



**Universidade Estadual Paulista - “Júlio de  
Mesquita Filho” - Faculdade de  
Odontologia de Araçatuba - Departamento  
de Ciências Básicas  
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas**



**SAMUEL RODRIGUES LOURENÇO DE MORAIS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA SOBRE A  
PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E  
FATORES REGENERATIVOS PELO TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO DECORRENTE DE UMA SESSÃO DE  
EXERCÍCIO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE**

**ARAÇATUBA-SP  
2011**



**SAMUEL RODRIGUES LOURENÇO DE MORAIS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA SOBRE A  
PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E FATORES  
REGENERATIVOS PELO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO  
DECORRENTE DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO RESISTIDO DE  
ALTA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho” – UNESP, como  
parte parcial dos requisitos para a  
obtenção do título de “Mestre em  
Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof. Adj. Sandra Helena  
Penha de Oliveira

ARAÇATUBA - SP  
2011

# **SAMUEL RODRIGUES LOURENÇO DE MORAIS**

**Nascimento:** 23 de Março de 1983

**Localidade:** Goiânia – Goiás

**Filiação:** João Batista de Moraes e Neusa Maria Rodrigues Moraes

**2005 – 2008:** Graduação em Licenciatura Plena em Educação Física  
Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

**2008 – 2009:** Pós-Graduação em Fisiologia do Exercício  
Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

## DEDICATÓRIA

À **Deus**, pelo dom da vida e da sabedoria, sendo minha fonte de fé e esperança durante toda minha vida.

Aos meus pais, **João e Neusa**, e meu irmão **Silas**, os quais foram meu alicerce para a construção dos meus sonhos, merecedores por mais essa conquista.

À minha orientadora, **Sandra Helena Penha de Oliveira**, a quem possuo grande admiração e carinho.

À minha namorada **Paula**, quem me deu conforto e carinho durante um período muito importante, te amo!

A todos meus **amigos**, pela ajuda e compreensão durante essa fase de ausência, muito obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS, por me conceder o dom da vida, saúde, inteligência e paz.

Agradeço do fundo de meu coração aos meus pais e ao meu irmão (João, Neusa e Silas), que me deram todo amor do mundo, e que inúmeras vezes adiaram seus sonhos e desejos para satisfazer meus caprichos e por um melhor futuro a mim, me educando de maneira sábia, não para si mesmos, mas para vida.

Agradeço de maneira especial a minha excelente orientadora, Sandra Helena Penha de Oliveira, que além de me orientar neste trabalho, com muita paciência e sabedoria, mostrou-me o poder do conhecimento, ensinando-me muitas coisas, inclusive acreditar em mim mesmo. Muito obrigado Professora!

Agradeço à minha namorada, Paula, pelo carinho, amor, paciência e apoio durante esse período. Te amo!

Agradeço a todos os amigos que fiz durante esse período, em especial, Wagner, Michael, Leonardo, Daniel, Caril, Ariane e Bruno. Cada um de vocês me ajudou de formas diferentes, mas todos me ajudaram a alcançar esse objetivo, muito obrigado!

Agradeço a todos os componentes do Laboratório de Farmacologia (Isabele, Leonardo, Daniel, Adriano e Elisa) pelo auxílio em minhas pesquisas durante esse período. Muito obrigado!

Agradeço à todas as pessoas que sempre me estimularam a crescer e nunca desistir de meus sonhos.

Agradeço em especial a funcionária Ana Cláudia Martins Grieger Manzati.

Agradeço a todos os funcionários da UNESP pelo empenho e cooperação.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

*Albert Einstein*

MORAIS, S. R. L. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA SOBRE A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E FATORES REGENERATIVOS PELO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DECORRENTE DE UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Araçatuba – 2011.

## RESUMO

Os mecanismos envolvidos na adaptação do tecido muscular à prática de exercícios aeróbios, já está bem elucidada em diversos estudos. Essa adaptação ocorre por meio de um processo de reparo desencadeado por dano muscular (processo inflamatório). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com L-arginina sobre os mecanismos envolvidos na liberação de mediadores inflamatórios e fatores regenerativos do tecido muscular esquelético após uma simples sessão de exercício resistido (ER) de alta intensidade, e avaliar o possível papel protetor da L-arginina sobre os efeitos desencadeados pelo ER no tecido muscular esquelético. Ratos machos Wistar foram divididos em 5 grupos: (grupo controle (C), pós-exercício(0), 8, 24 e 48 horas pós-exercício), suplementados com L-arginina (1 g/kg) uma hora antes do início do exercício, ou aminoguanidina (50 mg/kg) 30 minutos antes do início do treino, ambos por gavagem. Os animais foram submetidos a prática do TR durante 4 dias por meio de uma escada com 80° de inclinação, e com aparato de sobrepeso, correspondentes à 80% do peso corporal de cada animal, acoplado aos animais somente no quarto dia de treinamento. O sangue periférico e o tecido muscular esquelético (extensor digitorum longus) foram coletados para a análise de Mieloperoxidase (MPO), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), citocina-induzida quimiotática para neutrófilos (CINC-2), fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ), Colágeno tipo 1, Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), creatina quinase (CK), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e a Proteína C Reativa (CRP) por RT-PCR e ELISA. A suplementação com L-arginina promoveu grande redução na migração de neutrófilos no tecido muscular esquelético, na produção de TNF- $\alpha$ , CINC-2 e CRP, e potencializou a produção e expressão dos fatores regenerativos musculares (TGF- $\beta$ , Colágeno tipo 1 e VEGF). O pré-tratamento com aminoguanidina reverteu o processo. A suplementação com L-arginina (percursor do óxido nítrico) promoveu papel protetor sobre o tecido muscular esquelético e aumentou a expressão de fatores regenerativos após uma sessão de alta intensidade de ER. Nós sugerimos que esses efeitos estejam relacionados a via do óxido nítrico (NO).

**Palavras-chave:** Exercício resistido. Músculo esquelético. Processos inflamatórios. Fatores regenerativos. L-arginina.



MORAIS, S. R. L. **EFFECT OF L-ARGININE SUPPLEMENTATION UPON THE PRODUCTION OF INFLAMMATORY MEDIATORS AND REGENERATIVE FACTORS OF SKELETAL MUSCLE TISSUE ARISING FROM A COURSE OF ORIENTED PRATICE OF RESISTANCE TRAINING.** 2011. 135 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Araçatuba – 2011.

### ABSTRACT

The mechanisms involved of muscular adaptation to aerobic exercise have previously been described in several studies. This adaptation occurred through a repair process following tissue damage (inflammatory process). The aim of this study was to analyze the effect of the L-arginine supplementation upon the mechanisms involved on release of inflammatory mediators and regenerative factors of skeletal muscle tissue post a single bout of high intensity of resistance exercise (RE), and evaluate the possible protective role of L-arginine supplementation in the effects of RE in skeletal muscle tissue. Male Wistar rats were divided into 5 groups: (control group (C), post-exercise (0), 8, 24 and 48 hours post-exercise), with L-arginine (1 g/kg) one hour before training began or aminoguanidine (50 mg/kg), 30 minutes before starting training, both by gavage. The animals were subjected to RE practice for four days, through a staircase with 80° tilt, with the overload apparatus corresponding to 80% relative to the body weight on the fourth day. Peripheral blood plasma samples, skeletal muscle (extensor digitorum longus) were collected for analysis of myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Collagen type 1, vascular endothelial growth factor (VEGF), creatine kinase (CK), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and C-Reactive protein (CRP) by RT-PCR and ELISA. L-arginine promoted a great reduction in neutrophil migration, TNF- $\alpha$ , CINC-2 and CRP, and up-regulated the regenerative factors of skeletal muscle (TGF- $\beta$ , collagen type 1 and VEGF). Aminoguanidine pre-treatment reversed the process. L-arginine (nitric oxide precursor) supplementation played a protective role in the skeletal muscle tissue and increased the expression of regenerative factors after a high intensity RE session. We suggest that this protection is related to the nitric oxide (NO) pathway.

**Keywords:** Resistance exercise. Skeletal Muscle. Inflammatory process. Regenerative factors. L-arginine.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** – Visão frontal da escada utilizada para a prática do exercício resistido.

**Figura 2** – Visão lateral da escada utilizada para a prática do exercício resistido.

**Figura 3** – Foto do animal realizando o exercício resistido com sobrecarga (80% massa corporal) acoplada à calda.

**Figura 4** – Foto do local onde os animais descansavam entre as séries de exercício resistido.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

**Gráfico 1** – Migração de neutrófilos para o tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

**Gráfico 2** – Produção de TNF- $\alpha$  e CINC-2 no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

**Gráfico 3** – Produção e expressão de TGF- $\beta$  (RNAm) no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido

**Gráfico 4** – Expressão de colágeno tipo 1 no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

**Gráfico 5** – Expressão de VEGF (RNAm) no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

**Gráfico 6** – Atividade das enzimas ALT e AST no plasma do sangue periférico de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

**Gráfico 7** – Atividade enzimática de CK no plasma do sangue periférico de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

**Gráfico 8** – Atividade da enzima PRC no plasma do sangue periférico de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACSM = American College of Sports Medicine – Colégio Americano de Medicina do esporte
- ALT = Alanina Aminotransferase
- ALT/TGP = Alanina Aminotransferase/ Transaminase glutâmico pirúvica
- AST = Aspartato Aminotransferase
- AST/GOT = Aspartato Aminotransferase/Transaminase Oxalacética
- bp = *base pairs* – pares de base
- C = Família de Quimiocinas (possui um único resíduo de cisteína)
- CAT = Catalase
- CC = Família de Quimiocinas (resíduos de cisteína adjacentes)
- cDNA = DNA complementar, sintetizado a partir de um RNA mensageiro
- CEAA = Comitê de Ética na Experimentação Animal
- CINC-2 = citocina-induzida quimiotática para neutrófilos
- CK = Creatina quinase
- CK-NAC = Creatina quinase
- CRP = Proteína C Reativa
- CX3 = Família de Quimiocinas (com 1 resíduo de cisteínas e 3 de aminoácido)
- CXC = Família de Quimiocinas (resíduos de cisteína separados por um aminoácido)
- DEPC = Dimetil pirocarbonato
- DHHS = Departamento Americano de Saúde e Serviços Humanos
- DNase = Enzima capaz de degradar o DNA genômico
- dNTP = 2' – deoxynucleoside 5'- triphosphate – consiste em quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), e quando unidas formam as unidades estruturais do DNA e do RNA
- DTT = DL-Dithiothreitol - reagente utilizado para produção de cDNA (RT-PCR)
- EDL = Extensor digitorum longus (tecido muscular esquelético)
- EO = Estresse oxidativo
- ER = Exercício Resistido
- EROS = Espécies reativas de oxigênio
- GPX = Glutathione Peroxidase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de hidrogênio
- H-TAB = Hexadecyltrimethylammonium bromide

ICAM-1 = Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 – Molécula de adesão intercelular

$\text{I}\kappa\beta\text{-}\alpha$  = NF- $\kappa\beta$  inhibitor alpha – Inibidor da via NF- $\kappa\beta$  -  $\alpha$

L-name = inibidor seletivo da enzima NOSc (constitutiva)

LOX = enzima Lysyl oxidase

MMPs = Metaloproteinases

MPO = Mieloperoxidase

NF- $\kappa\beta$  = complexo proteico relacionado a fatores transcricionais, envolvida na resposta imune (citocinas, radicais livres) promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios.

NO = *Nitric oxide* – Óxido Nítrico

NOSi  $\downarrow$  = inibição da enzima NOSi

NOSi = Óxido nítrico sintetase induzida

NOSi KO = animal geneticamente modificado sem a presença da enzima NOSi

$\text{O}_2^{\bullet -}$  = Superóxido

OD = *Optical density* – Densidade óptica

$\text{OH}^{\bullet}$  = Radical hidroxil

Oligo-DT = primer utilizado para síntese de cDNA, por meio da hibridização da calda Poly A do RNAm

PBS = Tampão fosfato salino

PBS+BSA 1% = Tampão fosfato salino + Albumina sérica bovina 1%

PCR = *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PMN = Células Polimorfonucleares

RNAse = Nuclease que catalisa a degradação do RNA

RT-PCR = *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* – Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase

SOD = Superóxido dismutase

TAE 50x = Tampão (TRIS – Acetato – EDTA). Utilizado na preparação de géis de agarose e como um tampão de corrida para eletroforese

TGF- $\beta$  = Fator transformador de crescimento  $\beta$

TMB 0,5% = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TR+Amino = Treinado e pré-tratado com aminoguanidina

TR+L-arg = Treinado e suplementado com L-arginina

VEGF = *Vascular endothelial growth factor* – Fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR2 = receptor de VEGF

## SUMÁRIO

1	Introdução e Síntese Bibliográfica	23
1.1	Exercício Resistido: Características e benefícios	23
1.2	Atividade física e sistema imunológico	25
1.3	Treinamento Resistido e Processos Inflamatórios	29
2	Proposição	37
3	Materiais e Métodos	39
3.1	Animais	39
3.2	Protocolo de Suplementação com L-arginina	39
3.3	Protocolo para o pré-tratamento com aminoguanidina	39
3.4	Programa orientado de Exercício Resistido de alta intensidade	39
3.5	Coleta do sangue periférico e do tecido muscular esquelético	44
3.6	Determinação da infiltração de neutrófilos no tecido muscular esquelético	45
3.7	Análise da expressão de RNAm do tecido muscular esquelético: isolamento do RNA, transcriptase reversa e Reação em cadeia da polimerase	46
3.8	Determinação da produção de TNF- $\alpha$ , CINC-2 e TGF- $\beta$ do tecido muscular esquelético	48
3.9	Determinação da atividade enzimática de Aspartato Aminotransferase (ALT) e da Alanina Aminotransferase (AST)	49
3.10	Determinação da atividade enzimática de Creatina Quinase (CK)	50
3.11	Determinação da produção de Proteína C Reativa (CRP)	51
3.12	Análise estatística	51
3.13	Soluções	52
4	Resultados	57
4.1	Migração de neutrófilos para o tecido muscular esquelético de animais submetidos ao programa orientado de	57

---

	treinamento resistido de alta intensidade	
4.2	Produção de TNF- $\alpha$ e CINC-2 no tecido muscular esquelético de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	59
4.3	Produção e expressão de TGF- $\beta$ (RNAm) no tecido muscular esquelético de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	61
4.4	Expressão de Colágeno tipo 1 (Rnam) no tecido muscular esquelético de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	63
4.5	Expressão de VEGF (Rnam) no tecido muscular esquelético de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	65
4.6	Atividade das enzimas ALT e AST no plasma do sangue periférico de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	67
4.7	Atividade enzimática de CK no plasma do sangue periférico de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	69
4.8	Atividade da CRP no plasma do sangue periférico de animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido de alta intensidade	71
5	Discussão	74
6	Conclusões	87
	Referências	89
	Anexos	105

## 1 Introdução e Síntese Bibliográfica

Constantemente, atletas são expostos a desafios fisiológicos intensos durante os períodos de treinamentos e competição. Esses períodos possuem intervalos muito curtos entre si, comprometendo o processo de recuperação fisiológica, em especial, o período de regeneração e reparo do tecido muscular esquelético. Devido a este motivo, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas em busca de ferramentas com objetivo de amenizar o impacto fisiológico de exercícios de alta intensidade e acelerar o processo de recuperação pós-treinamento. O exercício resistido (ER) é amplamente utilizado em praticamente todas as áreas esportivas como base de preparação física, com objetivos de melhora no desempenho e na proteção contra possíveis lesões, sendo uma ferramenta indispensável no atual meio esportivo.

### 1.1 Exercício Resistido: Características e Benefícios

A característica principal do ER (treinamento com pesos, treinamento resistido ou treinamento de força) é a realização de movimentos dinâmicos (concêntrico e excêntrico) ou estáticos (isométricos), contra uma determinada carga (mecânica, peso corporal) (RATAMESS et al., 2009)

As ações musculares do ER caracterizam-se em 2 tipos de ações musculares diferenciadas, que são as ações isométricas (excêntricas) e dinâmicas (concêntricas e excêntricas). A fase isométrica refere-se à sustentação de uma determinada carga, ou mesmo o próprio peso corporal, sem que ocorram movimentos excêntricos ou concêntricos, já a fase concêntrica refere-se a fase de encurtamento das fibras musculares, fase em que a força exercida pelo encurtamento muscular vence a resistência imposta por uma determinada carga. As ações excêntricas ocorrem durante a fase negativa do movimento, onde ocorre a resistência contra uma determinada carga onde o músculo se alonga devido à força de contração ser menor que a força de resistência (HARMAN, 2000), sendo a fase contrátil que mais promove injúria tecidual.

