well was measured at 570 nm and 630 nm with a Microplate Reader Benchmark Bio-Rad®. The results were expressed as the average percentage of concentration against control.

Trypan blue assay was performed to confirm possible alterations in cells populations. Briefly, cells ($2,5 \times 10^5$ /well) were grown for 4 days in a six well culture microplate (9,4 cm² growing area/well). After this period, the cultures were treated as follow: Control, 10 µM SNP, 0.5 mg/mL (*P. cupana extract*) plus 10 µM SNP, 1 mg/mL plus 10 µM SNP, 5 mg/mL plus 10 µM SNP, 10 mg/mL plus 10 µM SNP and 20 mg/mL plus 10 µM SNP followed by incubation for 6 hours period. After the exposition time, the cultures were trypsinized and counted in a hemocytometer.

2.7 Biochemical oxidative biomarkers analysis

We analyzed four oxidative metabolism biomarkers in the cell culture treatments: lipoperoxidation (TBARS), DNA damage (genotoxicity), superoxide dismutase activity (SOD) and catalase (CAT). Lipoperoxidation and DNA damage, frequently is consequence of oxidative imbalance caused by increase in free radicals concentrations. To evaluate the possible guarana action on antioxidant defenses we choose to analyze the SOD activity since this enzyme present a direct endogenous dismutation activity of the superoxide radical that is potentially produced by SNP treatment. Additionally, we measured the total polyphenol cell concentration in all treatments since the SNP treatment induce oxidative stress and the cell can to use the antioxidant compounds present in the culture medium to a mechanism protection against free radicals. All tests were previously standardized in a previous study performed by our research group (Montagner et al., 2010).

2.7.1 Lipoperoxidation: Thiobarbituric Acid Reative Substances assay (TBARS)

Lipid peroxidation was quantified by measuring the formation of TBARS (Ohkawa et al., 1979). The results are presented as MDA equivalents/mg protein. We used 3×10^6 cells to perform this assay.

2.7.2 Antioxidant enzymes assays

Total superoxide dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1) activity was measured spectrophotometrically according to Boveris and Cadenas (1997). One unit of activity is defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50 %. Catalase activity (EC 1.11.1.6.) was determined according to Aebi. One unit of CAT activity was defined as the activity required to degrading 1 μ M of hydrogen peroxide in 60s. Thiol groups were determined as described by Ellman. To perform each assay, we used a cell density of 3×10^6 cells.

2.8 Genotoxicity assay

Single Cell Gel Electrophoresis (Comet assay) was used to test the protection of guaraná to NIH 3T3 cells NP exposure. The assay was performed as described by Singh et al. (1995) in accordance with the general guidelines for use of the comet assay (Tice et al., 2000; Nadin et al., 2001; Hartmann et al., 2004). One hundred cells (50 cells from each of the three replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different researchers.

2.9 2,7 dihydrochlorofluorescein diacetate (DCFDA) Fluorescence assay

To confirm the potential antioxidant effect of guaraná on SNP treatment we performed an additional analysis using DCFDA assay. DCFDA is deacetylated by cytosolic esterases to dichlorofluorescein (DCFH). This nonfluorescent product is converted by RS into DCF, which can easily be visualized by strong fluorescence at around 525nm when excited at around 488 nm (Halliwell& Whiteman, 2004). We used a cell density of $2,5 \times 10^5$ cells/well in a 24 well microplate. After adherence, the cells were treated as follow: Control (C), 10 μ M SNP, 0.5, 1, 5, 10 and 20 mg/mL (*P. cupana* extract) plus 10 μ M SNP. After treatments, cells were washed and incubated with DCFDA (10 μ M) at 37°C for 40 min in dark. They were then washed twice with DPBS pH 7.4 and then the localization of the fluorescence in living cells treated with DCF was examined, using a Nikon grid-confocal microscope. The images were captured at 40X magnification using the Improvision (PerkinElmer®) software. Data were normalized to values obtained from untreated controls.

2.10 Statistical analysis

All analyses were carried out using the statistical package for social studies SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). To compare viability, biochemical oxidative metabolism variables and genotoxicity variables among treatment we performed analysis of variance followed by a *post hoc* Tukey test. The analysis of oxidative stress by DCF fluorescence was performed using the Digimizer image analysis software (MedCalc Software, Mariakerke, 2005-2009 Belgium) from evaluation of measure average intensity of cells (pixels units). At least 30 cells for each treatment was analyzed and the fluorescence intensity observed were compared using one way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Tukey test. To support the statistical parametric tested used here the data were log transformed. The results were presented in mean \pm standard error (SE). All p values were two-tailed. The alpha value considered to be statistically significant was $p = 0.05$.

3 Results

3.1 Guaraná effect on SNP cytotoxicity

The cytotoxicity MTT and Trypan blue assays showed a protective guaraná effect on cells exposed to SNP ($F=159.36$, $p=0.0001$). As can see in Figure 1, the MTT assay showed that at concentrations 0.5, 1.0, 5.0 and 10 mg/mL plus 10 μ M SNP the guarana restored cell viability to levels similar to control group. However, at 20 mg/mL guaraná concentration was observed an intermediary viability between negative (without SNP) and positive (10 μ M SNP) groups.

Figure 1 here

Trypan blue assay presented similar protective results observed in MTT assay. However, in this test the frequency of cell viability in 20 mg/mL was also similar in to observed in negative control group. The cell viability frequency were respectively: SNP=7 %, 0.5 mg/mL=101 %, 1.0 mg/mL=100 %, 5.0 mg/mL=98 %, 10.0 mg/mL=92.8 % and 20.0 mg/mL=82 % ($F=86.74$, $p= 0.0001$).

3.2 Guaraná effect on SNP lipid peroxidation and antioxidant enzymes levels

The lipid peroxidation evaluated by TBARS bioassay showed a significant association with cell treatments ($F=209.32$, $p<0.0001$). As can see in Figure 2 the 10 μ M SNP exposition doubled the level of lipid peroxidation when compared with the control group. The 0.5 mg/mL guaraná plus 10 μ M SNP also present significant increase in lipid peroxidation when compared to control group. Nevertheless, this treatment still decreased the lipid peroxidation when compared to 10 μ M SNP treatment ($F=35.78$, $p<0.001$). The other guaraná treatments reduced the lipid peroxidation to levels lower than that observed in the control group. The treatment

with 20 mg/mL guaraná plus 10 μ M SNP was shown that the lowest peroxidation levels when compared with other treatments.

The CAT activity observed in control group was 1.59 ± 0.08 μ mol/min/mg protein. However, in the presence of 10 μ M SNP without or with guaraná supplementation the catalase activity was completely inhibited. For this reason the statistical analysis to compare the treatment groups was not performed.

The treatment with 10 μ M SNP as well as the all treatments with guaraná addition showed higher SOD activity than the control group (Figure 2). The analysis of SOD activity showed that 10 μ M SNP increased significantly the level of its enzyme when compared to control group. The treatments with 0.5, 1 and 5 mg had the highest levels of SOD activity. The treatments with higher guaraná concentrations (10 and 20 mg/mL) presented SOD activity similar observed in cells treated just with 10 μ M SNP.

Figure 2 here

3.3 Guaraná effect on SNP genotoxicity

The genotoxicity was evaluated from comet assay under alkaline conditions. Table 1 shows the comet class and DNA damage index (Table 1). In presence of 10 μ M SNP all nucleus analyzed presented some DNA damage. The statistic comparison among treatments showed that lower guaraná concentrations (0.5 and 1.0 mg/dL) reverted the genotoxicity caused by 10 μ M SNP, since the mean of DNA damage index was similar to no treated control group. On the other hand, guaraná concentrations from 5 to 20 mg/mL presented a DNA damage index similar to 10 μ M SNP treatment indicating no genoprotective effect.

3.3 Guaraná effect on SNP cell oxidative stress evaluated by DCF Fluorescence assay

The average intensity of cells fluorescence was compared among treatments. We observed significant differences among treatments ($F=22.41$, $p<0.001$). As can see in Figure 3 cells treated with 10 μ M SNP showed higher oxidative stress when

compared to no treated control group. The guaraná supplementation decreased the oxidative stress until 5 mg/mL. We did not observe significant difference in fluorescence intensity among this treatments and the control cell group. However, the highest guaraná concentration (20 mg/mL) did not protect the cells from the oxidative stress caused by 10 μ M SNP exposition since the fluorescence intensity was similar to 10 μ M SNP group no guaraná supplemented.

Figure 3 here

4 Discussion

Our study demonstrates, for the first time, that guaraná extract presents *in vitro* protective effects against cytotoxicity and oxidative stress on NIH-3T3 embryonic fibroblasts cells caused by SNP exposure. However, these effects were dependent of guaraná concentration being the most effective extract concentrations ranging from 0.5 to 5 mg/mL.

These results suggest that guaraná has *in vitro* bioactive action on NO modulation since the SNP is *in situ* NO donor (Friederich & Butterworth, 1995). In biological systems the SNP decomposes to generate NO that is a free radical with an unpaired electron. Although low concentrations of NO may induce direct effects that lead physiological and regulatory responses, however, the increase of NO concentrations is not beneficial and may induce negative effects as oxidation, nitration, and nitrosation of target molecules. NO reacts with superoxide anion to generate peroxynitrite. Peroxynitrite is highly reactive molecule that causes damage to proteins and DNA (Reid & Durham, 2002). In some pathological conditions as chronic inflammation, stroke, diabetes, inflammation, neurodegeneration, cancer occur peroxynitrite generation related mainly from increase in NO levels (Ahmad et al., 2009, Martínez & Andriantsitohaina, 2009). In these terms, it is important to identify foods that have some action on NO or RNS compounds generated by excess of NO concentration in the organism and its mechanism action (Halliwell, 2006 and 2008; Lambert & Joshua., 2010).

From the results described here we believe that guaraná could present an antioxidant effect on NO generated from SNP or on peroxynitrite produced by excess of NO that reacts with superoxide ion that is continuously generated by mitochondrial respiratory machinery. The potential guaraná antioxidant function could explain the decrease in cell death caused by exposure to SNP in cells which were supplemented with guaraná. In both cell viability analyses performed here (MTT and trypan blue assays) we observed that guaraná after six hours of exposure to SNP from 0.5 to 10 mg/mL concentrations restored the viability to similar percentages observed in no treated control cell. However, the higher guaraná concentration tested here (20 mg/mL) presented an intermediary effect on viability from no treated control cell and cell SNP exposed. This results indicate that the “chemical protection provided by guaraná” is dependent of balance among its bioactive compounds and other oxidation or biological products present in the cells. Accordingly an increase greater than that required in the amount of antioxidant compounds can lead to an imbalance that is not beneficial to the cell.

In fact, evidences suggests that NO and peroxynitrite have many consequences on cell function, including cell death (Green and Kroemer, 2004). *In vitro* and *in vivo* studies described that high concentrations of NO, generated by donor drugs or by iNOS gene transfer caused extensive cell death (Thomas et al., 2008).

Peroxynitrite initiates diverse reactions leading eventually to disrupted cell signaling, cell death, and apoptosis. Evidences have suggested that low concentrations of peroxynitrite trigger apoptotic cell death, while higher concentrations induce necrosis (Thomas et al., 2008; Hill et al., 2010).

The peroxynitrite present a multiple cytotoxicity pathways that can induce cell death: Initiation of lipid peroxidation, direct inhibition of mitochondrial respiratory chain enzymes, inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, inhibition of membrane Na(+)/K(+) ATP-ase activity, inactivation of membrane sodium channels, and other oxidative protein modifications contribute to the cytotoxic effect of peroxynitrite. In addition, peroxynitrite is a potent trigger of DNA strand breakage. A DNA nick sensor enzyme, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) also becomes activated upon sensing DNA breakage (Cowell & Russell, 2004).

Activated PARP-1 cleaves NAD(+) into nicotinamide and ADP-ribose and polymerizes the latter on nuclear acceptor proteins. Peroxynitrite-induced overactivation of PARP consumes NAD(+) and consequently ATP culminating in cell dysfunction, apoptosis or necrosis (Szabo, 2003).

Since we use a fairly high concentration of SNP that induces a mortality rate above 90% in six hours of exposure, the protective effects of guaraná, in this period probably are related to necrotic cellular events. However, investigations to determine the protective nature of guaraná (in apoptotic or necrotic cellular events) need to be conducted.

