
CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE – BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

**BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E MARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS TREINADOS E SUPLEMENTADOS COM L-
ARGININA**

CARMEM PERES VALGAS DA SILVA

**Rio Claro – SP
2014**

**BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E MARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS TREINADOS E SUPLEMENTADOS COM
L-ARGININA**

CARMEM PERES VALGAS DA SILVA

Banca: Angelina Zanesco (Orientadora)

Leonardo dos Reis Silveira

Carlos Henrique Grossi Sponton

612.3
S586b Silva, Carmem Peres Valgas da
Biogênese mitocondrial e marcadores de estresse oxidativo
em ratos treinados e suplementados com L-arginina / Carmem
Peres Valgas da Silva. - Rio Claro, 2014
86 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Angelina Zanescio
Coorientador: Maria Andreia Delbin

1. Nutrição. 2. Exercício físico. 3. Mitocôndria. 4. Enzimas
antioxidantes. 5. Suplementação. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à toda a minha família, especialmente aos meus pais Elizabeth e Carlos, meu irmão Felipe e meus avós Luzia, Ede e José.

Obrigada por acreditarem no meu sonho e por sonharem junto comigo...

Vô, onde quer que você esteja obrigada por tudo...

Vó, obrigada por se orgulhar de mim...

“Eu tive a ajuda de quem você não acredita

Tive a esperança de chegar até aqui

Vim caminhando, aqui estou e me decidi:

Eu vou ficar...Eu vou ficar

Eu já fiquei...Pois me encontrei.”

(A viagem – Padre Zezinho)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser tudo em minha vida...

À minha orientadora Angelina Zanesco, por ter paciência e confiar no meu trabalho e nas minhas ideias desde a iniciação científica...Seu apoio me permitiu amar a pesquisa e chegar até aqui. Tenho certeza que tenho a melhor orientadora que poderia ter escolhido.

Às minhas co-orientadoras Maria Andréia Delbin, Ana Paula Davel e Fernanda Piriviero, que sempre estiveram dispostas a me ajudar e contribuir com ideias essenciais a essa pesquisa.

Aos doutorandos Paolo La Guardia, do Departamento de Bioenergética da FCM Unicamp e Carolina Moura, do Laboratório de Fontes Proteicas da FEA Unicamp, que contribuíram de forma inestimável a esse projeto.

Agradeço especialmente ao Hygor Nunes e à Amanda Sponton pela amizade e pela ajuda nos dias dos experimentos e no treinamento dos animais nos momentos que tive de estar ausente.

Aos Doutores Pablo Lollo e Everardo Magalhães Carneiro, que em minha qualificação contribuíram com ideias importantes para o término dessa pesquisa.

Aos senhores Miguel, Toninho e Aguinaldo, por cuidarem dos nossos ratos no biotério.

Ao apoio financeiro da FAPESP, que foi primordial para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus amigos do Departamento de Farmacologia da FCM Unicamp, pois foi com vocês que tive os primeiros ensinamentos e foi nesse laboratório que aprendi o que é pesquisar e amar a ciência.

Aos meus amigos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Unicamp, pois com vocês aprendi a fazer técnicas essenciais à minha pesquisa e ao lado de vocês que ri, aprendi e nunca me esqueci de que antes de pesquisadores somos seres humanos que necessitam de afeto e momentos dedicados a nós mesmos. Em especial à Aline, Jamaira e Stefano, que me ajudam desde o início de tudo...

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física da Unesp Rio Claro por me receberem de braços abertos e por todo o ensinamento, amizade, ajuda, carinho e momentos felizes que me proporcionaram

quando morei e todas as vezes que estive na cidade. Obrigada por tudo Iane, Aline, Carlos, Chadi, Puga, Maycon e Rodrigo...

À UNESP Rio Claro e todos os seus funcionários (principalmente à Ivana) por me receber como nova integrante e me fazer amar a Universidade.

À “mãe” UNICAMP, em especial à Faculdade de Educação Física (FEF). Pois foi lá que tudo começou: Todo dia que entrava por aqueles portões agradecia a Deus por me conceder viver aquele sonho...Na FEF aprendi muito, não apenas a amar e a viver a Educação Física, mas também a ser uma pessoa melhor. Tenho muito orgulho dessa profissão que é tão pouco valorizada, me sinto preparada para lutar para que isso mude. Obrigada por isso FEF...

Aos amigos que fiz na FEF, nunca me esquecerei do apoio que vocês me deram mesmo depois de formados. Obrigada: Anderson, Paulão, Karenzita, Henrique, Catú, Minduim e Felipão.

Aos amigos do Grupo Maria Luzia, por 7 anos de amizade, por me apoiarem sem questionar, mesmo sem entender como é essa vida de pesquisador perdoaram minhas ausências, rezaram por mim e acreditaram em mim muitas vezes mais que eu mesma...em especial ao Daniel, Gabriel, Laura e Mariana.

A todos os professores que tive, pois seus ensinamentos formaram a base de tudo o que conheço e pretendo conhecer...

Serei eternamente agradecida a todos vocês...

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA	Página
1 - A mitocôndria.....	19
2 - Anatomia bioquímica de uma mitocôndria.....	21
3 - Produção de energia celular.....	23
4 - Complexo ATP sintase.....	24
5 - Representação esquemática da biogênese mitocondrial.....	28
6 - Biogênese mitocondrial induzida por atividade contrátil.....	29
7 - Formação do óxido nítrico.....	33
8 - NO e metabolismo.....	35
9 - NO e ativação da biogênese mitocondrial.....	36
10 - Hipótese do estudo.....	39
11 - Evolução do peso corporal, ração ingerida, peso da gordura epididimal e do músculo gastrocnêmio.....	50
12 - Tolerância ao esforço.....	52
13 - Expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS).....	53
14 - Nitrito e Nitrato.....	54
15 - Expressão da Cu/Zn-SOD no extrato citoplasmático, Mn-SOD no extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico e MDA citoplasmático e plasmático.....	55
16 - Expressão da AMPK $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e PGC-1 α no extrato citoplasmático do músculo gastrocnêmio.....	56
17 - Expressão do Fator de Transcrição Mitocondrial A (mtTFA), citocromo c oxidase (COXIV) e ATP sintase subunidade c.....	58

TABELA

1- Peso corporal inicial e final, ingestão alimentar, gordura epididimal, colesterol total, HDL-C colesterol, triglicerídeos e glicemia de jejum de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SDLA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TRLA).....	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – Acetil-CoA carboxilase	CEUA – Comitê de ética em estudos animais
Acetil-CoA - Acetil-coenzima A	cit – Citoplasma
Acil-CoA – Colesterol aciltransferase	CO – monóxido de carbono
ADP – Difosfato de adenosina	CO ₂ - Dióxido de carbono
AICAR - 5-aminoimidazole - 4 carboxamide-1-β-D-ribonucleoside	Col. Total – Colesterol Total
AGAT – Amidinotransferase da glicina	CPT-1–Carnitina palmitoil transferase 1
AGL – Ácido graxo livre	CT – Colesterol total
AMP – Adenina monofosfato	CuZnSOD – Superóxido dismutase cobre-zinco
AMPc – monofosfato de adenosina cíclico	dL – decilitro
AMPK – Proteína quinase ativada pelo AMP	DNA – Ácido desoxirribonucleico
ANOVA – Análise de variância	DTT – Ditiotreitól
ASL – Liase argininosuccinato	e ⁻ - Elétron
ASS – Sintetase do argininosuccinato	ECL - Enhanced chemiluminescence
ATP - Trifosfato de adenosina	EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
β-oxidação – Beta-oxidação	EGTA - Ethylene glycol tetraacetic acid
BH ₄ – Tetrahidrobiopterina	ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
BSA – Albumina sérica bovina	eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
Ca ²⁺ – Cálcio	ERN – Espécie reativa de nitrogênio
CaMK – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina	ERO – Espécie reativa de oxigênio
CAT – Catalase	ETC – Cadeia de transporte de elétrons
CEMIB - Centro Multiinstitucional de Bioterismo	FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FADH ₂ - Flavina adenosina dinucleotídeo;	L - Litro
FCM – Faculdade de Ciências Médicas	L-Arg – L-Arginina
FMN – Flavina mononucleotídeo	LCAT - Lecitina-colesterol aciltransferase
g – Grama	LCFA – Ácido graxo de cadeia longa
GCs – Guanilato ciclase solúvel	LDL – Lipoproteína de baixa densidade
GH – Hormônio do crescimento	L-NAME - N ^o -nitro-L-arginine methyl ester
GLUT's – Proteínas transportadoras de glicose	LSH – lipase hormônio sensível
GLUT4–Transportador de glicose tipo 4	M – Molar
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico	mA – Miliampere
GPAT – Glicerol-fosfato aciltransferase	Malonil-CoA – Malonil- coenzima A
GPx – Glutathione peroxidase	MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
H ₂ O – Água	MDA – Malondialdeído
HCL – Ácido clorídrico	MFEL – Máxima fase estável de lactato
HDL – Lipoproteína de alta densidade	mg – Miligrama
HDL-C – Lipoproteína de alta densidade – colesterol	Min – Minutos
HSL – Lipase hormônio sensível	mit – Mitocôndrias
IB – Instituto de biociências	mM – Milimolar
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível	MnSOD – Manganês superóxido dismutase
KCL – Cloreto de potássio	mRNA – RNA mitocondrial
kDa – Kilodalton	mtDNA - DNA mitocondrial
Kg – Kilograma	MtTFA – Fator de transcrição mitocondrial A
KH ₂ PO ₄ – Hidrogenofosfato de potássio	NaCl – Cloreto de sódio
Km/h – Quilômetros por hora	

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo	SDS – Sulfato de sódio
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal	S.E.M – Erro padrão da média
NO - Óxido Nítrico	SOD – Superóxido dismutase
NO ₂ - - Ânion nitrito	TAG – Triglicerídeo
NO ₃ - - Ânion nitrato	TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
NOS – Óxido nítrico sintase	TBS-T – Tris buffered saline Tween-20
NO _x – Nitrito e nitrato	TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico
NRF-1 – Fator respiratório nuclear 1	TFAM – fator de transcrição mitocondrial A
NRF-2 – Fator respiratório nuclear 2	TIM – Translocase de membrana interna
O ₂ – Gás oxigênio	TOM – Translocase de membrana externa
O ₂ - - Ânion superóxido	TR – Grupo treinado
ONOO ⁻ - Peroxinitrito	TR/LA – Grupo treinado + L-Arginina
PGC-1 α - coativador 1 α do receptor gama ativado pelo peroxisoma proliferador	UNESP – Universidade do Estado de São Paulo
pH - Potencial de hidrogênio iônico	UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
Pi – Fosfato inorgânico	UTR – Região não traduzida 3´
PKG – Proteína quinase G	VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
PVDF – Polivinil difluorida	VO _{2máx} - Consumo máximo de oxigênio
RBP – Proteínas ligadas ao RNA	ZDF – Zucker diabetic and fatty
RNA – Ácido ribonucleico	μ g – Micrograma
ROS – Reactive oxygen species	μ M – Micromolar
SD – Grupo sedentário	°C – grau Celsius
SD/LA – Grupo sedentário + L-Arginina	

SUMÁRIO

PÁGINA

1- INTRODUÇÃO.....	17
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 - A mitocôndria – características gerais.....	19
2.2 – Mitocôndria e metabolismo energético.....	22
2.3 – Mitocôndria, espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante.....	24
2.4 – A Biogênese Mitocondrial.....	26
2.5 – Exercício Físico e biogênese mitocondrial.....	28
2.6 – Exercício Físico aeróbio: Outras ações metabólicas.....	30
2.7– Óxido nítrico: ações metabólicas.....	32
2.8 - Suplementação com L-arginina.....	37
3- HIPÓTESE.....	39
4-OBJETIVO GERAL.....	40
4.1 – Objetivos específicos.....	39
5 - METODOLOGIA.....	41
5.1 – Animais.....	41
5.2 – Grupos experimentais.....	41
5.3 – Suplementação oral com L-arginina.....	41
5.4 – Programa de treinamento físico.....	42
5.5 – Teste de esforço.....	43
5.6 – Peso corporal, gordura epididimal e consumo alimentar.....	43
5.7 – Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	44
5.7.1 - Perfil lipídico.....	44
5.7.2 - Concentrações de nitrato e nitrito (NO_x^-) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticos.....	44
5.8 - Determinação nas concentrações de nitrito e nitrato (NO_x^-) em tecido muscular.....	45
5.9 - Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) citoplasmáticas.....	45

5.10 - Obtenção do extrato muscular total.....	45
5.11 – Obtenção do extrato enriquecido de mitocôndrias.....	46
5.12 – Avaliação das proteínas de interesse por Western Blott.....	46
5.12.1 – Eletroforese e transferência das amostras.....	47
5.12.2 – Incubação com os anticorpos e determinação das proteínas de interesse.....	47
6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
7- RESULTADOS.....	49
8- DISCUSSÃO.....	60
8.1 – Parte 1: Efeito do treinamento físico.....	60
8.1.2 - Peso corporal e parâmetros bioquímicos.....	60
8.1.3 - Teste de tolerância ao esforço, expressão proteica e níveis de nitrito/nitrato (citosol/plasmático).....	61
8.2 – Parte 2: Efeito da associação treinamento físico e suplementação com L-arginina.....	65
8.2.1 - Teste de tolerância ao esforço, expressão proteica e estado redox.....	65
9- CONCLUSÕES.....	68
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXO 1.....	86

RESUMO

A mitocôndria é uma organela que desempenha importante função no metabolismo energético. Sabe-se que tanto o óxido nítrico quanto o exercício físico isolados promovem biogênese mitocondrial, aumentando seus principais indutores de biogênese, dentre esses, o coativador 1α do receptor gama ativado pelo peroxisoma proliferador (PGC- 1α) e o fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA). No entanto, nenhum trabalho avaliou a associação entre L-arginina e exercício físico sobre os biomarcadores mitocondriais. Assim, os objetivos desse trabalho foram avaliar a tolerância ao esforço, o estado redox e os biomarcadores mitocondriais em ratos treinados e suplementados com L-arginina. Métodos: Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: sedentários sem e com L-arginina (SD; SDLA) e grupos treinados: sem e com suplementação (TR; TRLA). Treinamento físico aeróbio foi realizado em sessões de 60 min, 5 dias na semana, por 8 semanas. A L-arginina foi administrada por via oral através de gavagem (62,5 mg/ml/dia/rato). Teste de esforço físico com velocidade incremental até a exaustão foi realizado na oitava semana de treinamento físico. O músculo gastrocnêmio foi isolado e as expressões proteicas do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA); ATP sintase subunidade c; citocromo c oxidase (COXIV); proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK); as enzimas antioxidantes superóxido dismutase subtipos: Cu/Zn-SOD e Mn-SOD e a óxido nítrico sintase neuronal e endotelial (nNOS e eNOS) foram medidas no citoplasma e no extrato enriquecido de mitocôndrias por Western Blott. Também foram realizadas análises plasmáticas de glicemia, perfil lipídico, além de nitrito e nitrato (NOx) e MDA plasmáticos e citoplasmáticos. Resultados: O treinamento físico aeróbio associado ou não à L-arginina promoveu redução na glicemia (aproximadamente 8%) e triglicérides (aproximadamente 39%) plasmáticos. Enquanto que a suplementação com L-arg. levou à redução do colesterol total (aproximadamente 15%) em comparação ao grupo SD e TR. Houve aumento significativo na tolerância ao esforço físico no último teste nos animais treinados (TR: 175% e TRLA: 229%) em relação aos grupos sedentários, sendo que o grupo TRLA apresentou maior tolerância ao esforço também em comparação ao grupo TR (20%). O treinamento físico associado ou não à suplementação promoveu aumento significativo na expressão da COXIV (TR: 70% e TRLA: 100%) e Cu/Zn-SOD (TR: 80% e TRLA: 100%). Contudo apenas a associação exercício físico e suplementação de L-arginina promoveu aumento significativo nas expressões proteicas de mtTFA (50%) e ATP sintase c (170%) quando comparados ao grupo SD no extrato de mitocôndrias. A expressão da AMPK citoplasmática foi aumentada nos grupos que receberam a suplementação (SDLA: 60% e TRLA: 100%) em comparação aos grupos não suplementados. O grupo TRLA apresentou expressão proteica aumentada da PGC- 1α (aproximadamente 70%) Mn-SOD em comparação a todos os outros grupos estudados (aproximadamente 60%). Os grupos SDLA, TR e TRLA obtiveram redução do MDA citoplasmático (30%) em comparação ao grupo SD. As expressões de eNOS, nNOS e a concentração de MDA plasmático não se mostraram diferentes entre os grupos. A concentração de nitrito e nitrato muscular foi maior no grupo TRLA (aproximadamente 120%) comparado a todos os grupos estudados. Enquanto que não houve diferença significativa no NOx- plasmático. Conclusão: A associação treinamento físico e suplementação com L-arginina promoveu maior tolerância ao esforço físico que foi positivamente associada ao aumento das expressões proteicas de PGC- 1α , AMPK, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, mtTFA, COXIV e ATP sintase c, também à

produção de NO assim como redução da peroxidação lipídica em músculo gastrocnêmio de ratos. Esses achados podem propiciar novas estratégias na prevenção de doenças cardiometabólicas, pois a associação promove maior resistência ao exercício físico.

Palavras chave: L-arginina; exercício físico; biogênese mitocondrial; enzimas antioxidantes

ABSTRACT

The mitochondrion is an organelle which plays an important role in energy metabolism. It is known that both nitric oxide and exercise alone promote mitochondrial biogenesis, increasing its key transcription cofactors, among these, the peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator (PGC)-1 (PGC-1 α) and mitochondrial transcription factor A (mtTFA). However no study has evaluated the association L-arginine and exercise on mitochondrial biomarkers. The objectives of this study were to assess exercise tolerance, the redox state and mitochondrial biomarkers in trained rats supplemented with L-arginine. Methods: Wistar rats were divided into four groups: sedentary without and with L-arginine (SD; SDLA) and trained groups: with and without supplementation (TR; TRLA). Aerobic exercise was conducted in sessions of 60 min. 5 days a week for 8 weeks. L-arginine was administered orally by gavage (62.5 mg / ml / day / rat). Test of exercise tolerance with incremental speed until exhaustion was performed in the 8th week of physical training. The gastrocnemius muscle was isolated and protein expressions of mtTFA, ATP synthase subunit c, cytochrome c oxidase (COXIV), AMP-activated protein kinase (AMPK), the superoxide dismutase subtypes: Cu/Zn-SOD and Mn-SOD and neuronal nitric oxide synthase and endothelial (eNOS and nNOS) were measured in the cytoplasm and extract enriched in mitochondria by Western Blott. Fasting glucose, lipid profile, nitrite and nitrate (NO_x) and MDA were also analyzed. Results: Physical training with or without L-arginine caused a reduction in blood glucose levels (approximately 8%) and plasma triglycerides (approximately 39%). While supplemented with L-arg. led to a reduction in total cholesterol (15%) compared to the SD and TR group. A significant increase in exercise tolerance in the last test in the trained animals (TR: 175% e TRLA: 229%) compared with sedentary groups. While the TRLA group presented enhanced exercise tolerance in comparison to the TR group (20%) yet. The physical training associated or not to the L-arg supplementation increased the COXIV (TR: 70% and TRLA: 100%) and Cu/Zn-SOD (TR: 80% and TRLA: 100%) expression. However, only the association exercise and supplementation of L-arginine caused a significant increase in protein expressions of mtTFA (50%), ATP synthase c (170%) when compared with SD in the extract of mitochondria. The AMPK expression was increased in groups which received L-arg supplementation (SDLA: 60% and TRLA: 100%) compared with non-supplemented groups. The TRLA group showed increased protein expression of Mn-SOD compared to all other groups (approximately 60%). The nNOS, cytoplasmic eNOS and plasma NO_x⁻ and MDA were not different between groups. The production of nitrite and nitrate was higher in muscle TRLA (approximately 120%) compared to all studied groups. Conclusion: The physical training and supplementation with L-arginine promoted greater exercise tolerance that was positively associated with increased protein expression of AMPK, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, mtTFA, COXIV and the ATP synthase c, also the NO production and less lipid peroxidation in gastrocnemius muscle of rats. These findings may provide new strategies for the prevention of cardiometabolic diseases, since this association promotes greater resistance to physical exercise.

Key words: L-arginine; physical exercise; mitochondrial biogenesis; antioxidant enzymes

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado relação positiva entre sedentarismo e a presença de fatores de risco para doenças cardiometabólicas como a obesidade, resistência à insulina, diabetes, dislipidemias e hipertensão arterial, bem como mortalidade prematura (BLAIR et. al., 1996; LAKKA et al., 2003; RENNIE et al., 2003).

O músculo esquelético é capaz de adaptar-se em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos, sendo que a mitocôndria possui função central nessa característica desse tecido (LJUBICIC et al., 2010). A mitocôndria é uma das organelas mais intensamente estudadas na célula (VIÑA et al., 2009), sua função energética foi essencial para o surgimento das células eucarióticas, bem como o desenvolvimento de organismos complexos (NISOLI; CARRUBA, 2006). Sendo assim, no músculo esquelético, a regulação da biogênese mitocondrial, que se dá a partir de seus principais fatores de transcrição, como a PGC-1 α e a mtTFA é particularmente importante visto que as mitocôndrias possuem funções essenciais em seu metabolismo (SCHRAUWEN; HESSELINK, 2004). Além disso, a disfunção mitocondrial pode provocar diversas desordens que envolvem a produção de energia, como àquelas observadas em doenças cardiometabólicas. (JOSEPH et al., 2012).

Reações de óxido-redução (redox) ocorrem em todo o nosso organismo gerando moléculas oxidantes ou antioxidantes. Parte do oxigênio consumido pelas mitocôndrias será convertido em espécies reativas de oxigênio, que podem participar de importantes vias de sinalização, porém, quando em grandes concentrações, podem ser deletérias. Assim, o desequilíbrio do sistema redox leva ao estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2011).