A repetição de tais ações musculares caracteriza o estado de contratilidade muscular, período no qual o tecido muscular esquelético (fibras musculares) está em constante ação, através do encurtamento e alongamento



das miofibrilas, resultando em geração de força mecânica para a realização de uma determinada tarefa. Tais contrações promovem o surgimento de microfissuras nas fibras musculares esqueléticas (miofibrilas), dando início à liberação de mediadores inflamatórios (Miocinas), constituintes do sistema imunológico.

O exercício resistido traz inúmeros benefícios em relação à saúde e a aptidão física (MAIOR, 2002). Diversos órgãos de pesquisa na área de atividade física como o American College of Sports Medicine (ACSM) e o Departamento Americano de Saúde e Serviços Humanos (DHHS), recomendam a inclusão de treinamento de força como parte de um programa de atividade física (ACSM, 1998/2002; MAIOR, 2002), onde tal prática relacionada a aptidão física, reduz de forma significativa o risco de doenças cardiovasculares, diabetes não-insulino dependentes, retarda a osteoporose, promove a redução da massa gorda, preserva a capacidade funcional e promove o bem-estar psicológico (GOLDBERG, 1989; GOLDBERG et al., 1984; FLUCKEY et al., 1994; GUTIN; KASPER, 1992; LAYNE; NELSON, 1999; EVANS, 1999; KATCH; DRUM, 1986; EWART, 1989; MAIOR, 2002).

Através da contínua prática do ER, há a promoção do ganho de força (POWERS; HOWLEY, 2005), que ocorre através de adaptações neurais (coordenação intra e intermusculares) principalmente durante a fase inicial do treinamento, e adaptações estruturais como efeito crônico do mesmo (hipertrofia, resistência), sendo um dos principais fatores benéficos relacionados ao ER. A força muscular define-se como a tensão gerada por um músculo, ou um grupo muscular, contra uma resistência, sendo esta valência física necessária para a realização desde atividades cotidianas a atividades físicas especializadas (FLECK, 1997; MAIOR, 2002). A força muscular se distingue em 3 tipos: Força muscular máxima ou força pura; Força de potência e Força de resistência.

De acordo com Platonov e Bulatova (1998), a força máxima pode ser definida como o platô de força muscular máxima que o indivíduo possa alcançar em consequência de uma tensão muscular contra uma resistência, podendo ou não existir movimento articular. A força de potência se caracteriza como a mais rápida velocidade imposta pelo sistema neuromuscular em um determinado período de tempo, através da capacidade dos sistemas nervoso e muscular suportarem a resistência promovida pela contração muscular máxima

(SCHIMIDTBLEICHER, 1992; GOMES; TEIXEIRA, 1998; MAIOR, 2002). Já a força de resistência é definida pela capacidade do sistema neuromuscular de produzir o maior somatório de impulsos possíveis, sob condições metabólicas aeróbia e anaeróbia (GOMES; TEIXEIRA, 1998; NEUMAN, 1990; MAIOR, 2002).

Recentemente, diversos estudos têm abordado os efeitos do exercício físico sobre o sistema imunológico (BESEDOVSKY et al., 1985; BESEDOVSKY et al., 1992), principalmente o exercício aeróbio, porém, há poucas evidências sobre os efeitos do treinamento resistido sobre o sistema imunológico.

## 1.2 Atividade física e sistema imunológico

Estabeleceu-se através de vários estudos, uma possível interação entre a contração do músculo esquelético e mudanças no sistema imune, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Esta afirmação é baseada nas descobertas de que exercícios de alta intensidade promovem aumento do número de citocinas e induz liberação de radicais livres promovendo danos oxidativos, em diferentes órgãos, além do músculo esquelético, o fígado, pulmão e coração (NIELSEN; PEDERSEN, 2007; NIELSEN; PEDERSEN, 2008; FRANKIEWICZ-JOZKO; SIERADZAN-GABELSKA, 1996; ASHTON et al., 1998; RADÁCK et al., 1998)

O sistema imunológico é determinante no combate de microrganismos invasores, na remoção de células mortas e detritos celulares, no estabelecimento da memória imunológica, reparo tecidual (SCHULENBURG; EWBANK, 2004) e homeostasia do organismo, sugerindo assim uma inter-relação do sistema imune com outros sistemas, como o nervoso e o endócrino (LEANDRO et al., 2007). As células que constituem o sistema imune originam-se a partir de células hematopoiéticas pluripotentes, localizadas na medula óssea, e as diferenciações posteriores ocorrem não somente na medula, mas também em diferentes locais do organismo (LEANDRO et al., 2007). Uma das linhagens dessas células se refere às populações leucocitárias, os granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), os monócitos/macrófagos e os linfócitos (linfócitos T, B e células natural Killer (NK) (LEANDRO et al., 2007). Os monócitos são células presentes no sangue periférico que continuamente se diferenciam em macrófagos após migrarem para os tecidos (SCHULENBURG; EWBANK, 2004). Dentre as células constituintes do sistema imune, os

neutrófilos, macrófagos e as citocinas, estão relacionados e possuem grande importância nas lesões teciduais (HAMES; GLOVER, 2006; VIZI, 1998; GLEESON, 2000). Em resposta a exercícios de alta intensidade, ocorre neutrofilia, linfopenia e monocitose (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000) sendo estes possíveis indicadores da presença de infecções bacterianas ou de uma inflamação em resposta a uma lesão tecidual (SCHULENBURG; EWBANK, 2004). A distribuição dessas células parece ser mediada pela adrenalina, e em menor grau pela noradrenalina (BLALOCK, 1994; GARCIA, 2003; BESEDOVSKY, 2002; BESEDOVSKY, 1992). A prática de exercícios aeróbios de alta intensidade pode induzir inibição de muitos aspectos da defesa do organismo (imunossupressão), incluindo as atividades das células NK, e a resposta proliferativa dos linfócitos e a produção de anticorpos pelos plasmócitos (PEDERSEN et al., 1988; PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000; PERES et al., 2005; JONSDOTTIR, 2000), comprometendo as defesas do organismo contra agentes infecciosos e oncogênicos, assim como nos processos alérgicos e na autoimunidade. Há também aumentos na concentração plasmática de várias substâncias que influenciam a função leucocitária, incluindo citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e IL1- $\beta$ , citocinas anti-inflamatórias como a IL-6, IL-10 e receptor antagonista de IL-1(IL-1ra) e proteínas da fase aguda, como a Creatina Quinase (CK) e a proteína C-reativa (PCR) (GLEESON, 2000). Em relação a tipos de exercícios físicos (treinamento resistido e exercícios aeróbios), o TR promove muito mais inflamação e/ou dano muscular do que exercícios aeróbios (UCHIYAMA et al., 2006) devido à sobrecarga realizada durante a prática do TR.

A enzima creatina quinase (CK) tem seus níveis aumentados quando ocorre o dano tecidual, como por exemplo, o dano do sarcômero que envolve as fibras musculares esqueléticas, sendo utilizado como marcador de dano tecidual e indicador de desgaste físico (BRANCACCIO et al., 2006). Os níveis de CK se modificam de acordo com o tipo e com a intensidade do exercício, e sua atividade permite obter informações sobre o estado do tecido muscular esquelético, servindo como um indicativo de fadiga muscular (ANGELLI et al., 2004). Observa-se um maior aumento de CK em exercícios de treinamento resistido de alta intensidade ou exercícios prolongados em relação ao mesmo tipo de exercício, porém, com intensidades menores (baixa a moderada)

(BARQUILHA et al., 2009; UCHIDA et al., 2009; NOSAKA; NEWTON et al., 2002; TOFT et al., 2000; NIEMAN, 2001).

A proteína C-reativa (PCR) é sintetizada pelo tecido hepático, principalmente durante a fase aguda de processos inflamatórios e infecciosos, sendo utilizado como um marcador inflamatório, demonstrando importante relação com o sistema complementar, sendo um marcador da função do sistema imune (CHEYNE et al., 2010). A sua monitoração permite a avaliação da inflamação crônica sistêmica (HAIDARI et al., 2001; PEPYS et al., 1983). A existência de processos inflamatórios está relacionado ao surgimento e a progressão de doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, e a prática de exercícios aeróbios de maneira contínua é citada como uma intervenção terapêutica em pacientes com inflamação crônica, diminuindo os níveis sistêmicos dos marcadores inflamatórios, como por exemplo, a CRP (WOODS et al., 2009), no entanto, observa-se o inverso à prática de exercícios agudos (CANNON et al., 1989).

O efeito imunossupressor provocado pela atividade física sobre o sistema imune ocorre em determinadas situações como cargas e durações de treinamento exagerados inadequados às condições físicas do praticante, sendo que sua prática correta promove inúmeras melhorias em diversos aspectos funcionais e fisiológicos. Diversos estudos relatam que o exercício físico promove grande impacto sobre o sistema imunológico, levando ao aumento no número de citocinas, sendo um possível link entre a atividade contrátil do músculo esquelético e o sistema imunológico. Uma simples sessão de ER é capaz de promover várias mudanças sobre a homeostase, em especial, em relação ao tecido muscular esquelético.

Diversos estudos sugerem que a prática de exercícios físicos de intensidade moderada melhoram as funções do sistema imune, enquanto que a prática de exercícios físicos de alta intensidade parece enfraquecê-lo, tornando-o susceptível a doenças leves (GLEESON, 2007). Desde que a prática de exercícios físicos seja realizada de forma orientada e contínua, de acordo com as condições físicas do indivíduo, observa-se melhorias sobre as funções do sistema imune, sendo dependentes do volume e intensidade do exercício, onde os mecanismos que promovem a modulação do sistema imunológico já estão bem compreendidos (CALLE; FERNANDEZ, 2010). No entanto, o efeito do ER

sobre as células do sistema imune não está completamente compreendido, sabe-se que o volume e a intensidade do treinamento podem desencadear efeitos benéficos ou deletérios sobre a homeostase imunológica (KOCH, 2009).

Diversas pesquisas demonstram que exercícios de alta intensidade podem ser caracterizados como fatores estressantes ao sistema imunológico, promovendo o aumento de células inflamatórias circulantes (neutrófilos monócitos e linfócitos), onde o exercício atua como um modulador imunológico, agindo tanto no processo de injúria como no reparo do tecido muscular esquelético. O processo de reparo é constituído, por exemplo, do fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ), da produção de colágeno, do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do aumento da síntese protéica, porém, a relação entre os efeitos da prática do treinamento resistido de alta intensidade e sua influência sobre os mediadores inflamatórios (miocinas) e os fatores atuantes na regeneração do tecido muscular não estão completamente compreendidos (IZQUIERDO et al., 2009; NIEMAN, 2001; ANGELI et al., 2004; LAGRANHA et al., 2004; NIESS et al., 1998). Sabe-se que a expressão de TGF- $\beta$  está intimamente relacionada com a injúria tecidual, onde durante o dano tecidual o TGF- $\beta$  encontra-se aumentado (SMITH et al., 2007; MCLENNAN et al., 1997). Porém, há controvérsias na literatura sobre o efeito do TGF- $\beta$ , visto que estudos mostram um efeito dual, podendo tanto ser positivo ou deletério sobre o reparo tecidual (BHATAGNAR et al., 2010; CANNON;PIERRE 1998; MASSAGUE, 1990; SMITH et al., 2007; LIU et al., 2001). Outro fator de grande importância no processo do reparo tecidual é o colágeno, o qual tem sua síntese aumentada por exercícios de alta intensidade por meio de alterações de enzimas relacionadas à síntese de colágeno, dessa forma, auxiliando no processo de regeneração e reparo do tecido muscular esquelético (HEINEMEIER et al., 2007). Durante a fase de regeneração e reparo tecidual, é observado o aumento não somente dos fatores citados anteriormente, mas também o aumento da angiogênese, promovido por meio de duas vias, a angiopoietina e o VEGF (PAPETTI; HERMAN, 2002; GAVIN et al., 2007). Estes fatores angiogênicos promovem o aumento no número de capilares ao redor da fibras musculares, e esse aumento provavelmente está relacionado a prática de exercícios de alta intensidade (SALTIN et al., 1968; ANDERSEN; HENRIKSSON, 1977; GAVIN et al., 2007).

Portanto, observa-se um grande e vasto campo imuno-fisiológico a ser desvendado e compreendido em relação à prática de atividades físicas sobre o sistema imune, em especial, sobre os efeitos desencadeados pela prática do TR.

### 1.3 Exercício Resistido e Processos Inflamatórios

A modificação na musculatura por trabalho mecânico ou injúria inicia uma rápida e seqüencial invasão de células inflamatórias musculares que podem persistir desde alguns dias até mesmo semanas, enquanto a musculatura é reparada, ocorrendo regeneração e crescimento da musculatura que se encontra em processo inflamatório (TIDBALL, 2005).

A inflamação é uma ampla base variável de processos patológicos e fisiológicos (TIDBALL, 2005) que são desencadeados por agressões ao organismo, iniciando a liberação de diversas células inflamatórias, mediadores químicos que promovem a dilatação e o aumento de permeabilidade dos vasos sanguíneos, permitindo um maior fluxo sanguíneo para a área agredida, bem como a exsudação de líquidos, proteínas e leucócitos para o espaço intersticial (COSTA, 2005). Os leucócitos circulantes envolvidos nas respostas inflamatórias são os neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e plaquetas. Estes migram do sangue para o tecido em direção ao agente invasor auxiliando as células residentes localizadas no tecido conjuntivo, entre eles os mastócitos, fibroblastos, macrófagos residentes e células eventuais que podem auxiliar ou potencializar o processo (COSTA, 2005).

Entre os mediadores inflamatórios temos as citocinas e quimiocinas que são proteínas envolvidas nas respostas contra o agente invasor, onde sua liberação é transitória e estreitamente regulada. As citocinas se agrupam em classes de acordo com suas funções ou com a natureza de células alvo, podendo estar envolvida na ativação, migração, crescimento e diferenciação dos linfócitos (Interleucinas (IL-2 e IL-4)), Fator de crescimento Tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1, Interferons (IFN) e a IL-6 (COSTA, 2005).

Nos últimos anos, a identificação da musculatura esquelética como um órgão produtor de citocinas levou a descoberta de que as citocinas derivadas de contrações musculares podem apresentar não somente modificações no sistema imune, mas que essas citocinas derivadas da musculatura desenvolvem papéis



na mediação de mudanças metabólicas associadas ao exercício, desenvolvendo adaptação ao exercício (NIELSEN; PEDERSEN, 2008). Recentemente, Nielsen e Febrario (2008), sugeriram que as citocinas e outros peptídeos são produzidos, expressos e liberados por fibras musculares e dessa forma, podem exercer seus efeitos de maneira parácrina ou endócrina, sendo, portanto, denominadas mioquinas. A interleucina 6 (IL-6) foi a primeira mioquina a ser descoberta. No entanto, o músculo esquelético pode expressar e produzir citocinas de diferentes famílias, como exemplo, IL-6, IL-8 e IL-15 (citocinas pró-inflamatórias), onde a contração muscular exerce papel fundamental na regulação da expressão dessas citocinas. A produção de citocinas também pode ser modulada por uma variedade de estímulos como exercícios extenuosos (ER), hormônios do stress, crises de energia e estresse oxidativo. No entanto, até o presente momento, nenhum estudo foi conduzido no sentido de investigar o papel da citocina TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, e sua regulação com a quimiocina CINC-2, ambas quimiotáticas para neutrófilos no tecido muscular esquelético.