Although this study did not address the question of which mechanism of cell death (apoptosis or necrosis) is inhibited by guaraná in low concentrations. Additional biochemical and cytological analysis performed here indicated that the guaraná protection is related to differential modulation of cell oxidative stress indicators. From 1 mg/mL concentration of guaraná in cell medium we observed a significant reduction on lipid peroxidation even in the presence of SNP. These results reinforce the idea that guaraná act directly on peroxynitrite molecule since this compound is directly related to lipid peroxidation process. Peroxynitrite is a key contributor to oxidative damage, mainly because its highly reactive decomposition produces nitrogen dioxide ($\cdot\text{NO}_2$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and carbonate radical ($\text{CO}_3^{\cdot-}$). The peroxynitrite derived radicals can oxidise proteins, nitrate tyrosine residues and induce cell membrane lipid peroxidation (Denicola & Radi, 2005).

A very interesting result was found in the SOD. When we compared no treated cell (control group) and cells treated just with SNP, we observed increase in SOD levels in presence of SNP exposition. However, in the presence of guaraná supplementation the SOD levels increased more. Since cyanide is a selective inhibitor of Cu/Zn SOD enzyme the results indicate increase in SOD2 enzyme activity that did not present sensibility to cyanide.

SOD is one of the primary cellular antioxidants enzyme that catalyses the conversion of superoxide (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2), which can then be removed by catalase (CAT), glutathione peroxidase or peroxiredoxins (Emerit et al., 1994, Halliwell, 2006). Since a higher level of NO generated from SNP can increase the peroxynitrite production from the reaction of NO with superoxide ion, the increase

of SOD concentration in the cells treated just with SNP could indicate a cellular response in order to reduce the the availability of superoxide and thereby decrease the production of peroxynitrite.

Evidences have showed that NO can activate redox sensitive pathways that in many cases results in an increase of antioxidant potential of the cell. However, the direct effects of nitric oxide on the activity of principal antioxidant enzymes such as catalase and superoxide dismutase (SOD) are not well studied. However, a previous study performed by Lushchak and Lushchak (2009) that used yeast as experimental model described that NO spontaneously generated at SNP decomposition increased the activity SOD. These results agree with our findings described here. However, the authors also found increase in catalase levels from yeast exposed to SNP, at contrary we observed in our study.

These differences could be associated to the great catalase structure diversity in the organisms or differences in protocol treatment related to SNP of concentration and time of exposition. We hypothesized that the main reason to catalase inhibition observed in our protocol could to be related to cyanide effect that is also produced from SNP decomposition. Cyanide is a competitive inhibitor of catalase, strongly binding to the haeme group of catalase and stopping the enzyme's action (Chelikani et al., 2004). In this case, guaraná can not reverse this inhibitory reaction in the cells investigated here.

The antioxidant protective effect of guaraná on embryonic fibroblast cells studied here was also observed from DCF fluorescence analysis and genotoxicity analysis using DNA Comet assay. These analyses confirm that guaraná can to restore some oxidative cell damage after SNP exposure. However, the guaraná protective effect on oxidative stress observed from DCF fluorescence was in guaraná concentration < 10 mg/mL whereas genotoxicity protection from SNP exposure was found just in lower guaraná concentrations < 5 mg/mL. These data reinforced the idea that there is a higher amount of product that increases their antioxidant efficiency but dependent of balance among other antioxidant and oxidative compounds present into the cell. Taking to account these results we can estimate that the guaraná doses most effective in protecting the cell against the oxidative effects of SNP are going from 1 to 5 mg/mL.

Probably the antioxidant protective effect of guaraná on cells exposed to high levels of SNP molecules derivatives as NO and cyanide, as well as peroxynitrite generated from NO, was due to the high content of polyphenolic class compounds (Basile et al., 2005; Yamaguti-Sasaki et al., 2007; Halliwell, 2008; Lambert&Elias, 2010) and the methyl xanthines content (Azam et al., 2003).

Guaraná is rich in methylxanthines such as caffeine, theobromine, and theophylline, and contains tannins, saponins, catechins, epicatechins, proanthocyanidols, as well as trace concentrations of many other compounds (Belinardo et al., 1985). A study of the guaraná transcriptome performed by Angelo et al. (2008) revealed the presence of important secondary compounds in this plant, including transcript sequences related to flavonoid metabolism. The results described in the study suggested that guaraná exhibits similarities to *Camelia sinensis* (green and black tea), a plant that has been shown to have several interesting functional properties (Babu and Liu, 2008). It is found that green tea and black tea are able to protect against NO toxicity in several ways including NO and peroxynitrite scavenge (Paquay et al., 2000; Steffen et al., 2005).

The flavonoids present in these foods including guaraná, scavenge the precursors of peroxynitrite, that is, the superoxide anion radical (Bixby et al., 2005; Sato et al., 2010,) and the nitric oxide radical (Haenen and Bast, 1999). Moreover, the flavonoids present in several foods are efficient scavengers of peroxynitrite itself (Haenen et al., 1997).

The effect of polyphenol compounds present in green and black tea as well as guaraná as epigallocatechin-3-gallate (EGCG) showed that this molecule have an important action on toxic effects caused by peroxynitrite. A study performed in Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient fibroblasts that are more susceptible to peroxynitrite-induced cytotoxicity showed that the pretreatment with green tea polyphenol effectively blocked peroxynitrite-induced glutathione depletion, p53 accumulation, and apoptosis in both normal and G6PD-deficient cells. The findings described in the study suggested that G6PD deficiency enhances the toxicity of peroxynitrite and that EGCG initiates cell survival signaling via the PI3K/akt pathway (Ho et al., 2006).

Other molecule that could to be bioactive effect on oxidative metabolism is the caffeine. Caffeine is the psychoactive substance most widely consumed in the world, it is found not only in coffee but also in tea, carbonated beverages or soft drinks, chocolate, and a wide variety of medications, including appetite suppressants, diuretics, analgesics, and decongestants; the majority of which are sold over the counter and do not have a regulatory control (Echeveri et al., 2010). Caffeine is metabolized into more than 25 metabolites in humans, mainly Paraxanthine, Theobromine, and Theophylline.

Epidemiologic studies observed that intake of caffeine are associated with reduced levels of biomarkers of oxidative stress (Grucka-Mamczar et al., 2009). Caffeine has been reported as a protective substance against cellular damage with beneficial antioxidant effects; probably due to the main metabolites of caffeine, 1-methylxanthine and methyluric acid, that are highly effective antioxidants (Ofluoglu et al., 2009).

In a recent study performed by Inkielewicz-Stepniak and Czarnowski (2010) was investigated if the 1-month of caffeine and fluoride treatments administered separately and together have some effect on nitric oxide and total antioxidant status in serum, brain, liver and kidney of rats. The applied fluoride caused increase of NO, intensifying this way, lipid peroxidation and decreased total antioxidant status in serum brain, kidney and liver. However, the caffeine administered as an antioxidant, was relatively efficient in alleviating these adverse effects. Additionally the authors observed that caffeine treatment without fluoride presence increased the level of total antioxidant status in the investigated tissues and serum when compared to non treated control group. From the results described by Inkielewicz-Stepniak and Czarnowski (2010) and for the results found here we can suggest that caffeine present in higher concentrations in guaraná extract could to contribute in antioxidant effect observed in cells SNP exposed. However, additional investigation to evaluate the specific role of caffeine, other xantines and catechins present in guaraná on oxidative stress caused by SNP exposition need to be performed.

At last, it is important to comment that when we design the experimental protocol one pertinent question was related to potential solvent to dilute the guaraná extract. Some studies using compounds as Tween 80 (Mattei et al., 1998) to dilute

the guaraná before addition in culture medium. However, we choose to conduct all experiments with extracts prepared in the way they are usually brewed and drunk as described previously by Santa Maria et al. (1998) study since we believe this dilution is more realistic to human food beverage consumption rich in caffeine and catechins as green/black tea and coffee.

In conclusion, our data support that guaraná have antioxidant effect on NO metabolism mainly in situation that occur increase in the cellular NO levels. This biological effect may be a possible explanation to the lower prevalence of diseases in elderly who habitually consume guaraná when compared to elderly that not consume this food as obesity and metabolic syndrome described previously by Krewer et al. (2011).

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) of Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The authors would like to express their gratefulness to Adilson Bittencourt, Ricardo Zalewsky and all research team of Laboratory of Biogenomics (UFSM) that helped in the laboratorial analysis.

References

Ahmad, R., Rasheed, Z., & Ahsan, H. (2009). Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacology Immunotoxicology*, *31* (3), 388-96.

Angelo, P. C., Nunes-Silva, C. G., Brígido, M. M., Azevedo, J. S., Assunção, E. N., Sousa A. R., Patrício, F. J., Rego, M. M., Peixoto, J. C., Oliveira, W. P Jr., Freitas, D. V., Almeida, E. R., Viana, A. M., Souza, A. F., Andrade, E. V., Acosta, P. O., Batista, J. S., Walter, M. E., Leomil, L., Anjos, D. A., Coimbra, R. C., Barbosa, M. H., Honda, E., Pereira, S. S., Silva, A., Pereira, J. O., Silva, M. L., Marins, M., Holanda, F. J., Abreu, R. M., Pando, S. C., Gonçalves, J. F., Carvalho, M. L., Leal-Mesquita, E. R., da Silveira M. A., Batista, W. C., Atroch, A. L., França, S. C., Porto, J. I., Schneider, M. P., Astolfi-Filho, S.; Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research (REALGENE). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. (2008). *Plant Cell Reports*, *27* (1), 117-24.

Antunes, E., Gordo, W. M., de Oliveira, J. F., Teixeira, C. E., Hyslop, S., De Nucci, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. (2001). *Phytotherapy research*, *15* (5), 416-21.

Arnold, W. P., Longnecker, D. E., & Epstein, R. M. (1984). Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. *Anesthesiology*, *61*, 254–260.

Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., Hadi, S. M. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor*, *9*, 325-330.

Babu, P. V., Liu, D. (2008). Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 15 (18), 1840-50.

Basile, A., Ferrara, L., Pezzo, M. D., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montesano, D., (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 (1), 32-6.

Bellinardo, F., Martelli, A., & Valle, M. G. (1985). HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola* spp. samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 5, 398–401.

Bempong, D. K., & Houghton, P. J. (1992). Dissolution and absorption of caffeine from guarana. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44 (9), 769–771.

Berube-parent, S., Pelletier, C., Dore, J., Tremblay, A. (2005). Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *Brazilian Journal of Nutrition*, 94 (3), 432-6.

Bixby, M., Spieler, L., Menini, T., Gugliucci, A. (2005). *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Science*, 77, 345–358.

Boozer, C. N., Nasser, J. A., Heymsfield, S. B., Wang, V., Chen, G., Solomon, J. L. (2001). An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25 (3), 316-24.

Boveris, A., & Cadenas, E. (1997). Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch, L, Massaro, D. Oxygen, gene expression and cellular function. *Marcel Decker*, 105, 1-25.

Campos, A. R., Barros, A. I., Albuquerque, F. A., M Leal, L. K, Rao, V. S. (2005). Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. *Phytother Research*, 19 (5), 441-3.

Campos, A. R., Barros, A. I., Santos, F. A., Rao, V. S. (2003). Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. *Phytotherapy Research*, 17 (10), 1199-202.

Chelikani, P., Fita, I & Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61. 192-208.

Costa, K. C., Ribeiro, E. E., Ribeiro, E. A., Moresco, R. N., Ugalde Marques da Rocha, M. I., Santos Montagner, G. F., Machado, M. M., Viegas, K., Brito, E., Cruz. I. B. (2011). Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytotherapy Research*. Feb 22. doi: 10.1002/ptr.3437. [Epub ahead of print].

Cowell, R., & Russell, J. (2004). Nitrosative injury and antioxidant therapy in the management of diabetic neuropathy. *Journal of Investigative Medicine*, 52, 33–44.

Denicola, A., Radi, R. (2005). Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology*, 208 (2), 273-88.

Ducan, E., Patel, N. D. & Feucht, C. (2010). Energy drinks: a review of use and safety for athletes. *Physician and Sportsmedicine*, 38 (2). 171-9.

Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., Prieto, A. (2010). Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. *International Journal of Vascular Medicine*, 2010, 834060.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulphydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 589, 70-77.

Emerit, I., (1994). Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 99-109.

Espinola, E. B., Dias, R. F., Mattei, R., Carlini, E, A. (1998). Pharmacological activity of Guarana (Paullinia cupana Mart.) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 55 (3), 223-9.

Fonseca, C. A., Leal, J., Costa, S. S., Leitão, A. C. (1994). Genotoxic and mutagenic effects of guarana (Paullinia cupana) in prokaryotic organisms. *Mutation Reserach*, 321 (3),165-73.

Friederich, J. A & Butterworth, J. F IV. (1995). Sodium nitroprusside: Twenty years and counting. *Anesthesia and Analgesia*, 81 (1), 152–162.

Fukumasu, H., Avanzo, J. L., Heidor, R., Silva, T. C., Atroch, A., Moreno F. S., Dagli, M. L. (2006). Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (6), 862-7.

Fukumasu, H., Avanzo, J. L., Nagamine, M. K., Barbuto, J. A., Rao, K. V., Dagli, M. L. (2008). Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(4), 305-10.

Fukumasu, H., Latorre, A. O. & Zaidan-Dagli, M. L. (2011). Paullinia cupana Mart. var. sorbilis, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. *Phytotherapy Research*, 25 (1), 11-6.

Fukumasu. H., DA Silva, T. C., Avanzo, J. L., DE Lima, C. E., Mackowiak, I. I., Atroch, A., DE Souza Spinosa, H., Moreno, F. S., Dagli, M. L. (2006).

Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*, 233 (1), 158-64.

Geen, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626–9.

Graf, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G., Eaton, J. W. (1984). Iron catalyzed hydroxyl radical formation: stringent requirement for free iron coordination site. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 3620–3624.

Grucka-Mamczar, E., Zalejska-Fiolka, J., Chlubek, D., Kasperczyk, S., Błaszczyk, U., Haenen, G. R., & Bast, A. (1999). Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods in Enzymology*, 301, 490-503.

Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E., Bast, A. (1997). Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236 (3), 591-3.

Haller, C. A., Jacob, P., Benowitz, N. L. (2005). Short-term metabolic and hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 77 (6), 560-71.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344, 721–724.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141 (2), 312-22.

Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476 (2), 107-12.

Halliwell, B., & Whitemann, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brazilian Journal of Pharmacology*, *142*, 231-255.

Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L. (2004). Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, *19* (1), 51-9.

Haskell, C. F., Kennedy, D. O., Wesnes, K. A., Milne, A. L., Scholey, A. B. (2007). A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. *Psychopharmacology*, *21*(1), 65-70.

Hill, B. G., Dranka, B. P., Bailey, S. M., Lancaster Jr, J. R., Darley-Usmar, J. R. (2010). What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *Journal of Biological Chemistry*, *285* (26), 19699-19704.

Ho, H. Y., Wei, T. T., Cheng, M. L., Chiu, D. T. (2006). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects cells against peroxynitrite-induced cytotoxicity: modulatory effect of cellular G6PD status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54* (5), 1638-4.

Inkielewicz-Stepniak, I., Czarnowski, W. (2010). Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(6), 1607-11.

Jippo, T., Kobayashi, Y., Sato, H., Hattori, A., Takeuchi, H., Sugimoto, K., Shigekawa, M. (2009). Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous anaphylaxis and mast cell degranulation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *273* (9), 2110-2.

Kasperczyk, A., Świętochowska, E., & Birkner, E. (2009). The influence of sodium fluoride and caffeine on the activity of antioxidative enzymes and the concentration of malondialdehyde in rat liver, *Fluoride* 42, 105–109.

Kennedy, D. O., Haskell, C. F., Wesnes, K. A., Scholey, A. B. (2004). Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (Paullinia cupana) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 79 (3), 401-11.

Lambert, J. D., & Elias, R. J., (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 501 (1), 65-72.

Leite, R. P., Wada, R. S., Monteiro, J. C., Predes, F. S., Dolder, H. (2010). Protective Effect of Guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis) Pre-treatment on Cadmium-Induced Damages in Adult Wistar Testis. *Biological Trace Element Research*. May 22. [Epub ahead of print].

Lushchak, O. V & Lushchak, V. I. (2009). Possible pathways involved in activation of catalase and superoxide dismutase with sodium nitroprusside in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ukr Biokhim Zh*, 81 (2), 34-9.

Martínez, M. C & Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (3), 669-702.

Mattei, R., Dias, R. F., Espínola, E. B., Carlini, E. A., Barros, S. B. (1998). Guarana (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *Journal Ethnopharmacology*, 60 (2), 111-6.]

- Miura, T., Tatara, M., Nakamura, K., Suzuki, I. (1998). Effect of guarana on exercise in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21 (6), 646-8.
- Montagner, G. F. F., Sangrillo, M., Almeida, R. C., Machado, M. M., Mostardeiro, C. P., Duarte, M. F. F., Manica-Cattani, M. F., Algarve, T. D., da Rocha, M. I. M. U., da Cruz, I. B. M. (2010). Manganese Superoxide Dismutase V16A Gene Polymorphism in lymphocyte culture cells response to ultraviolet radiation exposition. *Toxicology in vitro*, 24 (5), 1410-6.
- Morelli, V., & Zoorob, R. J. Alternative therapies: Part I. Depression, diabetes, obesity. 2000. *American Family Physician*, 62 (5), 1051-60.
- Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M., & Ciocca, D. R. (2001). A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49 (9), 1183-6.
- Ofluoglu, E. H., Pasaoglu, H., & Pasaoglu, A. (2009). The effects of caffeine on L-arginine metabolism in the brain of rats. *Neurochemistry Research*, 34, 395–399.
- Ohkawa, H., Ohishi, H & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Opala, T., Rzymiski, P., Pischel, I., Wilczak, M., Wozniak, J. (2006). Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Medical Research*, 11 (8), 343-50.
- Paquay, J. B., Haenen, G. R., Stender, G., Wiseman, S. A., Tijburg, L. B., Bast, A., (2000). Protection against nitric oxide toxicity by tea. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48 (11), 5768-72.

Rauhala, P., Khaldil, A., Mohanakumar, K.P., Chiueh, C.C. (1998). Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1065–1073.

Ravi Subbiah, M. T., & Yunker, R. (2008). Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78 (2), 96-101.

Reid, M. B & Durham, W. J. (2002). Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging. *Annals of New York Academy of Sciences*, 959, 108–116.

Sabiz, M & Skaladanowski. (2009). Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: Implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle*, 8 (19), 3208-3216.

Sale, C., Harris, R. C., Delves, S., Corbett, J. (2006). Metabolic and physiological effects of ingesting extracts of bitter orange, green tea and guarana at rest and during treadmill walking in overweight males. *International Journal of Obesity*, 30 (5), 764-73.

Santamaria, A., Lopez, A., Diaz, M. M., Muñoz-Mingarro, D., Pozuelo, J. M. (1998). Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39 (3), 164-7.

Sato, M., Toyazaki, H., Yoshioka, Y., Yokoi, N., Yamasaki, T. (2010). Structural characteristics for superoxide anion radical scavenging and productive activities of green tea polyphenols including proanthocyanidin dimers. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58 (1), 98-102.

Singh, R. J., Hogg, N., Neese, F., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (1995). Trapping of nitric oxide formed during photolysis of sodium nitroprusside in aqueous and lipid

phases: an electron spin resonance study. *Photochemistry and Photobiology*, *61*, 325–330.

Smith, N., & Atroch, A. L. (2007). Guarana's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *7* (3), 279-282.

Steffen, Y., Schewe, T., & Sies, H. (2005). Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *331*, 1277–1283.

Szabo, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters*, *11*, 140-141:105-12.

Thippeswamy, T., McKay, J. S., Quinn, J. P., Morris, R. (2006). Nitric oxide, a biological doublefaced janus-is this good or bad? *Histology and Histopathology*, *21*, 445-58.

Thomas, D. D., Ridnour, L. A., Isemberg, J. S., Flores-Santana, W., Switzer, C. H., Donzellie, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambis, S., Colton, C., Harris, C., Roberts, D.D., Wink, D.A. 2008. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Implications in Cellular Signalling. *Free Radical in Biology and Medicine*, *45* (1), 18–31.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *35* (3), 206-21.

Wagner, C., Fachinetto, R., Dalla Corte, L.C., Brito, B.V., Severo, D., Dias, C.O.G., Morel, F.A., Nogueira, C.W., 2006. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Research*, *1107* (1), 192-8.

Yamaguti-Sasaki, E., Ito, L. A., Canteli, V. C., Ushirobira, T. M., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., de Mello, J. C. (2007). Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules*, 12 (8),1950-63.

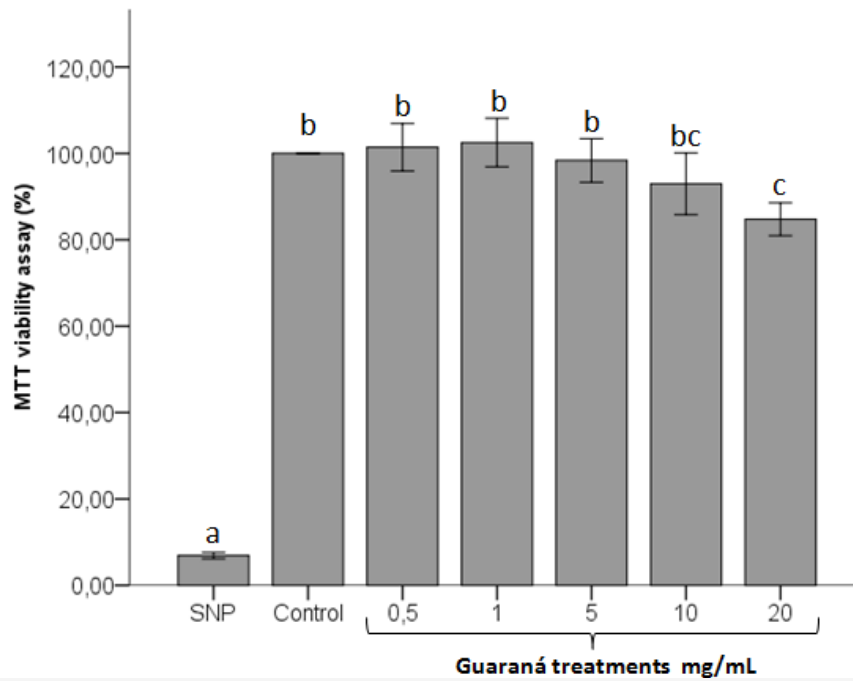


Figure 1. The reduction of MTT in NIH 3T3 cells measured after 6h of co-incubation with different concentrations of guaraná extracts and 10 μ M SNP. Data are presented as mean values \pm standard error (SE) from independent experiments made in octuplicate. Different letters indicated statistical differences between treatments, SNP and control groups by Anova One way analyses followed by Tukey post hoc test at $p < 0.05$.