A prática regular de exercícios físicos tem sido mostrada como benéfica em muitos parâmetros relacionados à saúde. Estes benefícios incluem melhora na função cardiovascular, melhora na defesa antioxidante, do perfil lipídico, manutenção da glicemia e do sistema redox (ZANESCO; ANTUNES, 2007). Observa-se também que o exercício físico promove aumento da capacidade de trabalho muscular pelo aumento na captação de oxigênio e sua utilização pelas mitocôndrias do músculo esquelético, além de redução do peso corporal, resultados estes relacionados às melhorias no fluxo

sanguíneo bem como de uma maior quantidade de mitocôndrias dentro da fibra muscular (HOOD, 2009).

Desde Hipócrates, os alimentos são considerados importantes na prevenção e/ou tratamento de doenças (“Let food be thy medicine and medicine be thy food”). No entanto, a farmaconutrição é um campo novo dentro da área de saúde, considerando os compostos chamados farmacológicos que possuem seus princípios ativos derivados de fontes alimentares. Assim, a fronteira entre o que é medicamento e o que é nutriente ainda não está bem definida, e nesse contexto a farmaconutrição tem merecido cada vez mais destaque na área de saúde, bem como nas ciências básicas na tentativa de entender os mecanismos pelos quais a administração de suplementos/nutrientes pode prevenir ou tratar determinadas patologias, associados ou não a outras abordagens terapêuticas. Dentre essas estratégias, alguns estudos mostram as possíveis utilizações da L-arginina - aminoácido precursor da molécula sinalizadora óxido nítrico (NO) - em associação ao exercício físico aeróbico como fatores na prevenção de doenças cardiometabólicas (ZANESCO; PUGA, 2013).

Considerando que o óxido nítrico desempenha importante papel na biogênese mitocondrial e que o exercício físico é um importante estímulo para a sua produção, nosso trabalho investigou os efeitos da associação da suplementação de L-arginina, aminoácido precursor para a síntese de óxido nítrico, com o treinamento físico aeróbico na capacidade física (tempo para atingir a exaustão) e nos marcadores da biogênese mitocondrial e de estado redox de ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mitocôndria – características gerais

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas presentes em quase todas as células eucarióticas (FEENEY; MALLON, 2010). São formadas por duas membranas altamente especializadas, uma interna e outra externa. Possuem também o espaço intermembranas e o espaço interno da matriz, onde se situa o DNA mitocondrial e variadas enzimas (LANOE; SCHOOLWERTH, 1979).

Acredita-se que as mitocôndrias tenham surgido nas células eucarióticas através de um processo denominado simbiose (geração de um novo organismo através de uma associação simbiótica estável) a partir do contato de uma célula hospedeira e células procarióticas (OLIVEIRA; MENCK, 2001). A partir dessa associação, houve a soma da glicólise anaeróbia e do metabolismo aeróbio na produção de energia, tornando essa capacidade de geração de energia celular mais eficiente. A partir da década de 40, a mitocôndria foi reconhecida como a principal região celular responsável pelo metabolismo energético, sendo que a partir da década de 50 foram sendo desvendadas e aprofundadas as etapas do metabolismo energético por importantes pesquisadores como Krebs e Lehninger (SOUZA, 2005). A figura 1 mostra mitocôndrias de músculo esquelético de camundongo fêmea, através de microscopia eletrônica.

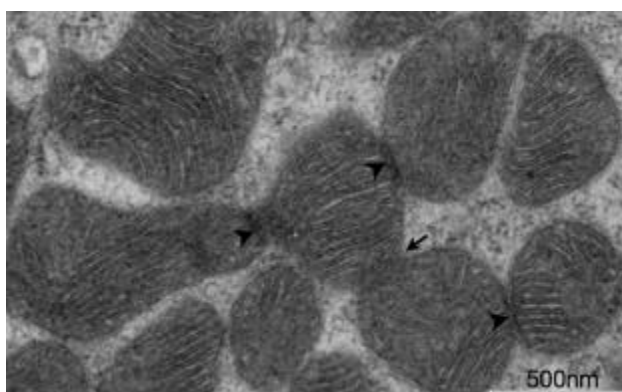


Figura 1. A mitocôndria. Imagem de mitocôndrias da região subsarcolemal de músculo esquelético através de microscopia eletrônica. As setas representam áreas de contato entre membranas externas de mitocôndrias. Adaptado de Picard e colaboradores (2013).

As mitocôndrias estão em constante alteração dentro das células. Interessantemente, o formato e quantidade das mitocôndrias variam conforme o tecido em que se encontram. Essas variações são desencadeadas por uma série de estímulos, dentre os quais o exercício físico (ALBERTS et al., 2004; NISOLI et al., 2008; VIÑA et al., 2009).

A membrana externa da mitocôndria apresenta enzimas que convertem substratos lipídicos para serem metabolizados na matriz, enquanto que a membrana interna apresenta cristas que amplificam a superfície total da organela (KISTLER; WEBER, 1975). É na membrana interna que os gradientes eletroquímicos de H^+ se dirigem à ATP sintase para a fosforilação oxidativa. Na membrana interna são contidas proteínas com importantes funções de conduzem as oxidações na cadeia respiratória, como a citocromo c oxidase (cuja função é transferir elétrons para o oxigênio molecular, formando 2 moléculas de água) e proteínas do complexo F_0 da ATP sintase (que irão funcionar como um “portão” de prótons para a produção de energia na matriz), além de proteínas transportadoras específicas que regulam a passagem de metabólitos por essa membrana (STOCK et al. 1999; ALBERTS et al., 2004).

Entre as membranas interna e externa há o espaço intermembranas, onde há importantes proteínas relacionadas à morte celular por apoptose (SIMON et al., 2000).

Na matriz mitocondrial estão presentes várias enzimas necessárias à expressão de genes mitocondriais além do próprio DNA genômico mitocondrial (mtDNA) e ribossomos mitocondriais especiais (ALBERTS et al., 2004; SHADEL, 2008). Os principais eventos metabólicos como o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), oxidação dos ácidos graxos e síntese de trifosfato de adenosina, o ATP, pela fosforilação oxidativa ocorre na matriz da mitocôndria (BALABAN, 1990; RODRIGUES, 2005). A figura 2 mostra a anatomia bioquímica de uma mitocôndria, sua estrutura e os principais componentes de cada estrutura.

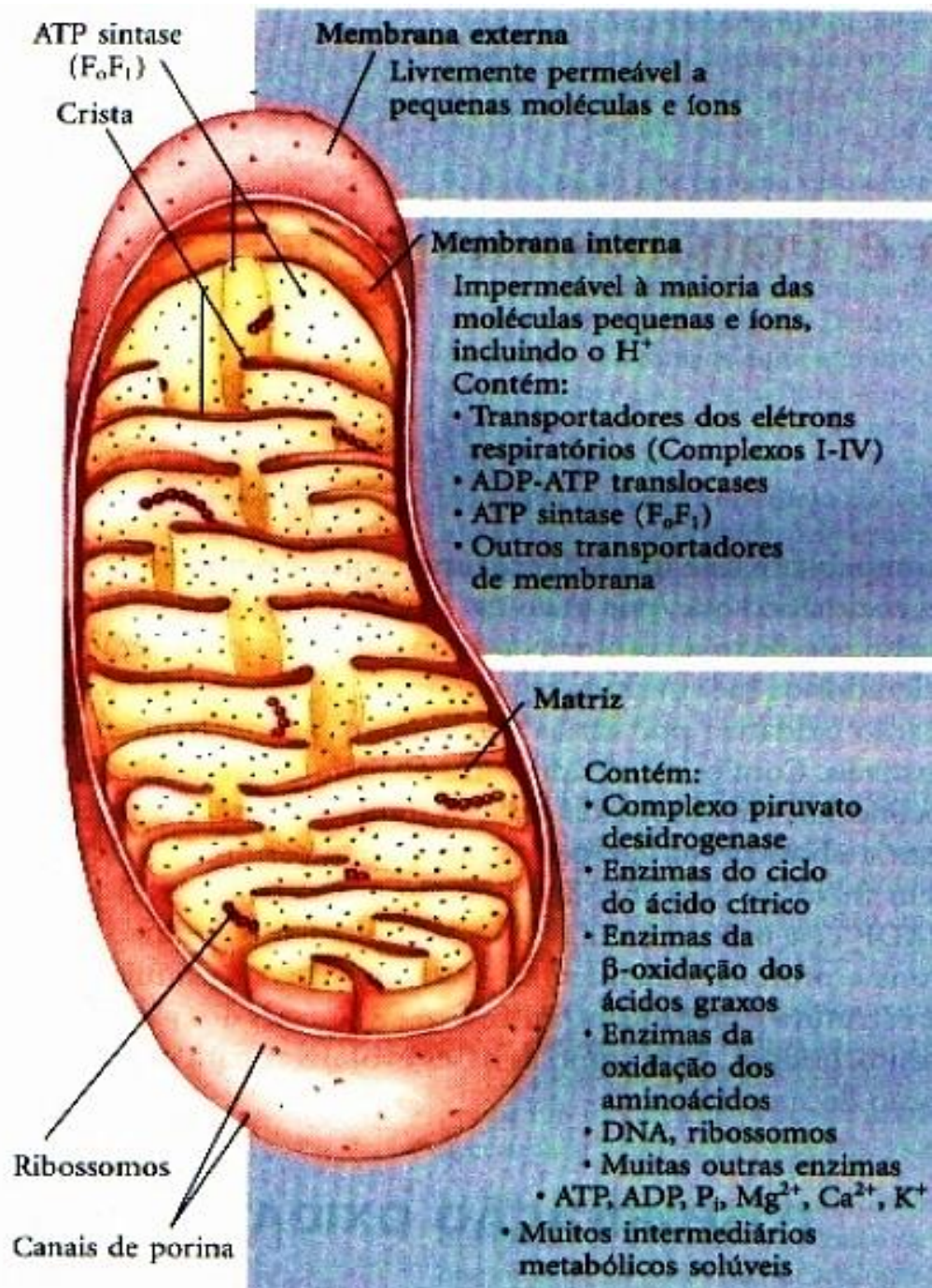


Figura 2. Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. As cristas mitocondriais proporcionam um expressivo aumento de superfície. O reservatório mitocondrial das coenzimas e intermediários está funcionalmente separado do reservatório citoplasmático. Em uma mitocôndria de músculo esquelético pode haver mais de 30.000 conjuntos de sistemas de transferência de elétrons e moléculas de ATP sintase distribuídas sobre toda a superfície de membrana (LEHNINGER et al., 2007).

Está bem estabelecido que a principal função da mitocôndria é a produção de ATP, a partir de substratos energéticos como glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Além disso, a mitocôndria atua na produção de calor e tem sido objeto de recentes

pesquisas na área de metabolismo do tecido adiposo marrom (BROOKS et al., 1980; SOUZA, 2005; BOSTRÖM et al., 2012).

2.2 Mitocôndria e metabolismo energético – produção de ATP (trifosfato de adenosina)

O metabolismo envolve reações anabólicas (consumo de ATP para a formação de moléculas mais complexas) e catabólicas (produção de ATP pela quebra de macromoléculas) (CURI, PROCÓPIO, 2009). Parte da energia gerada pela degradação de substratos (catabolismo) é utilizada para a produção de ATP, molécula de alta energia necessária para diferentes funções celulares tais como contração muscular, funcionamento das bombas iônicas, processos secretórios de hormônios e citocinas, dentre outros (GUYTON; HALL, 1997). Os principais substratos energéticos que levam à produção de ATP nas células são glicose, aminoácidos e ácidos graxos. Esses substratos são fornecidos pela dieta e disponíveis para a produção de energia no organismo a partir de processos de glicogenólise, proteólise e lipólise (WEGENER et al., 1996).

O processo de produção de ATP pelas mitocôndrias é também denominado “respiração celular”. A respiração celular ocorre em três etapas: (1) a formação de acetil-CoA a partir do piruvato, ácidos graxos e alguns aminoácidos; (2) a degradação dos resíduos do acetil pelo ciclo do ácido cítrico com a liberação de CO₂ e de coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂); e (3) a transferência de elétrons para o oxigênio molecular no complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, acoplada à fosforilação do ADP em ATP pela enzima ATP sintase (complexo V e/ou complexo F₀F₁), (ROGGE, 2009). A figura 3 ilustra essas etapas.

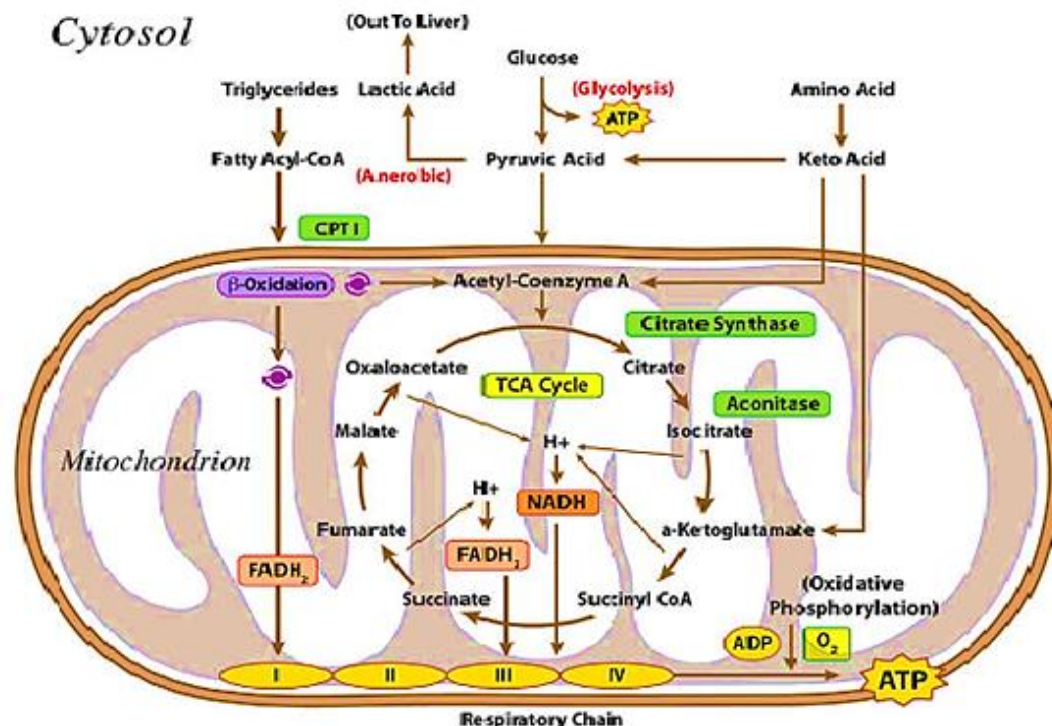


Figura 3. Produção de energia celular. Energia é formada dentro das células através do processamento de substratos vindos da alimentação através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e/ou através da β-oxidação de ácidos graxos. A formação de trifosfato de adenosina (ATP) é dirigida por uma série de reações enzimáticas que liberam elétrons de fontes de carboidratos, gorduras e proteínas e doam estes elétrons para a formação de ligações de fosfato de alta energia para ATP utilizável. A β-oxidação de ácidos graxos envolve uma série de quatro etapas, semelhantes às do ciclo TCA, que são repetidas até que todos os carbonos do canal de ácidos graxos Acil-CoA sejam convertidos para Acetil-CoA. O direcionamento de um substrato energético para a produção de ATP ou síntese de gorduras é dependente do Malonil-CoA. Se o citrato aumenta no citosol, mais malonil-CoA é formado e os ácidos graxos são sintetizados para armazenamento. Adaptado de (ROGGE, 2009).

O fluxo de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons (complexos I a IV) leva ao bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, tornando a matriz mitocondrial alcalina em relação ao espaço intermembranar. Esse gradiente de prótons fornece a energia (força próton motriz) para a síntese de ATP, a partir do ADP e Pi pela enzima ATP sintase da membrana interna (BIANCO, 2000; FENIOUK; JUNGE, 2005). A ATP sintase é uma proteína que contém 2 complexos, F₀ e F₁ (Figura 3), sendo F₁ uma proteína periférica de membrana e F₀ uma proteína integral de membrana (VON BALMOOS et al., 2009). O complexo F₀ funciona como um poro de prótons que “vazam” tão rapidamente quanto são bombeados pela transferência de elétrons. O componente F₀ é composto por três subunidades a, b e c em

uma proporção ab_2c_{10-12} (LEHNINGER et al., 2007). A subunidade c é um polipeptídeo pequeno constituído por duas hélices transmembrana que possui a função de “rotor” para a passagem dos prótons e para a mudança de conformação de F_1 para que haja a fosforilação oxidativa (CHINOPOULOS; SZABADIKAI, 2013). Sem a presença do complexo F_0 , o complexo F_1 não conseguirá sintetizar ATP a partir de $ADP+P_i$ (LEHNINGER et al., 2007).

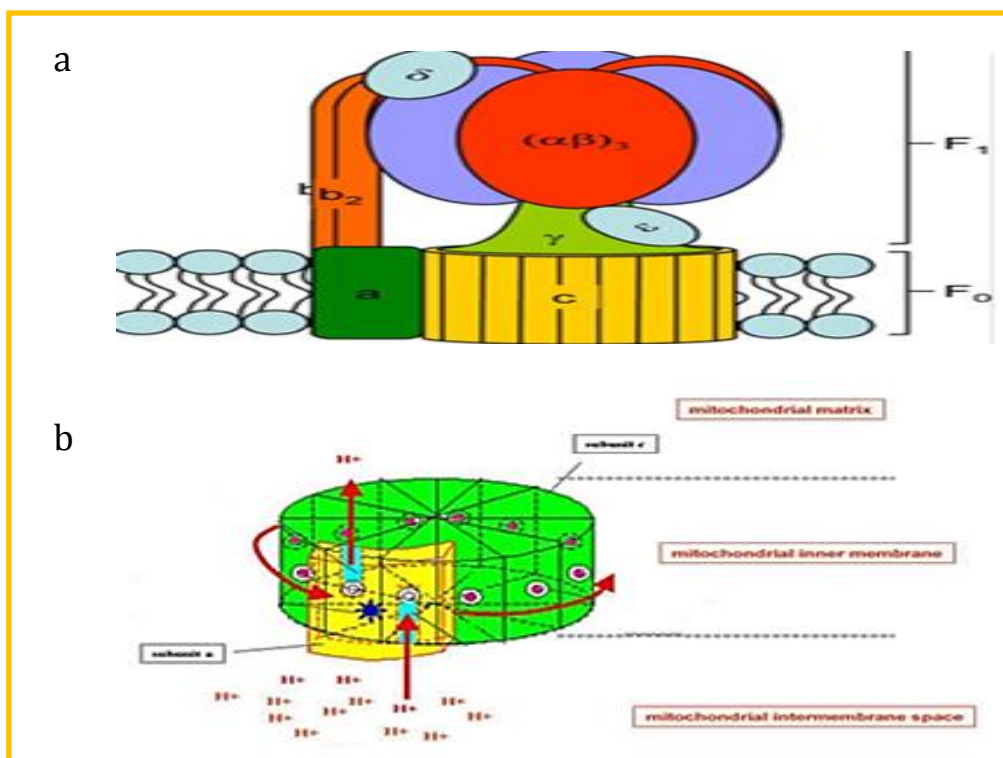
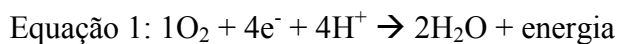


Figura 4. Complexo ATP sintase. (a) mostra os complexos F_1F_0 da proteína ATP sintase e (b) detalha o complexo F_0 e a subunidade c da ATP sintase, rotor necessário para a entrada dos prótons do espaço intermembranar para a matriz, fornecendo a energia necessária para a formação de ATP a partir de $ADP + P_i$ (OLGUN et al., 2007; VARCO-MERTH et al., 2008).

2.3 Mitocôndria, espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante

Reações de óxido-redução (redox) ocorrem em todo o nosso organismo gerando diferentes moléculas, que podem ter ações oxidantes ou antioxidantes, onde oxidação implica em perda de elétron e a redução, em ganho. Por outro lado, o desequilíbrio do sistema redox leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2009).

De acordo com Halliwell (1999), aproximadamente 80 a 90% do oxigênio que respiramos é utilizado no metabolismo aeróbio pelas mitocôndrias, na cadeia de transporte de elétrons. No complexo IV da cadeia de transporte de elétrons há a remoção de um elétron de cada uma das moléculas reduzidas de citocromo c (oxidando-as) e os quatro elétrons são adicionados ao O₂ para formar água. Isso ocorrerá com 95 a 98% do oxigênio utilizado na mitocôndria, conforme mostrado na equação 1.



Aproximadamente 2 a 5% do oxigênio é reduzido univalentemente a ânion superóxido (equação 2), o qual é uma importante espécie reativa de oxigênio.



O ânion superóxido é um radical livre que pode por si só levar a reações que irão causar destruição celular, através da peroxidação lipídica de suas membranas celulares (BARREIROS; DAVID, 2006). Além disso, o ânion superóxido é altamente reativo ao óxido nítrico (NO), molécula sinalizadora com importantes funções no metabolismo. A reação do O₂⁻ com o NO resulta na formação de peroxinitrito (ONOO⁻), espécie reativa de oxigênio potencialmente reativa e lesiva às células (GREEN et al., 2004; LAURINDO, 2008). Ou seja, a formação excessiva de O₂⁻ além de diretamente prejudicial às células, reduz a biodisponibilidade do NO, o que pode resultar em processos tromboembólicos, disfunção endotelial, desordens metabólicas, dentre outros (STOCKER; KEANEY, 2004; YUNG et al., 2006).

Por outro lado, temos um eficiente sistema antioxidante, que inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que possui a função de dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e água (LAURINDO, 2008). As SODs são encontradas no citoplasma (Cu/Zn-SOD), nas mitocôndrias (Mn-SOD), sendo esta a primeira enzima antioxidante a reagir com o ânion superóxido formado na cadeia de transporte de elétrons, sendo sua expressão imprescindível para a função mitocondrial e finalmente, a SOD extracelular (ecSOD), (GREENWALD, 1990; HINK; FUKAI, 2002). Nosso organismo possui também outras importantes enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT).