Diversos estudos demonstram que o TNF- $\alpha$  possui grande efeito pró-inflamatório resultante da sua capacidade de aumentar a expressão das moléculas de adesão endotelial e, subsequentemente, promover a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular (WITKO-SARSAT, 2000). Existem diversos fatores que vem influenciando o estudo sobre o TNF- $\alpha$  e sua relação com atividades físicas. Ostrowski (1999) observou em seu estudo, caracterizado por movimentos isotônicos (concêntrico e excêntrico), um aumento na produção dessa citocina. No entanto, diversos estudos com metodologias diferentes, não deixam claro o papel do TNF- $\alpha$  sobre os processos inflamatórios teciduais induzidos pela atividade física. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de um estudo sobre a relação do TNF- $\alpha$  com a atividade física e seu papel nas inflamações do músculo esquelético.

As quimiocinas são grupos específicos e particulares de citocinas, possuindo a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimiotaxise) e o movimento dirigido (quimiotaxia), sendo particularmente importantes na inflamação (COSTA, 2005), classificando-se em quatro classes: CC, CXC, C e CX<sub>3</sub>. Essa classificação é dependente dos resíduos de cisteína localizadas na porção N terminal, e sua atuação ocorrem em células alvo através de receptores específicos ligados a proteína G. A CINC-2 é uma quimiocina da classe CXC e é

responsável pela infiltração e ativação de PMN (Neutrófilos polimorfonucleares). Essa quimiocina tem um papel importante na resposta do hospedeiro contra microrganismos patógenos invasores, sendo produzidas por PMN ativadas, favorecendo ao acúmulo e ativação dessas células. Dados experimentais demonstram que durante a realização de exercícios físicos concêntricos verificou-se a expressão da IL-8 e o seu receptor CXCR2 em biópsia da musculatura esquelética (COSTA, 2005).

O termo estresse oxidativo (EO) é utilizado em circunstâncias nas quais o “desafio” por radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos (SIES, 1986). Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob EO quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático (UCHIYAMA, 2006), sendo que enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT), desenvolvem um papel fundamental contra o estresse oxidativo na musculatura (JI; FU, 1992; JI et al., 1992; OHISHI et al., 1998; POWERS et al., 1994; POWERS et al. 1999).

Um dos efeitos do ER é o estresse oxidativo, causado pela diminuição do fluxo sanguíneo, decorrente de contrações musculares repetitivas, e um rápido influxo sanguíneo imediatamente após a série de exercício, resultando em um estado de isquemia e reperfusão da musculatura acionada (NIELSEN; PEDERSEN, 2008). Sugere-se que o estresse oxidativo na musculatura esquelética causada pela prática de exercício físico (TR), resulte em uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (WITKO-SARSAT, 2000; OHISHI et al., 1998; POWERS et al., 1994; JI et al., 1992).

Lin et al. (2003) verificaram que o aumento na ocorrência de apoptose em timócitos está associada à elevação na produção de EROs em ratos submetidos a duas sessões de TR intenso. Entretanto, a relação entre exercícios resistidos (ER) e processos oxidativos não está claro, sendo que o estado de isquemia e reperfusão provocado pelo estresse mecânico, através do ER, leva ao



surgimento de EROs, que possivelmente induz dano as fibras musculares (UCHIYAMA, 2006).

A isquemia e a reperfusão promovida pelo estresse mecânico através de repetições concêntricas e excêntricas do ER inicia um processo denominado estresse por cisalhamento nas células endoteliais, sendo um potente estímulo para a produção de óxido nítrico. Existem muitos fatores que podem afetar a excitação e a contração e acoplamento da musculatura exercitada e sua fadiga, como o declínio na concentração intracelular de  $K^+$ , e aumento na concentração intracelular de  $Na^+$ , acúmulo de  $H^+$  e  $P_i$ , e redução do potencial de fosforilação de ATP (HUANG et al., 2008), onde espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio são aumentadas durante a fadiga muscular (FAGANELLO, 2003). O óxido nítrico (NO), ou monóxido de nitrogênio, é um gás solúvel, produzido por células endoteliais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e por neurônios específicos do cérebro. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor que possui sete elétrons do átomo de nitrogênio e oito do oxigênio (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas e está presente em quase todos os sistemas do organismo (SCHACHNIK, 2008; MORRIS; BILLIAR, 1994). Durante a década de 1980, o NO foi considerado apenas um poluente ambiental indesejável e carcinógeno potencial encontrado na neblina, na fumaça dos cigarros e na descarga dos automóveis (JAMES, 1995).

O NO deriva-se da L- arginina, um aminoácido não essencial, o qual é citado em diversos estudos por promover um possível efeito protetor contra situações de estresse oxidativo e inflamação em alguns órgãos (pulmonar, cardíaco) e de melhoras no estado fisiológico pós-estresse físico. A produção do NO ocorre através da ação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (NOSi) sobre a molécula de arginina, resultando na produção de citrulina e NO, atuando sobre as células alvo através da indução do monofosfato de guanosina, o qual, por sua vez, desencadeia diversos processos intracelulares, produzindo, por exemplo, o relaxamento das células do músculo liso vascular, apresentando um potente efeito vasodilatador, atuando na função vascular (COSTA, 2005). O NO também reduz a agregação e a aderência plaquetária, inibe diversas características da inflamação induzida por mastócitos e serve como regulador de recrutamento de leucócitos. Furchgott e Zawadzki (1980) verificaram que a ação

de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, dependia da integridade do endotélio e envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, que foi chamado de EDRF (*Endothelial-Derivated Relaxing Factor*).

Rapoport e Murad (1983) propuseram que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Aproximadamente sete anos após a descoberta do EDRF, estudos detalhados da sua ação biológica nos vasos (IGNARRO, 1987; MONCADA et al., 1988; PALMER et al., 1987) e nas plaquetas (RADOMSKI et al., 1987) demonstraram que esse composto era idêntico ao NO (SCHACHNIK, 2008).

Huang et al (2008) realizou um estudo com ratos, onde os mesmos receberam suplementação de L-arginina e foram submetidos a exercício aeróbio de alta intensidade. Os resultados demonstraram que a suplementação com L-arginina diminui o estresse oxidativo promovido pelo exercício e aumentou a capacidade de reparo em relação ao sistema pulmonar e cardíaco. Indicadores de dano muscular e hepático (alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)), encontraram-se diminuídos nos animais submetidos a suplementação com L-arginina, sendo essas enzimas citosólicas presentes no plasma sanguíneo, como indicadores características da resposta extenuante da musculatura após os exercícios físicos.

A ALT e a AST são enzimas associadas ao tecido hepático liberadas em grandes quantidades na corrente sanguínea quando ocorre o dano tecidual hepático. Essas enzimas são utilizadas como preditores de citotoxicidade, de resistência à insulina (Diabete Mellitus tipo 2) e doenças cardiovasculares utilizadas como marcadores precisos e sensíveis para identificação de dano hepático (RUTTER et al., 2004; WANNAMETHEE et al., 2005). A enzima ALT está intimamente relacionada ao tecido hepático, já a AST, está relacionada tanto ao tecido hepático como ao tecido muscular esquelético, onde as mesmas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas. Estudos prévios têm demonstrado que exercícios exaustivos aumentam a atividade das enzimas ALT e AST, resultando em dano hepático (BOWERS et al., 1978; LEVINGER et al., 2009). Huang et al. (2008), após submeter animais a treinamento aeróbio de alta intensidade cronicamente, observou que a suplementação com L-arginina foi

capaz de diminuir a atividade das enzimas ALT e AST, porém, a literatura não reporta estudos avaliando o efeito da suplementação com L-arginina durante a fase aguda da inflamação induzida por treinamento resistido.

Nos últimos anos, tem havido um grande interesse no papel da ativação ou patologias ou processos inflamatórios, incluindo exercícios extenuantes que induzem dano em diferentes tecidos (GOMEZ-CABRERA et al., 2005; MOROZOV et al., 2006). A Mieloperoxidase (MPO) é liberada pela ativação de neutrófilos e essa atividade é utilizada como um marcador para infiltração de neutrófilos nos tecidos. Estudos indicaram que tanto a xantina oxidase (XO) (uma metalflavoporteína, que se encontra significativamente aumentada na circulação e nos tecidos durante exercícios exaustivos) como a MPO são as duas principais fontes extracelulares de EROs liberadas durante exercícios extenuantes e são responsáveis pelo estresse oxidativo induzido por exercícios exaustivos em vários tecidos incluindo o cardíaco, musculoesquelético, fígado, pulmão e rins. (GOMEZ-CABRERA et al., 2005; MOROZOV et al., 2006)

O músculo esquelético possui uma alta capacidade de recuperação e que se inicia imediatamente após a lesão, contudo a regeneração muscular humana é limitada e, se a lesão for extensa, a regeneração poderá não ocorrer, fazendo com que o músculo seja substituído por tecido conectivo. Existem dois mecanismos pelos quais uma nova fibra muscular pode ser formada: (1) dividindo-se em duas por cisão longitudinal ou (2) pela ativação de células satélites, sendo as últimas, células mononucleadas, fusiformes e estão presentes entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (MOROZOV et al., 2006).

Os efeitos do ER sobre as fibras musculares e demais tecidos citados anteriormente, demonstram ser de grande complexidade e não totalmente claros sobre seus processos fisiológicos. Diversos estudos demonstram-se contraditórios, principalmente sobre o possível efeito do NO (protetor ou não protetor) sobre o organismo. Tidball (2005) em seu estudo relata que o NO derivado da musculatura parece ser um importante regulador do dano e da inflamação muscular pela invasão de células inflamatórias, servindo como protetor ao dano muscular por inflamação através da inibição da expressão e adesão molecular que são necessárias para a interação leucocitária com o endotélio vascular.

## 2 – Proposição

Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com L-arginina sobre os mecanismos envolvidos na liberação dos mediadores inflamatórios e dos fatores regenerativos do tecido muscular esquelético, desencadeados pela prática de exercício resistido. Para responder a essas questões, foram avaliados:

- A infiltração de neutrófilos no tecido muscular esquelético;
- A produção dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e CINC-2;
- A produção das enzimas Creatina quinase (CK) e Proteína C reativa (CRP);
- A produção de TGF- $\beta$ ;
- A expressão de TGF- $\beta$ , Colágeno tipo 1 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF);
- A produção de Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotranferase (AST).

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Animais

Todos os métodos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Araçatuba – SP (CEAA-FOA/UNESP) (2009-002045). Foram utilizados 110 ratos machos Wistar (180 à 200g / 40 dias), os quais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Básicas durante os ensaios experimentais, sendo alojados em salas com temperatura controlada (22°C/24°C), com acesso a água e ração *ad libitum* e sistema de claro/escuro de 12 horas.

### 3.2 Protocolo de suplementação com L-arginina

O grupo de animais recebeu suplementação de L-arginina (Sigma Aldrich A5006-500g), precursor do óxido nítrico, via gavagem (1g/kg, pH=7,4) dissolvido em tampão TRIS (pH=8,8) (TRABELIS;LAVOIE, 1996), uma hora antes do início do treinamento proposto. O grupo treinado (sem suplementação), recebeu solução de TRIS (1mL/animal), apenas nos dias de treinamento, com o objetivo de submeter os animais a mesma situação de estresse.

### 3.3 Protocolo para o pré-tratamento com aminoguanidina

Os animais foram pré-tratados com aminoguanidina (Sigma Aldrich A7009-100 g), inibidor seletivo da enzima NOSi, via gavagem (50 mg/kg) dissolvida em NaCl 0,9% (pH=7,4) (ABDEL-ZAHER et al., 2007), 1 mL/animal, 30 minutos antes do treinamento proposto. O grupo treinado (sem pré-tratamento) recebeu NaCl 0,9% (1mL/animal), apenas nos dias de treinamento, com o objetivo de submeter os animais a mesma situação de estresse.

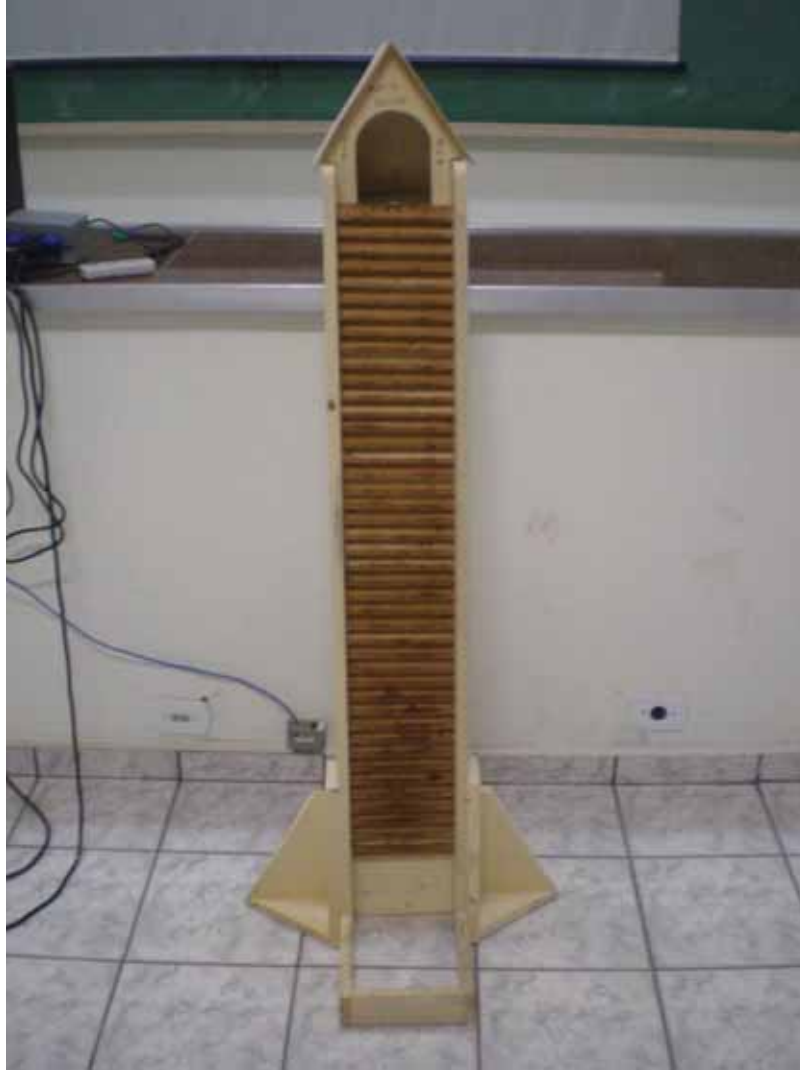
### 3.4 Programa de exercício resistido de alta intensidade

Os animais (sedentários) realizaram o exercício proposto por meio de uma escada com as seguintes dimensões: (1.1 3 x 0.18 m, 2 cm (espaço entre degraus)), 80° de inclinação. No topo um local (casa), com medida de 20 x 20 x 20 cm, onde os animais paravam para o descanso durante as subidas

(HORNBERGER; FARRAR, 2004). Nos três primeiros dias, os animais realizaram consecutivamente 8, 10 e 12 séries de exercícios, com 30 segundos cronometrados de descanso entre as séries, sem acréscimo de carga. No quarto dia, foi acoplada a cauda de cada animal, um aparato com carga (esferas de ferro) relativa a 80% do peso corporal de cada animal, onde o mesmo realizou repetições com o mesmo tempo de intervalo dos três primeiros dias até a falha concêntrica (fadiga muscular). Os animais foram divididos em grupos: Grupo Controle (C), Grupo pós-exercício (0), Grupo 8 horas pós-exercício (8), Grupo 24 horas pós-exercício (24) e Grupo 48 horas pós-exercício (48). Em relação à suplementação de L-arginina e o pré-tratamento com aminoguanidina, 10 animais de cada grupo receberam a suplementação ou pré-tratamento (L-arginina ou aminoguanidina) e outros 10 animais recebendo apenas o veículo transportador (NaCl 0,9%), e todos foram submetidos ao treinamento proposto.

Animais por grupo (n=10)	TREINADO	TREINADO + L-ARGININA (1 g/kg)	TREINADO + AMINOQUANIDINA (50 mg/kg)
Controle (sedentário)	-	-	-
Pós-exercício (0)	+	+	-
8 horas pós- exercício (8)	+	+	-
24 horas pós- exercício (24)	+	+	+
48 horas pós- exercício (48)	+	+	+

**Tabela 1** – Tabela referente a divisão dos grupos, suplementação com L-arginina e o pré-tratamento com aminoguanidina.