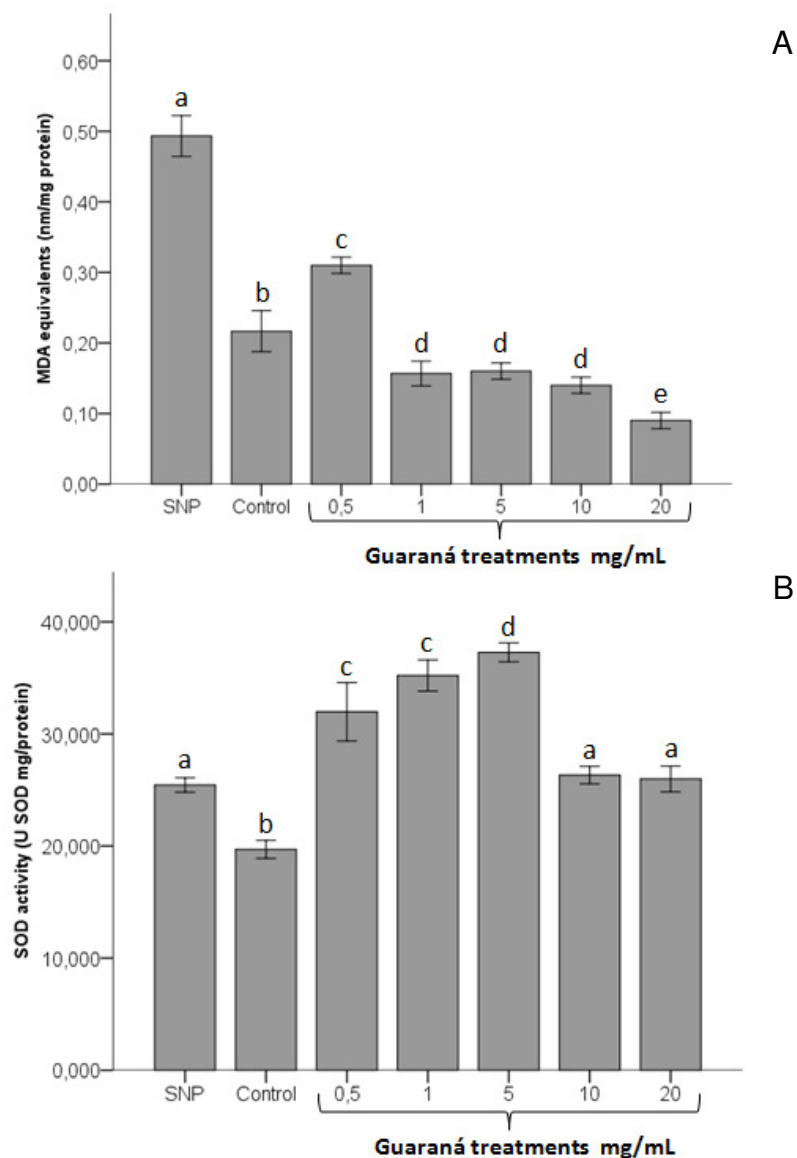


Figure 2. Effect of different guaraná concentrations plus 10 μ M SNP induced TBARS production and SOD activity in NIH 3T3 cells homogenates in comparison to control cultures and 10 μ M SNP cultures. Data show means \pm SE values of independent experiments performed in triplicate.

In A and B, different letters indicated statistical differences by Anova One way analyses followed by Tukey post hoc test at $p < 0.05$.

Table 1. DNA migration in the comet assay for the genotoxicity assessment of embryonic fibroblast NIH-3T3 cell line cultures exposure to 10 μ M SNP with and without guaraná extract (*Paullinia cupana*) supplementation.

| Treatments | Comet Class frequency (Mean \pm SE /100 nucleus analyzed) | | | | | Index damage |
|-----------------|--|--------------|------------|-------------|--------------|------------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Control | 52 \pm 2 | 26 \pm 1 | 11 \pm 2 | 9 \pm 0.6 | 2 \pm 0.01 | 0.47 \pm 0.02 ^a |
| 10 μ M SNP | 0 | 1 \pm 0.7 | 7 \pm 1 | 63 \pm 2 | 29 \pm 2 | 1 \pm 0.0 ^a |
| Guaraná (mg/mL) | | | | | | |
| 0.5 | 47 \pm 4 | 12 \pm 2 | 8 \pm 3 | 13 \pm 3 | 19 \pm 2 | 0.53 \pm 0.14 ^a |
| 1.0 | 60 \pm 3 | 13 \pm 0.6 | 7 \pm 2 | 10 \pm 2 | 9 \pm 3 | 0.39 \pm 0.13 ^a |
| 5.0 | 14 \pm 1 | 13 \pm 1 | 16 \pm 1 | 59 \pm 2 | 8 \pm 1 | 0.86 \pm 0.11 ^b |
| 10.0 | 8 \pm 2 | 18 \pm 2 | 20 \pm 1 | 39 \pm 3 | 11 \pm 2 | 0.88 \pm 0.08 ^b |
| 20.0 | 13 \pm 1 | 10 \pm 1 | 16 \pm 3 | 51 \pm 4 | 10 \pm 1 | 0.87 \pm 0.02 ^b |

SE= standard error; Index damage: $\Sigma(1,2,3,4 \text{ comet class})/100$. Different letters mean statistical differences among control group, 10 μ M SNP group and 10 μ M SNP plus guaraná treatments using Anova One-way analysis of variance followed by Duncan test. 0= nucleus without DNA damage.

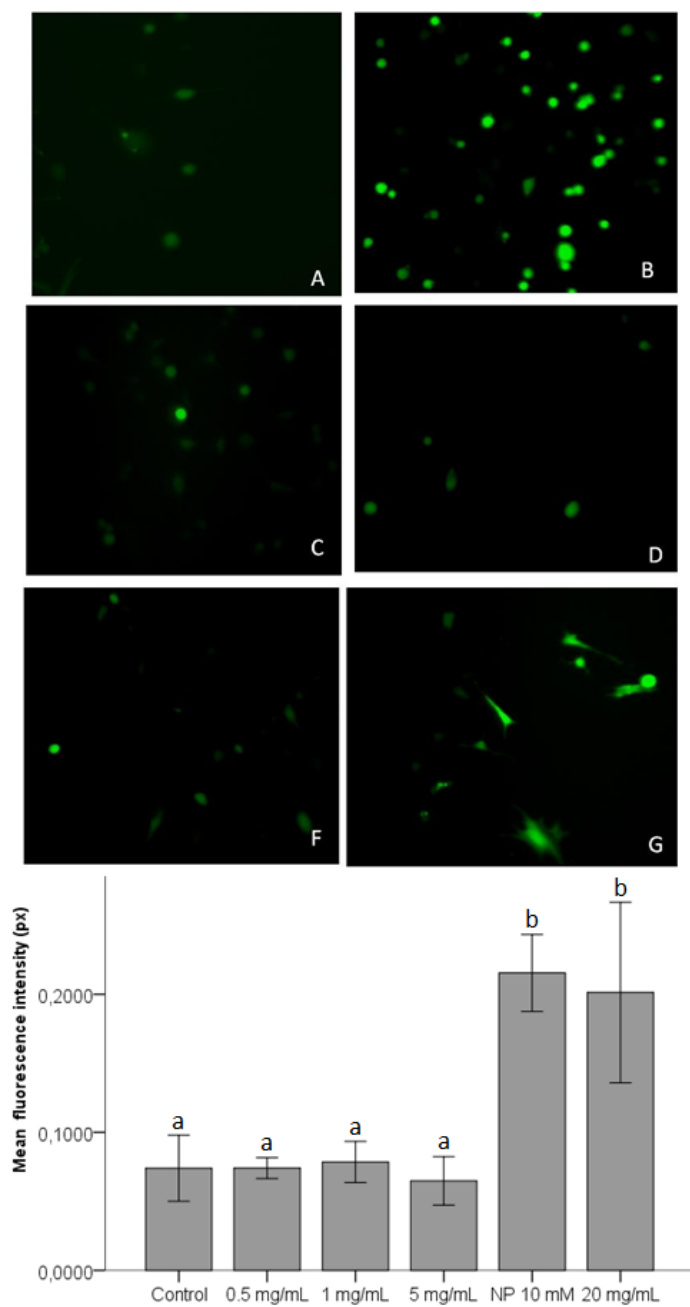


Figure 3. Effect of different guaraná concentrations plus 10µM SNP on ROS production through the measurement of DCF fluorescence intensity in NIH 3T3 living cells in comparison to control cultures and 10µM SNP cultures. Data show means \pm SE values of fluorescence intensity measured of at least 30 cells.

Different letters indicated statistical differences between treatments, SNP and control groups by Anova One way analyses followed by Tukey post hoc test at $p < 0.05$.

A – control, B – 10µM SNP, C – 0.5mg/mL, D – 1mg/mL, E – 5mg/mL, D – 20 mg/mL.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu efeito de extrato aquoso do guaraná em diferentes concentrações na toxicidade induzida pelo NO[•] e outros compostos produzidos a partir da decomposição do NPS. Os resultados sugeriram uma atividade protetora *in vitro* do guaraná contra a citotoxicidade e estresse oxidativo em células embrionárias da linhagem NIH 3T3.

A partir da revisão da literatura indexada no Medline e Scielo não foi encontrado estudo similar em relação aos efeitos do guaraná a exposição do NPS em linhagem embrionária de fibroblasto NIH 3T3. Portanto, considera-se que estes são os primeiros resultados descritos sobre o tema.

Algumas considerações se fazem necessárias para melhor interpretar os resultados obtidos. A primeira delas versa sobre questões metodológicas associadas ao estudo, como é o caso do tipo de solvente utilizado nos testes realizados. Estudos prévios têm utilizado tanto a dissolução de extratos cru ou semi-purificados do guaraná em água (aquecida como ocorre com o café e o chá) ou em outros solventes como o Tween 20 (MATTEI et al.,1998). Entretanto, para a condução do presente estudo escolheu-se diluir o guaraná em água destilada já que o guaraná é rotineiramente ingerido desta forma, mesmo que no caso do extrato cru, a solubilidade seja muito baixa. Entretanto, no extrato semi-purificado utilizado no estudo este problema foi contornado pelo aquecimento da água como feito por Santa Maria e colaboradores(1998). Acredita-se que esta forma seria a mais próxima da realidade já que não ocorreria efeito adicional dos solventes, e assim poderiam ser obtidas conclusões bioquímicas e fisiologicamente relevantes.

As demais considerações dizem respeito aos resultados obtidos. Inicialmente, foram avaliados os efeitos protetores do guaraná relacionados à citotoxicidade induzida pelo NPS através da avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos NIH 3T3. Os resultados mostraram um aumento na viabilidade celular de células expostas ao NPS e também suplementadas com guaraná sugerindo efeito protetor do extrato. Entretanto, tal efeito não foi dependente da concentração já que

concentrações mais elevadas de guaraná (>10 μM) não apresentaram proteção à mortalidade celular desencadeada pelo NPS.

Sabe-se que a alta produção de espécies reativas e radicalares induzida pela alta concentração de óxido nítrico gerado através da decomposição do NPS, causa estresse oxidativo e nitrosativo (efeitos indiretos do óxido nítrico) (HALLIWELL, 2006; THOMAS et al., 2008). Isto ocorre, principalmente através da formação de peroxinitrito, nitritos e nitratos (THOMAS et al., 2008), aumentando, por consequência a peroxidação lipídica, dano ao DNA e oxidação de proteínas. Esses eventos tóxicos têm como consequência a injúria das células indutoras de apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2006, HALLIWELL, 2008). De fato, tem sido relatado na literatura que baixas concentrações de peroxinitrito desencadeiam eventos relacionados à morte celular por apoptose, enquanto altas concentrações induzem necrose. (BIXBY et al., 2005; THOMAS et al., 2008; HILL et al., 2010).

Por outro lado, o NO^{\bullet} em concentrações fisiologicamente controladas é uma molécula importante para a homeostase corporal de diversos sistemas, em especial o cardiovascular. Isto porque o NO^{\bullet} apesar de ter alguns aspectos semelhantes ao superóxido já que é um elétron desemparelhado, não reage com a maioria das biomoléculas. O NO^{\bullet} reage sim, com outros radicais livres funcionando mais como um composto antioxidante do que como um composto pró-oxidante. Como o NO^{\bullet} é solúvel em meio aquoso e lipídico ele consegue atravessar as membranas celulares e se difundir no citoplasma onde, em muitas células, atua como uma molécula sinalizadora. Esta situação se modifica se a produção do NO^{\bullet} for muito elevada como ocorre a partir da decomposição do NPS (VALKO et al., 2006).

Assim, os resultados obtidos sugerem que concentrações de guaraná entre 0,5 mg/mL a <10 mg/mL parecem reverter, em seis horas, os efeitos tóxicos causados pelos NO^{\bullet} e outros compostos produzidos pela decomposição do NPS, possivelmente por atenuar o potencial efeito pró-oxidante relacionado com níveis elevados de NO^{\bullet} . Entretanto, concentrações superiores do guaraná, parecem não ter esta propriedade. Deste modo, sugere-se que os fatores causais deste fenômeno precisem ser melhor estudados a partir de estudos complementares.