Sabe-se que em algumas condições patológicas como na obesidade, diabetes, dentre outras, há uma produção elevada de EROs, e o sistema antioxidante não consegue combater, gerando o fenômeno denominado estresse oxidativo (ANTUNES NETO; PAULA, 2011; FERREIRA et al., 2011). O estresse oxidativo pode resultar em danos oxidativos nas membranas celulares e DNA de diversas células e organelas, como nas mitocôndrias, levando à diminuição de sua capacidade de trabalho e à exacerbação de processos patológicos. Assim, a geração excessiva de EROs resulta em dano celular que pode levar a uma redução na produção mitocondrial de ATP (REN et al. 2010). Estudos mostram que o estresse oxidativo além de causar danos ao DNA mitocondrial e redução da capacidade antioxidante, resulta em prejudicada biogênese mitocondrial nos músculos esquelético e cardíaco (KIM et al., 2008). Portanto, o estresse oxidativo pode ser uma das causas de mudanças negativas na biogênese mitocondrial e considerando a importância de moléculas sinalizadoras como o óxido nítrico na regulação do metabolismo e biogênese mitocondrial, um sistema antioxidante eficiente é importante para prevenir danos mitocondriais e para aumentar a biodisponibilidade do NO (KELLEY et al., 2002).

2.4 A Biogênese Mitocondrial

O controle celular sobre as mudanças adaptativas na quantidade de mitocôndrias requer a capacidade de detectar a necessidade de produção adicional de energia mitocondrial, seguida pelo desencadeamento de vias de sinalização que resultarão em um aumento da expressão de genes para a formação de novas mitocôndrias na célula (CLEMENTI; NISOLI, 2005). O processo de biogênese mitocondrial refere-se não apenas à formação de novas mitocôndrias, mas também ao processo de aumento da organela e da expressão de enzimas relacionadas à sua função. É um processo complexo, uma vez que a mitocôndria é derivada de genomas nucleares e mitocondriais (HOOD, 2009). Diferentes estímulos, como a ativação simpática, o exercício físico, a queda da temperatura corporal, as espécies reativas de oxigênio, dentre outros, podem ativar a biogênese mitocondrial (NISOLI et. al., 2003; NISOLI et al., 2008; HOOD, 2009; KOWALTOWSKI et. al., 2009). Como apresentado na figura 5, a biogênese mitocondrial ocorre através da ativação do coativador 1 α do receptor gama ativado

pelo proliferador de peroxisoma, o PGC-1 α – (Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator (PGC)-1). O PGC-1 α é uma proteína reguladora de uma variedade de processos metabólicos, incluindo a formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos e no coração, bem como no controle da β -oxidação mitocondrial (LIN et. al., 2005, SILVEIRA et. al., 2006), e também controla a resposta celular ao estresse oxidativo (ST-PIERRE et. al., 2006). Na biogênese mitocondrial, a PGC-1 α interage com fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), os quais são conhecidos reguladores do processo de transcrição e replicação mitocondrial. Com maior importância, o NRF-1 que ativa, entre outras enzimas, o fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA ou TFAM), que é um potente estimulador da duplicação do DNA mitocondrial (VIÑA, 2009). O trabalho de Choi e colaboradores (2001) mostra que os níveis de mtTFA são proporcionais ao do mtDNA. Estudos com células HeLa mostram que redução na expressão da mtTFA está associada à diminuição da replicação do DNA mitocondrial. Portanto, o aumento na expressão da mtTFA preveniria desordens relacionadas à redução da expressão proteica desse fator, além de resultar em aumento na biogênese mitocondrial (MEDEIROS, 2008).

Todas as proteínas que regulam a transcrição e replicação do DNA mitocondrial são codificadoras nucleares e requerem entrada na organela. Provavelmente a mais importante dessas proteínas a serem transportadas é a mtTFA. A entrada das proteínas para a mitocôndria é um processo complexo que envolve transportadores de proteínas que ficam em compartimentos submitocondriais, principalmente as Translocases de Membrana Externa, (ou complexo TOM), e as Translocases de Membrana Interna (ou complexo TIM). Na matriz mitocondrial, a mtTFA leva a um aumento no número de cópias do DNA presente na célula e à replicação da mitocôndria (HOOD, 2009; VIÑA, 2009). A consequência fisiológica de um aumento na biogênese mitocondrial seria um aumento na tolerância ao exercício físico e resistência à fadiga (HOOD et al., 2006).

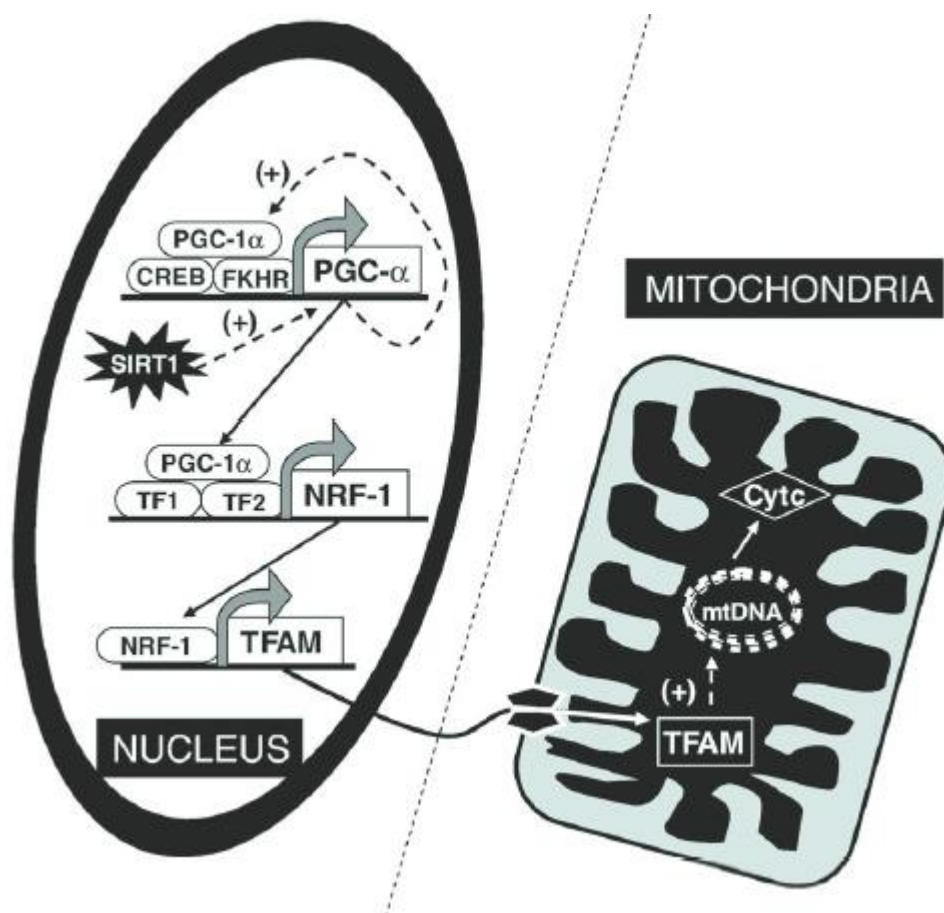


Figura 5. Representação esquemática da biogênese mitocondrial. Adaptado de Viña e colaboradores (2009).

2.5 Exercício Físico e Biogênese Mitocondrial

O exercício físico realizado cronicamente desempenha importante papel no metabolismo energético, promovendo uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos que levam à biogênese mitocondrial em todos os tipos de fibras musculares (HOLLOSZY, 1967; LJUBICIC et al., 2010). Esses efeitos resultam em melhora na resistência à fadiga e controle do peso corporal, o que está fortemente relacionado a um aumento na atividade enzimática mitocondrial e produção de ATP. Evidências mostram que a atividade contrátil leva à biogênese mitocondrial por aumento nas concentrações de cálcio citoplasmático e formação do complexo cálcio/calmodulina, aumento no consumo de oxigênio e formação de EROs (GOMEZ-CABRERA et al. 2008), ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e produção de NO (NISOLI et al. 2004; NISOLI et al.

2008) e aumento da razão AMP/ATP, e subsequente ativação da proteína quinase ativada pelo AMP, a AMPK (KAVANAGH et al. 2000; HOOD, 2001; BERGERON et al. 2001), que age como um “sensor” de energia celular e é ativada por um aumento da formação de AMP através do consumo de ATP. A AMPK desempenha diversas ações no metabolismo (KAHN et al., 2005), incluindo a ativação de PGC-1 α que promove a sinalização para a biogênese mitocondrial. A figura 6 mostra a ativação das vias da biogênese mitocondrial pela atividade contrátil muscular.

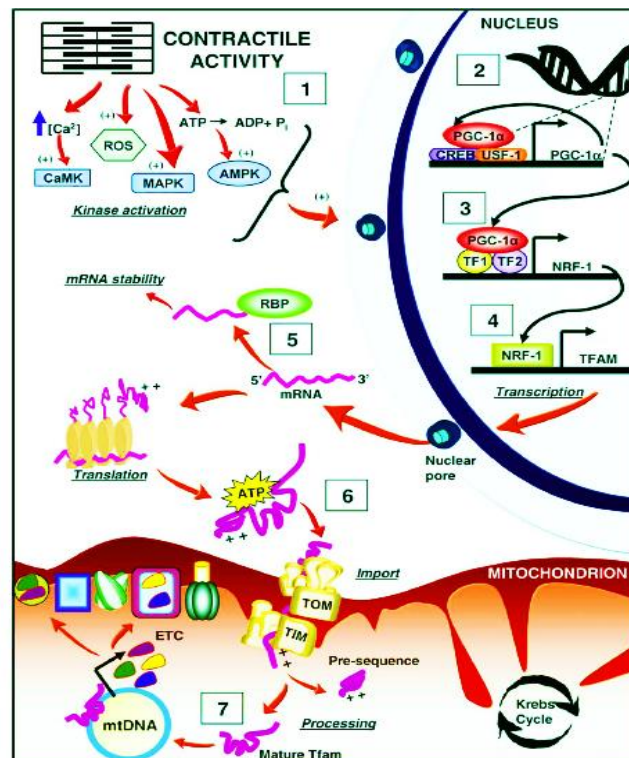


Figura 6. Biogênese mitocondrial induzida por atividade contrátil. (1) Uma única sessão de atividade contrátil resulta na ativação de múltiplas vias de moléculas de sinalização e quinases. Elevação no cálcio intracelular está associada com a ativação subsequente da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS) e ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e AMP quinase (AMPK) também constituem diversas disposições de vias de sinalização que são elevadas pela atividade contrátil. (2) Essas múltiplas cascatas de sinalização induzem a ligação de fatores de transcrição à região promotora do PGC-1 α e obtém sua transcrição. A PGC-1 α auto regula sua própria transcrição e (3) se liga à região promotora de seus genes alvo como os fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) e estimula sua expressão. (4) NRF-1 trans-ativa genes codificadores nucleares codificando proteínas destinadas à mitocôndria como o fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA/TFAM). (5) Estas proteínas destinadas às mitocôndrias são transcritas no núcleo e exportadas para o citoplasma onde o mRNA transcrito poderá ser estabilizado ou desestabilizado para a ligação das proteínas ligadas ao RNA (RBP) para a região não traduzida 3'(UTR) do mRNA. (6) Após a tradução, muitas proteínas mitocondriais são sintetizadas como proteínas precursoras com cliváveis pré-sequências N-terminais. Estas são importadas pelas maquinarias de importação proteica que consistem nas translocases da membrana externa (TOM) e translocases de

membrana interna, (TIM). Uma vez importadas, as proteínas precursoras são processadas para produzir a forma madura. (7) TFAM, um fator de transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA), pode induzir a expressão de proteínas codificadas mtDNA que, juntamente com DNA nuclear transcrita proteínas, são montadas para formar complexos de multisubunidades que se tornam parte da cadeia de transporte de elétrons (ETC). Adaptado de Ljubcic e colaboradores (2010).

O exercício físico também tem a função de melhorar a atividade da via de translocação de proteínas para a mitocôndria. Estudo prévio mostrou que a expressão das principais proteínas transportadoras (complexo TOM e complexo TIM) está aumentada em resposta à atividade contrátil muscular (TAKAHASHI et al., 1998). Além disso, estudos mostram que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) provenientes do exercício físico, promove ativação da PGC-1 α e dos fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (OLMOS et al., 2009). De fato, estudo prévio mostrou que a contração de células musculares esqueléticas promove aumento na formação das EROs e ERNs, com consequente aumento na expressão de PGC-1 α , que é abolida na presença de antioxidantes (SILVEIRA et al., 2006). Um estudo envolvendo treinamento físico em indivíduos saudáveis com suplementação de vitamina C mostrou que a biogênese mitocondrial foi inibida pela suplementação com essa vitamina antioxidante (GOMEZ-CABRERA et al., 2008). Estes estudos sugerem que o exercício físico e a ação de espécies reativas de oxigênio em conjunto podem estimular a biogênese mitocondrial.

2.6 Exercício físico aeróbio: Outras ações metabólicas

O exercício físico aeróbio é também conhecido como uma forma de prevenção para as doenças cardiometabólicas (DURSTINE; HASKELL, 1994; WAREHAM et al., 1998; ZANESCO; PUGA, 2013), pois age diretamente em seus fatores de risco como alterações da tolerância a glicose, pressão arterial e controle do perfil lipídico. Trabalhos mostram que o exercício aeróbio é capaz de promover perda de peso e/ou sua manutenção através do aumento do gasto energético e maior utilização dos substratos energéticos pelas mitocôndrias (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2001; CIOLAC; GUIMARÃES, 2004). O aumento da atividade simpática no exercício pode também aumentar a oxidação de ácidos graxos em relação ao uso de carboidratos, visto que as catecolaminas estimulam o aumento da lipólise (THOMPSON et al., 2012).

O exercício físico é conhecido por aumentar o conteúdo mitocondrial, melhorando a capacidade do tecido para o consumo de oxigênio e formação de ATP, como já mencionado anteriormente.

Muitos estudos têm demonstrado relação direta entre atividade física, menor resistência à insulina e aumento do transporte de glicose no músculo esquelético independente de insulina (HOLLOSZY, 2003). Durante o exercício, o transporte de glicose na célula muscular aumenta, assim como a sensibilidade da célula à ação da insulina. Muitos fatores determinam a maior taxa de captação da glicose como, por exemplo, maior circulação sanguínea (débito cardíaco aumentado e liberação de fatores relaxantes dependentes de endotélio – como o NO), permitindo que este substrato seja utilizado pela musculatura (IRIGOYEN et al., 2003). O transporte de glicose no músculo esquelético ocorre principalmente por difusão facilitada, através de proteínas transportadoras (GLUT's) cujos principais ativadores são a insulina e o exercício físico. Existem evidências de que o exercício físico aumenta o transporte de glicose para o músculo esquelético através da translocação da GLUT 4, e isso acontece com a presença ou não de insulina (HAYASHI et al., 1998), alguns dos mecanismos pelos quais o exercício físico promove o aumento da captação de glicose pelo músculo é através da ativação da AMPK, sendo que esta estimula a translocação do GLUT-4 e transporte da glicose no músculo esquelético (LI et al., 2004), o exercício físico também é capaz de ativar a NOS endotelial, e contribuir para o aumento da captação de glicose (LIRA et al., 2007). O exercício físico apresenta tanto efeito agudo quanto crônico sobre a sensibilidade à insulina, o que reforça a necessidade da prática de atividades físicas com regularidade tanto em pessoas saudáveis quanto com patologias já instaladas (PERSGHIN et al., 1996).

Além de seus efeitos sobre a captação da glicose, o exercício físico também promove alterações sobre o perfil lipídico e lipoproteínas. Estudos mostram que indivíduos fisicamente ativos apresentam maiores valores de HDL colesterol e menores valores de triglicérides, LDL e VLDL colesterol, quando comparado às pessoas sedentárias (DURSTINE; HASKELL, 1994; CIOLAC; GUIMARÃES, 2004). Essa melhora é atribuída a vários fatores, dentre eles, observamos que o exercício físico aumenta a atividade da enzima lipase lipoproteica, ampliando a capacidade do músculo esquelético de consumir ácidos graxos (BLOMHOFF, 1992). O exercício físico também

aumenta a atividade da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), enzima presente na lipoproteína de alta densidade (HDL) que participa do transporte de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado. Dessa forma, a ação da LCAT diminui a quantidade de colesterol no sangue (FORTI; DIAMENT, 2006). Além disso, pela ativação da AMPK há a ativação da lipase hormônio sensível (LSH) que é responsável pelo aumento da hidrólise de TAG no tecido adiposo (TANSEY et al., 2004). Através da AMPK há também a inibição de vias que ativariam a lipogênese e diminuição da lipólise, no caso a inativação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), enzima que converte o excesso de acil-CoA para malonil-CoA (uma molécula que é convertida para a síntese de ácidos graxos e é um inibidor alostérico da CPT-1). Como resultado, o nível de malonil-CoA é diminuído em resposta à AMPK, aumentando a atividade da CPT-I (carnitina palmitoil transferase I - enzima que é responsável pela transferência de ácidos graxos de cadeias longas para a entrada na mitocôndria para β -oxidação) e estimulando a oxidação de ácidos graxos no fígado (WINDER; HARDIE, 1996; WELLS et al., 2005). A AMPK também inativa a glicerol-fosfato-acil transferase (GPAT), que é uma enzima que participa da produção de TAG. A longo prazo, a AMPK atua diminuindo a expressão de genes lipogênicos e neoglicogênicos (ZHOU et al., 2001).

2.7 Óxido Nítrico: Ações metabólicas

Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico (NO) merece importante destaque no controle de diversas funções do organismo. É um radical livre produzido a partir da L-arginina (ácido 2-amino-5-guanidino pentanóico) e do oxigênio, através de cofatores como tetrahidrobiopterina (BH_4), NADPH, cálcio, calmodulina, FMN e FAD pelas várias isoformas da NO sintase (NOS) em quase todas as células do organismo (WU; MORRIS JR, 1998; JOBGEN et al., 2006). A síntese de NO ocorre a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), produzindo também a citrulina (ZAGO; ZANESCO, 2006; ZANESCO; ANTUNES, 2007).

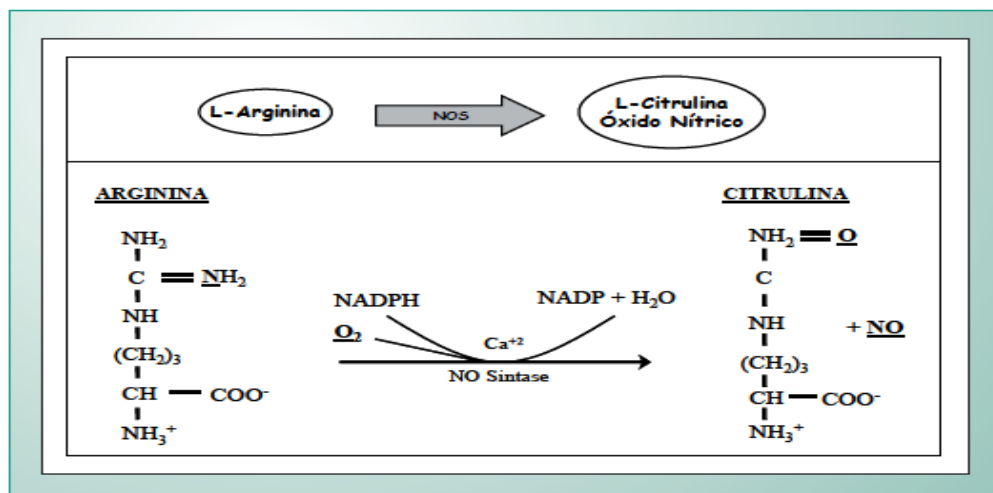


Figura 7. Formação do óxido nítrico. Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase. Adaptado de (ZAGO; ZANESCO, 2006).

Existem 3 isoformas de NOS: a endotelial (eNOS ou NOS3), localizada principalmente nas células endoteliais, onde se encontra primeiramente na membrana plasmática e citoplasma da célula; a neuronal nNOS (ou NOS1), descoberta inicialmente nos tecidos nervosos, é localizada na mitocôndria e no citoplasma celular; e a induzível (iNOS ou NOS2), a qual foi inicialmente encontrada por ser induzível sobre certas condições patológicas nos macrófagos e hepatócitos, é localizada no citoplasma (ALDERTON et al., 2001). Além disso, uma isoforma de NOS mitocondrial, provavelmente a nNOS, tem sido descrita como uma proteína constitutiva no interior da membrana mitocondrial que gera NO em uma reação Ca^{2+} dependente (GHAFOURIFAR; CADENAS, 2005). O músculo esquelético expressa todas as 3 isoformas da NOS (STAMLER; MEISSNER, 2001), sendo a nNOS predominantemente expressa em fibras do tipo II (fibras de contração rápida) (KOBZIK et al., 1994), mas também é razoavelmente expressa em fibras do tipo I (de contração lenta) (GOSSRAU, 1998; TEWS et al. 1997), a eNOS é predominantemente encontrada nas fibras do tipo I (mais vascularizadas) (STAMLER; MEISSNER, 2001; KOBZIK et al. 1995) e a iNOS é fracamente expressa tanto em fibras do tipo I quanto em fibras do tipo II (GATH et al. 1999). A síntese de NO não é regulada unicamente pela quantidade de NOS, mas também pela disponibilidade de cofatores que participam desta síntese como NADPH, BH₄, cálcio e L-arginina (WU; MENINGER, 2000).

O NO é uma molécula pequena, relativamente instável. É um radical livre que, dependendo das suas concentrações pode ter efeitos benéficos ou deletérios para o organismo. O NO liga-se à guanilato ciclase solúvel (GCs) que é o maior receptor para níveis fisiológicos de NO e esta ligação ativará o segundo mensageiro, o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) que realiza suas funções através da ativação da proteína quinase dependente de GMPc, a PKG (RUSSWURN; KOESLING, 2002).