**Figura 1** – Visão frontal da escada utilizada para a prática do exercício resistido.

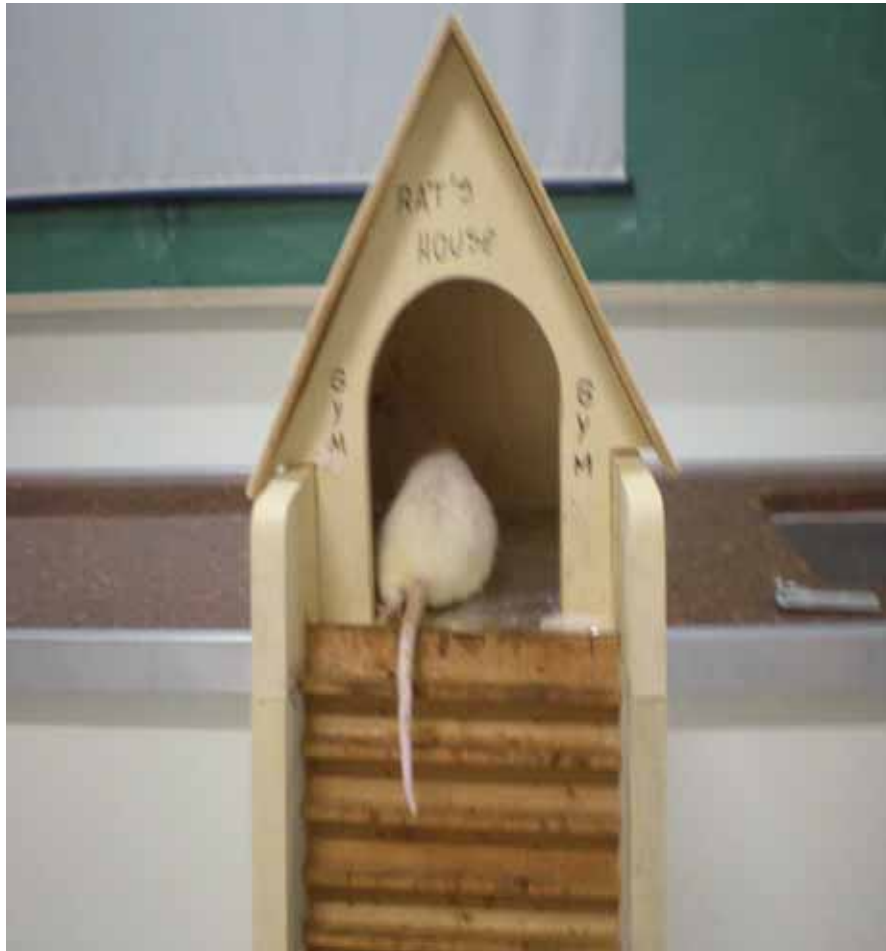


**Figura 2** – Visão lateral da escada utilizada para a prática do exercício resistido.





**Figura 3** – Foto do animal realizando o exercício resistido com sobrecarga (80% massa corporal) acoplada à calda.



**Figura 4** – Foto do local onde os animais realizavam o descanso entre as séries de exercício resistido.

### **3.5 Coleta do sangue periférico e do tecido muscular esquelético**

Após o quarto dia do exercício proposto, os animais foram anestesiados com cloridato de Ketamina (80 mg/mL) e cloridato de xilazina (10 mg/mL) administrados subcutaneamente. O sangue periférico foi obtido por punção da aorta abdominal e em seguida, armazenado em um tubo de 10 mL heparinizado, logo após (0) hora; e também 8, 24 e 48 horas após a última sessão do treinamento proposto. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos à 4°C. O plasma foi coletado e armazenado a -80°C para análises posteriores. O tecido muscular esquelético (extensor digitorum longus (EDL)) foi removido e dividido ao meio, logo após (0) e 8, 24 e 48 horas após a última sessão do treinamento proposto. Uma parte foi armazenada em tubos contendo 1 mL de TRIzol Reagent (Invitrogen, CA,USA), e a outra parte do

tecido foi colocadas em tubos tipo ependorf. Todos os tubos foram rapidamente congelados em nitrogênio e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

### **3.6 Determinação da infiltração de neutrófilos no tecido muscular esquelético**

O recrutamento de neutrófilos para o tecido muscular esquelético foi avaliado a partir da dosagem da enzima mieloperoxidase do tecido muscular EDL. Este tecido foi pesado e em seguida armazenado no tampão 1 (NaCl 0,1M (5,84 g/l) + Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M (5,58 g/l) em NaPO<sub>4</sub> 0,02M (pH 4,7)) num total de 2mL/ 1g de amostra. Em seguida as amostras foram homogeneizadas três vezes com auxílio de um Polytron, e em seguida centrifugadas durante 15 minutos à 13.000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ , e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume inicial do tampão 1 ao pellet, e a solução foi agitada. Em seguida foi adicionado 800  $\mu\text{L}$  of NaCl 0,2% durante 30 segundos, e posterior a esse período, adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  NaCl 1,6% + Glucose 5% as amostras. As amostras foram centrifugadas durante 15 min à 13.000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$  e novamente o sobrenadante foi descartado. O mesmo volume adicionado de tampão 1, foi adicionado de tampão 2 (H-TAB 0,5% em NaPO<sub>4</sub> 0.05M com pH de 5,4), e em seguida as amostras foram homogenizadas com o auxílio de vortex e congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas duas vezes. Novamente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos 10.000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esta etapa o sobrenadante foi coletado e armazenado para a avaliação da enzima mieloperoxidase. Em uma placa de 96 poços, 5  $\mu\text{l}$  das amostras foram incubados com 45  $\mu\text{l}$  de NaPO<sub>4</sub> (com volume final de 50  $\mu\text{l}$ ), 25  $\mu\text{l}$  de TMB por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e 100  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este período, 50  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram adicionados em cada poço para parar a reação. A leitura foi realizada em absorbância (OD 450 nm) utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos neutrófilos totais por amostra por grama de tecido, sendo a curva padrão realizada com 30.000 neutrófilos no primeiro ponto.

### **3.7 Análise da expressão de RNAm do tecido muscular esquelético: isolamento do RNA, transcriptase reversa e Reação em cadeia da polimerase**

O RNA total foi obtido do tecido muscular esquelético EDL, com o uso do reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O tecido congelado em Trizol foi macerado com o auxílio de um Polytron. Em seguida foi adicionado 200 µL de clorofórmio em cada tubo de amostra, e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a solução aquosa foi transferida para novos tubos e 500 µL de álcool isopropílico foi adicionado a cada tubo da amostra e armazenado a -20°C até o dia seguinte. No dia seguinte, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi removido e 500 µL de etanol 75% foi adicionado à cada amostra. As amostras foram centrifugadas novamente a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Em seguida todo o sobrenadante foi descartado e os tubos foram vertidos para baixo até o pellet estar completamente seco. Após esta etapa, o pellet foi ressuspensionado em 20 µL de água de DEPC a 0,1% por amostra, e em seguida armazenados a -80°C. A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro com a leitura sendo realizada utilizando absorvância de 260/280 nm (OD260 equivalente a cada unidade). A concentração do RNA total do tecido muscular esquelético foi calculada com base do RNA total e através do peso da amostra analisada. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C e usadas subsequentemente em procedimentos de transcriptase reversa. Para a realização da transcriptase reversa, 1 µg de RNA total foi utilizado em uma reação contendo 1 µL de oligo-DT (0,5 µg/µL, Invitrogen), 4 µL de dNTP (2,5 µM, Invitrogen), 2 µL of DTT (0,1m/500 µl, Invitrogen), 4 µL de 5x first-standard buffer (250 mM, Invitrogen) e 1 µL de reverse transcriptase (Super Script II, 200 U/µL, Invitrogen). A reação de transcriptase reversa foi realizada de acordo com o perfil de amplificação seguinte: pré-desnaturação a 70°C durante 10 minutos, amplificação (desnaturação a 4 °C durante 5 minutos; anelamento a 42 °C durante 60 minutos; e extensão a 90°C durante 5 minutos). Após a termociclagem as amostras foram armazenadas a 4°C para posteriores análises. Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), 1 µL de cDNA foi

usado em uma reação contendo 4  $\mu\text{L}$  de água de DEPC, 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5  $\mu\text{M}$ , Invitrogen), 2,5  $\mu\text{L}$  de 10x PCR Rxn Buffer (- $\text{MgCl}_2$ , Invitrogen), 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 nM, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de primer 10 nM, 12,8  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Invitrogen) e 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen). O conjunto de primers (ratos) utilizados foram:  $\beta$ -actina (sense: 5' – GAA GCT GTG CTA TGT TGC CCT AGA - 3', antisense: 5' – GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT – 3', 445 bp), TGF- $\beta$ 1 (sense: 5' – GGT TAT GAC TTC AGC TTC CTG CCT - 3', antisense: 5' - ATG TAG GCT ACG CTG TTC TTG – 3' CAG, 387 bp), Colágeno tipo 1 (sense: 5' – GGT TAT GAC TTC AGC TTC CTG CCT – 3', antisense: 5' – ATG TAG GCT ACG CTG TTC TTG CAG, 548 bp), e VEGF (sense: 5' – ACC CTG GCT TTA CTG CTG TAC CTC – 3', antisense: 5' – TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA, 614 bp). Para a realização da reação da cadeia de polimerase, foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, de acordo com o seguinte perfil de amplificação: pré-desnaturação a 94 °C durante 40 segundos, amplificação (desnaturação a 94 °C durante 40 segundos; anelamento a 60 °C durante 40 segundos; extensão a 72 °C durante 1 minuto) durante 30 ciclos, com extensão final a 72 °C durante 10 minutos para todos os primers utilizados. Para detecção dos produtos amplificados, uma alíquota de 13  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose (196 mL de água ultrapura (livre de DNase e RNase), 3,6 gramas de agarose e 4 mL de tampão TAE 50 X), corado com brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 90 volts, por 150 minutos, em uma cuba de eletroforese horizontal, e o cDNA foi visualizado luz ultravioleta em um transiluminador (GE Healthcare - ImageQuant 100). O peso molecular dos produtos da RT-PCR foi determinado pela comparação com marcador de peso molecular conhecido (DNA ladder, 100-1500 bp, Invitrogen). A fotodocumentação dos géis de agarose foi realizada com a utilização de uma máquina fotográfica acoplada ao transiluminador (Olympus SP-500 UZ).

Os resultados foram expressos em relação a expressão de  $\beta$ -actina. As determinações da relação entre TGF- $\beta$ / $\beta$ -actina, Colágeno tipo 1/ $\beta$ -actina e VEGF/ $\beta$ -actina foram realizadas pelas médias das análises densitométricas obtidas através do programa Scion Image.

### 3.8 Determinação da produção de TNF- $\alpha$ , CINC-2 e TGF- $\beta$ do tecido muscular esquelético

O tecido muscular esquelético (EDL) foi coletado, lavado com soro fisiológico (NaCl 0,9%, pH= 7,4) e rapidamente congelado em nitrogênio líquido, e em seguida armazenado a -80°C, para posterior avaliação da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), citocina-induzida quimiotática para neutrófilos (CINC-2) e o fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ). No dia anterior ao experimento as amostras foram homogenizadas com auxílio de um Polytron em solução de 1 mL de PBS juntamente com comprimido contendo inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, em seguida o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Uma placa de 96 poços para cada proteína analisada (TNF- $\alpha$  (4  $\mu$ g), CINC-2 (4  $\mu$ g) e TGF- $\beta$  (kit R&D Systems – TGF- $\beta$ 1 control) foi revestida com anticorpo monoclonal (anticorpo de captura) (50  $\mu$ L por poço), em seguida armazenada a 4°C (geladeira) durante 18 horas. No dia seguinte, a placa foi lavada com solução de lavagem. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L de PBS+BSA 1% em cada poço, e as placas foram mantidas em incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas novamente e adicionado 50  $\mu$ L proteína recombinante diluída em PBS+BSA 1% no primeiro poço nas seguintes concentrações: (TNF- $\alpha$  (4000 pg), CINC-2 (4000 pg) e TGF- $\beta$  (2000 pg/mL, kit R&D Systems – TGF- $\beta$ 1 standard), do segundo poço até o décimo primeiro as concentrações foram diluídas a metade e mantidas incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Após 2 horas, as placas foram lavadas e adicionado 50  $\mu$ L de anticorpo biotilado diluído em PBS+BSA 1% (TNF- $\alpha$  (0,3  $\mu$ g), CINC-2 (0,2  $\mu$ g) e TGF- $\beta$  (kit R&D Systems – TGF- $\beta$  conjugated)) e as placas mantidas em incubação durante 1 hora. Após, as placas foram lavadas e adicionado 50  $\mu$ L do reagente TMB (Sigma, CA, USA) em cada poço e incubadas durante 30 minutos em ambiente livre de luz a temperatura ambiente. Após os 30 minutos, 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi adicionado a cada poço para a paralisação da reação enzimática. A quantificação dos resultados foi feita pela leitura da densidade óptica das amostras usando um espectrofotômetro com absorvância de 450 nm. A concentração do TNF- $\alpha$ , CINC-2 e TGF- $\beta$  foi calculada a partir de uma curva padrão em pg/mL.

### 3.9 Determinação da atividade enzimática de Aspartato Aminotransferase (ALT) e da Alanina Aminotransferase (AST)

A determinação da atividade total das enzimas ALT e AST foi determinada utilizando kits comerciais (ALT/TGP (Liquiform, Labtest); AST/GOT (Liquiform, Labtest), por espectrofotometria (Biosystem – BTS330 photometer). As análises enzimáticas de ALT e AST foram obtidas do plasma do sangue periférico, da seguinte maneira: o conteúdo do reagente 2 foi transferido para o frasco do reagente 1 e homogeneizado suavemente. Em um tubo rotulado calibrador, foi pipetado 1,0 mL de reagente de trabalho (mistura entre o reagente 2 com o reagente 1). Em seguida, o espectrofotômetro foi zerado com água deionizada, foram realizadas 2 leituras do calibrador e a absorbância ajustada para 340 nm. Após esta etapa, 0,1 mL de cada amostra foi adicionada ao reagente de trabalho, homogeneizadas e incubadas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL do reagente 2, homogeneizado e transferido imediatamente para a cubeta. Após 1 minuto, a leitura inicial ( $A_1$ ) foi realizada, e após 2 minutos a absorbância foi registrada ( $A_2$ ). Para o cálculo da concentração enzimática, utilizou-se a seguinte equação:

$$\Delta A/\text{minuto teste} = (A_1 - A_2)/2$$

$$\Delta A/\text{minuto calibrador} = (A_1 - A_2)/2$$

$$\text{Fator} = \frac{\text{Atividade do calibrador}}{\Delta A/\text{minuto calibrador}}$$

$$\Delta A/\text{minuto calibrador}$$

$$\text{AST/ALT (U/L)} = \Delta A/\text{minuto teste}/\text{Fator}$$



### 3.10 Determinação da atividade enzimática de Creatina Quinase (CK)

A determinação da atividade total da enzima CK foi realizada utilizando-se de kit comercial CK-NAC (Liquiform, Labtest) por espectrofotometria (Biosystem – BTS330 photometer). A atividade enzimática de CK foi obtida do plasma do sangue periférico, da seguinte maneira: o reagente de trabalho foi obtido através da transferência do conteúdo do frasco do reagente 2 para o frasco do reagente 1, sendo homogeneizado suavemente em seguida. O calibrador foi obtido através da adição de água tipo II (indicada no rótulo) ao frasco do calibrador, o qual permaneceu em descanso durante 10 minutos, e logo após foi homogeneizado suavemente por inversão. Em seguida, em tubos contendo 1,0 mL do reagente de trabalho, foi adicionado 20 µL de amostra em cada tubo, e em seguida incubadas em banho-maria a 37°C por 2 minutos. O espectrofotômetro foi zerado com água deionizada, calibrado com o auxílio do calibrador, o qual foi submetido a duas leituras. Em seguida as leituras das amostras foram realizadas através do registro da absorbância inicial ( $A_1$ ), e após 2 minutos, o registro da absorbância final ( $A_2$ ). Para o cálculo da atividade enzimática de CK, foi utilizada a seguinte equação:

CCal: concentração do calibrador

$$\Delta A/\text{minuto teste} = (A_2 - A_1)/2$$

$$\Delta A/\text{minuto calibrador} = (A_2 - A_1)/2$$

$$\text{Atividade da CK (U/L)} = \frac{\Delta A/\text{minuto teste}}{\Delta A/\text{minuto calibrador}} \times \text{CCal}$$



### 3.11 Determinação da produção de Proteína C Reativa (PCR)

A produção de PCR foi avaliada por meio do plasma do sangue periférico utilizando-se kit comercial (ACTIVE<sup>®</sup> Proteína C-Reativa-ELISA DSL-10-42100), por espectrofotometria. Primeiramente, em uma placa de 96 poços foram pipetados 10  $\mu$ L dos padrões, controles e amostras respectivamente em cada poço. Em seguida, foi adicionados 200  $\mu$ L de tampão de ensaio, e logo após, a placa foi colocada em um agitador de placas durante 30 minutos. Após este período, a placa foi lavada por 5 vezes com o auxílio de uma lavadora de placas. Após a lavagem, 100  $\mu$ L de solução conjugada diluída com enzima-anticorpo Anti-CRP foi adicionada em cada poço. A placa foi novamente submetida a agitação durante 15 minutos. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes e após a lavagem foi adicionado a cada poço 100  $\mu$ L de cromógeno de TMB (ambiente escuro) e a placa agitada durante 10 minutos (agitador de placas). Em seguida foi adicionado a cada poço 100  $\mu$ L de solução de interrupção. Logo em seguida, a quantificação dos resultados foi feita por meio da comparação das densidades ópticas das amostras e suas respectivas diluições, usando um leitor de placas com absorvância de 450 nm. A concentração de CRP foi calculada a partir de uma curva padrão expressa em ng/mL

### 3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM, e as comparações intergrupos realizados através do teste one-way ANOVA, com correção de Bonferroni. Valores de *P* menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

### 3.13 Soluções

#### 1 - Tampão de diluição L-arginina:

##### 1.1 - Tampão TRIS

- 6,1 gramas de TRIS
- 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- pH= 8.0

#### 2 - Tampão de diluição Aminoguanidina:

##### 2.1 - NaCl 0,9%:

- 0,9 gramas de cloreto de sódio
- 100 ml de água de milliQ
- pH= 7.4

#### 3 - Mieloperoxidase

3.1 - Solução 1: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (12,48 g/L)

3.2 - Solução 2: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11,35 g/L)

3.3 - Solução A: NaPO<sub>4</sub> 0,08 M

3.4 - Solução B (NaPO<sub>4</sub> 0,05M): 125 mL da solução A + 75 mL de água de milliQ

3.5 - Solução C (NaPO<sub>4</sub> 0,02M): 80 mL NaPO<sub>4</sub> 0,05M + 120 mL água de milliQ

##### 3.6 - Tampão 1:

NaCl 0,1M (5,84 g/L) + NaEDTA 0,015M (5,58g/L) de NaPO<sub>4</sub> 0,02M (Solução C)  
(pH=4,7)

**3.7 - Tampão 2:**

1g H-TAB (0,5%)/200 mL NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH=5,4)

**3.8 - Solução 3: NaCl 0,2%**

- 0,02g NaCl + qsp 10 mL água de milliQ

**3.9 - Solução 4:**

- 0,16g NaCl + qsp 10 mL água de milliQ

**3.10 - Solução 5:**

- 0,5g Glicose + qsp 10 mL água de milliQ

**4 - Ensaio imunoenzimático (ELISA)****4.1 - PBS tamponado, pH 7,4 (Solução [10x])**

- Preparar 1000 ml (1litro) com água MilliQ.
- (Armazenar a 4°C por tempo indeterminado)

Quantidade suficiente para 1 litro :

NaCL	0,14M	8,18 g/L	80g
KCl	2,7mM	0,20 g/L	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	(0,20 g/L)	2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM	1,15 g/L de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro; 1,44 g/L de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O ; 2,90 g/L de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	11,5g

#### 4.2 - PBS coating (PBS tamponado [1x]) pH 7,4

- Preparar 500ml com água de Milliq.
- Adicionar 450ml de Água de Milliq em 50ml de solução PBS tamponado [10x]
- (Armazenar a 4°C por até 2 semanas)

#### 4.3 - PBS + Tween 20 0,1% (Wash buffer) pH 7,2

- Preparar 1 litro com água de Milliq (volume da solução dependente do número de placas, para a lavagem de uma placa em todos os procedimentos do Elisa é utilizado um litro da solução Wash buffer);
- Adicionar 900 ml de Água de Milliq em 100 ml de solução PBS tamponado [10x];
- Em seguida adicionar 1000µl Tween 20 para 1 litro de solução e homogeneizar até obter a diluição total (Obs.: pode-se preparar a solução sem a adição do Tween um dia antes do experimento, mas o Tween deve ser adicionado apenas no momento da utilização do wash buffer);
- Ideal não armazenar por um período superior a 2 dias.

#### 4.4 – PBS coating + BSA 1% [SIGMA – 5503]

O volume desta solução será de acordo com o número de poços a serem utilizados durante o experimento.

Ex: para um volume final de 40 ml de PBS coating adiciona-se 0,4g de BSA [Sigma].

#### 4.5 – Streptoavidina

Diluição de 1:2000 em PBS+BSA 1%.

#### 4.6 – TMB

TMB Single Solution - Ready to use - 500 mL (Invitrogen, CA, USA)

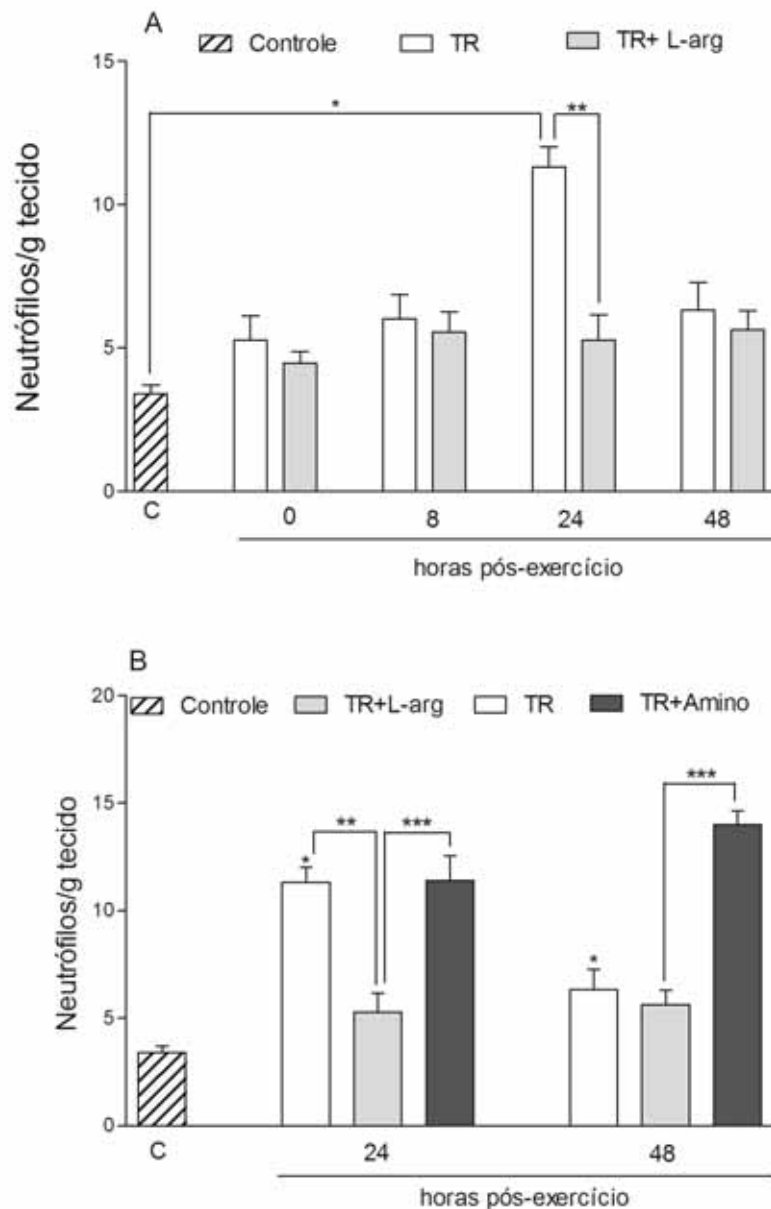
#### 4.7- Ácido Sulfúrico

30 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído em 1 litro de água destilada

## 4 Resultados

### 4.1 Migração de neutrófilos para o tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

A primeira análise a ser realizada em nosso estudo foi avaliar a migração de neutrófilos para o tecido muscular esquelético. Para tanto determinamos a concentração da enzima mieloperoxidase na musculatura esquelética (EDL) dos animais submetidos ao programa orientado de treinamento resistido. Os grupos foram divididos em períodos: 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício. Nossos dados demonstraram que o pico da inflamação ocorreu no período de 24 horas pós-exercício no grupo TR, em comparação aos grupos 0, 8 e 48 horas pós-exercício (Figura 1A). Em relação aos grupos que receberam a suplementação com L-arginina, o recrutamento de neutrófilos não sofreu modificação estatisticamente significativa, exceto no período de 24 horas pós-exercício (TR+L-arg), onde observamos uma grande redução na migração de neutrófilos, quando comparado ao grupo treinado e não suplementado (TR) no mesmo período (Figura 1A). Em relação ao pré-tratamento com aminoguanidina, observamos uma reversão do efeito promovido pela suplementação com L-arginina observado no período de 24 horas pós-exercício, promovendo dessa forma um aumento no recrutamento de neutrófilos para o tecido muscular esquelético. No tempo de 48 horas pós-exercício não observamos migração de neutrófilos no grupo treinado e nem no suplementado com L-arginina, no entanto, animais pré-tratados com aminoguanidina apresentaram um aumento no recrutamento de neutrófilos (Figura 1B).

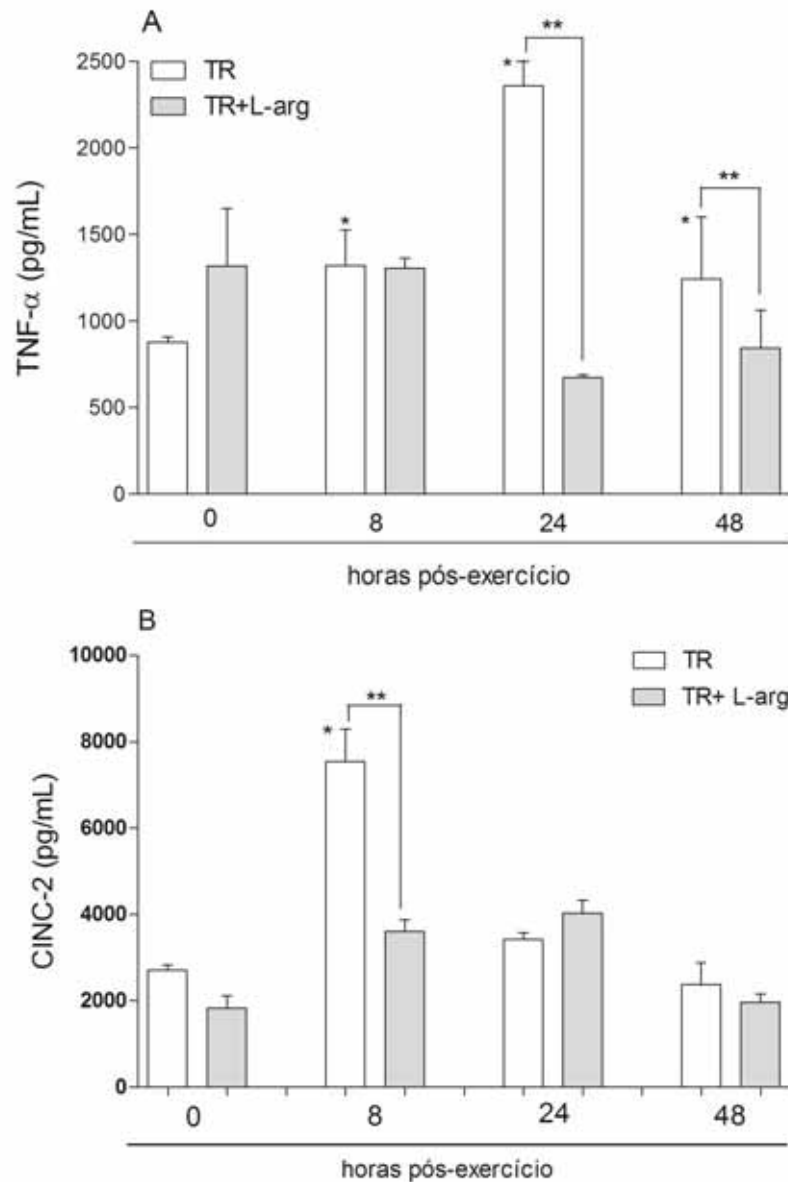


**Gráfico 1** – Recrutamento de neutrófilos para o tecido muscular esquelético (EDL) após sessão de treinamento resistido de alta intensidade. **Painel A:** Os animais foram divididos em 5 grupos: Grupo Controle (C); treinado (TR) e treinado e suplementado (TR+L-arg) com L-arginina (1 g/kg), e avaliados 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício. \* $p < 0,001$  TR vs. C; \*\* $p < 0,001$  TR+L-arg vs. TR (24h). **Painel B:** Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo Controle (C-sedentário); treinado (TR); treinado e suplementado com L-arginina (TR+L-arg) e treinado e pré-tratado com aminoguanidina (50 mg/kg) (TR+Amino), avaliados 24 e 48 horas pós-exercício. \* $p < 0,001$  TR (24 e 48h) vs. C, \*\* $p < 0,001$  TR+L-arg vs. TR (24h), \*\*\* $p < 0,001$  TR+amino (24 e 48h) vs. TR+L-arg. Os resultados foram expressos por média $\pm$ EPM em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

#### **4.2 Produção de TNF- $\alpha$ e CINC-2 no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade**

No sentido de investigarmos a produção de mediadores inflamatórios que induzem migração de neutrófilos para o tecido muscular esquelético após uma sessão de alta intensidade de TR, nós avaliamos a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a citocina-induzida quimiotática para neutrófilos (CINC-2). Observamos que o pico de produção de TNF- $\alpha$  ocorreu no mesmo período de pico da infiltração de neutrófilos (Figura 1A), ou seja, 24 horas pós-exercício no grupo TR (treinado e não suplementado) em relação aos demais grupos. Após a suplementação com L-arginina, observamos uma significativa redução na produção de TNF- $\alpha$  24 horas pós-exercício quando comparado ao grupo TR. No período de 48 horas pós-exercício, novamente, a suplementação com L-arginina foi capaz de diminuir a produção de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo TR. Diferentemente da produção de TNF- $\alpha$ , o pico da produção de CINC-2 ocorreu no período de 8 horas pós-exercício no grupo TR, diminuindo aos níveis controle 24 e 48 pós-exercício (Figura 2B). Observamos uma pequena tendência de diminuição da produção de CINC-2 nos períodos 0 e 48 horas pós-exercício, nos grupos que receberam a suplementação de L-arginina, porém, não significativa (Figura 2B).