Entretanto, algumas reflexões podem ser feitas sobre as prováveis causas metabólicas associadas a tais resultados. Vale comentar que a morte celular

provocada pelo NPS em curto período de tempo sugere que o balanço energético celular pode servir como um “interruptor” entre os dois modos de morte celular. O radical peroxinitrito danifica o DNA e aciona mecanismos de reparo do mesmo. A enzima sensor poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) também se torna ativada quando existem danos ao DNA (COWELL & RUSSELL, 2004). A ativação da PARP-1 causa a conversão de NAD(+) em nicotinamida e ADP-ribose e polimeriza este último em proteínas aceptoras nucleares. A super ativação da PARP pelo peroxinitrito consome ATP e culmina em disfunção celular levando a apoptose ou necrose. (SZABO, 2003).

Durante a co-incubação com os extratos de guaraná nas concentrações de 0,5 até 10 mg/mL, como anteriormente comentado ocorreu um aumento significativo na viabilidade celular comparado com o grupo tratado somente com NPS 10 µM. Estes valores também foram similares ao grupo controle (células tratadas somente com o meio DMEM). O efeito protetor observado nos tratamentos com guaraná nas concentrações variando de 0,5 até 10 mg/mL provavelmente seja atribuído ao alto conteúdo de compostos da classe dos polifenóis como as catequinas presentes no guaraná bem como de compostos que também têm ação antioxidante como as xantinas (cafeína, teobromina e teofilina) (BASILE et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; HALLIWELL, 2008; LAMBERT&ELIAS, 2010) e metil xantinas (AZAM et al., 2003; OFLUOGLU et al., 2009; INKIELEWICZ-STEPNIAK & CZARNOWSKI, 2010).

Entretanto, altas concentrações de catequinas e metilxantinas presentes nos tratamentos com maior concentração do guaraná podem também terem contribuído para menor viabilidade celular. Um estudo realizado por Hashimoto e colaboradores, 2004 demonstrou que o pré-tratamento de células JB6C1 41 com cafeína resultou em inibição da ativação do complexo ciclina D1-cdk4, inibindo desta forma a proliferação das células quando estimuladas por fatores de crescimento (soro fetal bovino) (HASHIMOTO et al., 2004). Alguns efeitos da cafeína no ciclo celular já relatados, incluem bloqueio do ciclo celular na fase G2 (PALAVOR et al., 1995) e supressão da cdk2 através de um mecanismo p53 independente (QI et al., 2002). A ação inibitória direta da cafeína sobre diversas quinases; quinase mutada ataxia-telangiectasia (IC50, 0,2 mM), ATM e Rad3 quinases (IC50, 1.1 mM), mTOR (IC50,

0,4mM), proteína quinase dependente do DNA (IC50, <10 mM), hChk (IC50, <5 mM), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) p100 α (IC50, 0,4 mM), PI3K p100 β (IC50, 0,4 mM), PI3K p100 γ (IC50, 1,0 mM) e PI3K p100 δ (IC50, 75 μ M), já foi relatada (FOUKAS et al., 2002).

Estudos prévios também já descreveram que a cafeína e seus metabólitos inibem diretamente a PI3K nos primeiros 30 minutos (FOUKAS et al., 2002). Por este motivo, a inibição da via da Akt-GSK-3 β é resultado da inibição da PI3K (HASHIMOTO et al., 2004). Estas enzimas inibidas pela cafeína são pertencentes às vias de sinalização relacionadas à sobrevivência, diferenciação e morte celular. Então a queda de viabilidade visualizada nas células tratadas com 20 mg/mL de guaraná, provavelmente seria um reflexo dos processos relacionados ao metabolismo pró-apoptótico desencadeado das metilxantinas (AZAM et al., 2003; HASHIMOTO et al., 2004).

Adicionalmente, evidências têm descrito que a cafeína, em determinadas situações e concentrações pode ter um efeito pró-oxidante. Isto porque, a cafeína também se liga a íons cobre, causando a redução Cu^{2+} para Cu^{1+} , que na presença de oxigênio molecular levam a produção de EROs (AZAM et al., 2003), conferindo desta forma, efeito pró-oxidante associado a esta molécula e seus metabólitos (AZAM et al., 2003).

Em relação ao potencial efeito do aumento na concentração de catequinas na cultura de linfócitos, estudos prévios também demonstraram que catequinas (epicatequina gallato - EGCG) presentes no chá verde induzem apoptose em vários cânceres humanos, incluindo células de câncer de bexiga humano, células pró-cancerosas da linhagem DU145 (CHUNG et al., 2001; PHILLIPS et al., 2009). Estas moléculas também inibem o crescimento celular e ativam cascatas pró-apoptóticas em células HNSCC e em células de carcinoma de cólon humano (*LoVo cells*). Estes resultados indicam que as catequinas têm ação quimiopreventiva e/ou quimioterapêutica através da diminuição da viabilidade ou via ativação de cascatas que induzem apoptose. Outro estudo conduzido por Tu e colaboradores, 2010, demonstrou que a EGCG em altas concentrações (por volta de 50 μ M) provoca queda de viabilidade e induz apoptose em embriões de camundongo (TU et al., 2010).

Outro fator que pode ter contribuído para a queda da viabilidade das células expostas ao tratamento de 20 mg/mL, é o fato de que compostos da classe dos polifenóis são instáveis em meio DMEM (meio utilizado para proliferação das células e dissolução dos extratos de guaraná utilizados no estudo) e se auto-oxidam (devido ao conteúdo de ferro livre no meio de cultura e ao alto nível de oxigênio na estufa de incubação que é de 95%) gerando espécies reativas, principalmente $O_2^{\cdot-}$, radicais fenólicos e H_2O_2 (HALLIWELL, 2008). A EGCG, por exemplo, adicionada ao meio DMEM começa a se oxidar imediatamente, gerando níveis citotóxicos de EROs (HALLIWELL, 2008) (Figura 11).

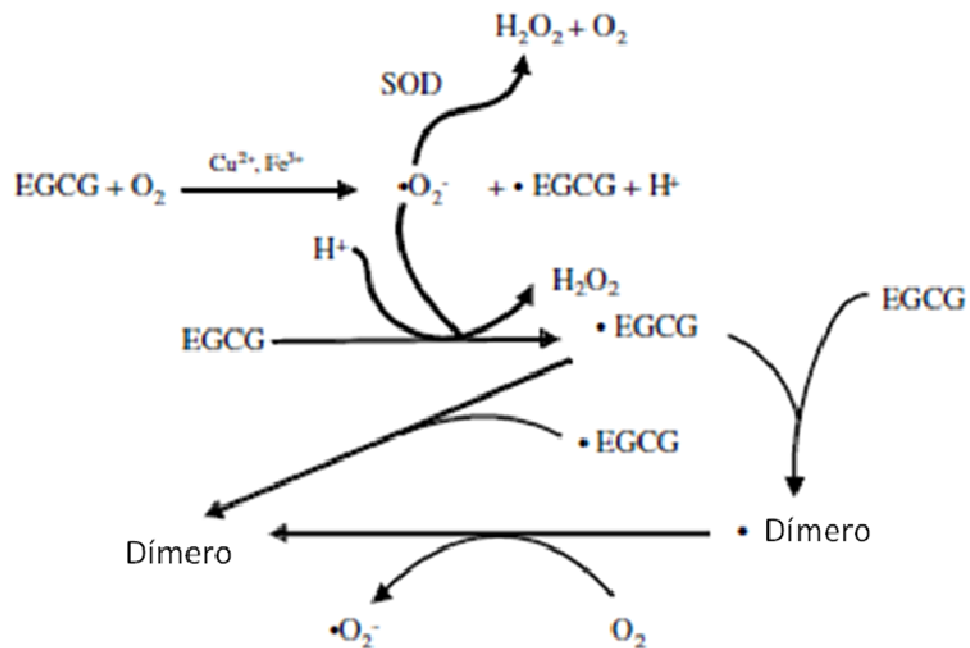


Figura 11 – Mecanismo proposto para geração de espécies reativas de oxigênio a partir da auto-oxidação da EGCG. Em pH neutro ou alcalino no meio de cultura celular (DMEM no caso do presente estudo), a EGCG é oxidada pelo oxigênio molecular para formar $O_2^{\cdot-}$ e o radical EGCG ($EGCG^{\cdot}$) em uma reação provavelmente catalisada por metais de transição presentes no meio, Fe^{3+} , Cu^{2+} . O $O_2^{\cdot-}$ pode então reagir com outra molécula de EGCG para formar o $EGCG^{\cdot}$. Este radical pode colidir com outro da mesma espécie para formar um radical dímérico EGCG. Este radical tem a capacidade de reagir com oxigênio para formar novos radicais diméricos e $O_2^{\cdot-}$. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser ainda convertido em H_2O_2 . Adaptado de Sang et al., 2005.

Então pode ser inferido que como a concentração do extrato no tratamento em questão também eleva a concentração de polifenóis no meio e esta condição

pode ativar ou mesmo manter ativada as cascatas relativas à morte celular observadas nas células tratadas somente com NPS. Esta sugestão também é corroborada pelos resultados observados no ensaio da DCFH já que o tratamento de 20 mg/mL mostrou intensidade de fluorescência similar ao das células tratadas somente com NPS 10 μ M, indicando uma alta produção de espécies reativas.

Uma vez que o tratamento com guaraná em concentrações <20 mg/mL também diminuiu a taxa de oxidação da DCFH parece que este extrato diminui realmente a produção de radicais livres gerados pelo NPS. A oxidação da DCFH origina o DCF que é um composto fluorescente. Estudos iniciais pensavam que esta reação ocorria somente em presença de peróxidos e, portanto, seria indicador de níveis elevados deste radical livre. Entretanto, investigações adicionais demonstraram que o DCFH também é oxidado por outras moléculas ativas como o OH^\bullet , ROO^\bullet , NO^\bullet e ONOO^- (HEADLAM et al., 2004). No presente estudo, já que a principal molécula de radical livre gerada a partir do NPS é o NO^\bullet , provavelmente a ação do guaraná diminui os níveis deste composto e assim, diminui os níveis de oxidação da DCFH como foi observado nos resultados obtidos pela análise da fluorescência dos fibroblastos por microscopia confocal. Entretanto, um estudo complementar deverá ser feito para confirmar esta hipótese envolvendo medidas diretas dos níveis de óxido nítrico nas células.

O outro grupo de resultados descritos no presente estudo envolve a modulação de indicadores do estresse oxidativo relacionado ao NPS pelo tratamento com o extrato do guaraná. Assim, o próximo passo foi analisar o marcador de peroxidação lipídica, o TBARS. Os valores de peroxidação dos tratamentos de 1, 5, 10 e 20 mg/mL+NPS10 μ M apresentaram níveis abaixo dos valores do grupo e do grupo tratado somente com NPS 10 μ M. Somente o tratamento com 0,5 mg/mL mostrou valores de peroxidação acima do grupo controle, mas significativamente abaixo do grupo NPS 10 μ M, indicando que este tratamento também é efetivo na proteção contra os efeitos pro-oxidantes do NPS. Os menores níveis de peroxidação lipídica observada nas demais concentrações confirmam a ação antioxidante do guaraná não só em relação às células tratada com NPS mas também em relação as células não-tratadas.

A explicação para o efeito destes tratamentos (0,5 até 10 mg/mL) provavelmente está relacionada à alta concentração de compostos fenólicos que o guaraná apresenta. No caso, tais compostos têm sido considerados mais eficazes em seqüestrar radicais livres (Figura 12). Um estudo proposto por Yamaguti-Sasaki et al., 2007, descreveu os resultados do ensaio de DPPH para os compostos epicatequina-(4 β →8)-catequina, epigallocatequina, catequina e galocatequina. Estes compostos polifenólicos isolados desta planta e de outras espécies, pelos autores em questão mostraram valores de 3,29, 8,56, 9,93, e 15,26 respectivamente (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Adicionalmente, o estudo detalhou que as características estereoquímicas da catequina e galocatequina (2R, 3S) em relação à epigallocatequina (2R, 3R) podem ser responsáveis pelo aumento da capacidade de seqüestro de radicais livres. (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Esta última condição demonstra que a trihidroxilação do anel B destes compostos aumenta a sua capacidade de DPPH (SANG et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

Acredita-se que a inclusão dos resultados que indicam ação antioxidante das catequinas presentes no chá são relevantes no presente estudo uma vez que, parece que o guaraná guarda importante similaridade de compostos secundários com esta planta. Esta afirmativa está baseada no estudo do transcriptoma do guaraná realizado por Angelo e colaboradores, 2008. Estes autores demonstraram similaridades significativas em transcritos de compostos relacionados ao metabolismo de flavonóides presentes no chá (verde e preto) produzido pela espécie *Camelia sinensis* (ANGELO et al., 2008). Esta evidência forneceu maior suporte aos nossos dados e discussão.