Na musculatura lisa vascular, a via NO/GMPc/PKG reduz os níveis de cálcio intracelular, levando ao relaxamento das fibras musculares lisas. Já no músculo esquelético, as ações do NO são complexas, pois envolvem vários fatores diretos e indiretos relacionados à contração muscular. No entanto, sabe-se que doadores de NO e ativadores do GMPc resultam em aumento da velocidade de contração muscular, sendo assim, o NO pode ter influência direta na contração muscular no momento do exercício (MARECHAL; BECKER-BLEUKX, 1998). Embora o NO tenha importantes ações diretas na contração muscular, as funções metabólicas do NO tem sido muito estudadas e mais esclarecidas.

Entre as funções metabólicas do NO em concentrações fisiológicas no organismo temos: o aumento da oxidação de ácidos graxos por reduzir a disponibilidade de malonil-CoA, redução da síntese de triacilgliceróis por atividade de inibição da GPAT (enzima que regula a síntese de triacilglicerol), elevação da lipólise basal, estimulação do transporte de glicose nos músculos esqueléticos e tecido adiposo levando ao aumento a oxidação de glicose, redução da síntese de glicogênio hepático e da lipogênese no tecido adiposo (JOBGEN et al., 2006). A figura 8 mostra as principais funções metabólicas do NO.

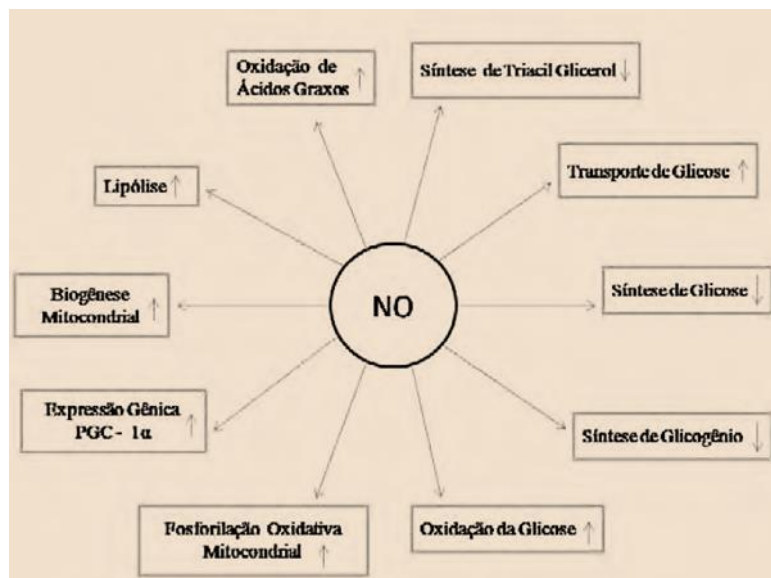


Figura 8. NO e metabolismo. Funções metabólicas onde o NO está envolvido. Modificado de Jobgen e colaboradores (2006).

Na mitocôndria, o NO age em diversos níveis. Devido sua propriedade vasodilatadora, ele regula o fluxo sanguíneo para vários tecidos, e por isso indiretamente aumenta a disponibilidade de substratos respiratórios para a mitocôndria. Além disso, o NO regula diretamente a ligação do oxigênio e sua liberação pela hemoglobina (WOLZT et. al., 1999). O NO parece influenciar diretamente o consumo de oxigênio pela mitocôndria devido sua função na adaptação à hipóxia. Em situações de baixa concentração de oxigênio, o NO liga-se de forma reversível à citocromo c oxidase, competindo com o oxigênio, modulando a fosforilação oxidativa e levando à melhor redistribuição do oxigênio às células vizinhas (CLEETER et. al., 1994; HAGEN et. al., 2003; MONCADA; BOLANOS, 2006). Essa modulação do consumo do oxigênio é muito importante no exercício físico prolongado, isso porque impede o brusco consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) pelas mitocôndrias, situação que prejudicaria a manutenção do exercício a longo prazo (MAXWELL et al, 1998). O NO, por fim, possui efeitos benéficos na formação de novas mitocôndrias, sendo que a biogênese mitocondrial induzida pelo NO é considerada um sistema de regulação do metabolismo celular a longo prazo (CLEMENTI; NISOLI, 2005). Tratamento com doadores de NO aumenta a quantidade de mitocôndrias. Este processo é mediado via ativação do GMPc, que ativa a expressão de PGC-1 α , a qual em sequência estimula a

expressão de NRF-1 e mtTFA (Figura 9), aumentando assim a transcrição e replicação do DNA mitocondrial (CLEMENTI; NISOLI, 2005).

Estudos têm mostrado possível interação do NO e AMPK na regulação da PGC-1 α e possivelmente no aumento da biogênese mitocondrial. Trabalho anterior promove evidências para propor um feedback positivo entre a produção de NO e a ativação da AMPK, que resulta no aumento da expressão da PGC-1 α , genes mitocondriais e GLUT-4. Embora tanto a AMPK quanto as enzimas NOS podem ser reguladas por múltiplos mecanismos, como o exercício físico, citado anteriormente. Porém, estudo com inibidores da NOS sugere que a inibição da NOS impede a estimulação da biogênese mitocondrial mediada por doadores de AMPK, como a AICAR (LIRA et al., 2010).

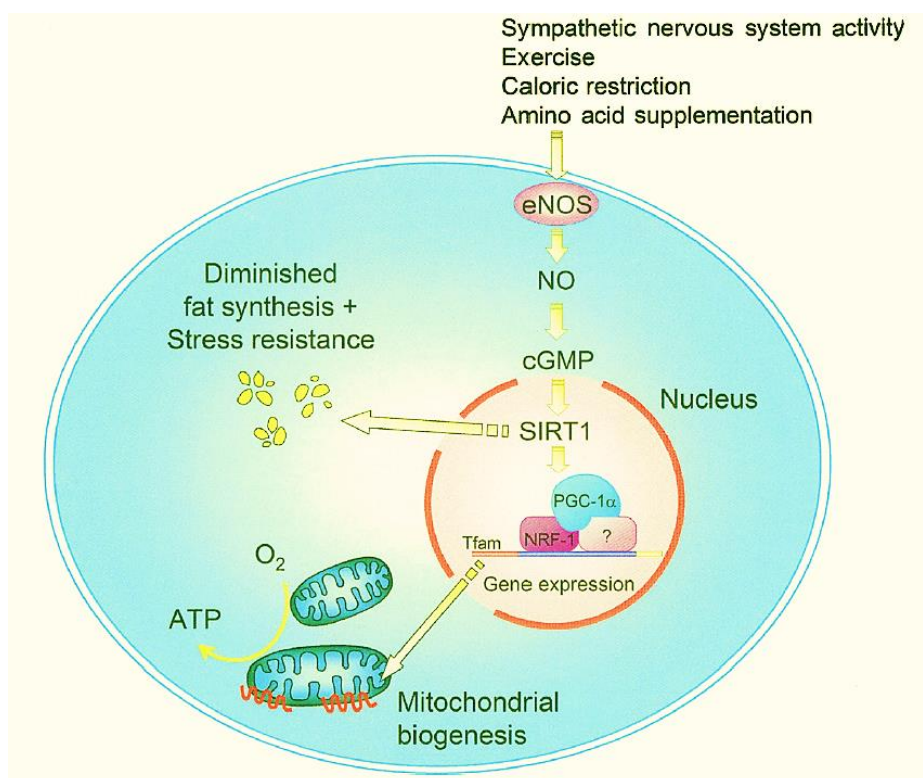


Figura 9. NO e ativação da biogênese mitocondrial. Diferentes estímulos, incluindo a ativação do sistema nervoso simpático, atividade física, restrição calórica e suplementação de aminoácidos, em especial a L-arginina, podem induzir à produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) através de um aumento nos níveis da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nos músculos esquelético e cardíaco. Os genes mitocondriais envolvidos na biogênese mitocondrial são ativados como consequência, levando ao aumento da biogênese mitocondrial e da produção de ATP. Adaptado de Nisoli e colaboradores (2004).

A suplementação na dieta com L-arginina, a qual aumenta as concentrações de NO tem sido mostrada como uma possibilidade para aumentar a expressão de NOS endotelial e produção de NO, levando à melhora da biogênese mitocondrial (NISOLI et al., 2008). O exercício físico é também um dos estimuladores para a produção de NO, como mostrado na figura 9. No entanto, nenhum trabalho avaliou a suplementação de L-arginina com o treinamento aeróbio crônico na expressão das proteínas mitocondriais.

2.8 Suplementação com L-arginina

Nos últimos 30 anos, tem havido um crescente interesse pelas propriedades bioquímicas, farmacológicas e nutricionais da L-arginina, no sentido de explorar suas possíveis funções na prevenção e tratamento de diversas desordens cardiometabólicas (LI et al., 2009).

A L-arginina é um aminoácido essencial para crianças e condicionalmente essencial para adultos, particularmente em situações de recuperação de trauma ou doenças (VISEK, 1986; WU; MORRIS, 1998). A fonte de arginina livre é a partir das proteínas da dieta, especialmente das carnes, laticínios e frutas como as nozes, castanhas, avelãs, caju e coco. No entanto, 40% desta arginina é metabolizada no intestino antes de alcançar a circulação sanguínea. É importante destacar que 85% da L-arginina presente na circulação se origina através do turnover das proteínas corporais. Além disso, há a síntese endógena (*de novo*) da L-arginina, a partir da citrulina (HARRISON, 1997; MAXWELL; COOKE, 1998). A citrulina é sintetizada a partir da glutamina e da prolina nas mitocôndrias dos enterócitos, liberada do intestino delgado e captada principalmente pelos rins para a produção de arginina. Assim, seres humanos com rins funcionais possuem grande parte da L-arginina vinda a partir da citrulina endógena e também exógena (WU et al., 2009).

O metabolismo da L-arginina é complexo, uma vez que dentro das células participa de vias muitas delas ainda não totalmente esclarecidas (COMAN et al., 2008). Assim, a L-arginina participa da síntese de diversas proteínas, como de uréia, creatina, agmatina, dentre outras (MORRIS, 2004). A L-arginina parece exercer grande influência em diversos sistemas do organismo, como o cardiovascular, imune, hormonal, assim como no metabolismo. Essas diversas funções estão relacionadas a

diversos mediadores, em especial o NO, um de seus mais conhecidos produtos (WU et al., 2009).

Atualmente, muitos trabalhos têm se atentado aos efeitos da L-arginina no metabolismo dos substratos energéticos, isso porque é cada vez mais essencial que encontre-se alternativas farmacológicas para a prevenção e /ou tratamento de desordens cardiometabólicas. Assim, estudos em modelos animais têm mostrado que níveis fisiológicos de L-arginina estão envolvidos na oxidação de glicose e de ácidos graxos (JOBGEN et al., 2009; WU et al., 2009). Sendo assim, importante para a manutenção do peso corporal.

Os possíveis mecanismos relacionados a esses diversos efeitos metabólicos da L-arginina relacionam-se principalmente a vias dependentes do NO (BELL et al., 2001). Contudo, sabe-se que níveis fisiológicos de arginina levam ao aumento na produção de monóxido de carbono (CO) via hemeoxigenase em diversos tipos celulares (LI et al., 2009), sendo que tanto o NO quanto o CO ativam a guanilil ciclase. Esta por sua vez, leva à formação do segundo mensageiro GMPc, e assim a todas as ações no metabolismo dos substratos energéticos que poderiam também levar a um aumento da resistência à fadiga e redução do peso corporal.

Os valores de Km da NOS para a arginina são de 3 a 20 micromolares, o que representa aproximadamente 10% das concentrações intracelulares de L-arginina. Entretanto, estudos mostram que um aumento de 0,05 a 10 micromolares das concentrações extracelulares de L-arginina leva a um acréscimo na produção de NO em células endoteliais e macrófagos ativados (WU; MEININGER, 2002). Ou seja, mesmo quando há concentrações normais de L-arginina na circulação, ainda assim a suplementação poderia levar ao aumento na produção de NO. Contudo, não foram encontrados estudos mostrando um efeito crônico da suplementação com L-arginina na produção de NO no músculo esquelético.

3. HIPÓTESE

Considerando a importância do exercício físico aeróbio na prevenção de doenças cardiometabólicas, como a obesidade e o diabetes mellitus tipo II e também que o exercício físico e o NO isoladamente têm sido mostrados como estímulos para a biogênese mitocondrial por vias de sinalização distintas (figura 10), nossa hipótese foi que a suplementação com L-arginina levaria a um aumento na produção de óxido nítrico na musculatura esquelética de animais treinados e essa associação resultaria em um aumento na expressão de marcadores da biogênese mitocondrial e no estado redox de animais saudáveis, resultando em melhoria na tolerância ao esforço, além de redução do peso corporal e melhoria do perfil lipídico e glicemia.

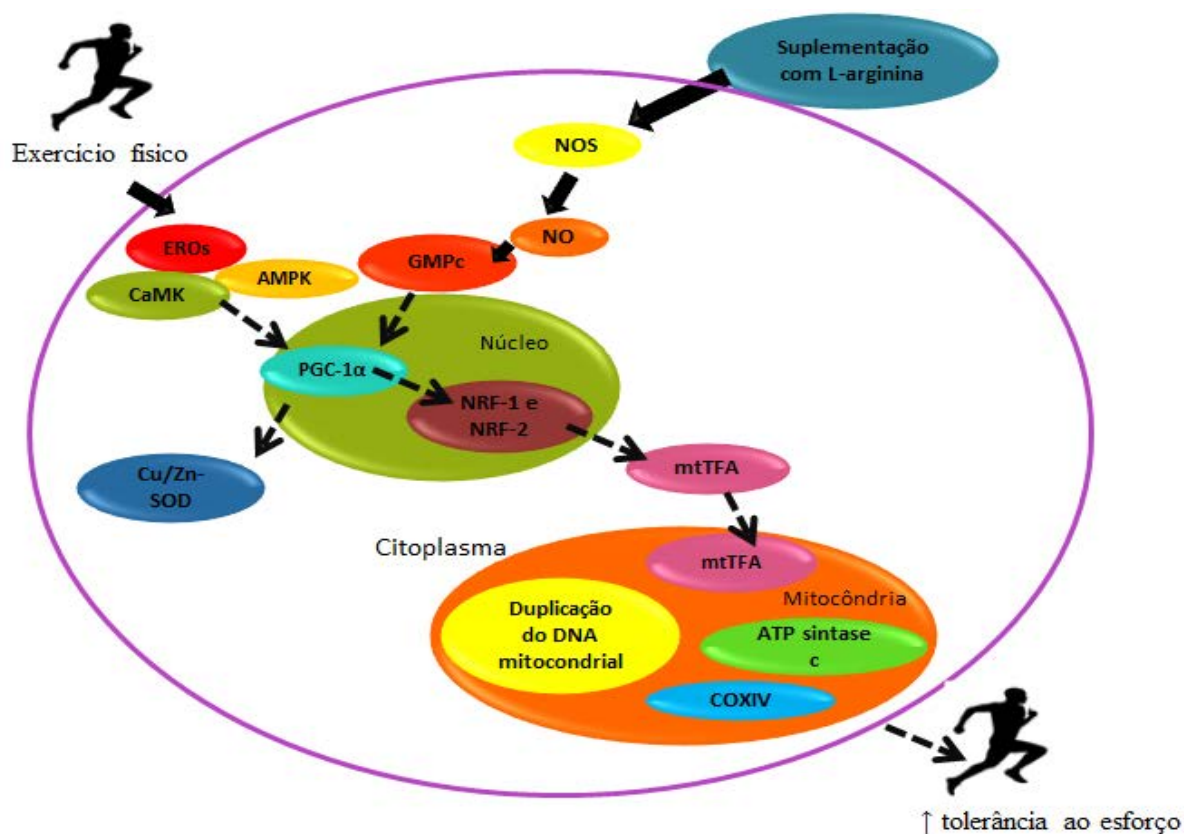


Figura 10. Hipótese do estudo. O exercício físico associado à suplementação com L-arginina resultaria em uma ampliação no estímulo para a biogênese mitocondrial, através da formação de EROs, ativação da AMPK e da CAMK pelo exercício físico e aumento da formação de NO e GMPc a partir da L-arginina. Estes são estímulos para a ativação da PGC-1 α e mtTFA. Essa ativação levaria a um aumento da biogênese mitocondrial com consequente aumento na expressão da COXIV e ATP sintase c, bem como da expressão da enzima superóxido dismutase na célula muscular esquelética, resultando então em

aumento na tolerância ao esforço físico. As setas preenchidas compreendem vias de sinalização classicamente estudadas. As setas tracejadas compreendem as vias de sinalização pertencentes à hipótese do estudo.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da associação do treinamento físico aeróbico à suplementação com a precursora do NO, L-arginina, sobre a biogênese mitocondrial no músculo esquelético, perfil lipídico, tolerância ao esforço físico e estado redox de ratos.

4.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

I. Através da técnica de Western Blott, detectar possíveis alterações na expressão citoplasmática e do extrato enriquecido de mitocôndrias das proteínas responsáveis pela função e biogênese mitocondrial e estado redox:

1. PGC-1 α ;
2. AMPK
3. mtTFA
4. subunidade c da ATP sintase
5. Citocromo c oxidase (COXIV)
6. NOS endotelial
7. NOS neuronal
8. Cu/Zn-SOD
9. Mn-SOD

II. Através de análises bioquímicas, avaliar no citoplasma muscular:

1. Nitrito e nitrato

2. MDA

III. Através de análises bioquímicas, avaliar diferentes parâmetros sanguíneos de jejum como:

1. Colesterol total
2. Colesterol HDL
3. Triglicerídeos sanguíneos
4. Glicemia
5. Nitrito e nitrato
6. Malondialdeído (MDA)

IV. Avaliar a tolerância ao esforço físico através do máximo tempo de permanência em teste de velocidade incremental.

V. Avaliar a evolução do peso corporal e do consumo alimentar, bem como a massa da gordura epididimal.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Ratos Wistar (270-310 g, n=80) provenientes do Centro Multi-institucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), ficaram alojados no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de ciências médicas (FCM) em gaiolas coletivas, com 4 animais por gaiola. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* (Ração Padrão Labina, Purina). O biotério dispõe de ciclo claro/escuro (12/12 h).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética animal (CEUA – IB UNESP), protocolo 0715 de 22 de março de 2012 (vide anexo 1).

5.2 Grupos Experimentais

Para este estudo, os animais foram divididos em 4 grupos:

1. Grupo sedentário (SD)
2. Grupo sedentário + L-arginina (SDLA)
3. Grupo treinado (TR)
4. Grupo treinado + L-arginina (TRLA)

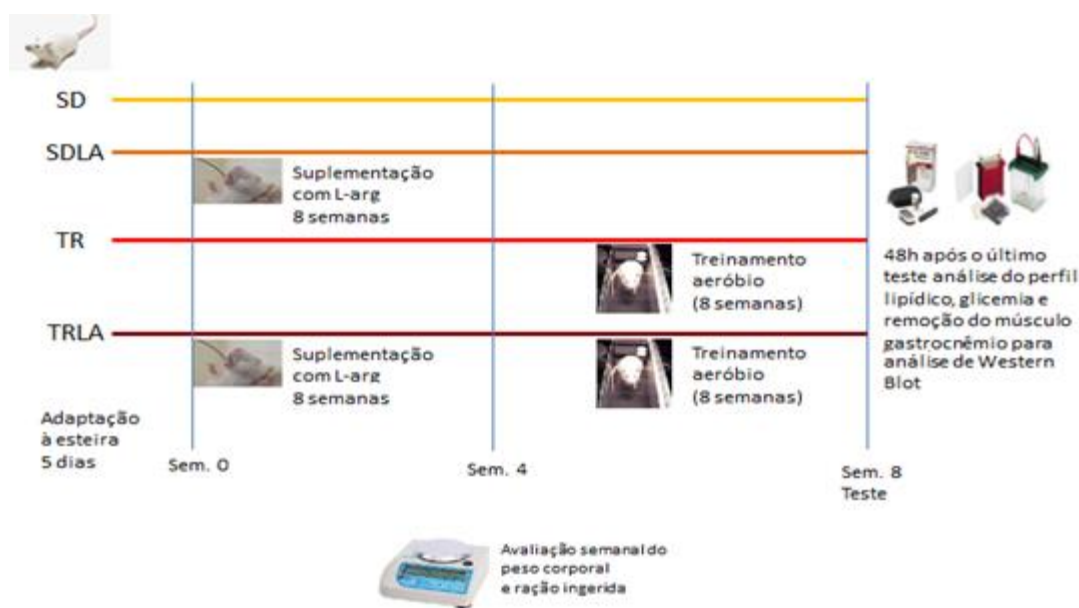
5.3 Suplementação oral com L-arginina (L-arg)

Os animais receberam diariamente, durante 8 semanas, suplementação oral de L-arg, que foi administrada por entubação orogástrica, utilizando-se seringas de 1 ml e agulhas de gavagem, onde foi administrada uma dose diária de 62,5 mg/ml/dia/rato (YANG et al., 1998) no período da manhã. A suplementação foi administrada sempre após a sessão de exercício físico, no sentido de evitar ações agudas da L-arginina no momento do treino/teste e garantir o bem estar do animal durante o treinamento, evitando desconforto gástrico no momento do exercício físico.

5.4 Programa de Treinamento Físico aeróbio: Corrida em esteira

Na primeira semana de estudo, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira que consistiu em manter os animais nas velocidades entre 0,3 km/h no primeiro dia até 0,6 km/h no quinto dia da semana. As sessões obtiveram progressão de tempo até que os animais conseguissem permanecer correndo na por 60 minutos. Após o período de adaptação, o treinamento físico aeróbio foi iniciado com uma velocidade de 0,6 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente conforme a evolução do grupo de animais, até atingir a velocidade final de 1,2 km/h a partir da terceira semana de treinamento. Esta intensidade de exercício escolhida corresponde à velocidade em que os animais atingem a máxima fase estável de lactato, o que corresponde a uma intensidade moderada de exercício aeróbio (MANCHADO et al., 2005).