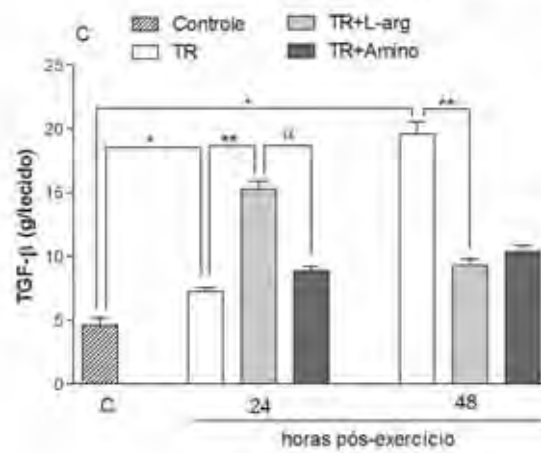
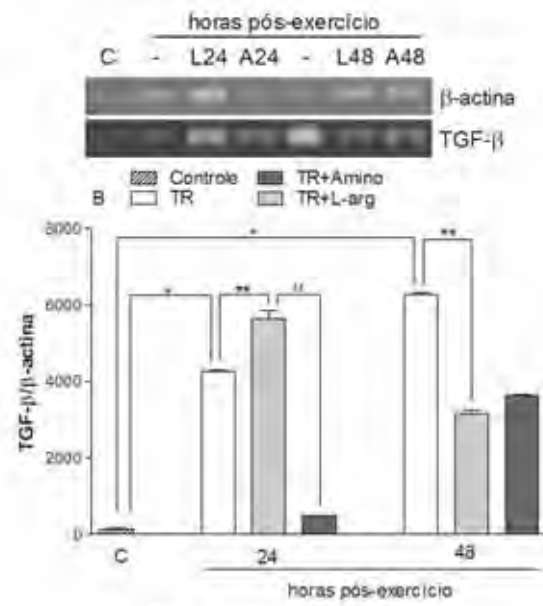
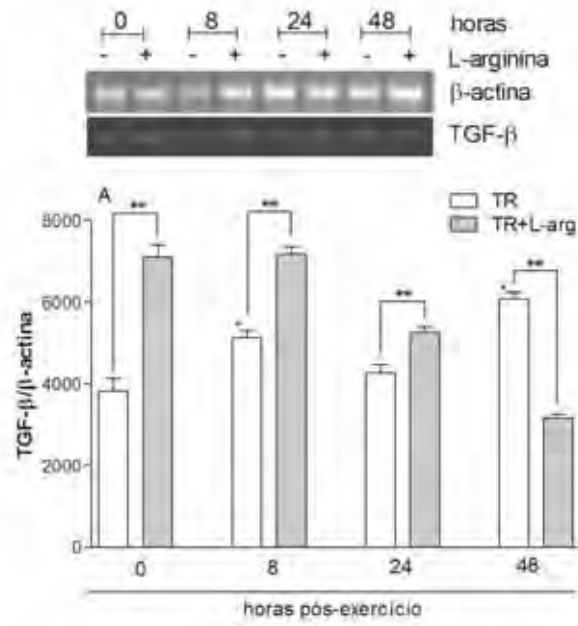




**Gráfico 2** – Produção de TNF- $\alpha$  e CINC-2 no tecido muscular esquelético (EDL) após sessão de treinamento resistido de alta intensidade. **Painel A:** Produção de TNF- $\alpha$  pelo tecido muscular esquelético 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício, com ou sem suplementação de L-arginina (1 g/kg) (TR+L-arg) e treinado (TR). \* $p < 0,001$  TR (24h) vs. TR (0,8 e 48h) e \* $p < 0,05$  (8 e 24h) vs. TR (0h) vs. grupos TR (8,24 e 48 h); \*\* $p < 0,001$  (24 h) e \*\* $p < 0,05$  (48 h) TR+L-arg vs. grupos TR. **Painel B:** Produção de CINC-2 pelo tecido muscular esquelético 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício, com ou sem suplementação de L-arginina (1 g/kg) (TR+L-arg) e treinado (TR). \* $p < 0,05$  TR (8h) vs. TR (0, 24 e 48 h), \*\* $p < 0,01$  TR+L-arg (8h) vs. TR (8 h). Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

### **4.3 Produção e expressão de TGF- $\beta$ (RNAm) no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade**

Nosso próximo passo foi avaliar a influência do TR e da suplementação de L-arginina sobre os fatores regenerativos do tecido muscular esquelético (EDL). Para tanto, o primeiro fator participante da regeneração e reparo tecidual a ser avaliado foi o Fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ). O pico de produção de TGF- $\beta$  ocorreu 48 horas pós-exercício em relação aos grupos TR 0, 8 e 24 horas pós-exercício (Figura 3A). Observamos que a suplementação com L-arginina, promoveu aumento significativo na expressão de TGF- $\beta$  logo após o exercício (0), 8 e 24 horas em relação aos grupos treinados (TR) nos respectivos períodos (Figura 3A). Este aumento observado no período de 0 h pós-exercício foi decaindo de acordo com o tempo. Inversamente ao observado com o grupo suplementado com L-arginina, o pré-tratamento com aminoguanidina foi capaz de diminuir com grande significância a expressão de TGF- $\beta$  no período de 24 horas pós-exercício em relação aos grupos TR+L-arg (Figura 3B/C). Porém, no período de 48 horas pós-exercício, o pré-tratamento com aminoguanidina não promoveu diminuição da expressão de TGF- $\beta$  quando comparado ao grupo suplementado com L-arginina (Figura 3B/C).

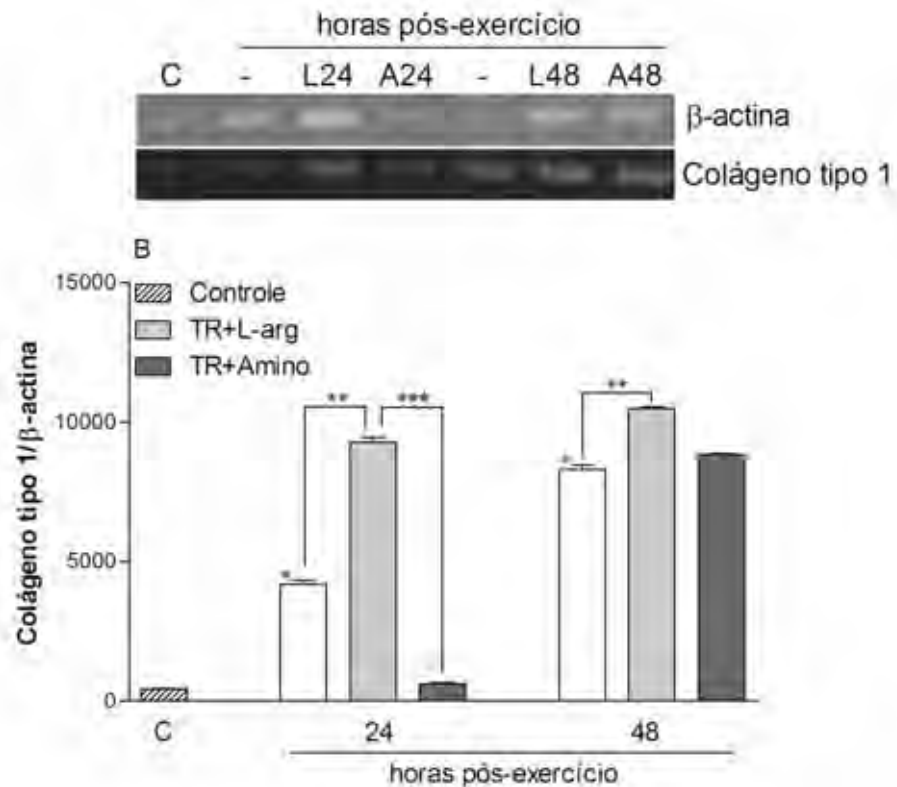
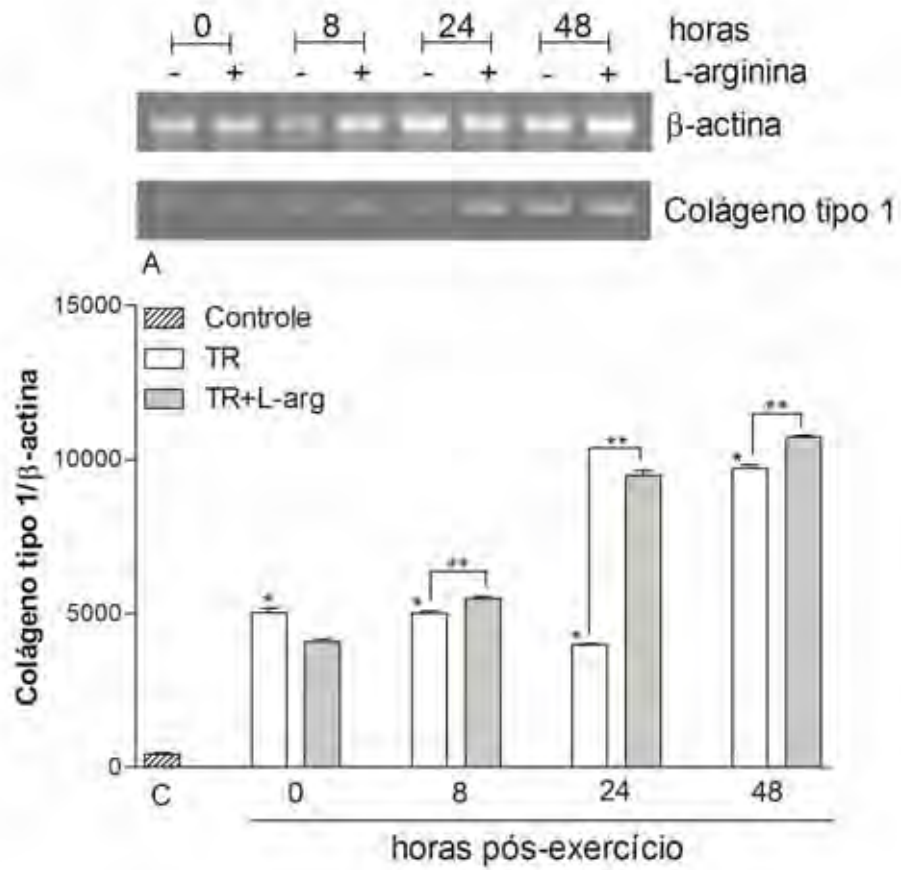


**Figura 3:** Expressão e produção de TGF- $\beta$  no tecido muscular esquelético (EDL) após TR de alta intensidade. **Painel A:** Expressão de TGF- $\beta$  (RNAm) (EDL) nos momentos 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício, em grupos treinados suplementados ou não com L-arginina (1 g/kg) (TR+L-arg ou TR). \* $p < 0,05$  TR (8h) vs. TR (0 e 24h) e \* $p < 0,05$  TR (48h) vs. TR (0,8 e 24h); \*\* $p < 0,01$  (0h) e \*\* $p < 0,05$  (8 e 24h) TR+L-arg vs. TR. **Painel B:** Expressão de TGF- $\beta$  (RNAm) (EDL) 24 e 48 horas pós-exercício, em grupos treinados (TR) suplementados ou não com L-arginina (TR+L-arg) ou aminoguanidina (50 mg/kg) (TR+Amino). A expressão de TGF- $\beta$ / $\beta$ -actina foram determinada pelas médias de análises densitométricas. \* $p < 0,001$  TR vs. C; \*\* $p < 0,05$  (24h) e \*\* $p < 0,01$  (48h) TR+L-arg vs. TR;  $\alpha$   $p < 0,0001$  TR+amino vs. TR+L-arg (24h). **Painel C:** Produção de TGF- $\beta$  (EDL) 24 e 48 horas pós-exercício por ELISA. \* $p < 0,05$  TR vs. C; \*\* $p < 0,01$  (24h) e \*\* $p < 0,001$  (48h) TR+L-arg vs. TR;  $\alpha$   $p < 0,01$  TR+amino vs. TR+L-arg (24 h). Os resultados foram expressos por média $\pm$ EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

#### 4.4 Expressão de Colágeno tipo 1 (RNAm) no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade

Em continuidade com nossas análises sobre a expressão de fatores regenerativos do tecido muscular esquelético, nosso próximo passo foi a avaliação da expressão de Colágeno tipo 1. Por meio dos dados obtidos, nós observamos que o pico de expressão de colágeno (RNAm) ocorreu 48 horas pós-exercício no grupo treinado (TR) quando comparados aos grupos 0, 8 e 24 horas pós-exercício.

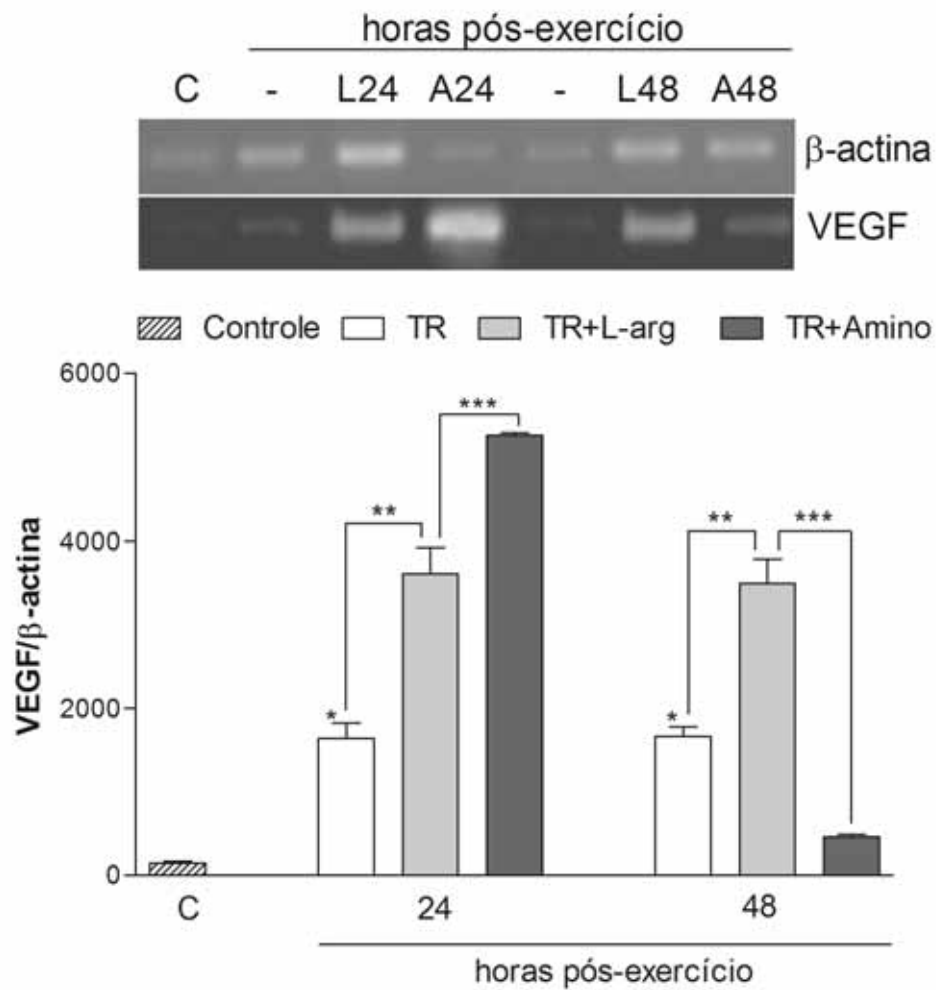
A suplementação com L-arginina, promoveu de forma tempo-dependente, aumento na expressão de colágeno (RNAm) 8, 24 e 48 horas pós-exercício (Figura 4A). Já, o pré-tratamento com aminoguanidina (50 mg/kg), inibiu o efeito promovido pela suplementação de L-arginina diminuindo a expressão de colágeno (RNAm) 24 horas pós-exercício. No entanto, 48 horas pós-exercício, a aminoguanidina não foi capaz de inibir a expressão de colágeno (RNAm) quando comparada ao grupo suplementado com L-arginina (Figura 4B).