Os polifenóis são os principais compostos presentes em plantas com atividade antioxidante, embora não sejam os únicos (BASILE et al., 2005). Foi demonstrado que os flavonóides possuem atividade antioxidante *in vitro*, se mostrando altamente capazes de neutralizar uma grande diversidade de EROs, ERNs e Espécies Reativas derivadas do Cloro; tais como O₂^{•-}, OH[•], LOO[•], ONOO⁻, HCl, ONOOH, entre outros (BIXBY et al., 2005; HALLIWELL, 2008; LAMBERT & ELIAS, 2010). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos se deve as suas propriedades redox (SANG et al., 2005; LAMBERT & ELIAS, 2010), que exercem

seu papel na adsorção e neutralização de radicais livres. Um exemplo de modelo proposto para a ação destes compostos é detalhado na figura 12.

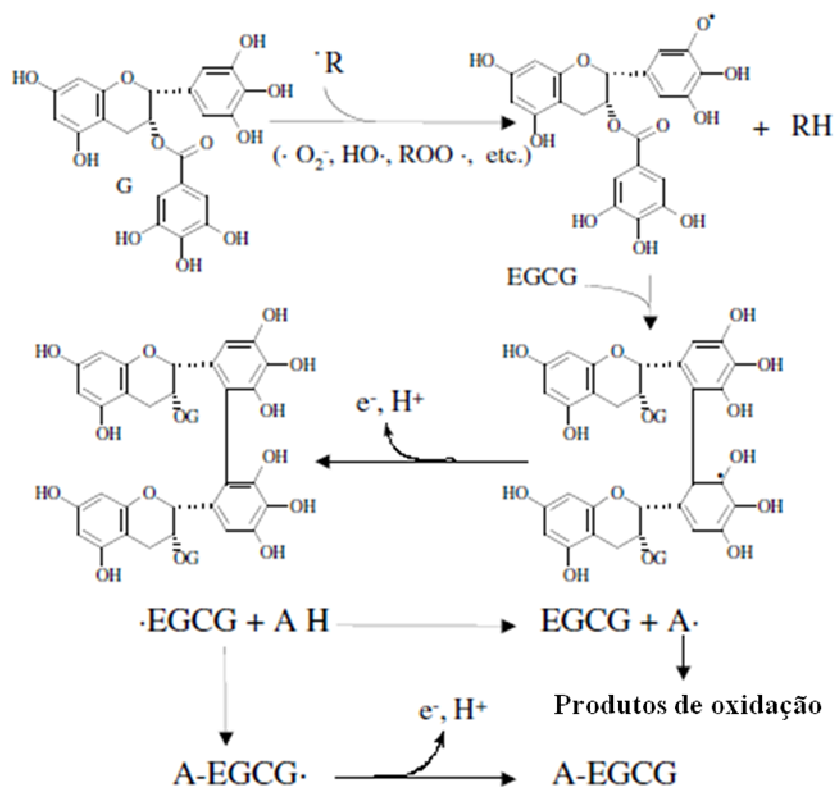


Figura 12. Mecanismo proposto para ação da EGCG. Este poderoso antioxidante neutraliza imediatamente radicais livres tais como, superóxido, hidroxil e peróxidos orgânicos, formando a partir desta reação inicial, o radical EGCG \cdot . Este radical pode reagir com outra molécula de EGCG formando um dímero (Teasinesina A). Em sistemas biológicos, o radical EGCG \cdot é eliminado por outros agentes tais como ascorbato, glutatona e proteínas para regenerar a EGCG. O radical EGCG \cdot pode reagir com estes agentes, formando adutos EGCG. Adaptado de Sang e colaboradores, 2005.

A química que explicaria esta atividade seria principalmente a transferência atômica de hidrogênio (HAT), reações de transferência de um único elétron (SET) ou ambas envolvendo grupamentos hidroxila presentes em grande quantidade nestes compostos. Os antioxidantes presentes em plantas como o chá verde, *guaraná* e outras (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; ANGELO et al., 2008; LAMBERT & ELIAS, 2010), exercem a sua atividade inibindo as reações deletérias de oxidação via HAT, inibindo principalmente peroxidação lipídica e neutralizando espécies reativas como o peroxinitrito, gerado por altas concentrações de óxido nítrico via NPS. Este

processo diminuiria desta forma a produção de espécies reativas (visualizada através da diminuição da intensidade da oxidação do DCFH em DCF) e nos níveis de peroxidação lipídica.

Análise de potenciais efeitos genotóxicos no DNA causado pelo SNP e sua reversão pelos tratamentos com guaraná também corroboram a hipótese de que o extrato desta planta modula efeitos tóxicos produzidos por níveis excessivos de NO[•]. Estas análises corroboram a idéia de que o guaraná teria a capacidade proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo NPS em doses ≤ 5 mg/mL.

Por último, enzimas do sistema antioxidante enzimático (SOD e CAT) foram avaliadas nos culturas tratadas com e sem guaraná expostas ao NPS. A análise dos dados mostrou um resultado interessante em relação à atividade destas enzimas em células expostas ao NPS com e sem extrato de guaraná.

O efeito do NPS sobre a atividade da catalase foi dramático uma vez que esta enzima foi inibida sem que o tratamento com guaraná fosse capaz de reverter este fenômeno. Já em relação SOD observou-se aumento nos níveis desta enzima na presença do NPS em relação ao grupo controle. Já a adição de guaraná elevou mais ainda os níveis desta enzima. Estes precisam ser interpretados sob a luz da estrutura e função da SOD. Os níveis de atividade da SOD total avaliados no presente estudo, na realidade representam um somatório da atividade de três formas enzimáticas: a SOD1, SOD2 e SOD3.

Tanto a SOD1 quanto a SOD3 são cobre/zinco dependentes, enquanto a SOD2 é dependente de manganês e age exclusivamente dentro da mitocôndria. Trabalhos clássicos sobre as enzimas superóxido dismutases agrupados na revisão de Fridovich (1975) já descreviam que as SODs dependentes de Cu/Zn são inibidas pela presença de cianeto. Isto ocorre porque o cianeto liga-se ao Cu²⁺. Por este motivo, ensaios específicos da atividade da SOD2 geralmente envolvem o uso de cianeto como inibidor seletivo das SODs Cobre e Zinco dependentes (OKADO-MATSUMOTO & FRIDOVICH, 2001).

Já o cianeto também é um inibidor competitivo da catalase, uma vez que se liga fortemente ao seu grupo heme interrompendo a ação da enzima (CHELIKANI et al., 2004). Como o NPS sofre redução liberando lentamente cianeto e NO[•] a

presença deste composto após seis horas de exposição ao NPS pelos fibroblastos pode ser responsável pela inativação da catalase.

O intrigante é que o cianeto por ser também um inibidor das SOD1 e SOD3 sugere que o aumento nos níveis desta enzima observados tanto no tratamento com NPS quanto nas células suplementadas com guaraná esteja relacionado diretamente à atividade da SOD2.

Das três isoformas da SOD a SOD2 é considerada vital para a sobrevivência do organismo (LI et al.,1995). Por outro lado, como a reação entre o radical superóxido e o NO^{\bullet} é danosa para a célula, já que ocorre formação de peroxinitrito, o aumento nos níveis da SOD2 seria biologicamente plausível. A indução de maior quantidade de SOD2 diminuiria a quantidade de superóxido, diminuindo assim a reação desta molécula com o NO^{\bullet} e a cascata oxidativa que culmina com sérios danos a célula como é caso da peroxidação lipídica e alterações genotóxicas. Uma vez que o guaraná parece não apresentar atividade biológica nos níveis de cianeto, a potencial diminuição nos níveis de NO^{\bullet} e/ou a indução nos níveis de SOD2 poderia explicar o seu efeito antioxidante e protetor descrito no presente estudo.

Evidências têm mostrado que o NO^{\bullet} ativa rotas redox que, em muitos casos, aumentam o potencial antioxidante das células. Entretanto, efeitos diretos do NO^{\bullet} na atividade das principais enzimas antioxidantes são pouco estudados. Um estudo prévio feito por Luschak e Luschak (2009) usando leveduras como modelo experimental descreveu que o NO^{\bullet} espontaneamente gerado pela decomposição do NPS aumentou a atividade da SOD. Estes resultados foram similares com os achados aqui descritos. Porém, os autores também observaram aumento nos níveis de catalase. Talvez esta diferença em relação aos resultados descritos aqui esteja relacionada à taxa de produção do cianeto dentro das células que poderiam ser diferentes pelo tempo de exposição ao NPS que não foi similar entre o estudo aqui descrito e o estudo de Luschak e Luschak (2009), ou mesmo por diferenças metabólicas entre as células aqui testadas (fibroblastos) e as leveduras (LUSCHAK & LUSCHAK, 2009).

Outra questão que poderia ser aventada para explicar a morte celular relacionada à exposição ao NPS seria o seu efeito no aumento dos níveis de cianeto produzidos pela sua decomposição, na eficiência da respiração celular. Sendo a

exposição a cianetos inevitável, uma parte dos organismos vivos possui vias metabólicas que permitem neutralizar este composto. Porém, quando a concentração de cianeto sobe consideravelmente esta condição afeta a célula. O cianeto possui alta afinidade com metais e tende a formar cátions metálicos complexos. Geralmente estas moléculas fazem parte dos sítios ativos de diversas enzimas importantes o que leva a inibição da função das mesmas. Assim, o mecanismo que explica a toxicidade do cianeto envolve a inibição da cadeia respiratória mitocondrial. O cianeto liga-se ao ferro no estado férrico (Fe^{3+}) da citocromo oxidase mitocondrial, enzima que é responsável por mediar a transferência de elétrons para o oxigênio molecular na última etapa da fosforilação oxidativa. Assim, o bloqueio desta enzima interrompe a capacidade da célula utilizar o oxigênio o que conduz a anoxia. Este processo, por sua vez reduz drasticamente a produção de ATP o que pode levar a morte celular (LENINGER, 2005).

Uma vez que a decomposição do NPS em cianeto ocorre mais lentamente do que em NO^{\cdot} um estado de anoxia celular também não seria um processo tão rápido. Entretanto, como o guaraná reverteu à mortalidade celular provocada pelo NPS, mas não demonstrou ação direta na reversão da inibição da catalase parece que a anoxia não seria o principal processo que causa a morte celular após seis horas de exposição a este agente, mas sim outros processos como a indução da apoptose ou mesmo necrose causada pelos danos oxidativos massivos. É claro que, não é possível descartar que uma parte da inviabilidade celular observada no estudo não tenha sido desencadeada por anoxia celular.

Análise dos níveis de genotoxicidade causados pela exposição ao NPS também mostraram reversão associada à suplementação do meio de cultura com guaraná em concentrações ≤ 10 mg/mL. Este possível efeito protetor poderia estar relacionado com a ação antioxidante direta de moléculas ativas presentes no guaraná, como as catequinas, em moléculas como o peróxido de hidrogênio e, a partir da diminuição nesta molécula, ocorre diminuição na produção de radicais hidroxil que causam extensos danos a molécula de DNA.

Dada a sua complexidade, um modelo potencial da ação protetora do guaraná é proposto sendo o mesmo esquematicamente apresentado na Figura 13.

Como pode ser visto no quadro A da Figura 13, o NPS nos fibroblastos aqui estudados gera uma série de eventos em cascata. O primeiro deles relacionado à produção de cianeto seria a inibição das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutases Cu/Zn dependentes. Esta inibição teria como consequência direta o aumento nos níveis de H_2O_2 . Esta molécula, por ser altamente reativa com íons metais como o Ferro tende a produzir radicais livres como a OH^\bullet que tem alta afinidade pela molécula do DNA. Esta afinidade levaria a danos genotóxicos compatíveis aos observados no presente estudo nas células tratadas com NPS.