As sessões de exercício físico foram realizadas 5 dias contínuos por semana, com duração de 60 minutos cada, durante o período de 8 semanas. As sessões foram realizadas em uma esteira ergométrica elétrica, em baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70m de largura, 0,45m de altura e 1,35m de comprimento. Após o término do treinamento físico, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas, antes de serem sacrificados. O esquema abaixo ilustra o protocolo experimental.



Esquema do protocolo experimental

5.5 Teste de esforço

O teste de esforço consistiu em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 0,3 km/h a cada 3 minutos, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério utilizado para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr mediante o incremento de velocidade da esteira (BROOKS; WHITE, 1978). Este teste apresenta correlação significativa com a medida do consumo direto de oxigênio em ratos machos, conforme evidenciado por Rodrigues e colaboradores (2007).

Para excluir os efeitos fisiológicos agudos da última sessão de exercício, os animais foram eutanasiados 48h depois da última sessão de exercício físico aeróbio.

5.6 Peso corporal, gordura epididimal e consumo alimentar

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram mensurados ao início do protocolo experimental e semanalmente até o final do estudo.

Após a eutanásia, a gordura epididimal foi isolada e pesada.

5.7.1 Perfil lipídico

Os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TAG) foram medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico (KATAL-MG). O HDL-colesterol (HDL-C) foi determinado por método de precipitação utilizando também kit específico (KATAL-MG), seguindo as instruções do fabricante.

O LDL colesterol foi determinado a partir da equação de Friedwald (SPIGHI, et al., 2013), onde:

$$\text{LDL-C} = \text{Colesterol total} - \text{HDL colesterol} - (\text{Triglicérides}/5)$$

5.7.2 Concentrações de nitrato e nitrito (NO_x^-) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticos

Amostras de plasma foram utilizadas para determinação da produção endógena de NO por meio indireto através da quantificação dos ânions nitrato e nitrito (NO_x^- ;

μM), produtos terminais da oxidação do NO, pelo método colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). As amostras foram previamente ultra filtradas por meio de microfiltros (Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA).

Foram também utilizadas amostras de plasma para a determinação do malondialdeído (MDA) pelo método colorimétrico para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (μM) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA).

5.8 Determinação das concentrações de nitrato e nitrito (NO_x^-) em tecido muscular

Amostras de extrato citoplasmático foram filtradas e utilizadas para a determinação da produção endógena de NO por meio da quantificação dos ânions nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), pelo método ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de nitrito e nitrato citoplasmático foi determinada pela razão da concentração obtida com a leitura da absorbância da amostra filtrada com a concentração da quantificação proteica do filtrado da mesma amostra.

5.9 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) citoplasmáticas

Foram utilizadas amostras de citoplasma do músculo gastrocnêmio para a determinação do (MDA) pelo método colorimétrico para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (μM) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). A concentração de MDA foi determinada pela razão da concentração obtida pela leitura da absorbância da amostra com a concentração proteica da mesma amostra.

5.10 Obtenção do extrato muscular total

Porções de aproximadamente 200mg do músculo gastrocnêmio de ambas as patas do animal foram homogeneizadas em politron (Polytron[®] Homogenizers) em

tampão contendo 10mM de EDTA, 100mM de TRIS, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, Na_3VO_4 , PMSF e Aprotinina.

5.11 Obtenção do extrato enriquecido de mitocôndrias

A técnica de isolamento da fração enriquecida de mitocôndrias do músculo esquelético de ratos foi baseada em técnica descrita por trabalhos anteriores (TONKONOJI ; SAHLIN, 1997; SILVEIRA et al., 2006). Esta técnica teve por objetivo a separação de um extrato enriquecido de mitocôndrias e um extrato de citoplasma, onde ambos foram usados para as análises posteriores por Western Blott. Para conseguir esses extratos, os músculos gastrocnêmios de ambas as patas do animal foram homogeneizados em um béquer fixado no gelo com um meio contendo 100mM de sacarose; 100mM de KCL; 50mM de Tris-HCl; 1mM de KH_2PO_4 ; 0,1mM EGTA e 0,2% de albumina sérica bovina (BSA); pH 7,4. Em seguida, foram realizadas centrifugações diferenciais para recolhimento do citoplasma em tubo separado e separação da fração enriquecida de mitocôndrias a partir do recolhimento do pellet mitocondrial e ressuspensão da fração de mitocôndrias em meio contendo 225mM de manitol; 75mM de sacarose; 10mM de Tris HCl; 0,1mM de EDTA; 10mM de KH_2PO_4 e 10 mM de KCL; pH 7,4.

5.12 Avaliação das proteínas de interesse por Western Blott

As amostras de extrato citoplasmático e enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmio foram utilizadas para a determinação da concentração de proteínas pelo método de BCA (Pierce), e então a quantidade necessária para aplicar 75 μg e 50 μg (respectivamente para os extratos citoplasmático e mitocondrial) de proteína em géis de acrilamida de 7,5% e 12% foi calculada para cada amostra. Em seguida foi preparado o gel em um sistema Mini-Protean (BioRad) para detecção de proteínas de interesse para a realização do projeto.

No extrato citoplasmático, foi avaliada a expressão total da proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK α 1 e α 2), fator de transcrição mitocondrial A, proteína antioxidante superóxido dismutase (SOD) em sua isoforma específica citoplasmática

(CuZn-SOD) e óxido nítrico sintase neuronal e endotelial (nNOS e eNOS). Já no extrato enriquecido de mitocôndrias, foram avaliadas a mtTFA, ATP sintase subunidade c, citocromo c oxidase e a isoforma da SOD avaliada foi a mitocondrial (Mn-SOD).

5.12.1 Eletroforese e transferência das amostras

As alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia- 0,5 mM; SDS- 0,17 mM; DTT- 39 μ M; Tris- HCL pH=8 - 0,01 M e Azul de bromofenol- 0,5%) e mantidas a 99°C durante 5 minutos e, em seguida, estas amostras foram aplicadas no gel com SDS a 3% (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese em gel com 7,5% e 12% de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema Mini-Protean II (Eletrophoresis Cell, BioRad) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 100 Volts (Power Pac 200, BioRad). Junto com as amostras foi aplicado no gel um padrão de proteínas “marcadores de peso molecular” (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada, durante 20 segundos, com metanol. Para a transferência, o gel, a membrana e o papel Whatman foram colocados em um sistema de *sandwich* e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Modulo de Transferência, BioRad) contendo a solução de transferência (Tris- 25 mM; Glicina- 190 mM; SDS-0,05 % e Metanol- 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA (Power Pac 200, BioRad), durante 18 horas. A transferência foi confirmada através da coloração do gel com Ponceau (ROMERO-CALVO et al., 2010). As proteínas das membranas foram fixadas e coradas com ácido acético 1%, por 5 minutos, e coradas com Ponceau- 1%; ácido acético-1% durante 5 minutos. A descoloração das membranas foi feita com uma sequência de lavagens iniciada com água destilada seguida por finalização com o TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %). As membranas foram então incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e sob agitação com uma solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %).

5.12.2 Incubação com os anticorpos e detecção das proteínas de interesse

Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas durante 15 horas com anticorpo primário contra as isoformas da AMPK α 1 e 2 (Abcam, Cambridge-MA), PGC-1 α (1:1000 Cell Signalling Technology), mtTFA (1:500 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz-CA), CuZn-SOD (1:1000, Sigma-Aldrich), Mn-SOD (1:1000, Axxora LLC, San Diego-CA), nNOS e eNOS (1:1000, BD Biosciense, San Jose-CA), ATP sintase subunidade c (1:500, Abcam, Cambridge-MA) e citocromo c oxidase (1:1000, Novus Biologicals, Cambridge-UK) em solução bloqueante à temperatura de 4°C e sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos com TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %), sob agitação. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com anticorpos secundários, anti-goat (1:4000 para mtTFA, Jackson, West Grove-PA), anti-mouse (1:4000 para nNOS, 1:4000 para ATP sintase c e 1:5000 para Cu/Zn-SOD, Abcam) e anti-rabbit (1:5000 para Mn-SOD, 1:5000 para COXIV, 1:4000 para AMPK, Amersham, Piscataway-NJ), diluídos em solução bloqueante e incubados por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Ao final, o excesso dos anticorpos secundários foi lavado com solução de TBS-T em 4 lavagens sucessivas de 10 minutos cada. As proteínas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science). A seguir, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Life Science), e as bandas impregnadas foram posteriormente reveladas. A razão da coloração de Ponceau foi realizada para normalização da expressão das proteínas de interesse (ROMERO-CALVO et al., 2010). A análise densitométrica das bandas das proteínas separadas pela técnica de *Western Blott* foram feitas pela gravação dos filmes por um *scanner*. Para análise e quantificação das bandas foi utilizado o programa de análise de imagens ImageJ.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M) para n experimentos. Foi realizada análise de variância (ANOVA Two-way) para determinação

das diferenças entre os grupos e pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0, foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

A figura 11 apresenta os resultados referentes ao peso corporal, ingestão alimentar, gordura epididimal e peso do músculo gastrocnêmio nos quatro grupos estudados.

Os valores de peso corporal foram semelhantes para todos os grupos no início do estudo, sendo que ao final das 8 semanas esses valores foram significativamente menores nos grupos TR e TRLA (aproximadamente 20%) em relação aos grupos sedentários (SD e SDLA) (Figura 11, painel A). A ingestão alimentar foi menor em ambos os grupos treinados (aproximadamente 23%) quando comparados aos grupos sedentários (Figura 11, painel B). De maneira similar, a massa da gordura epididimal foi menor em ambos os grupos treinados (TR: 42% e TRLA: 38%) em comparação aos animais sedentários (Figura 11, painel C). Não houve alteração no peso do músculo gastrocnêmio entre os grupos (Figura 11, painel D).

A tabela 1 mostra os valores do perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides) e glicemia de jejum. Podemos observar que os valores de colesterol total foram menores no grupo SDLA (aproximadamente 12%) quando comparado aos grupos SD e TR. Todavia, a suplementação com L-arginina quando associada ao treinamento físico levou a um aumento nas concentrações de HDL-C (44%) em comparação ao grupo sedentário. Já o treinamento isoladamente provocou um aumento nas concentrações de LDL-C (39%) quando comparado ao grupo SD, embora a razão HDL/LDL não tenha se modificado nesse grupo. Já no grupo TRLA a razão HDL/LDL foi significativamente maior em comparação a SD e SDLA (185%). Os grupos TR e TRLA apresentaram valores reduzidos de triglicérides em aproximadamente 60% quando comparados aos grupos SD e SDLA.

Os valores de glicemia também foram menores nos grupos treinados (aproximadamente 8%) quando comparados aos grupos sedentários. A suplementação com L-arginina levou a valores aumentados de glicemia no grupo SDLA em comparação a SD (11%) (Tabela 1).

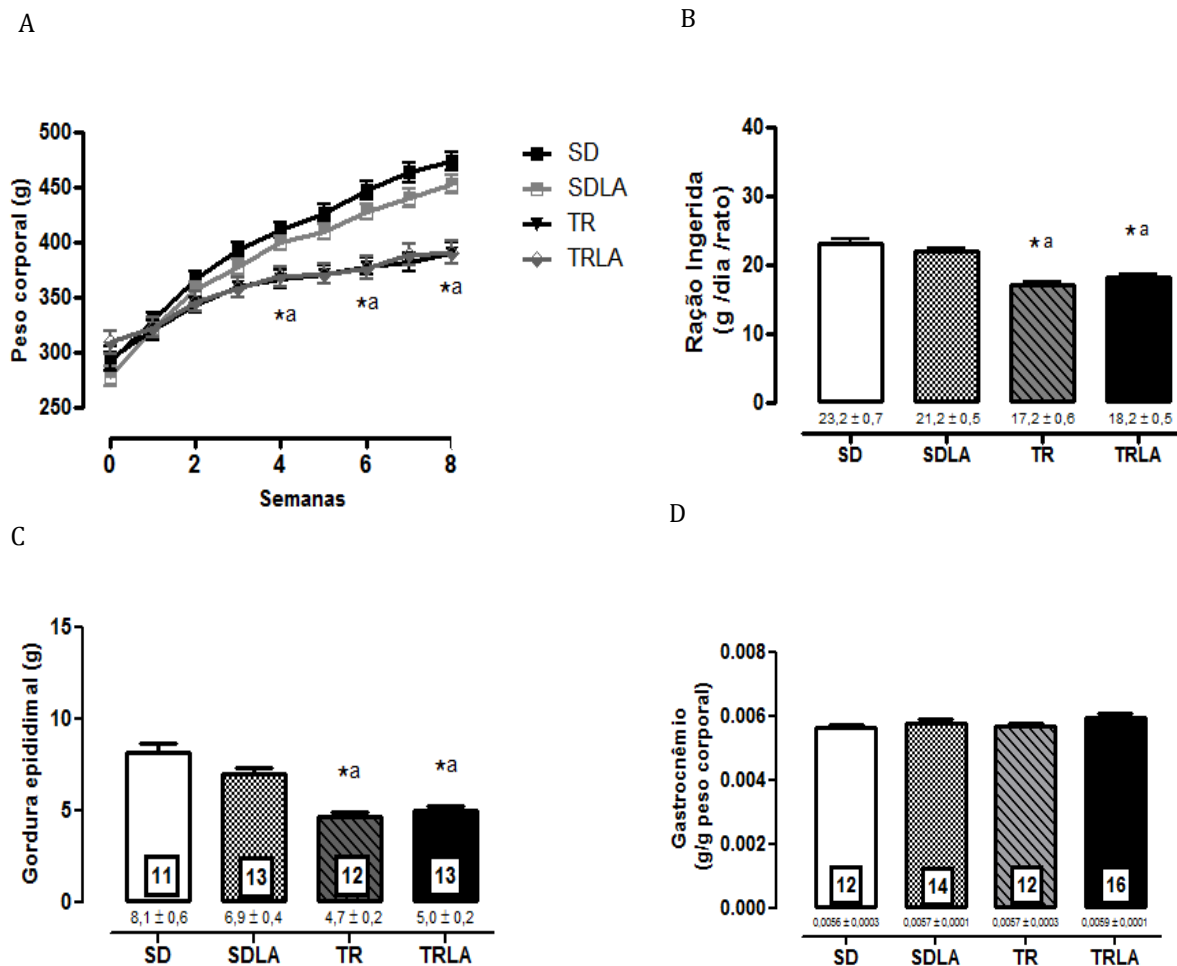


FIGURA 11. Evolução do peso corporal, ração ingerida, peso da gordura epididimal e do músculo gastrocnêmio de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SDLA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TRLA). * $p < 0,05$ TR e TRLA comparados ao grupo sedentário (SD). ^a $p < 0,05$ TR e TRLA comparados ao grupo SDLA.

Tabela 1. Colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicerídeos e glicemia de jejum de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SDLA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TRLA).

	SD	SDLA	TR	TRLA
Colesterol Total(mg/dl)	51,5 ± 1,5	45,3 ± 2,3 ^{*b}	55 ± 0,9	50,4 ± 1,6
HDL-C (mg/dl)	14,9 ± 1,6	16,7 ± 1,4	17,9 ± 1,7	21,4 ± 1,8*
LDL-C (mg/dl)	23,2 ± 2	24,8 ± 2	32,3 ± 1,8*	25,2 ± 2
Razão HDL/LDL (mg/dl)	0,3 ± 0,05	0,4 ± 0,05	0,6 ± 0,09	1,1 ± 0,2 ^{*a}
Triglicerídeos (mg/dl)	69,9 ± 3,7	76,6 ± 3,7	44,6 ± 4,8 ^{*a}	41,5 ± 3,6 ^{*a}
Glicemia (mg/dl)	84,7 ± 2	93,8 ± 2,1*	77,5 ± 1,5 ^{*a}	77,9 ± 1,8 ^{*a}

Dados expressos como ± SEM de $n=5-10$ animais/grupo. * $p<0.05$, em comparação ao grupo SD; ^a $p<0.05$ em comparação ao grupo SDLA, ^b $p<0.05$ em comparação ao grupo TR; ^c $p<0.05$ em comparação ao grupo TRLA.

Tolerância ao esforço

O treinamento físico empregado neste estudo promoveu melhora significativa na tolerância ao esforço nos animais submetidos ao treinamento físico na oitava semana de estudo (TR: 20,6 ± 1,2 min e TRLA: 24,7 ± 0,6 min), quando comparado aos animais sedentários (SD: 7,8 ± 1,6 min e SDLA: 10,7 ± 1,5 min). Podemos observar que a associação suplementação com L-arginina e exercício físico levou a um maior tempo total de exaustão em comparação ao grupo apenas treinado (20%) (figura 12).

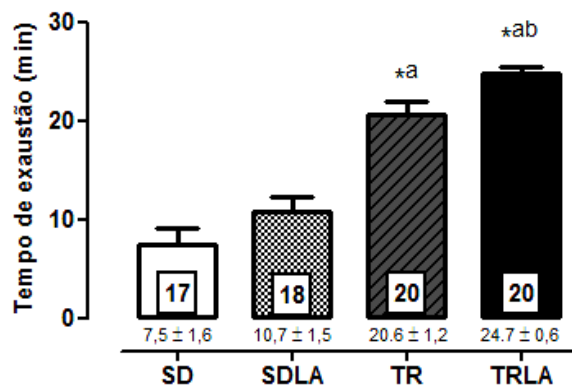


FIGURA 12. Tolerância ao esforço avaliada através de teste de esforço com velocidade incremental até a exaustão na oitava semana de estudo em ratos sedentários e treinados, submetidos ou não à suplementação oral com L-arginina. * $P < 0,05$ TR e TRLA em comparação a SD. ^a $p < 0,05$ TR e TRLA em comparação ao grupo SDLA. ^b $p < 0,05$ TRLA em comparação ao grupo TR.

Expressão proteica de NOS e concentração de nitrito e nitrato no plasma e no citoplasma muscular

Considerando os resultados anteriores e com o objetivo de detectarmos os mecanismos pelos quais o exercício físico associado à suplementação de L-arg estaria melhorando o tempo de exaustão, passamos a investigar se a associação treinamento físico/L-arg promovia mudanças na via nNOS/NO ou eNOS/NO, ambas presentes em músculo esquelético de ratos. Observamos que não houve diferenças tanto na expressão proteica da nNOS na fração citoplasmática quanto na mitocondrial (Figura 13, painéis A e B). Não houve também diferenças na expressão da eNOS (Figura 13 painel C).

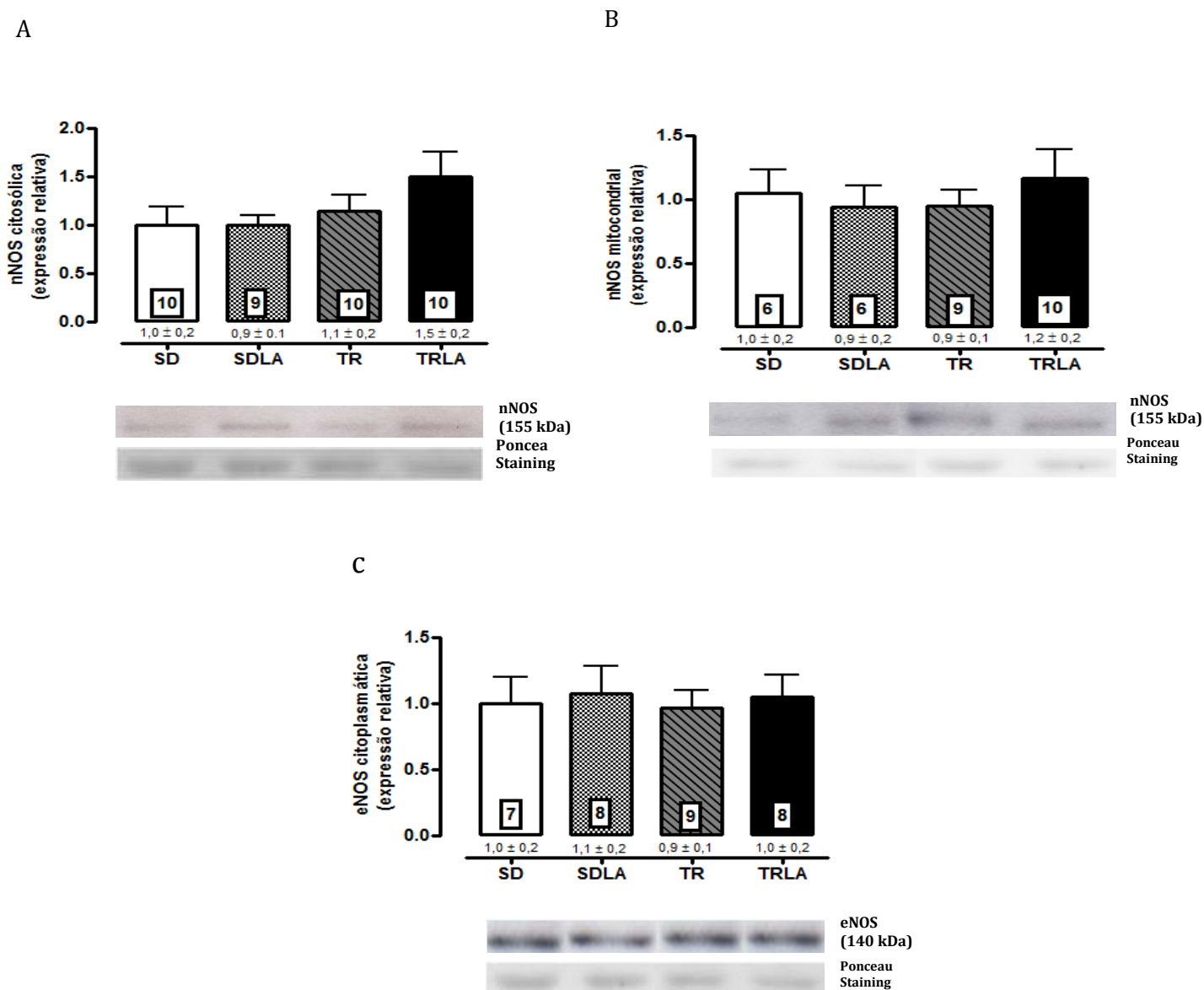


FIGURA 13. Expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) no extrato citoplasmático (painéis A e C) e nNOS no extrato enriquecido em mitocôndrias (painel B) do músculo gastrocnêmio dos ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA. A média da expressão proteica (unidades arbitrárias) do grupo SD foi considerada com o valor de 1 e os outros grupos experimentais foram normalizados a partir desse valor.