**Figura 4:** Expressão de colágeno tipo 1 (RNAm) no tecido muscular esquelético (EDL) após sessão de TR de alta intensidade. **Painel A:** Expressão de colágeno tipo 1 (RNAm) (EDL) 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR) e suplementados ou não com L-arginina (1 g/kg) (TR+L-arg). \* $p < 0,001$  (48h), \* $p < 0,01$  (0 e 8h) e \* $p < 0,05$  (24h) TR vs. C; \*\* $p < 0,001$  (24 h) e  $p < 0,05$  (8 e 48h) TR vs. TR+L-arg. **Painel B:** Expressão de colágeno tipo 1 (RNAm) (EDL) 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR) e suplementado ou não com L-arginina (TR+L-arg) ou aminoguanidina (50 mg/kg) (TR+amino). A expressão de TGF- $\beta$ / $\beta$ -actina foi determinada pelas médias de análises densitométricas. \* $p < 0,001$  (24h) e \* $p < 0,0001$  (48h) TR vs. C; \*\* $p < 0,01$  (24h) e \*\* $p < 0,05$  (48h) TR vs. TR+L-arg; \*\*\* $p < 0,0001$  TR+amino (24h) vs. TR+ L-arg. Os resultados foram expressos por média $\pm$ EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

#### **4.5 Expressão de VEGF (RNAm) no tecido muscular esquelético de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade**

Em continuidade sobre as análises dos fatores regenerativas do tecido muscular esquelético (EDL), nosso próximo passo foi avaliar a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Em relação a expressão de VEGF, observamos uma expressão semelhante 24 e 48 horas pós-exercício nos grupos TR, com significância em relação ao grupo controle (C) (Figura 5). A suplementação com L-arginina foi capaz de aumentar a expressão de VEGF (RNAm) 24 e 48 horas pós-exercício em relação ao grupo TR. No período de 24 horas, o pré-tratamento com a aminoguanidina potencializou a expressão de VEGF quando comparado ao grupo TR suplementado com L-arginina (Figura 5). Já no período de 48 horas pós-exercício, observamos que o pré-tratamento com aminoguanidina diminuiu significativamente a expressão de VEGF (RNAm) quando comparado ao grupo TR suplementado com L-arginina (Figura 5).



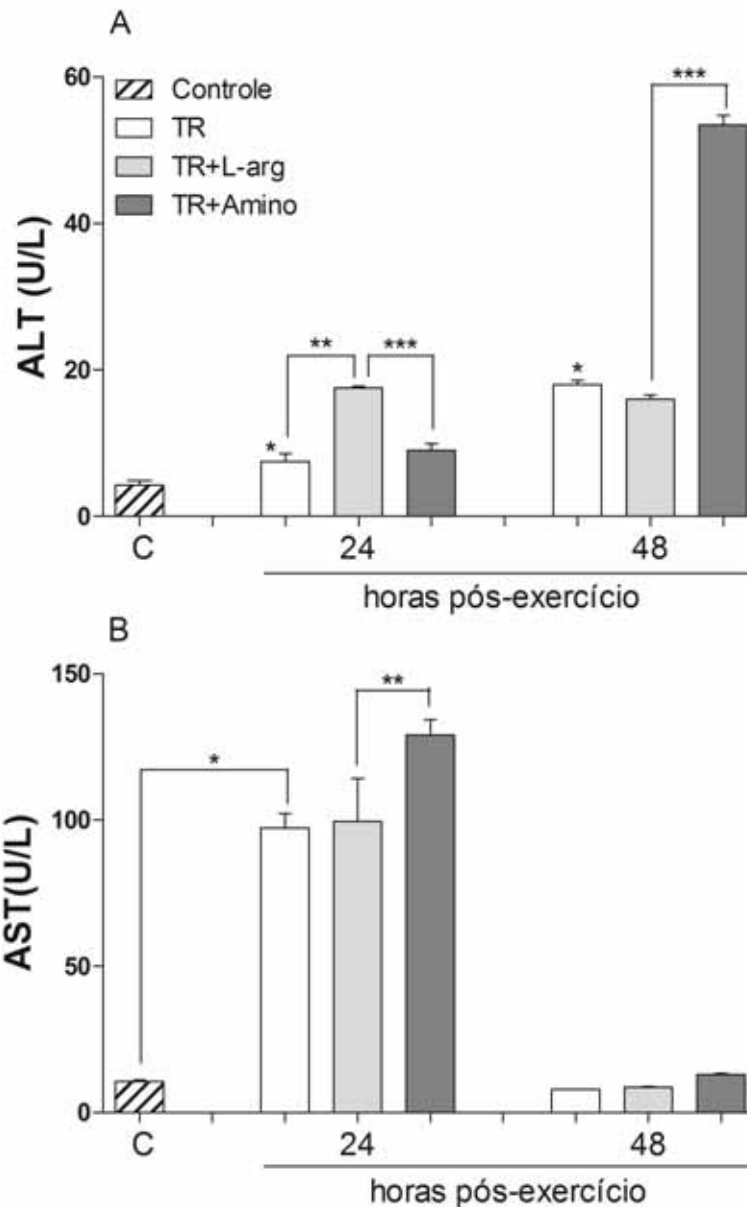
**Gráfico 5** - Expressão de VEGF (RNAm) no tecido muscular esquelético (EDL) após sessão de TR de alta intensidade 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR), e suplementado ou não com L-arginina (1 g/kg) ou aminoguanidina (50 mg/kg). Expressão de VEGF/β-actina nos grupos: Controle (C); (-) não suplementado e treinado (TR); L24 e L48 (treinados e suplementados com L-arginina (TR+L-arg) 24 e 48 horas pós-exercício); A24 e A48 (treinados e suplementados com aminoguanidina 24 e 48 horas pós-exercício). A expressão de VEGF/β-actina foi determinada pelas médias de análises densitométricas. \* $p < 0,001$  TR vs. C; \*\* $p < 0,01$  TR (24 e 48h) vs. TR+L-arg (24 e 48h), \*\*\* $p < 0,5$  (24h) e  $p < 0,001$  (48h) TR+amino vs. TR+L-arg. Os resultados foram expressos por média±EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

#### **4.6 Atividade das enzimas ALT e AST no plasma do sangue periférico de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade**

Com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de L-arginina sobre o tecido hepático e dano muscular, verificamos a atividade enzimática de ALT e AST no plasma do sangue periférico dos animais submetidos ao treinamento proposto. Observamos que os animais treinados liberam a enzima no plasma quando comparados ao grupo sedentário (controle). A suplementação com L-arginina induziu um aumento na liberação da enzima ALT 24 horas pós-exercício mantendo-se 48 horas após. Porém, o pré-tratamento com aminoguanidina promoveu uma diminuição da liberação da enzima ALT 24 h pós-exercício e um aumento 48 horas pós-exercício quando comparada ao grupo TR+L-arg (Figura 6A).

Em relação à atividade enzimática da AST, observamos que a produção foi maior 24 horas pós-exercício diminuindo 48 h após. A suplementação com L-arginina não foi capaz de alterar essa produção. O pré-tratamento com aminoguanidina induziu um ligeiro aumento estatisticamente significativo quando comparada ao grupo TR+L-arg 24 h (Figura 6B).



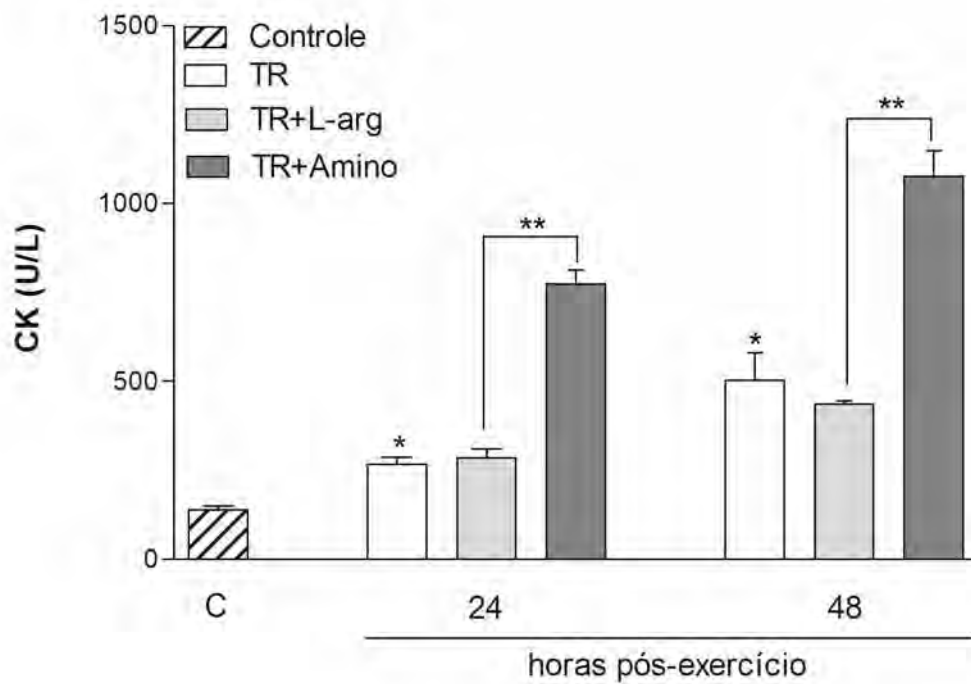


**Gráfico 6** – Atividade enzimática de ALT e AST no plasma do sangue periférico após TR de alta intensidade, 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR), e suplementado ou não com L-arginina (1 g/kg) ou pré-tratados com aminoguanidina (50 mg/kg). **Painel A:** Atividade enzimática da ALT 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR), e suplementado ou não com L-arginina ou aminoguanidina. \* $p < 0,05$  (24h) e \* $p < 0,01$  TR vs. grupo C; \*\* $p < 0,01$  TR+L-arg (24h) vs. TR ; \*\*\* $p < 0,05$  (24h) e \*\*\* $p < 0,0001$  (48h) TR+amino vs. TR+L-arg. **Painel B:** Atividade enzimática da AST no plasma 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR), e suplementado ou não com L-arginina ou pré-tratados com aminoguanidina (50 mg/kg). \* $p < 0,001$  TR vs. C; \*\* $p < 0,05$  TR+amino vs. TR+L-arg (24h). Os resultados foram expressos por média $\pm$ EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

#### **4.7 Atividade enzimática de CK no plasma do sangue periférico de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade**

Nossa próxima etapa foi avaliar a atividade enzimática de CK no plasma do sangue periférico, para analisar de maneira indireta se houve dano muscular e desgaste fisiológico dos animais submetidos à suplementação e ao treinamento proposto.

Por meio dos dados obtidos em nosso estudo, observamos um aumento da atividade de CK 24 horas pós-exercício aumentando 48 horas após. A suplementação com L-arginina não foi capaz de alterar a atividade da enzima em nenhum dos momentos avaliados. No entanto, o pré-tratamento com aminoguanidina, potencializou a atividade de CK tanto 24 e 48 horas pós-exercício (Figura 7).

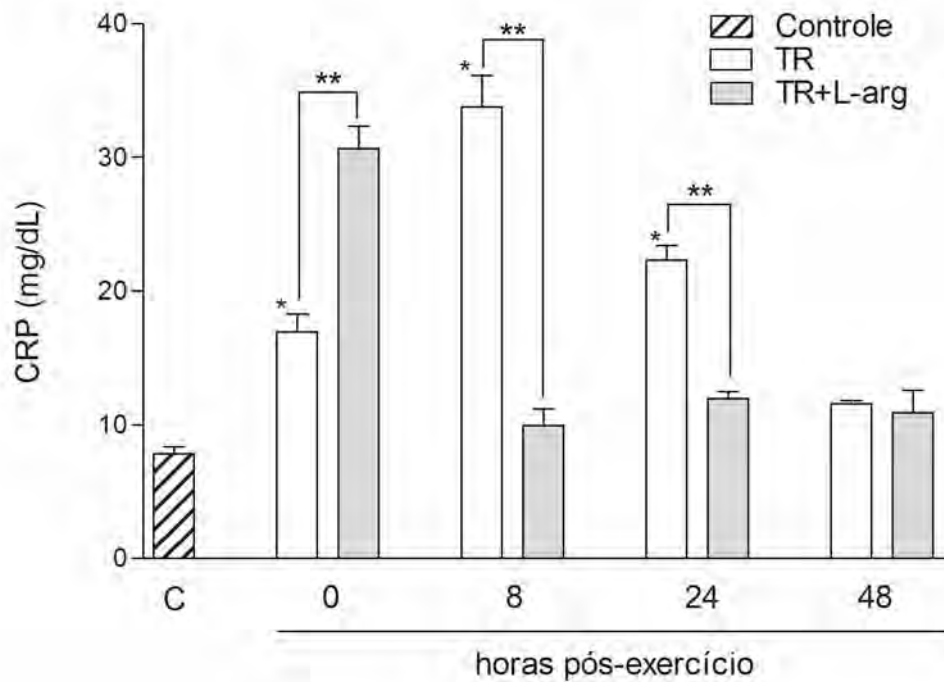


**Gráfico 7** – Atividade enzimática de CK no plasma do sangue periférico após sessão de TR de alta intensidade 24 e 48 horas pós-exercício, em grupo treinado (TR) e suplementado ou não com L-arginina (1g/kg) ou pré-tratados com Aminoguanidina (50 mg/kg). \*  $p < 0,05$  TR vs. C; \*\* $p < 0,001$  (24h) e \*\* $p < 0,0001$  (48h) TR+amino vs. TR+L-arg. Os resultados foram expressos por média  $\pm$  EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

#### **4.8 Atividade da enzima CRP no plasma do sangue periférico de animais submetidos a uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade**

Com o objetivo de avaliar a nível sistêmico, o efeito do treinamento proposto e a suplementação de L-arginina sobre o processo inflamatório decorrente da prática do TR avaliamos a atividade da CRP, uma proteína produzida pelo tecido hepático durante a fase aguda de processos inflamatórios, servindo como um marcador inflamatório.

Nossos dados demonstraram que o treinamento proposto induziu um aumento da atividade de CRP 0, 8 e 24 horas pós-exercício. Observamos que o pico da atividade de CRP ocorreu 8 horas pós-exercício, mesmo período de pico de produção observado em relação à produção de CINC-2. A suplementação com L-arginina, foi capaz de reverter a produção de CRP 8 e 24 horas pós-exercício, mantendo-se 48 horas após (Figura 8). Nos períodos 0 horas, observamos uma potenciação da atividade da enzima reduzindo após 8 e 24 horas após o treinamento (Figura 8).



**Gráfico 8** – Atividade enzimática de CRP por meio da análise do plasma do sangue periférico após sessão de TR de alta intensidade 0, 8, 24 e 48 horas pós-exercício, em grupos treinados (TR) e suplementados ou não com L-arginina (1 g/kg). \* $p < 0,001$  (8h) e \* $p < 0,01$  (0 e 24h) TR vs. C; \*\* $p < 0,001$  (0 e 24h) e \*\* $p < 0,0001$  (8h) TR+L-arg vs. TR. Os resultados foram expressos por média $\pm$ EPM, com 10 animais por grupo em 3 experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada momento (ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de Múltipla Comparação).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que uma simples sessão de exercício resistido de alta intensidade foi capaz de promover aumento da produção de marcadores inflamatórios e interferência direta sobre a modulação dos fatores regenerativos do tecido muscular esquelético sendo revertidos pela suplementação com L-arginina.

Várias evidências têm demonstrado que exercícios exaustivos estimulam a ativação de neutrófilos e conseqüentemente liberação da enzima mieloperoxidase, o qual induz severos danos oxidativos em tecidos por meio de espécies reativas de oxigênio (EROS). Além disso, outros estudos têm demonstrado que os neutrófilos ativados invadem rapidamente as células musculares, causando dano muscular após exercícios extenuantes, induzindo dano tecidual (HUANG et al., 2008).