O segundo evento importante seria a produção massiva de NO^\bullet . O NO^\bullet por ter alta afinidade com o $O_2^{\bullet-}$ produz, através desta reação grande quantidade de peróxido nitrito ($ONOO^-$). Esta espécie reativa de nitrogênio, por sua vez aumenta dramaticamente a peroxidação lipídica da membrana plasmática e das organelas o que impacta a estrutura e função celular, de um modo sistêmico.

Na tentativa de minimizar os efeitos tóxicos relacionados à reação NO^\bullet e $O_2^{\bullet-}$ a célula parece induzir o aumento nos níveis de SOD2 que teria o papel de “competir” com o NO^\bullet pela molécula de $O_2^{\bullet-}$.

Já o quadro B da Figura 13 é apresentado um possível esquema da ação protetora do guaraná que explicaria a diminuição na mortalidade das células causadas pelo NPS, da peroxidação lipídica, taxa de oxidação principalmente do H_2O_2 e da genotoxicidade.

Inicialmente, considerando os principais componentes bioativos do guaraná, os mesmos poderiam agir diretamente na neutralização dos níveis de NO^\bullet produzidos pelo NPS. Parece que o guaraná também, via rota não conhecida, teria a propriedade de induzir uma atividade ainda maior da SOD2, o diminuindo assim a disponibilidade de $O_2^{\bullet-}$ para reagir com o NO^\bullet . Uma das principais consequências deste processo seria a diminuição nos níveis de peroxidação lipídica.

Outra potencial ação protetora do guaraná seria a sua ação antioxidante na molécula de H_2O_2 . Os resultados que mostraram menor nível de oxidação celular utilizando o ensaio do DCFH corroboram esta hipótese já que a oxidação desta molécula para DCF é principalmente desencadeada pelo H_2O_2 . Deste modo, mesmo não revertendo os efeitos tóxicos do cianeto na catalase, minimizaria a produção do H_2O_2 e, por consequência a produção de outros radicais livres altamente

genotóxicos como a OH^\bullet . Tal hipótese é corroborada pelos resultados aqui descritos que observaram diminuição nos níveis de peroxidação lipídica, taxa de oxidação da DCFH, níveis de genotoxicidade, aumento na atividade da SOD na presença de guaraná no meio de cultura. Entretanto, como ressaltado diversas vezes, tal efeito protetor estaria associado a uma amplitude de concentração ≤ 10 mg/mL de guaraná.

Apesar de plausível, este modelo precisa ser testado a partir da condução de um estudo complementar incluindo também a análise de outras enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e também dos próprios níveis de óxido nítrico.

Mesmo existindo questões em aberto e limitações relacionadas ao presente estudo, o conjunto dos resultados corrobora a idéia de que o guaraná modula diferencialmente os efeitos pró-oxidantes do óxido nítrico. Esta modulação diferencial poderia explicar, em parte, os efeitos benéficos da ingestão do guaraná previamente descritos na literatura e pelo grupo de pesquisa que colabora com a investigação aqui apresentada (KREWER et al., 2011).

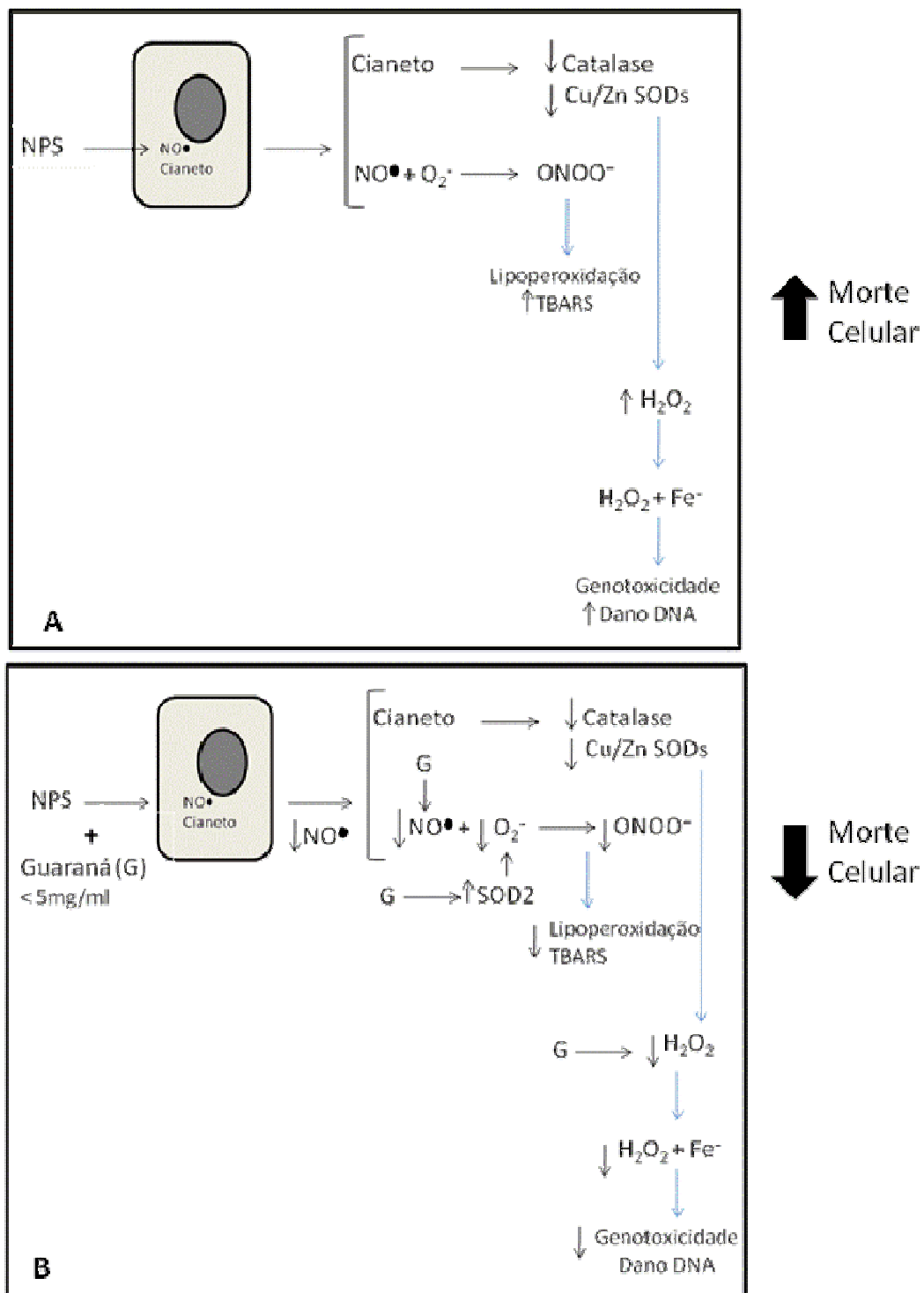


Figura 13. Modelo proposto para a ação do Guaraná (G) na reversão dos efeitos tóxicos do Nitroprussiato de Sódio (NPS).

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, apesar da abordagem do estudo a respeito da influência do guaraná no metabolismo do Óxido Nítrico (NO[•]) ser inicial, o corpo de evidências apresentadas dá maior suporte às propriedades antioxidantes relacionadas ao aumento intracelular de NO[•].

Há evidências que corroboram o efeito antimutagênico do guaraná, na citotoxicidade induzida por NO[•].

Fornecem evidências dos possíveis mecanismos pelos quais o guaraná exerce a sua atividade antioxidante e antimutagênica contra a toxicidade do excesso de NO.

Estes resultados podem mostrar uma possível explicação para a baixa prevalência de doenças em idosos que habitualmente consomem guaraná comparado aos idosos que não consomem este alimento, que apresentam maior prevalência de obesidade e síndrome metabólica.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Analisar a concentração de NO decorrente da degradação do NPS no meio de cultura e em células, durante diversos tempos de incubação via método de Griess e via marcação fluorescente com a DAF-2 que permite essa mensuração em concentração nM;
- Analisar a concentração de nitratos e nitritos decorrentes da degradação do NPS no meio de cultura e nas células;
- Analisar a concentração de espécies reativas no meio de cultura com o NPS, somente com o guaraná e co-incubação do guaraná com o NPS, via análise de fluorescência da DCF;
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação antioxidante da cafeína e outras metilxantinas presentes no guaraná contra toxicidade e estresse oxidativo e nitrosativo induzido pelo NPS;
- Analisar os efeitos NPS sobre as enzimas Glutathione Redutase e Transferase;
- Avaliar os efeitos da suplementação do guaraná em culturas de células tratadas com o NPS sobre a atividade das enzimas glutathione peroxidase e transferase;
- Avaliar os efeitos do cianeto sobre a atividade da SOD;
- Introduzir outros marcadores de genotoxicidade além do ensaio cometa;
- Testar essa mesma metodologia com o modelo experimental de células tronco mesenquimais humanas.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, D. L.; SILVA, C. R da. Fitohormônios: Abordagem Natural da Terapia Hormonal. São Paulo: **Editora Atheneu**, p. 1-02. 2002.

AMUNOM, I. et al. In H. WEINER (Ed.), Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism. **Purdue: Purdue University Press** vol. 12 (p. 118–123). 2005.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J Hum Nutr Diet**. Vol. 14(3). p. 243-50. 2001

ANGELO, P. C. et al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Rep**. Vol. 27(1). p.117-24. 2008.

AUGUSTO, O. Radicais Livres: *Bons, maus e naturais*, **Oficina de Textos: São Paulo**, 2006.

AZAM, S. et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor**. Vol. 9. p.325-330. 2003.

BARBOSA, G. D. A.; MELLO, J. C. P. Avaliação clínica do extrato de guaraná no controle da placa bacteriana dentária. **Rev. paul. Odontol**. Vol. 26(4). p.28-30. 2004.

BARREIRA, ET AL. Antioxidant activities of extracts from chestnut flower. **Food Chemistry**. Vol.107. p.1106-1113. 2008.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**, Vol.3. p.1109-1115. 2004.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol**. Vol. 102(1) p.32-6. 2005

BELLIARDO, F. et al. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola* spp. samples. **Z Lebensm Unters Forsch** 180(5):398-401.

BEMPONG, D. K; HOUGHTON, P. J. Dissolution and absorption of caffeine from guarana. **J Pharm Pharmacol**. Vol. 44(9). p.769-71. 1992.

BERGENDI, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, Vol.65. p.1865–1874. 1999.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim Nova**. Vol.29. p.1340-1344. 2006.

BERUBE-PARENT, S. et al. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **Br J Nutr**. Vol. 94(3). p.432-6. 2005.

BIXBY, M. et al. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**. Vol. 77. p.358. 2005.

BOOZER, C. et al. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **Int J Obes Relat Metab Disord**. Vol. 25(3). p.316-24. 2001.

BURCZYNSKI, M. E. et al. The reactive oxygen species- and Michael acceptor inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha-beta unsaturated aldehyde 4-hydroxy- 2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenone. **J Biol Chem**. Vol. 276(4). p.2890–2897. 2001.

BURDON, R. H.; GILL, V.; Alliangana, D. **Free Radical Res**. 1996, 24, 81.

BYDLOWSKI, S. P.; D'AMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. An aqueous extract of guaraná (Paullinia cupana) decreases platelet thromboxane synthesis. **Braz J Med Biol Res**. Vol. 24(4). p.421-4. 1991

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. A novel property of an aqueous guaraná extract (Paullinia cupana): inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Braz J Med Biol Res**. Vol. 21(3). p.535-8.1988.

CADET, J. et al. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. **Mutat Res**. Vol. 531(1-2). p.5-23. 2003.

CAMPOS, A. R, et al. Guarana (Paullinia cupana Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytother Res**. Vol.17(10). p.1199-202. 2003.

CAO, C. et al. AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H₂O₂-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **J Biol Chem**. Vol. 283(43). p.28897-908.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **J AOAC Int**. Vol. 81(4). p.691-701. 1998.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. **Mutat Res**. Vol.681. p.51-67. 2009.

CERQUEIRA, F. M; MEDEIROS, M. H. G; AUGOSTO, O. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Quim. Nova**. Vol.30(2). p.441-449, 2007.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Vol. 61. p.192-208. 2004.

CHIUEH, C. C. Neuroprotective properties of nitric oxide. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** Vol.890. p.301–311. 1999.