De maneira interessante, quando avaliamos a concentração de NO_x^- na fração citoplasmática do músculo esquelético observamos que o grupo TRLA apresenta aumento significativo quando comparado aos grupos SD (140%), SDLA (85%) e TR (118%). (Figura 14, painel A). No entanto, não observamos qualquer alteração na concentração plasmática de NO_x^- nos grupos estudados (Figura 14, painel B).

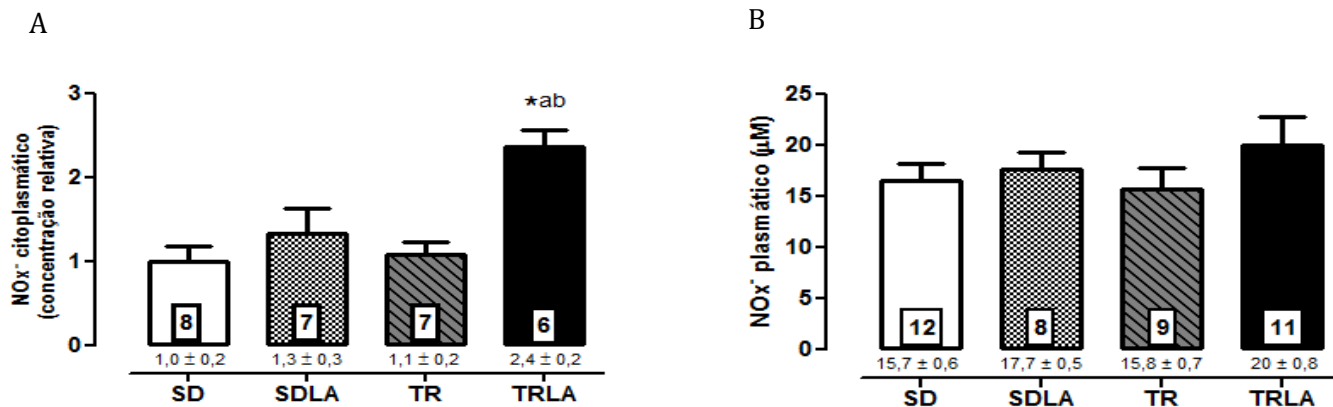


FIGURA 14. Nitrito e nitrato no extrato citoplasmático do músculo gastrocnêmio (painel A) e plasmático (painel B) dos ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA. ^{*ab}p<0,05 TRLA em comparação a SD. A média da concentração de nitrito nitrato citoplasmáticos (μM/mg de proteína filtrada) do grupo SD foi considerada com o valor de 1 e os outros grupos experimentais foram normalizados a partir desse valor.

Expressão proteica da superóxido dismutase e níveis de MDA

Avaliamos também o estado redox nos extratos citoplasmático e mitocondrial do músculo gastrocnêmio dos diferentes grupos. Como esperado, a expressão da Cu/Zn-SOD no extrato citoplasmático foi maior em ambos os grupos treinados (TR: $1,8 \pm 0,2$ e TRLA: $2 \pm 0,3$) em comparação aos animais sedentários (SD: $1 \pm 0,1$ e SDLA: $1,3 \pm 0,1$). O grupo TRLA apresentou maior elevação (100%) quando comparado ao grupo apenas treinado (80%), em relação aos grupos SD e SDLA, (Figura 15, painel A). O grupo SDLA apresentou elevação de 30% em comparação ao grupo SD, porém esse resultado não foi estatisticamente significativo. Surpreendentemente, a expressão da Mn-SOD do extrato mitocondrial foi aumentada significativamente no grupo TRLA, em aproximadamente 50%, em relação a todos os outros grupos (Figura 15, painel B).

A peroxidação lipídica, avaliada através da medida da concentração citoplasmática de MDA se mostrou reduzida nos grupos SDLA, TR e TRLA em comparação ao grupo SD (aproximadamente 30%) (Figura 15, painel C). A concentração de MDA plasmático não foi modificada em todos os grupos estudados (Figura 15, painel D).

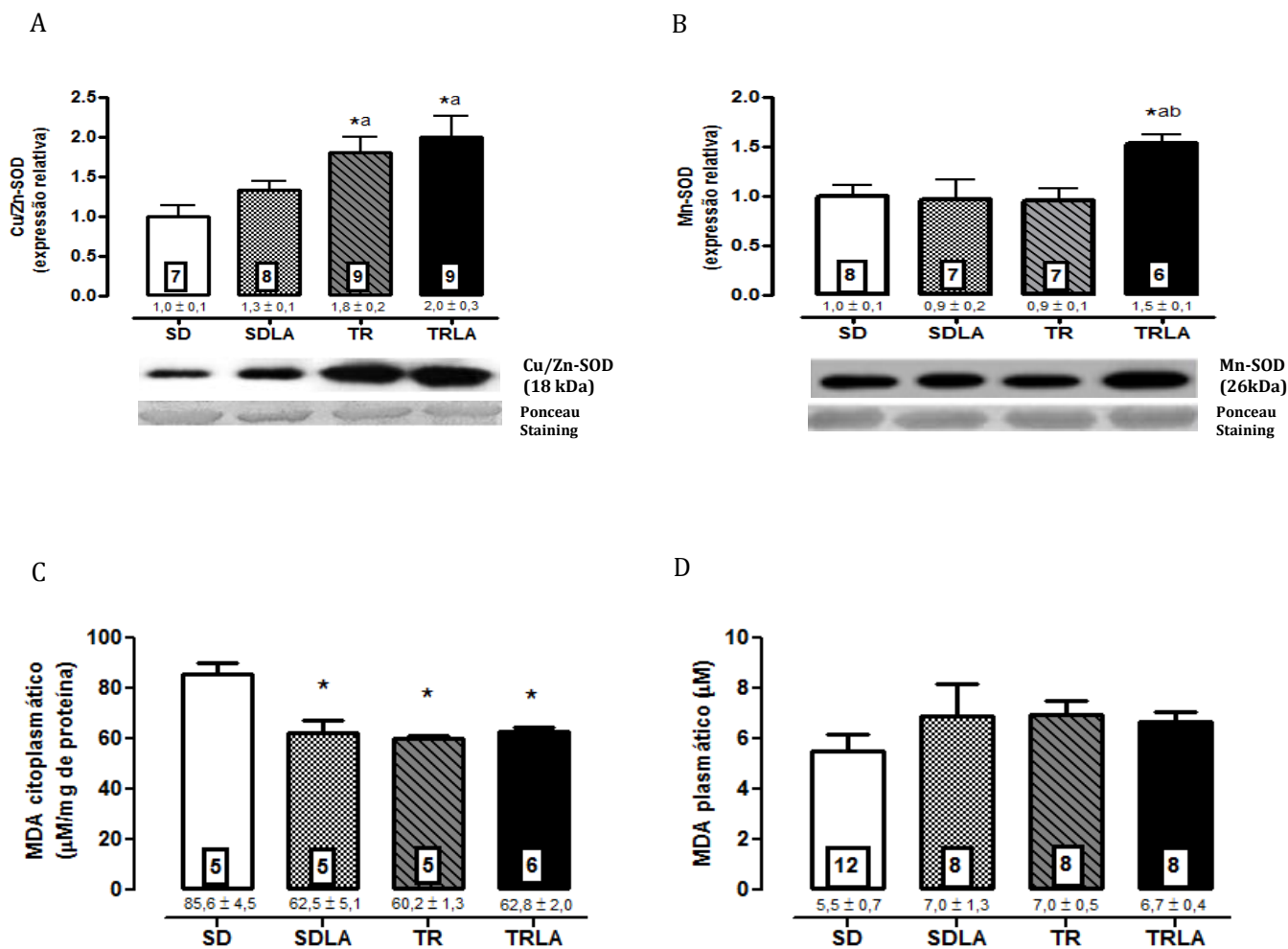


FIGURA 15. Expressão da Cu/Zn-SOD no extrato citoplasmático, Mn-SOD no extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmio e MDA citoplasmático e plasmático de ratos SD, SDLA, TR e TRLA. Para os dados de Cu/Zn-SOD e Mn-SOD, a média da expressão proteica (unidades arbitrárias) do grupo SD foi considerada com o valor de 1 e os outros grupos experimentais foram normalizados a partir desse valor. * $p < 0,05$ SDLA, TR e TRLA em comparação a SD. ^a $p < 0,05$ TR e TRLA em comparação a SDLA. ^b $p < 0,05$ TRLA em comparação a TR.

Expressão proteica de AMPK total no extrato citoplasmático e PGC-1 α no homogenato muscular total

A expressão da AMPK total no extrato citoplasmático de músculo gastrocnêmio mostrou-se aumentada nos grupos que receberam suplementação com L-arginina, sendo que o grupo SDLA apresentou expressão 60% maior em comparação a SD e o grupo

TRLA apresentou expressão aproximadamente 100% maior em comparação a SD e TR (Figura 16, painel A).

A expressão da PGC-1 α encontrou-se aumentada se comparado aos grupos experimentais SD (60%), SDLA (100%) e TR (77%) (Figura 16, painel B).

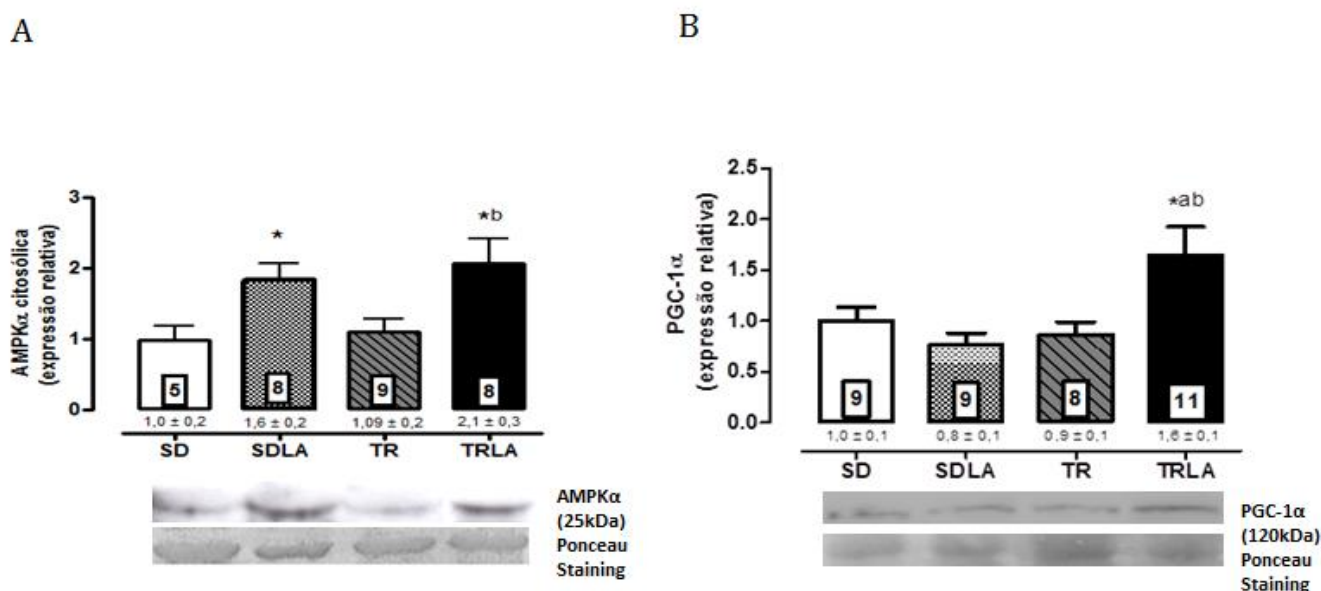


FIGURA 16. Expressão da AMPK α 1 e α 2 e PGC-1 α no músculo gastrocnêmio de ratos SD, SDLA, TR e TRLA. Para os dados, a média da expressão proteica (unidades arbitrárias) do grupo SD foi considerada com o valor de 1 e os outros grupos experimentais foram normalizados a partir desse valor. * $p < 0,05$ SDLA e TRLA em comparação a SD. ^a $p < 0,05$ TRLA em comparação a SDLA. ^b $p < 0,05$ TRLA em comparação a TR.

Expressão proteica do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), ATP sintase c e citocromo c oxidase

Finalmente, avaliamos a expressão proteica de mtTFA, que expressa indiretamente a existência da biogênese mitocondrial em resposta ao protocolo experimental aplicado, além das expressões da citocromo c oxidase e ATP sintase subunidade c, proteínas diretamente envolvidas na produção de ATP. Podemos observar que a expressão proteica da mtTFA foi significativamente aumentada em animais treinados (90%) em comparação ao grupo sedentário. Nota-se um aumento de 60% no

grupo SDLA em comparação a SD, mas esse valor não foi estatisticamente significativo. Os animais que receberam L-arg em associação ao treinamento físico obtiveram maior expressão de mtTFA tanto na fração citoplasmática (160% comparado a SD e aproximadamente 40% comparado a SDLA e TR), quanto na fração rica em mitocôndrias (aproximadamente 68%) quando comparado ao grupo SD (Figura 17, painéis A e B). Interessantemente, a expressão do marcador de aumento da biogênese mitocondrial COXIV apresentou-se aumentada em aproximadamente 85% em ambos os grupos submetidos ao treinamento físico em comparação aos grupos sedentários (Figura 17, painel C). Embora a expressão de ATP sintase c tenha se mostrado 80% aumentada nos grupos SDLA e TRLA em comparação a SD, apenas foi estatisticamente significativa o aumento da expressão dessa enzima no grupo TRLA (170%) comparado ao grupo SD (Figura 17, painel D).

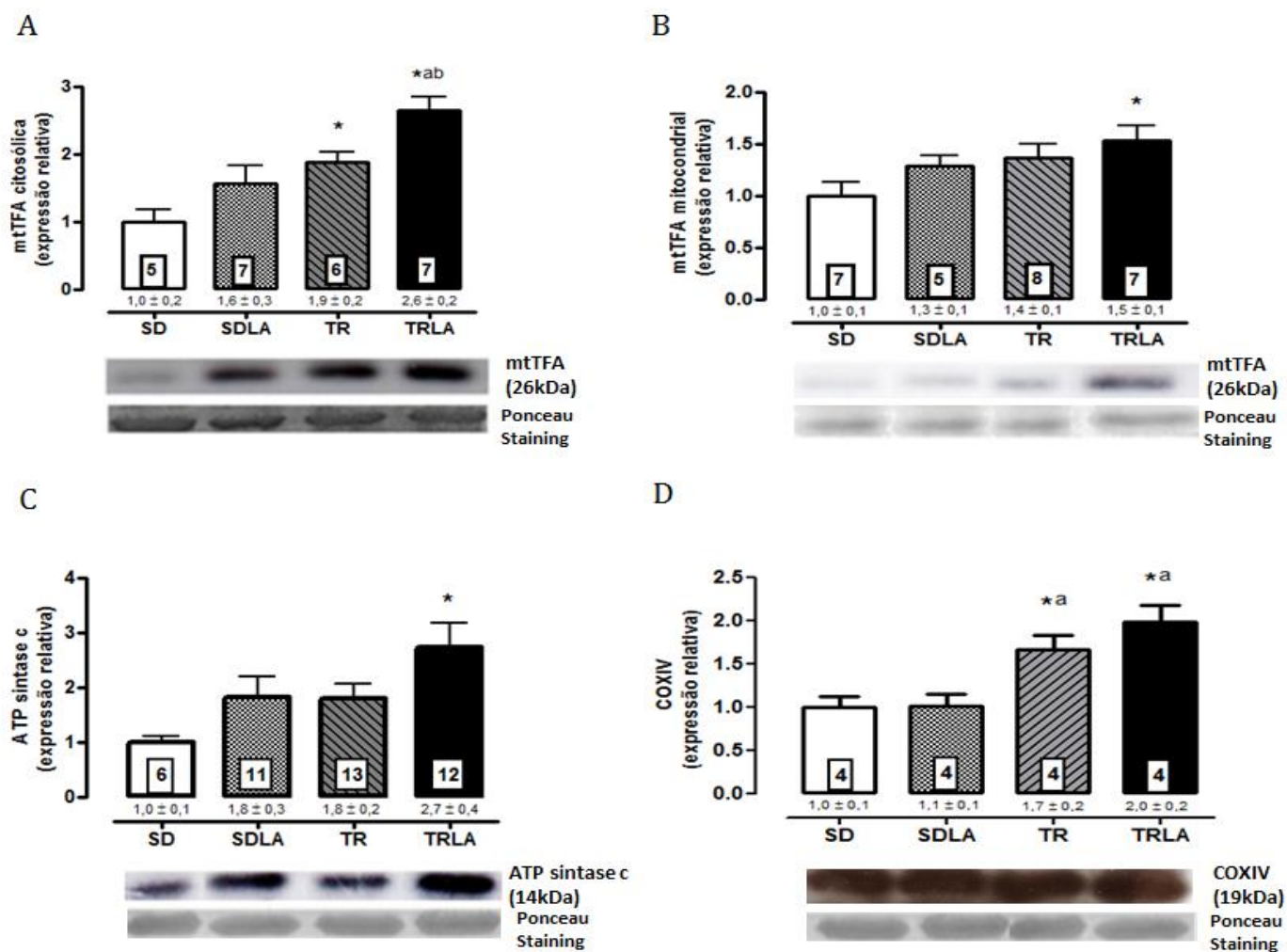


FIGURA 17. Expressão do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), citocromo c oxidase (COXIV) e ATP sintase subunidade c no extrato citoplasmático e no extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico dos ratos SD, SDLA, TR e TRLA. A média da expressão proteica (unidades arbitrárias) do grupo SD foi considerada com o valor de 1 e os outros grupos experimentais foram normalizados a partir desse valor. Mitocôndria: * $p < 0,05$ TR e TRLA em relação a SD. ^a $p < 0,05$ TR e TRLA em relação a SDLA.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO POR 8 SEMANAS EM ANIMAIS
SAUDÁVEIS:

Parâmetro	TR
Ganho de peso corporal	↓
Massa da gordura epididimal	↓
Tolerância ao esforço (último teste)	↑
Glicemia de jejum	↓
Triglicérides plasmáticos	↓
Colesterol Total	↔
Cu/Zn-SOD	↑
Mn-SOD	↔
MDA citoplasmático	↓
nNOS (citoplasmática/mitocondrial)/expressão	↔
eNOS citoplasmática/expressão	↔
NOx ⁻ citoplasmático/plasma	↔
MtTFA (citoplasmática)/expressão	↑
MtTFA (mitocondrial)/expressão	↔
PGC-1 α	↔
ATP sintase c	↔
COXIV	↑
AMPk	↔

1. DISCUSSÃO

8.1 Parte 1: Efeito do treinamento físico

Peso corporal e parâmetros bioquímicos

A partir dos resultados apresentados, observamos menor ganho de peso corporal, de massa de gordura epididimal e de ingestão alimentar nos animais submetidos ao treinamento físico por 8 semanas, o que foi independente da suplementação de L-arginina. Esses achados podem ser atribuídos à maior utilização de substratos energéticos durante o período de treinamento físico aeróbio. Sabe-se que o exercício físico tem a capacidade de otimizar a β -oxidação de ácidos graxos pelo músculo esquelético, além de aumentar a lipólise e diminuir a lipogênese, acarretando na redução da massa gorda em ratos. Em relação à ingestão alimentar, os animais treinados apresentaram menor consumo semanal de ração, resultado similar ao estudo de Silva e colaboradores (2009). Titchenal (1988) pesquisou as diferenças de consumo alimentar em ratos treinados, mostrando que ratos Wistar treinados apresentam menor consumo alimentar. Um fator associado à menor ingestão alimentar em animais treinados pode ser a melhora crônica na sinalização à leptina desses grupos animais, sendo que o estudo de Zhao e colaboradores (2011) demonstrou melhora na sinalização hipotalâmica desse hormônio em ratos Wistar submetidos ao exercício físico crônico, com redução na ingestão alimentar. Assim, nossos achados mostram que a diferença na ingestão alimentar pode também ser um dos fatores para o menor ganho de peso corporal nos grupos treinados.

Com relação aos parâmetros bioquímicos, o treinamento físico per se promoveu efeitos benéficos nos valores triglicérides e glicemia. De fato, estudos prévios mostram que o exercício físico tem a capacidade de reduzir os níveis de triglicérides (WOOD, HASKELL, 1979; CASELLA-FILHO et al., 2011). Sabe-se que o exercício físico, além de promover aumento da lipólise, permite maior utilização de ácidos graxos no músculo esquelético para produção de energia pelas mitocôndrias, diminuindo a concentração desses no plasma e sendo benéfico para a redução dos triglicérides plasmáticos. Os resultados da glicemia de jejum mostraram que o exercício físico por si só foi capaz de levar à redução na glicemia de jejum, sugerindo que captação de glicose e

possivelmente a sensibilidade à insulina foram melhoradas pelo exercício físico, que foi independente da suplementação de L-arginina. Trabalhos tem mostrado de maneira sistemática os efeitos benéficos do exercício físico sobre o controle glicêmico tanto em animais saudáveis (LUCIANO et al., 2002) quanto em modelos experimentais de diabetes mellitus (MUSI et al., 2001; DE OLIVEIRA et al., 2005; GHOSH et al., 2010), onde o exercício físico modula a sinalização da insulina em diferentes vias, entre elas a via IRS/Akt e via da AMPK, que por sua vez ativam o transportador de glicose para a membrana celular (MUSI, GOODYEAR, 2006). Cabe ressaltar que nenhum grupo em nosso estudo apresentou parâmetros glicêmicos acima dos valores considerados saudáveis, sendo esses até 100 mg/dl (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Teste de tolerância ao esforço, expressão proteica e níveis de nitrito/nitrato (citosol/plasmático)

Dentro dos objetivos propostos, o desempenho físico foi avaliado através do teste de esforço, em que verificamos a menor tolerância ao exercício físico em ratos sedentários, observada pelo menor tempo de exercício obtido neste grupo no teste final, mostrando que com o avanço da idade, ganho de peso corporal e sedentarismo ocorre redução da capacidade dos ratos em se exercitar. De fato, estudo prévio mostra que alterações metabólicas causadas pelo sedentarismo, excesso de peso e obesidade, levam a menor desempenho físico, refletindo uma deficiência na produção da energia (para revisão, ver ROGGE, 2009). Como esperado, o treinamento físico aumentou a tolerância ao esforço em comparação aos animais sedentários. Trabalho anterior de nosso laboratório mostrou que ratos submetidos ao treinamento físico apresentam maior tempo de corrida até a exaustão (GOMEZ-CAMPOS, 2010; DELBIN et al., 2012). O mecanismo pelo qual o treinamento físico melhorou a performance dos animais não é claro neste estudo, pois quando avaliamos a expressão de algumas proteínas citosólicas e/ou mitocondriais não observamos qualquer alteração na via de sinalização dessas enzimas como a NOS, AMPK, PGC-1 α e a subunidade c da ATP sintase. Somente observamos aumentos pontuais de algumas enzimas como a COXIV e a mtTFA citosólica, mas não a mtTFA mitocondrial, não permitindo um link entre a maior tolerância ao esforço e os biomarcadores analisados que compõem a via de sinalização da biogênese mitocondrial.

Assim, apesar dessa via ter sido apontada como de grande relevância na biogênese mitocondrial tanto no repouso quanto em resposta ao exercício físico (NISOLI et al., 2004; LEE-YOUNG et al., 2010; TENGAN et al., 2012), nossos achados mostram que o treinamento físico per se não modificou a expressão das enzimas nNOS e eNOS e nem as concentrações de nitrito/nitrato no citosol e no plasma. Além disso, esses resultados diferem de trabalhos prévios que mostram sistematicamente aumento na expressão das proteínas mtTFA, AMPK e PGC-1 α em resposta a elevação de NO, EROs e/ou AMPK pelo exercício físico e consequente biogênese mitocondrial (HOLLOSZY, 2008; VIÑA et al., 2009; HOLLOSZY, 2011; TENGAN et al., 2012). No entanto devemos considerar que apenas nosso estudo realizou a avaliação da expressão de mtTFA tanto no citoplasma quanto no extrato de mitocôndrias e os estudos apresentados realizaram essa análise apenas no extrato muscular total. Além disso, estudo prévio em ratos saudáveis submetidos a 4 semanas de treinamento aeróbio encontrou aumento na expressão tanto da nNOS quanto da eNOS no músculo gastrocnêmico, de similar magnitude (VASSILAKOPOULOS et al., 2003). As razões para essa discrepância poderiam ser devidas aos tipos musculares analisados nos diferentes estudos, espécie animal usada e protocolo de exercício físico executado. De fato, trabalhos prévios avaliando os efeitos do exercício físico e/ou treinamento físico na função/conteúdo de mitocôndrias de músculo esquelético de ratos usaram protocolo de treinamento ou exercício físico de alta intensidade tanto para natação (WRIGHT et al., 2007; YADA, MATOBA, 2013) como para corrida em esteira (HOLLOSZY, 1967; DAVIES et al., 1981). É importante salientar que a maioria dos trabalhos usou inclinação em esteira de cerca de 8%, enquanto que em nosso estudo nenhuma inclinação foi usada. Portanto, diferente dos estudos anteriores, em nosso protocolo de treinamento físico não observamos qualquer alteração nos biomarcadores de biogênese mitocondrial relacionados tanto a via NOS/NO/GMPc como para a via de sinalização da AMPK. Por outro lado, nossos dados mostram claramente que o programa de exercício físico foi efetivo em promover aumento na expressão proteica da Cu/Zn-SOD e redução nas concentrações de MDA citoplasmático. Trabalhos prévios mostram que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada promove aumento na expressão de enzimas antioxidantes, em especial a superóxido dismutase, em tecidos vasculares de animais (DE MORAES et al., 2008; CLAUDINO et al., 2010), como também no músculo esquelético de ratos Wistar (LI et al., 2011), Sprague-Dawley (JI, FU, 1992) e

camundongos (BARRETO et al. 2012) e de seres humanos (MAJERCZAK et al., 2010; BRINKMANN et al., 2011). Essa adaptação tem sido mostrada por ser benéfica em resposta ao aumento na produção de EROs causada pelo próprio exercício físico (GOMEZ-CABRERA et al., 2008; VIÑA et al., 2009).

**SUMÁRIO DOS RESULTADOS:
EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO + L-ARGININA EM ANIMAIS
SAUDÁVEIS**

Parâmetro	TRLA
Tolerância ao esforço (último teste)	↑↑
HDL colesterol	↑
Mn-SOD	↑↑
nNOS (citoplasmática/mitocondrial)	↔
eNOS citoplasmáticas	↔
NOx ⁻ citoplasmático	↑↑
NOx plasmático	↔
mtTFA (citoplasmática e mitocondrial)	↑
PGC-1 α	↑↑
ATP sintase c	↑
AMPk	↑↑

8.2 Parte 2: Efeito da associação treinamento físico e suplementação com L-arginina

Teste de tolerância ao esforço, expressão proteica e estado redox

Nosso estudo mostrou que a associação treinamento físico e suplementação com L-arginina foi efetiva em melhorar ainda mais a tolerância ao esforço físico visto pelo teste incremental quando comparado aos efeitos do treinamento físico per se. Esse efeito benéfico poderia ser em decorrência da maior ativação da via de sinalização NO/AMPK que por sua vez foi positivamente associada ao aumento na expressão de mtTFA, PGC-1 α e da subunidade c da ATP sintase.

A associação treinamento físico e suplementação de L-arginina promoveu significativa elevação de nitrito/nitrato no citoplasma do músculo gastrocnêmio bem como aumento na expressão da proteína AMPK nesse grupo experimental. De fato, estudo de Maxwell e colaboradores (2001) mostrou que camundongos suplementados com L-arginina apresentaram valores elevados de nitrito e nitrato, além de valores aumentados no consumo máximo de oxigênio, o que representa um aumento na potência aeróbia. Em seres humanos, a administração de L-arginina é mostrada como possível recurso ergogênico para aumentar a tolerância ao esforço e tempo de exaustão, possivelmente devido ao efeito vasodilatador do NO gerando maior oferta de substratos necessários para a síntese proteica e biogênese mitocondrial no momento de recuperação após o exercício e também levaria a maior remoção de metabólitos, tais como lactato e amônia, os quais estão relacionados à fadiga muscular durante atividade física intensa e prolongada (SCHAEFER et al., 2002). Além disso, Camic e colaboradores (2010) mostraram que adultos sedentários submetidos a 4 semanas de suplementação com L-arginina tiveram resistência aumentada à fadiga em teste incremental até a exaustão em cicloergômetro. Em modelo experimental, foram observados efeitos positivos da suplementação com L-arginina em ratos idosos submetidos a uma sessão de exercício exaustivo (HUANG et al., 2008). Embora existam estudos que não mostrem efeitos adicionais da L-arginina na performance de indivíduos treinados (ABEL et al., 2005), sabe-se que a arginina é um substrato que

pode diretamente participar do ciclo de Krebs, o que pode influenciar diretamente a produção de ATP no momento do teste de esforço (McCARDLE, 2000),

Poucos trabalhos existem sobre a ação concomitante da L-arginina e treinamento físico sobre o metabolismo (MCCONELL, 2007). Mais especificamente, nenhum trabalho analisou os efeitos associados do treinamento físico com a suplementação de L-arginina sobre os mediadores da biogênese mitocondrial. Nossos achados indicam que existe uma relação positiva entre a via de sinalização NO/AMPK e maior tolerância ao esforço. De fato, trabalhos recentes mostram a interação NO/AMPK na regulação do metabolismo em cultura de células (LIRA et al., 2010) e durante o exercício físico (SCHIMMACK et al., 2013). Por outro lado, a maior ativação da via NOS/NO/GMPc parece reduzir a capacidade funcional de músculo gastrocnêmio de ratos treinados e tratados com sildenafil (RINALDI et al., 2013). Parece assim que as vias de sinalização do NO em músculo esquelético são de grande complexidade e que dependendo da concentração e do segundo mensageiro ativado, as respostas podem ser opostas. Interessantemente, não detectamos nenhuma alteração significativa na expressão das proteínas nNOS e eNOS, apesar de podermos observar na figura 13, painel A, haver uma tendência de maior expressão da nNOS nesse grupo experimental (1.5 A.U.) quando comparado ao grupo SD (1.0 A.U.). Questionamos então sobre a procedência dessa maior concentração de NOx^- , considerando que não houve modificação da expressão proteica das duas isoformas constitutivas da NOS. Considerando que houve aumento significativo na expressão da enzima Mn-SOD bem como da isoforma Cu/Zn-SOD nesse grupo experimental, podemos inferir que a elevação das concentrações de NOx^- citosólico poderia ser devido à sua maior biodisponibilidade como consequência da ação sinérgica dessas duas enzimas antioxidantes em resposta ao tratamento experimental (treinamento físico + L-arginina), e não necessariamente a um aumento de sua produção. Além disso, observamos que os níveis de MDA apresentaram-se reduzidos, indicando menor peroxidação lipídica, o que parece ser um efeito tanto do treinamento físico quanto da suplementação com L-arginina. Diferentemente da expressão e/ou atividade da enzima Cu/Zn-SOD, não foram encontrados estudos que associaram treinamento físico e/ou suplementação de L-arginina na expressão da Mn-SOD no músculo esquelético. Sabe-se que deficiência na Mn-SOD leva a aumento no estresse oxidativo e diminuição na função mitocondrial (LUSTGARTEN et al., 2011). A Mn-SOD é a responsável pela dismutação do ânion superóxido produzido na

mitocôndria, portanto, esta será a primeira forma de defesa contra EROs produzidas pelas mitocôndrias no momento do exercício. De fato, o estudo de Kinugawa e colaboradores (2005) demonstrou que camundongos *knockout* para a Mn-SOD apresentam menor tolerância ao esforço físico, e que essa menor tolerância é revertida quando há a administração de Tempol, um mimético da superóxido dismutase. Os autores associaram a menor tolerância ao esforço físico com a excessiva produção de ânion superóxido nesses animais, o qual se ligaria ao NO, formando peroxinitrito, o que impediria a ação do NO nas diferentes vias de sinalização no músculo esquelético. Sendo assim, mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos que levaram essa associação ao aumento da expressão da Mn-SOD no extrato mitocondrial desse grupo.

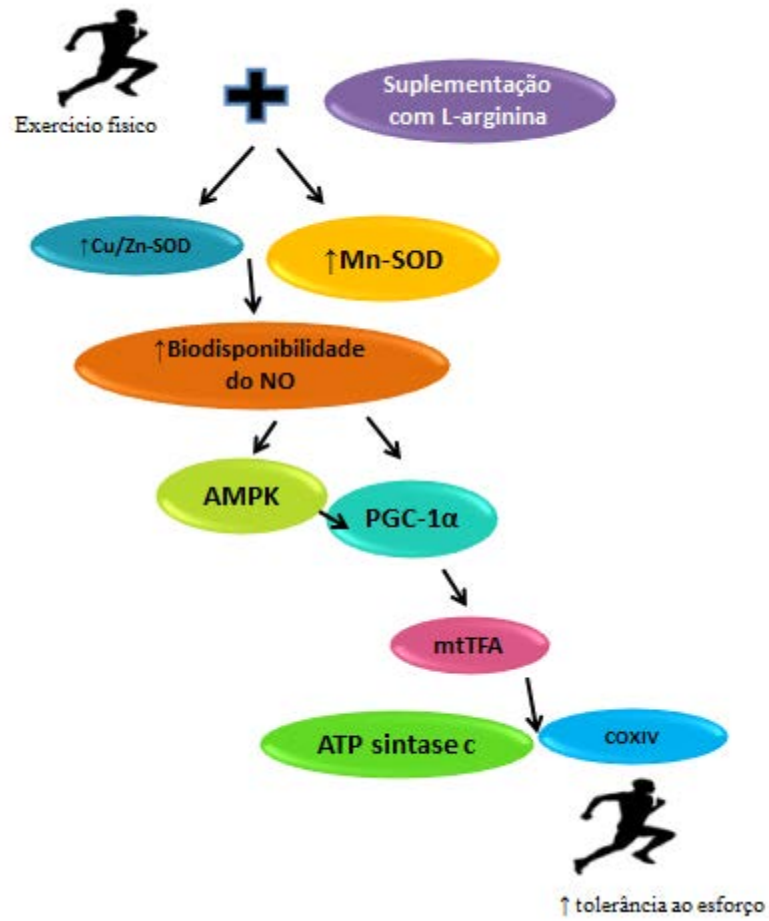
Sabe-se que a biogênese mitocondrial ocorre através da ativação do PGC-1 α , que é uma proteína reguladora de uma variedade de processos metabólicos, incluindo a formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos e no coração e que fatores de transcrição e replicação mitocondrial como o mtTFA tem fundamental importância nesse processo (MEDEIROS, 2008; VIÑA, 2009; RUSSELL et al., 2013). Assim, investigamos esses marcadores de biogênese mitocondrial e os possíveis efeitos da associação treinamento físico e suplementação de L-arginina. Nossos achados mostram que essa associação foi efetiva em promover elevação em todos os marcadores de biogênese mitocondrial analisados, PGC-1 α e mtTFA. Além disso, observamos que a expressão proteica da subunidade c da ATP sintase foi marcadamente elevada nesse grupo, mostrando claramente que esse protocolo experimental foi efetivo em promover alterações na via de sinalização da biogênese mitocondrial. Trabalho prévio mostra que aumento na biogênese mitocondrial estaria associado a um aumento na tolerância ao exercício físico e resistência à fadiga (HOOD et al., 2006). Portanto, nosso estudo mostra que a associação treinamento físico e suplementação com L-arginina promove efeitos benéficos no que se refere à maior tolerância ao exercício físico em animais saudáveis e que os mecanismos moleculares envolvidos nesse fenômeno parecem estar relacionados a ativação da via NO/AMPK/PGC-1 α /mtTFA em músculo esquelético de ratos. As possíveis aplicações desses resultados estão relacionadas às doenças cardiometabólicas como obesidade, aterosclerose e síndrome metabólica, pois trabalhos prévios mostram que a suplementação de L-arginina per se possui efeitos benéficos, revertendo a disfunção endotelial em seres humanos com fatores de risco cardiovascular

(McCAFFREY et al., 1995; MAXWELL, COOKE, 1998; MAXWELL et al., 2001), inclusive em idosos, obesos e diabéticos (CHAUHAN et al. 1996; WASCHER et al., 1997; OZÇELIKAI et al., 2000). Considerando que a farmaconutrição estará num futuro próximo dentro das abordagens terapêuticas, estudos envolvendo a interação exercício físico e suplementação de nutrientes podem trazer novas perspectivas tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças cardiometabólicas.

8. CONCLUSÕES

Nossos dados mostram que o treinamento físico per se não foi capaz de alterar os marcadores da biogênese mitocondrial de músculo gastrocnêmio de ratos. Por outro lado, a associação treinamento físico com a suplementação de L-arginina promove maior ativação da via NO/AMPK que por sua vez pode ter desencadeado maior expressão proteica dos marcadores de biogênese mitocondrial PGC-1 α , mtTFA e da subunidade c da ATP sintase, que foram positivamente associados à maior tolerância ao esforço dos animais pertencentes a esse grupo.

PROPOSTA DE MECANISMO PARA O PROTOCOLO EMPREGADO NO ESTUDO



1. REFERÊNCIAS BIBIGRÁFICAS

ABEL T, KNECHTLE B, PERRET C, ESER P, VON ARX P, KNECHT H. Influence of chronic supplementation of arginine aspartate in endurance athletes on performance and substrate metabolism - a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Int J Sports Med.** v.26, n.5, p.344-349, Jun.2005.

ADA (American Diabetes Association). Standards of medical care in diabetes. **Diabetes care.** v.34, n.1, p.S11-61, Jan. 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal** v. 357, n.1, p. 593-615, Ago. 2001.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM stand position on the appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.33, n.2, p. 2154-2156, Jul. 2001.

ANTUNES NETO, J. M. F.; PAULA, L. B. Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a prática de atividade física. **Brazilian Journal of Biomotricity**, v. 5, n. 2, p.117-131, Mai. 2011.

BALABAN, R.S. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. **American Journal of Physiology.** v.258, n.3 Pt 1, p.C377-389, Mar.1990.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.** v.29, n.1, p.113-126, Ago. 2006.

BARRETO, T.O.; CLETO, L.S.; GIODA, C.R.; SILVA, R.S.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; DE SOUSA-FRANCO, J.et al. Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. **European Journal of Applied Physiolog.** v.112, n.7, p.2523-2530, Jul.2012.

BELL, A.C.; GE, K.; POPKIN, B.M. Weight gain and its predictors in Chinese adults. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders.** v.25, n.7, p.1079-1086, Jul.2001.

BERGERON R., REN, J.M., CADMAN, K.S., MOORE, I.K., PERRET, P., PYPART, M., et al.Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and

mitochondrial biogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 281, n.6, p.1340-1346, Dez. 2001.

BIANCO, A.C. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.** v.44, n. 4, São Paulo. Aug. 2000.

BLAIR, S KAMPERT, J.B., KOHL, H.W., BARLOW, C.E., MACERA, C.A., PAFFENBARGER, R.S. JR. et al. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. **JAMA.** v.276 (3), n.17, p.205-210, Jul.1996.

BLOMHOFF, J.P. Lipoproteins, lipases, and the metabolic cardiovascular syndrome. **J Cardiovasc Pharmacol.**v.20, n.8, p.S22-25, 1992.

BOSTRÖM, P., WU, J., JEDRYCHOWSKI, M.P., KORDE, A., YE, L., LO, J.C., RASBACH, K.A. et al. PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature.** v.481, n.7382, p.463-468, Jan. 2012.

BROOKS, G.A., WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol.** v.45, n.6, p.1009-1015, Dez. 1978 .

BROOKS, S.L.; ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J.; GOODBODY, A.E.; TRAYHURN, P. Increased proton conductance pathway in brown adipose tissue mitochondria of rats exhibiting diet-induced thermogenesis. **Nature.** v.286, n.5770, p.274-276, Jul.1980.

CASELLA-FILHO, A., CHAGAS, A.C., MARANHÃO, R.C., TROMBETTA, I.C., CESENA, F.H., SILVA, V.M. et al. Effect of exercise training on plasma levels and functional properties of high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome. **Am J Cardiol.** v.107, n.8, p.1168-1172, Abr. 2011.

CHAUHAN, A.; MORE, R.S.; MULLINS, P.A.; TAYLOR, G.; PETCH, C.; SCHOFIELD, P.M. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. **Journal of the American College of Cardiology.** v.28, n.7, p.1796-1804, Dez.1996.

CHINOPOULOS, C.; SZABADKAI, G. What makes you can also break you: mitochondrial permeability transition pore formation by the c subunit of the F(1)F(0) ATP-synthase? **Frontiers in Oncology.** v.3, p.25, 2013.

CHOI, Y.S.; KIM, S.; PAK, Y.K. Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice.** v.54, n.2, p.s3-s9, Dez.2001.

CIOLAC, E.G., GUIMARÃES, G.V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev. Bras. Med. Esporte.** v. 10, n.4, Jul/Ago.2004.

CLEETER, M. W., COOPER, J.M., DARLEY-USMAR, V.M., MONCADA, S., SCHAPIRA, A.H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS**, v. 345, n. 23, p. 50-54, Mai.1994.

CLEMENTI, E. NISOLI, E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**v.142, n.2, p.102-110, Out. 2005.

COMAN, D., YAPLITO-LEE, J., BONEH, A. New indications and controversies in arginine therapy. **Clin Nutr.**v.27, n.4, p.489-496, Ago. 2008.

CURI, R., PROCÓPIO, J. **Fisiologia básica.** 1ed. Editora Guanabara Koogan. 2009.

DAVIES, K.J., PACKER, L., BROOKS, G.A. Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. **Arch Biochem Biophys.** v. 209, n. 2, p. 539-554, Jul. 1981.

DE MORAES, C., DAVEL, A.P., ROSSONI, L.V., ANTUNES, E., ZANESCO, A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.** v. 29, p. 8-12, Mai.2008.

DE OLIVEIRA, C.A., LUCIANO, E., DE MELLO, M.A. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Exp Physiol.** v. 90, n.1, p. 79-86, Jan. 2005.

DELBIN, M.A., DAVEL, A.P., COUTO, G.K., DE ARAÚJO, G.G., ROSSONI, L.V., ANTUNES, E., ZANESCO, A. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. **PLoS One.** v.7, n.12, p. e53318. Dez. 2012.

DURSTINE, J.L, HASKELL, W.L. The influence of exercise on plasma lipids and lipoproteins. **Exerc Sport Sci Rev.** v.22, p. 477-521, 1994.

FEENEY, E.R.; MALLON, P.W. Impact of mitochondrial toxicity of HIV-1 antiretroviral drugs on lipodystrophy and metabolic dysregulation. **Current Pharmaceutical Design.** v.16, n.30 p.3339-3351, Out.2010.

FENIOUK, B.A.; JUNGE, W. Regulation of the F₀F₁-ATP synthase: the conformation of subunit epsilon might be determined by directionality of subunit gamma rotation. **FEBS Letters.** v.579, n.23, p.5114-5118, Set.2005.

FERREIRA, A.L.A. CORREA, C.R., FREIRE, C.M., MOREIRA, P.L., BERCHIERI-RONCHI, C.B., REIS, R.A., et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista Sociedade Brasileira Clínica Médica**. v.9, n.1, p.54-61, Jan/Fev.2011.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade (HDL): aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arq Bras Cardiol**. v. 87, n.5, p. 671-679, Jun. 2006.

GATH, I.; EBERT, J.; GÖDTEL-ARMBRUST, U.; ROSS, R.; RESKE-KUNZ, A.B.; FÖRSTERMANN, U. NO synthase II in mouse skeletal muscle is associated with caveolin 3. **Biochemical Journal**. v.340, n.3, p.723-728, Jun.1999.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends Pharmacol. Sci**. v.26, n. 4 p.190-195, Abr. 2005.