CHO, Y.M. et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol. 348(4). p.1472-8. 2006.

CHUNG, L. Y. et al. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci*. Vol.68. p.1207–14. 2001.

COWELL, R. & RUSSELL, J. Nitrosative injury and antioxidant therapy in the management of diabetic neuropathy. **J. Investig. Med**. Vol.52. p.33–44. 2004.

De Grey, A. D. N. J. HO₂[•]: The forgotten radical. **DNA Cell Biol**. Vol. 21. p.251–257. 2002.

DEBNATH, J.; BRUGGE, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. **Nat Rev Cancer**. Vol.5. p.675-688. 2005.

DICK, R. A. et al. Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. A new role for leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/ 15-oxoprostaglandin 13-reductase. **J Biol Chem** Vol. 276(44). p.40803–40810. 2001.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and tissue culture: Laboratory procedures in Biotechnology. (Wiley: New York), 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev**. Vol. 82. p.47–95. 2002.

ELLIS, E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutical intervention. **Pharmacology and therapeutics**. Vol.115. p.13-24. 2007.

EMERIT, I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. **Free Radic Biol Med**. Vol.16. p.99–109. 1994.

ESPINOLA, E. B. et al. Pharmacological activity of Guarana (Paullinia cupana Mart.) in laboratory animals. **J Ethnopharmacol**. Vol. 55(3). p.223-9. 1997.

ESTEY, T. et al. ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. **Exp Eye Res**. Vol. 84(1). p.3–12. 2007.

FONSECA, C. A. et al. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (Paullinia cupana) in prokaryotic organisms. **Mutat Res**. Vol. 321(3). p.65-73. 1994.

FOUNI, S. A. V. et al. Contribuição do guaraná em pó (Paullinia cupana) como fonte de cafeína na dieta/ Contribution of guaraná powder (Paullinia cupana) as a source of caffeine in the diet. **Rev. Nutr**. Vol. 20(1). p.63-68. 2007.

FUKUMASU H. et al. Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Res**. 41(4). p.305-10. 2008.

FUKUMASU. H et al. Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food Chem Toxicol**. Vol. 44(6). p.862-7. 2006.

GALLAGHER, E. P.; GARDNER, J. L.; BARBER, D. S. Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria. **Biochem Pharmacol**. Vol. 71(11). p.1619–1628. 2006.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends Pharmacol. Sci**. Vol. 26. p.190–195. 2005.

GILLILAND, D. G.; COLLIER, R. J. A model system involving anti-concanavalin A for antibody targeting of diphtheria toxin fragment A1. **Cancer Res**. Vol. 40(10). p.3564-9. 1980.

GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactives species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**. Vol. 266. p.73-83. 2008.

GREEN, H. & TODARO, G. J. The mammalian cell as differentiated microorganism. **Annu Rev Microbiol**. Vol. 21. p.573-600. 1967.

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chem Res Toxicol**. Vol.14(6). p. 611–650. 2001.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?. **Arch Biochem Biophys**. Vol.476(2). p.107-12. 2008.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**. Vol.141. p.312-322. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 5th ed., **Claredon Press: Oxford**, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. Vol.142. p.231–255. 2004.

HARFOUCHE, G.; MARTIN, M. T. Response of normal stem cells to ionizing radiation: a balance between homeostasis and genomic stability. **Mutat Res**. Vol.704(1-3). p.167-74. 2010.

HASKELL, C. F. et al. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **J Psychopharmacol**. Vol. 21(1). p.65-70. 2007.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. Vol.45. p.51–88. 2005.

HEADLAM, H. A.; DAVIES, M. J. Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. **Free Radic.Biol.Med**. Vol.36. p.1175-1184. 2004.

HELGASON, C.; MILLER, C. Basic cell culture protocols. **Humana Press**: Totowa. 2004.

HILL, B. G. et al. What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. **J Biol Chem**. Vol. 285(26). p.19699-19704. 2010.

HINSHELWOOD, A.; MCGARVIE, G.; ELLIS, E. M. Substrate specificity of mouse aldo-keto reductase AKR7A5. **Chem Biol Interact**. 143-144. p.263–269. 2003.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=4860268 (acesso em 12/03/2011).

INKIELEWICZ-STEPNIAK, I.; CZARNOWSKI, W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. **Food Chem Toxicol**. Vol. 48(6). p.1607-11. 2010.

JIN, Y.; PENNING, T. M. Aldo-keto reductases and bioactivation/ detoxication. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. Vol. 47. p.263–292. 2007.

KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (Paullinia cupana). **Appetite**. Vol. 50(2-3). p.506-13. 2008.

KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (Paullinia cupana) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. **Pharmacol Biochem Behav**. Vol. 79(3). p.401-11. 2004.

KOVACIC, P. et al. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. **Curr. Med. Chem.** Vol.12. p. 2601–2623. 2005.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr. Med. Chem.** Vol 8. p.773–796. 2001.

KUBIC, J.; PETROVIC, S.; NIKETIC, M. Antioxidant Activity on Four Endemic *Stachys* Taxa. **Biol. Pharm. Bull.** Vol. 29. p. 725-729. 2006.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of gree tea polyphenols: A role in cancer prevention. **Arch Biochem Biophys.** Vol. 501(1). p. 65-72. 2010.

LAMPE, J. W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **Am J Clin Nutr.** Vol. 70. p. 475-90. 1999.

LE PAGE F. et al. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. **Cell.** Vol. 101(2). p. 159-71. 2000.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.** Vol. 37. p. 1921–1942. 2004.

LI, D. et al. Mouse aldo-keto reductase AKR7A5 protects V79 cells against 4-hydroxynonena linduced apoptosis. **Toxicology.** Vol. 226(2-3). p. 172–180. 2006.

LIMA, W. P. et al. Metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clin Nutr.** Vol. 24(6). p.1019-28. 2005.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. The Haber–Weiss cycle, 70 years later: An alternative view. **Redox Rep.** Vol.7. p. 55–57. 2002.

LIU, Y. et al. Alteration of nuclear protein profiling for NIH-3T3 cells exposed to H₂O₂. **Cell Biochem Funct.** Vol. 28(7). p. 578-84. 2010.

LOUREIRO, et al. Formação de adutos exocíclicos com base em DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quím Nova.** Vol. 25. p. 777-793. 2002.

LOVELL, M.; XIE, C.; MARKESBERY, W. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. **Neurobiol Aging.** Vol. 22. p. 187–194. 2001.

LUSHCHAK, O. V.; LUSHCHAK, V. I. Possible pathways involved in activation of catalase and superoxide dismutase with sodium nitroprusside in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Ukr Biokhim Zh.** Vol. 81(2). p. 34-9. 2009.

MASER, E. Neuroprotective role for carbonyl reductase? **Biochem Biophys Res Commun**. Vol. 340(4). p. 1019–1022. 2006.

MATTEI, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **J Ethnopharmacol**. Vol. 60(2). p.111-6. 1998.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**. Vol. 88(3). p. 287-98. 1997.

Mouse Embryonic Stem Cell Cultures.
<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixb.asp> (acesso em 12/03/2011).

MURPHY, T. C. et al. Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A). **J Neurochem**. Vol. 86(2). p. 298–305. 2003.

NELSON, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 5° Ed. **Saraiva**. 1202 p.

OFLUOGLU, E. H.; PASAOGLU, H.; PASAOGLU, A. The effects of caffeine on l-arginine metabolism in the brain of rats. **Neurochem. Res**. Vol. 34. p. 395–399. 2009.

OPPERMANN, U. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. Vol. 47. p. 293–322. 2007.

PASTOR, N. et al. A detailed interpretation of OHradical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. **J. Mol. Biol.**, Vol. 304. p. 55–68. 2000.

PELOZO, M. I. G. et al. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Braz. Arch. Biol. Technol**. Vol. 51(3). p. 447-451. 2008.

PHILIPS, B. J. et al. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins. **Biomed Res**. Vol. 30. p. 207–15. 2009.

PICKLO, M. et al. Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. **Toxicol Appl Pharmacol**. Vol. 184. p. 187–197. 2002.

PONTIERI, V. ET al. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. **J Electrocardiol**. Vol. 40(6). p. 534.e1-8. 2007.

PRABHU, K. S. et al. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. **Arch Biochem Biophys**. Vol. 424(1). p. 72–80. 2004.

RADEWICZ, T. A.; EDWARDS, J.L.; KATULA, K. S. Effects of various polyphenolics on hydrogen peroxide-induced p53 activity in NIH3T3 cells. **J Med Food**. Vol. 13(1). p. 23-30. 2010.

RAE, T. D. et al. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. **Science**. Vol. 284. p. 805–808. 1999.

RAVANAT, J. L. et al. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Arch Biochem Biophys**. Vol. 423(1). p. 23-30. 2004.

RAVI SUBBIAH, M. T.; YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **Int J Vitam Nutr Res**. Vol. 78(2). p.96-101. 2008.

RAY, S. D. et al. Pre-exposure to a novel nutritional mixture containing a series of phytochemicals prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell deaths by enhancing BCL-XL expression and minimizing oxidative stress in the liver. **Mol Cell Biochem**. Vol. 293(1-2). p. 119-36. 2006.

RIDNOUR, L. A. et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Vol. 102. p.13147–13152, 2005.

ROBERTS, A. T. et al. The effect of an herbal supplement containing black tea and caffeine on metabolic parameters in humans. **Altern Med Rev**. Vol. 10(4). p. 321-5. 2005.

SALVADORI, M. C. et al. Determination of xanthines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography in horse urine after ingestion of Guaraná powder. **Analyst**. Vol.119(12). p. 2701-3. 1994.

SANG, S. et al. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. **Antioxid Redox Signal**. Vol. 7(11-12). p. 1704-14. 2005.

SANTAMARIA, A. et al. Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. **Ecotoxicol Environ Saf**. Vol. 39(3). p. 164-7. 1998.

SARETZKI, G. et al. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. **Stem Cells**. Vol. 26(2). p. 455-64. 2008.

SHORT, D. M. et al. Metabolism of trans, trans-muconaldehyde, a cytotoxic metabolite of benzene, in mouse liver by alcohol dehydrogenase Adh1 and aldehyde reductase AKR1A4. **Toxicol Appl Pharmacol**. Vol. 210. 163–170. 2006.

SILVEIRA, L. R. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arq Bras Endocrinol Metab.** Vol. 48. p. 812-822. 2004.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat. Res.** Vol. 531. p. 231- 251. 2003.

SOMBRA, L. L. et al. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **J Pharm Biomed Anal.** Vol. 36(5). p. 989-94. 2005

SZABO, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol Lett.** Vol. 140-141. p. 105-12. 2003.

THOMAS, D. D. et al. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Implications in Cellular Signalling. **Free Radic Biol Med.** Vol. 45(1). p. 18–31. 2008.

THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Ann N Y Acad Sci.** Vol. 1043. p. 111–117. 2005.

TOWNSEND, A. J. et al. Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells. **Chem Biol Interact.** Vol. 130-132(1-3). p. 261–273. 2001.

TU, H. C.; CHEN, C. P.; CHAN, W. H. Epicatechin gallate decreases the viability and subsequent embryonic development of mouse blastocysts. **Taiwan J Obstet Gynecol.** Vol. 49(2). p. 174-80. 2010.

USHIROBIRA, T. M. A. et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (Paullinia cupana) in rodents. **Food and Chemical Toxicology.** Vol 48(7). p. 1817-20. 2010.

VALKO, M. et al. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the etiology of colon cancer? **Biochim. Biophys. Acta.** Vol. 1527. p. 161–166. 2001.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.** Vol. 266. p. 37–56. 2004.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.** Vol. 39(1). p. 44-84. 2007.

VALKO, M., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.** Vol. 160. p. 1–40. 2006.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.** Vol. 12. p. 1161–1208. 2005.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova.** Vol. 30. p.1323-1338. 2007.

VORBACH, C.; HARRISON, R.; CAPECCHI, M. R. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. **Trends Immunol.** Vol. 24. p. 512–517. 2003.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules.** Vol. 12(8). p. 1950-63. 2007.

ZUCCO, F. et al. Toxicology investigation with cell cultures systems: 20 years after. **Toxicolo In Vitro.** Vol. 18. p. 153-163. 2004.