GHOSH, S., GOLBIDI, S., WERNER, I., VERCHERE, B.C., LAHER, I. Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview. **Clin Sci (Lond)**. v. 119, n. 2, p. 57-74, Abr. 2010.

GOMEZ-CABRERA, M. C. DOMENECH, E., ROMAGNOLI, M., ARDUINI, A., BORRAS, C., PALLARDO, F.V. et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. **The American Journal of clinical nutrition**. v.87, n.1, p.142-149, Jan. 2008.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes** v.53, n.1, p.110-118, 2004.

GREENWALD RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. **Free Radic Biol Med**. v. 8, n.2, p.201-209, 1990.

GUYTON, A. C.; HALL, J. **Tratado de fisiologia médica**. 9ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1997.

HAGEN, T. Taylor, C.T., Lam, F., Moncada, S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1a. **Science**. v. 302, n. 5652, p. 1975-1978, Dez. 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3ed. **New York: Oxford**, 1999.

HARRISON, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell. **The Journal of Clinical Investigation**. v.100, n.9, p.2153-2157, Nov.1997.

HAYASHI, T., HIRSHMAN, M.F., KURTH, E.J., WINDER, W.W., GOODYEAR, L.J. Evidence for 5'AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**.v.47, n.8, p.1369-1373, Ago.1998

HINK, H.U., FUKAI, T. Extracellular superoxide dismutase, uric acid, and atherosclerosis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. v.67, p.483-490, 2002.

HOLLOSZY, J.O. A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. V.284, n.3, p. E453-467, Mar. 2003

HOLLOSZY, J.O. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **The Journal of the Biological Chemistry**. 1967 May 10;242(9):2278 82.

HOLLOSZY, J.O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. **J Physiol Pharmacol**. v. 59, suppl 7, p. 5-18, Dez. 2008.

HOLLOSZY, J.O. Regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 expression by exercise. **Compr Physiol**. v.1, n.2, p. 921-940, Abr. 2011.

HOOD, D.A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**. v.90, n.3, p.1137-1157, Mar.2001.

HOOD, D.A. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**. v.34, n.3, p.465-472, Jun.2009.

HOOD, D.A.; IRRCHER, I.; LJUBICIC, V.; JOSEPH A.M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**. v.209, n.pt12, p.2265-2275, Jun.2006.

HUANG, C.C., TSAI, S.C., LIN, W.T. Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. **Exp.Gerontol**. v.43, n.6, p.571-577, Jun. 2008.

IRIGOYEN, M.C. Exercício Físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. **Rev Bras Hipertens**. v.10, n.2, p.109-116, Abr. /Jun. 2003.

JOBGEN, W.; MEININGER, C.J.; JOBGEN, S.C.; LI, P.; LEE, M.J.; SMITH, S.B. et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. **The Journal of Nutrition**. v.139, n.2, p.230-237, Fev.2009.

JOBGEN, W.S. FRIED, S.K., FU, W.J., MEININGER, C.J., WU, G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. **J Nutr Biochem**. v.17, n.9, p.571-588, Set. 2006.

JOSEPH, A.M., JOANISSE, D.R., BAILLOT, R.G., HOOD, D.A. Mitochondrial dysregulation in the pathogenesis of diabetes: potential role for mitochondrial biogenesis-mediated interventions. **Exp Diabetes Res**. V.2012, p.1-16, Dez. 2012

KAHN, B.B. ALQUIER, T., CARLING, D., HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab**. v.1, n.1, p.15-25, Jan. 2005.

KAVANAGH, N.I.; AINSCOW, E.K.; BRAND, M.D. Calcium regulation of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1457, n.1-2, p.57-70, Fev.2000.

KELLEY, D.E., HE, J., MENSHIKOVA, E.V., RITOV, V.B., 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.10, p. 2944–2950. Out. 2002.

KIM, J.A.; WEI, Y.; SOWERS, J.R. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. **Circulation Research**. v.102, n.4, p.401-414, Fev.2008.

KINUGAWA, S., WANG, Z., KAMINSKI, P.M., WOLIN, M.S., EDWARDS, J.G., KALEY, G., HINTZE, T.H. Limited exercise capacity in heterozygous manganese superoxide dismutase gene-knockout mice: roles of superoxide anion and nitric oxide. **Circulation**. v.111, n. 12, p. 1480-1486, Mar 2005.

KISTLER, A.; WEBER, R. A morphometric analysis of inner membranes related to biochemical characteristics of mitochondria from heart muscle and liver in mice. **Experimental Cell Research**. v.91, n.2, p.326-332, Mar.1975.

KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDT, D.S.; STAMLER, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**. v.372, n.6506, Dez.1994.

KOWALTOWSKI, J., DE SOUZA-PINTO, N.C., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**. v. 47, n. 4, p. 333-343, Mai. 2009.

LAKKA, T.A, LAAKSONEN, D.E., LAKKA, H.M., MÄNNIKKÖ, N., NISKANEN, L.K., RAURAMAA, R., et al. Sedentary life style, poorcardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Med Sci Sports Exerc.** v.35, n.8, p.1279-1286, Ago. 2003.

LANOUE, K.F., SCHOOLWERTH, A.C. Metabolite transport in mitochondria. **Annu Ver Biochem.**v.48, p.871-922, 1979

LAURINDO, F. R. M. Estresse Oxidativo Vascular. Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares. São Paulo: **Atheneu**, 2008, p. 433-443.

LEE-YOUNG, R.S., AYALA, J.E., HUNLEY, C.F., JAMES, F.D., BRACY, D.P., KANG, L., WASSERMAN, D.H. Endothelial nitric oxide synthase is central to skeletal muscle metabolic regulation and enzymatic signaling during exercise in vivo. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 298, n.5, p. R1399-R1408, Mai. 2010.

LEHNINGER, DAVID, L. NELSON, MICHAEL M. COX. Princípios de Bioquímica. **Editora: Sarvier**, 4ª edição, 2007.

LI, J. HU, X., SELVAKUMAR, P., RUSSELL, R.R., CUSHMAN, S.W., HOLMAN, G.D., YOUNG, L.H. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.287, n.5, p.834-841, Nov. 2004.

LI, J.; ZHANG, Y.B. Effects of different hypoxic training modes on activities of mitochondrial antioxidants and respiratory chain complex in skeletal muscle after exhaustive running in rat. **Sheng Li Xue Bao.** v.63, n.1, p.55-61, Fev.2011.

LI, X., BAZER, F.W., GAO, H., JOBGEN, W., JOHNSON, G.A., LI, P., et al. Amino acids and gaseous signaling. **Amino Acids.** v.37, n.1, p.65-78, Mai. 2009.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab.** v.1, n.6, p.361-370, Jun. 2005.

LIRA, V.A, BROWN, D.L., LIRA, A.K., KAVAZIS, A.N., SOLTOW, Q.A., ZEANA, E.H., CRISWELL, D.S. Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells. **J Physiol.**v.15, n.588, p. 3551-3566, Set.2000

LIRA, V.A. SOLTOW, Q.A., LONG, J.H., BETTERS, J.L., SELLMAN, J.E., CRISWELL, D.S et al. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.293, n.4, p.1062-1068, Out. 2007 .

LJUBICIC, V., JOSEPH, A.M., SALEEM, A., UGUCCIONI, G., COLLUMARCHESE, M., LAI, R.Y., et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. **Biochim Biophys Acta**. v.1800, n.3, p.223-234, Mar. 2010.

LUCIANO, E., CARNEIRO, E.M., CARVALHO, C.R., CARVALHEIRA, J.B., PERES, S.B., REIS, M.A., SAAD, M.J., BOSCHERO, A.C., VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**. v.147, n.1. p.149-157, Jul. 2002

LUSTGARTEN, M.S., JANG, Y.C., LIU, Y., QI, W., QIN, Y., DAHIA, P.L., MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging. **Aging Cell**. v.10, n.3, p.493-505, Jun.2011

MANCHADO, F.B., GOBATTO, C.A., CONTARTEZE, R.V.L., PAPOTI, M., MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**. v. 8, p.1-8, 2005.

MARECHAL, G.; BECKERS-BLEUKX, G. Effect of nitric oxide on the maximal velocity of shortening of a mouse skeletal muscle. **Pflugers Arch**. v.436, n.6, p.906-913, Nov. 1998.

MAXWELL, A.J.; COOKE, J.P. Cardiovascular effects of L-arginine. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. v.7, n.1, p.63-70, Jan.1998.

MAXWELL, A.J.; HO, H.V.; LE, C.Q.; LIN, P.S.; BERNSTEIN, D.; COOKE, J.P. L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. **Journal of Applied Physiology**. v.90, n.3, p.933-938, Mar.2001

MCARDLE, W. ; KATCH, F. I. ; KATCH, V.L. Fisiologia do Exercício - Energia, Nutrição e Desempenho Humano. **Editora Guanabara 2ª ed.** 2002

MCCAFFREY, M.J.; BOSE, C.L.; REITER, P.D.; STILES, A.D. Effect of L-arginine infusion on infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. **Biology of the Neonate**. v.67, n.4, p.240-243, 1995.

MCCONELL, G.K. Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 10, n.1, p. 46-51, Jan. 2007.

MEDEIROS, D.M. Assessing mitochondria biogenesis. **Methods**. v.46, n.4, p.288-294, Dez.2008.

MONCADA, S.; BOLANOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J Neurochem.** v.97, n.6, p.1676-1689, Jun.2006.

MORRIS, S.M. Jr. Enzymes of arginine metabolism. **The Journal of Nutrition.** v.134, n.10, p.2743s-2747s, Out.2004.

MUSI, N., GOODYEAR, L.J. Insulin resistance and improvements in signal transduction. **Endocrine.** v.29, n.1, p.73-80, Fev. 2006.

MUSI, N., HAYASHI, T., FUJII, N., HIRSHMAN, M.F., WITTERS, L.A., GOODYEAR, L.J. AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.280, n.5, p.E677-E684, Mai.2001.

NISOLI, E. et. al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.101, n.47, p.16507-16512, Nov.2004.

NISOLI, E. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. **Science.** v.7, n.299, p.896-899, Fev.2003.

NISOLI, E.; CARRUBA, M.O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. **Journal of Cell Science.** v.119, n.14, p.2855-2862, Jul.2006

NISOLI, E.; COZZI, V.; CARRUBA, M.O. Amino acids and mitochondrial biogenesis. **Am J Cardiol.** v. 101, n.11A, p. 22E-25E, Jun. 2008.

OLGUN, A. Biological effects of deuteronation: ATP synthase as an example. **Theoretical Biology and Medical Modelling.** Fev.2007

OLIVEIRA, M.C.; MENCK, C.F.M. Biologia molecular e evolução. Universidade de São Paulo – USP: **Editora Holos**, 2001.

OLMOS, Y. VALLE, I., BORNIQUEL, S., TIERREZ, A., SORIA, E., LAMAS, S. et al. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1 alpha in the induction of oxidative stress genes. **J Biol Chem.** v.284, n.21, p.14476-14484, Mai.2009.

OZÇELIKAY, A.T.; TAY, A.; GUNER, S.; TASYARAN, V.; YILDIZOGLU-ARI, N.; DINÇER, U.D. et al. Reversal effects of L-arginine treatment on blood pressure and vascular responsiveness of streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacological Research.** v.41, n.2, p.201-209, Feb.2000.

PERSGHIN, G. PRICE, T.B., PETERSEN, K.F., RODEN, M., CLINE, G.W., GEROW, K., et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med.**v.335, n.18, p.1357-1362, Out.1996.

PICARD, M.; WHITE, K.; TURNBULL, D.M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. **Journal of Applied Physiology.** v.114, n.2 p.161-71, Jan.2013.

REN, J.; PULAKAT, L.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J.R. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Journal of Molecular Medicine (Berlin).** v.88, n.10, p.993-1001, Out.2010.

RENNIE, K.L., MCCARTHY, N., YAZDGERDI, S., MARMOT, M., BRUNNER, E. Association of metabolic syndrome with both vigorous and moderate physical activity. **Int J Epidemiol.** v.32, n.4, p.600-606, Ago.2003.

RINALDI, B., DONNIACUO, M., SODANO, L., GRITTI, G., SIGNORIELLO, S., PARRETTA, E., BERRINO, L., URBANEK, K., CAPUANO, A., ROSSI, F. Effects of sildenafil on the gastrocnemius and cardiac muscles of rats in a model of prolonged moderate exercise training. **PLoS One.** v. 8, n.7, p. e69954, Jul. 2013.

RODRIGUES, A.S.I. **A expressão da proteína mitocondrial CL-39KDa na identificação de doenças mitocondriais associadas a defeitos do complexo I.** Tese apresentada na Escola paulista de medicina – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2005.

ROGGE, M.M.; The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. **Biol Res Nurs.**v.10, n.4, p.356-373, Abr.2009.

ROMERO-CALVO, I. OCÓN, B., MARTÍNEZ-MOYA, P., SUÁREZ, M.D., ZARZUELO, A.,MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem.** v.401, n.2, p.318-320, Jun. 2010.

RUSSELL, A.P., FOLETTA, V.C., SNOW, R.J., WADLEY, G.D. Skeletal muscle mitochondria: A major player in exercise, health and disease. **Biochim Biophys Acta.** Nov. 2013

RUSSWURM, M.; KOESLING, D. Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. **Mol Cell Biochem.** v.230, n.1-2, p.159-164, Jan.2002.

SANTOS, C.X.; TANAKA, L.Y.; WOSNIAK, J. LAURINDO, F.R. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxid Redox Signal**. v.11, n.10, p.2409-2427, Out.2009.

SCHAEFER, A.; PIQUARD, F.; GENY, B.; DOUTRELEAU, S.; LAMPERT, E.; METTAUER, B. et al. L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. **International Journal of Sports Medicine**. v.23, n.6, p.403-407, Ago.2002.

SCHRAUWEN, P. HESSELINK, M.K. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. **Diabetes**. v.53, n.6, p.1412-1417, Jun.2004

SCHIMMACK, G., DEFRONZO, R.A., MUSI, N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. v.8, p. 591-602, 2006.

SHADEL, G.S. Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology. **Am J Pathol**. v.172, n.6, p.1445-1456, Jun. 2008.

SILVA, A.S. **Efeito do treinamento físico associado à suplementação de L-Arginina na resposta relaxante de artéria femoral de ratos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências da Motricidade) – Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SILVEIRA, L.R. Pilegaard, H., Kusuhara, K., Curi, R., Hellsten, Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**. v. 1763, n.9, p.969-976, Set. 2006.

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

SOUZA, C.F.M. Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Fev.2005.

STAMLER, JS, MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol Rev**. v.81, n.1, p.209-237, Jan.2001

STOCKER, R.; KEANEY, J.F. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**. v.84, n.4, p.1381-478, 2004.

ST-PIERRE, J. et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**. v. 127, n.2, p.397-408, Oct. 2006.

TAKAHASHI, M. et al. Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system. **Am J Physiol**. v.274, n.5, p.C1380- C1387, Mai.1998.

TANSEY, J.T., SZTALRYD C, HLAVIN EM, KIMMEL AR, LONDOS C. The central role of perilipin in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. **IUBMB Life**. v.56, n.7, p.379-385, Nov. 2004.

TENGAN, C.H., RODRIGUES, G.S., GODINHO, R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. **Int J Mol Sci**. v. 13, n.12, p. 17160-17184, Dez. 2012.

TEWS, D.S., GOEBEL, H.H., SCHNEIDER, I., GUNKEL, A., STENNERT, E., NEISS, W.F. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. **J Neuropathol Exp Neurol**. v.56, n.12, p. 1283-1289, Dez. 1997

THOMPSON, D., KARPE, F., LAFONTAN, M., FRAYN, K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. **Physiol Rev**.v.92, n.1, p.157-191, Jan. 2012

TITCHENAL, C.A. Exercise and food intake. What is the relationship? **Sports Med**. v.6, n.3, p.135-145, Set.1998.

TONKONOJI M, SAHLIN K. Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. **Acta Physiol Scand**. v. 161, n. 3, p. 345-353, Nov.1997.

VARCO-MERTH, B.; FROMME, R.; WANG, M.; FROMME, P. Crystallization of the c14-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1777, n.7-8, p.605-612, Jul./Ago.2008.

VASSILAKOPOULOS, T. DECKMAN, G., KEBBEWAR, M., RALLIS, G., HARFOUCHE, R., HUSSAIN, S.N. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v.284, n.3, p.L452-457, Mar.2003.

VIÑA, J., GOMEZ-CABRERA, M.C., BORRAS, C., FROIO, T., SANCHIS-GOMAR, F., MARTINEZ-BELLO, V.E., et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.61, n. 14, p.1369-1374, Nov.2009.

WISEK, W.J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. **The Journal of Nutrition**. v.116, n.1, p.36-46, Jan.1986.

von BALLMOOS, C.; WIEDENMANN, A.; DIMROTH, P. Essentials for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. **Annual Review of Biochemistry**. v.78, p.649-672, 2009

WAREHAM,N.J. HENNINGS, S.J., BYRNE, C.D., HALES, C.N., PRENTICE, A.M., DAY, N.E. A quantitative analysis of the relationship between habitual energy expenditure, fitness and the metabolic cardiovascular syndrome. **Br J Nutr**. v.80, n.3, p.235-241, Set.1998.

WASCHER, T.C.; GRAIER, W.F.; DITTRICH, P.; HUSSAIN, M.A.; BAHADORI, B.; WALLNER, S. et al. Effects of low-dose L-arginine on insulin-mediated vasodilatation and insulin sensitivity. **European Journal of Clinical Investigation**. v.27, n.8, p.690-695, Ago.1997.

WEGENER, G.; KRAUSE, U.; NEWSHOLME, E.A. Metabolic regulation - physiological and medical aspects. **Experientia**. v.52, n.5, p.391-395, Mai.1996.

WELLS, B.J. WELLS, B.J., MAINOUS, A.G., EVERETT CJ. Association between dietary arginine and C-reactive protein. **Nutrition**. v.21, n.2, p.125-130, Fev.2005.

WINDER, W.W, HARDIE, D.G. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. **Am J Physiol**. v.270, n.2, p.E-299-304, Fev.1996.

WOLZT, M. MacAllister, R.J., Davis, D., Feelisch, M., Moncada, S., Vallance, P., et al. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, NO release, and biological activity. **J Biol Chem**. v. 274, n.41, p.28983-28990, Out.1999.

WOOD, P.D, HASKELL, W.L. The effect of exercise on plasma high density lipoproteins. **Lipids**. v.14, n.4, p.417-427, Abr.1979.

WRIGHT, D.C., GEIGER, P.C., HAN,D.H., JONES, T.E., HOLLOSZY, J.O. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-

1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. **J Biol Chem.** v. 282, n. 26, p. 18793-18799, Jun. 2007

WU, G. MEININGER, C.J. Arginine nutrition and cardiovascular function. **J Nutr.** v.130, n.11, p.2626-2629, Nov. 2000.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; KIM, S.W.; LI, P.; MARC RHOADS, J. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids.** v.37, n.1, p.153-168, Mai.2009.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; KIM, S.W.; LI, P.; MARC RHOADS, J. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids.** v.37, n.1, p.153-168, Mai.2009.

WU, G.; MEININGER, C.J. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. **Annual Review of Nutrition.** v.22, p.61-86, 2002.

WU, G.; MORRIS JR, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J,** v. 336, n.1, p. 1-17, Nov.1998.

WU, G.; MORRIS JR, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J,** v. 336, n.1, p. 1-17, Nov.1998.

YADA, K., MATOBA, H. Vitamin C supplementation does not alter high-intensity endurance training-induced mitochondrial biogenesis in rat epitrochlearis muscle. **J Physiol Sci.** Dez. 2013.

YANG, C.W. Kim, Y.S., Kim, J., Kim, Y.O., Min, S.Y., Choi, E.J. et al. Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol.* 1998;6(1):50-6.

YUNG, L.M.; LEUNG, F.P.; YAO, X.; CHEN, Z.Y.; HUANG, Y. Reactive oxygen species in vascular wall. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets.** v.6, n.1, p.1-19, 2006.

ZAGO, A.S., ZANESCO, A. Nitric Oxide, Cardiovascular Disease and Physical Exercise. **Arq Bras Cardiol.** v.87, n.6, p.e227-233, Dez.2006.

ZANESCO, A., ANTUNES, E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacol Ther.** v.114, n.3, p.307-317, Jun. 2007.

ZANESCO, A., PUGA, G.M., Doenças cardiometabólicas e exercício físico. **Ed. Revinter.** 2013

ZHAO, J., TIAN, Y., XU, J., LIU, D., WANG, X., ZHAO, B. Endurance exercise is a leptin signaling mimetic in hypothalamus of Wistar rats. **Lipids Health Dis.** v.10, p.225, Dez. 2011.

ZHOU, G. MYERS, R., LI, Y., CHEN, Y., SHEN, X., FENYK-MELODY, J. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J Clin Invest.** v.108, n.8, p.1167-1174, Out.2001.

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 014/2012

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Protocolo nº: 0715	Data de Registro CEUA: 02.02.2012
Projeto de Pesquisa: "Biogênese mitocondrial e marcadores de stress oxidativo em ratos treinados e suplementados com L-Arginina".	

Pesquisador Responsável: ANGELINA ZANESCO

Orientando(a): Carmem Peres Valgas da Silva

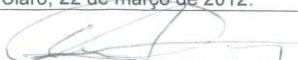
Colaborador(a): Ana Paula Coutro Davel, Maria Andréia Delbin, Edson Antunes.

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC
	<input checked="" type="checkbox"/> Mestrado
	<input type="checkbox"/> Doutorado
	<input type="checkbox"/> Outros – (especificar)

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 11ª reunião ordinária, realizada em 22.03.2012.

<input checked="" type="checkbox"/>	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Não Aprovou .
<input type="checkbox"/>	Retirou , devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 22 de março de 2012.


 Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad
 Coordenador da CEUA