A migração de neutrófilos avaliada no presente estudo indicou que o pico do processo inflamatório promovido pela prática do E

R ocorreu 24 horas pós-exercício. No estudo de Morozov et al. (2006), o pico de inflamação ocorreu 24 horas após a prática de exercício de alta intensidade, semelhante ao que obtivemos em nosso estudo. Uma importante observação no presente estudo foi que, a suplementação com L-arginina diminuiu a migração de neutrófilos durante o pico da inflamação no tecido muscular esquelético. Para confirmar a ação protetora do óxido nítrico em nosso modelo experimental, animais foram pré-tratados com aminoguanidina, um inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS<sub>i</sub>), e observamos a reversão do efeito protetor do NO promovido pela suplementação de L-arginina. Dados da literatura têm demonstrado que a L-arginina, um substrato para a produção de óxido nítrico (NO), promove a diminuição da transmigração de neutrófilos em pacientes pós-cirúrgicos (YEH et al., 2007). Outra possibilidade sobre o papel protetor da L-arginina foi descrita por Huang et al. (2008), sugerindo que o NO provavelmente desempenha papel protetor agindo como “scavenger” de radicais livres, inibindo a ação das EROS (espécies reativas de oxigênio) sobre o tecido muscular esquelético. Cuzzolin et al. (2000) também demonstrou que a diminuição na produção de NO, promoveu um significativo

aumento na adesão de neutrófilos após a fase aguda da prática de exercício. Existem grandes controvérsias na literatura sobre o efeito dual (protetor ou “vilão”) do óxido nítrico em relação aos processos inflamatórios. Inversamente ao observado em nosso estudo, a inibição da NOSi, seja por meio de inibidores específicos (aminoguanidina), ou estudos realizados com animais NOSi KO, demonstra diminuição do infiltrado e adesão de neutrófilos na ausência de NO (BREITBACH et al., 2001; BECK et al., 2004). Rus et al. (2010) observou em seu estudo que o NO exerce função positiva durante os períodos iniciais pós-inflamatórios, diminuindo a apoptose celular em células hepáticas e, em períodos posteriores (48 horas/ 5 dias) a inflamação, observa-se o efeito contrário ao observado nos períodos iniciais. O NO também exerce função bifásica sobre a via NF- $\kappa$ B, potencializando a mesma nos períodos iniciais pós-inflamação e diminuindo o estímulo durante a resolução do quadro inflamatório (SPEYER et al., 2003). Estudos demonstram que o efeito dual do NO se deve as suas diferentes ações em diferentes tecidos, onde a maioria dos estudos relaciona o efeito do NO sobre células endoteliais e células musculares lisas. Beck et al. (2004) observou diminuição na produção de TNF- $\alpha$  e no infiltrado de neutrófilos no cólon de animais NOSi  $\uparrow$ , e o inverso foi observado em animais controle. Já em relação ao tecido pulmonar, Speyer et al. (2003) observou o oposto, onde animais NOSi  $\uparrow$  demonstraram maior infiltrado de neutrófilos em relação aos animais controle, demonstrando uma grande variação dos efeitos promovidos pelo NO. Comparando os dados de literatura com o nosso estudo, verificamos que a ação do NO é de extrema complexidade e depende de multifatores, especialmente em relação ao tipo de tecido e, tipo e a duração da inflamação. Nosso estudo vem a ser um dos primeiros a analisar a relação do NO sobre o tecido muscular esquelético, sugerindo seu papel protetor, favorecendo a diminuição do infiltrado de neutrófilos no tecido muscular esquelético. Os mecanismos de sinalização ativados pelo NO sobre o tecido muscular inflamado serão objeto de futuros estudos pelo nosso grupo.

O nosso próximo passo foi avaliar a produção de CINC-2. A CINC-2 é um membro da família de quimiocinas CXC, sendo caracterizada como um potente fator quimiotático para neutrófilos (SHIBATA et al., 1995; SHIBATA et al., 1998; NISHINA et al., 2005). Esta quimiocina tem similaridades com a sequência da

família GRO humana e KC e MIP-2 de camundongos (NAKAGAWA et al., 1994). No presente estudo, diferentemente do que foi observado em relação ao recrutamento de neutrófilos e produção de TNF- $\alpha$ , o pico de produção de CINC-2 ocorreu 8 horas pós-exercício no grupo TR, decaindo a produção 48 horas pós-exercício, atingindo os valores do grupo controle. Possivelmente, a produção de CINC-2 possa ser um estímulo inicial para estimular as células musculares residentes a produzirem TNF- $\alpha$  e conseqüentemente induzir o recrutamento de neutrófilos, atingindo o pico de produção 48 horas pós-exercício. Observamos ainda que a suplementação com L-arginina promoveu uma significativa redução na produção de CINC-2, observada 8 horas pós-exercício, possivelmente refletindo na redução do infiltrado de neutrófilos e posteriormente, diminuição da produção de TNF- $\alpha$ . Desouza et al. (2005) observou em seu estudo que, o aumento da infiltração de neutrófilos ocorreu por meio de mecanismos envolvidos com o aumento da produção de CINC-2, e que, simultaneamente, foi observado o aumento da produção de TNF- $\alpha$ , indicando uma possível relação quimiotática entre CINC-2 sobre a produção de TNF- $\alpha$ .

O presente estudo demonstrou um aumento na produção de TNF- $\alpha$  no tecido muscular esquelético 24 horas pós-exercício de alta intensidade (pico). Resultados similares foram observados em outros estudos corroborando com o observado em nosso estudo (NETO et al., 2009; KARAGOUNIS et al., 2010; LIAO et al., 2010). A liberação de TNF- $\alpha$  está relacionada a exercícios exaustivos, promovendo mudanças na demanda metabólica muscular (NETO et al., 2009), induzindo proteólise e promovendo o surgimento de processos inflamatórios por meio da produção de EROS dos neutrófilos aderentes, os quais podem aumentar a ativação das vias NF- $\kappa$ B (grande liberadora de citocinas pró-inflamatórias) e ICAM-1. Esses dados sugerem um possível mecanismo de ação do TNF- $\alpha$  mediando o processo inflamatório (PETERSON et al. 2006; FROST et al., 1997; LAYNE; FARMER, 1999; WILLIAMSON et al., 2005). As contrações excêntricas do tecido muscular esquelético, que são características da prática do TR, têm sido relatadas por induzir expressão de TNF- $\alpha$ , e essa expressão, promove mudanças significativas no quadro inflamatório, induzindo acúmulo de neutrófilos e macrófagos, promovendo a liberação de proteases e miocinas, as quais podem contribuir para o dano muscular (NETO et al., 2009; CASSATELLA,



1999; LUSTER et al., 1999). Em nosso estudo, a produção de TNF- $\alpha$ , foi significativamente diminuída após a suplementação com L-arginina nos períodos de 24 e 48 horas pós-exercício em relação aos grupos TR. Fato semelhante foi observado em outro estudo, onde a suplementação com L-arginina promoveu diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, com especial significância sobre a produção de TNF- $\alpha$  no tecido muscular esquelético (HNIA et al., 2008). Estudos anteriores tem sugerido que a L-arginina promove efeito inibitório total sobre a via NF- $\kappa$ B, e concomitantemente, a inibição da via I $\kappa$ B- $\alpha$  (KABOURIDIS et al., 2002; HNIA et al., 2008), por meio da produção de NO, promovendo uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, CINC-2), podendo ser uma explicação sobre a diminuição de TNF- $\alpha$  observado em nosso estudo. Dessa forma, podemos sugerir que o NO promove diminuição na produção de TNF- $\alpha$  no tecido muscular esquelético.

Com o objetivo de verificar a influência do TR e da suplementação de L-arginina sobre os fatores regenerativos do tecido muscular esquelético, avaliamos a expressão de TGF- $\beta$ , Colágeno tipo 1 e VEGF no tecido muscular esquelético após uma sessão de TR de alta intensidade. Os dados do presente estudo demonstraram que o pico de expressão de TGF- $\beta$  foi observado 48 horas pós-exercício. Esse aumento está relacionado à injúria do tecido muscular esquelético (SMITH et al., 2007; MCLENNAN et al., 1997). Diversos estudos têm demonstrado que o TGF- $\beta$  desempenha um papel dual nos processos regenerativos e inflamatórios do tecido muscular esquelético. Os aspectos negativos envolvem a diminuição da síntese protéica, fibrose, diminuição na diferenciação miogênica e fusão mioblástica (LIU et al., 2001; SMITH et al., 2007). Por outro lado, os aspectos positivos do TGF- $\beta$  relacionam-se com a promoção da síntese de colágeno, proliferação fibroblástica, angiogenese (CANNON; St. PIERRE, 1998; MASSAGUE, 1990; SMITH et al., 2007) e aumento na transcrição de fatores do tecido muscular esquelético (Myogenic regulatory factors – Fatores reguladores de Miogênese (Myod)), aumentando assim a diferenciação miogênica de células satélites, as principais células responsáveis pela regeneração das fibras do tecido muscular esquelético (BHATAGNAR et al., 2010). A suplementação com L-arginina promoveu aumento na expressão de TGF- $\beta$  (0) e 8 horas pós-exercício, decaindo aos

níveis do grupo controle 48 horas pós-exercício. Corroborando com dados do presente estudo, Phillipin et al. (2011), avaliou em seu estudo, a influência do L-NAME (inibidor seletivo da enzima NOS constitutiva) sobre a produção de TGF- $\beta$ , e verificou uma moderada expressão de TGF- $\beta$  pós-trauma, apoiando a idéia de que baixos níveis de NO são capazes de promover a expressão de TGF- $\beta$ . Em nosso estudo, o pré-tratamento com inibidor seletivo da enzima NOSi (aminoguanidina), foi usado, e uma grande redução na expressão e na produção de TGF- $\beta$  foi observada 24 horas pós-exercício, exatamente durante o pico da inflamação, como demonstrado pelo infiltrado de neutrófilos. No entanto, 48 horas pós-exercício, a expressão de TGF- $\beta$  não foi dependente de NO, uma vez que a aminoguanidina não foi capaz de inibir a expressão e produção de TGF- $\beta$ , assim é sugerido que a presença do NO aumenta a expressão de TGF- $\beta$ , porém possivelmente tal expressão possa ser mediada por outro estímulo independente de NO 48 horas pós-exercício. Esta suposição pode ser devido a redução no fluxo sanguíneo, e conseqüentemente, diminuição do aporte protéico e a sinalização de fatores regenerativos do tecido muscular esquelético. O pequeno aumento observado na produção e expressão de TGF- $\beta$  em comparação com o grupo L-arginina 48 horas pós-exercício, pode ser devido a um efeito compensatório causado pelas fibras musculares esqueléticas, para promover um balanço sobre os fatores regenerativos, devido a diminuição da expressão de TGF- $\beta$  observada 24 horas pós-exercício, para que a regeneração de tecido muscular esquelético possa ocorrer de forma correta. Diversos estudos relatam o efeito do NO em diversos tecidos e órgãos, no entanto, o papel do NO na regulação da produção e expressão de TGF- $\beta$  no tecido muscular esquelético após TR de alta intensidade, ainda não foi anteriormente estudado. Por isso, pela primeira vez, o presente estudo elucida o papel da produção de TGF- $\beta$  no tecido muscular esquelético sobre o efeito da prática de TR de alta intensidade.

Em continuação as nossas análises, avaliamos a expressão do Colágeno tipo 1 no tecido muscular esquelético, e observamos que o pico da expressão ocorreu 48 horas pós-exercício. O colágeno é um importante fator na transferência da força das células musculares ao tecido ósseo, participando na composição do tecido muscular e dos tendões (HEINEMEIER et al., 2007). Exercícios de alta intensidade induzem síntese de colágeno tanto no tecido muscular como em tendões, e as contrações excêntricas parecem ser mais

significantes em estimular tal síntese do que as contrações concêntricas (HEINEMEIER et al., 2007). Os dados do presente estudo demonstraram que a expressão de colágeno tipo 1 e TGF- $\beta$  parecem ocorrer inversamente, enquanto nos momentos (0) e 8 horas pós-exercício, há uma forte expressão de TGF- $\beta$ , decaindo 24 e 48 horas pós-exercício, a expressão de colágeno tipo 1 é pequena nos tempos iniciais 0 e 8 horas pós-exercício, mas 24 e 48 horas pós-exercício, observa-se uma grande expressão de colágeno. Por meio dessa observação, é possível considerar que os períodos iniciais de injúria muscular (0 e 8 horas pós-exercício), são os principais períodos de intervalo de sinalização para a produção de colágeno, períodos em que a produção e expressão de TGF- $\beta$  encontra-se elevada. Isso pode ter ocorrido devido a estimulação dos fibroblastos pelo TGF- $\beta$ , promovendo o aumento da expressão de colágeno, ocorrendo durante o pico da inflamação (24 horas pós-exercício). Esse aumento na expressão de colágeno é extremamente importante para a regeneração do tecido muscular esquelético durante o processo de reparo. A atividade contrátil do tecido muscular pode promover mudanças na expressão de enzimas envolvidas no processamento do colágeno, como a lisil oxidase (LOX), a qual facilita o cross-linking do colágeno com as matrizes de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores, os quais regulam a degradação das moléculas de colágeno. No entanto, os mecanismos adaptativos, como também as enzimas relacionadas ao processamento do colágeno, ainda permanecem não totalmente esclarecidas (HEINEMEIER et al., 2007; KAGAN; LI, 2003; VISSE; NAGASE, 2003). A suplementação com L-arginina promoveu um aumento crescente na expressão de colágeno 8, 24 e 48 horas pós-exercício em comparação ao grupo TR. A literatura não relata nenhum estudo avaliando o efeito da L-arginina sobre a regeneração tecidual esquelético durante a prática de TR de alta intensidade. Sugere-se que esse aumento pode ser promovido pela sinalização do TGF- $\beta$ , cuja expressão foi aumentada pela suplementação de L-arginina, favorecendo a produção de NO. Para confirmar nossa hipótese, o pré-tratamento com aminoguanidina induziu grande redução na expressão de colágeno 24 e 48 horas pós-exercício. A partir dos dados do presente estudo, sugere-se que o NO está envolvido no aumento da expressão do colágeno 24 horas pós-exercício. No entanto, o aumento na expressão de colágeno que ocorreu 48 horas pós-exercício, não foi dependente da via do NO. Isso sugere que esse aumento pode

ter ocorrido devido a demanda do processo de regeneração e reparo do tecido muscular esquelético, por meio de outros mecanismos independentes de NO, como observado no TGF- $\beta$ . Estudos estão sendo conduzidos para solucionar essa questão.

A avaliação da expressão de VEGF pelo tecido muscular esquelético foi a próxima análise realizada no presente estudo, a fim de verificar a ligação entre esse fator e a regeneração do tecido muscular esquelético. A angiogênese é caracterizada por várias sequências coordenadas que são necessárias para promover um aumento no número de capilares, e duas vias estão envolvidas, o VEGF e a angiopoietina (PAPETTI; HERMAN, 2002; GAVIN et al., 2007). Dados da literatura têm demonstrado que exercícios de alta intensidade promovem diversas mudanças no tecido muscular esquelético, incluindo, aumento das enzimas oxidativas, aumento no número de capilares ao redor das fibras musculares e aumento da expressão de VEGF e receptores para VEGF, principalmente o receptor VEGFR-2, a principal via de angiogênese (SALTIN et al., 1968; ANDERSEN; HENRIKSSON, 1977; GAVIN et al., 2007). Os dados do presente estudo demonstraram que a expressão de VEGF 24 e 48 horas pós-exercício, nos grupos TR e TR+L-arg, seguem o mesmo padrão na expressão de VEGF. Por outro lado, o pré-tratamento com aminoguanidina potencializou a expressão de VEGF 24 horas pós-exercício, decaindo significativamente 48 horas pós-exercício. Estudos anteriores têm demonstrado que o NO é importante na regulação gênica do VEGF, por meio do aumento da transcrição, aumento do tempo de vida do VEGF e up-regulação do receptor VEGFR-2 (GAVIN et al., 2000; MILKIEWICZ et al., 2005; LLOYD et al., 2001). Uma possível explicação para o aumento da expressão de VEGF observado 24 horas pós-exercício no grupo pré-tratado com aminoguanidina, é provavelmente devido a necessidade do aumento do fluxo sanguíneo para o local da inflamação, sendo o principal efeito da enzima óxido nítrico sintase constitutiva. Por outro lado, 48 horas pós-exercício, uma diminuição na expressão de VEGF foi observada no grupo pré-tratado com aminoguanidina, sugerindo que a expressão de VEGF induzida pelo TR é dependente de NO, possivelmente, a inibição da NOS<sub>i</sub> promove down-regulação da expressão de VEGF (GAVIN et al., 2000; BADR et al., 2003). Outra possibilidade é que o aumento observado 24 horas pós-exercício foi suficiente para suprir o aporte angiogênico do tecido muscular esquelético, diminuindo a

expressão de VEGF 48 horas pós-exercício. Por meio dos dados obtidos em nosso estudo, observamos que o NO demonstrou efeito dual. Estudos prévios observaram o mesmo efeito, porém em tecidos diferentes, nos tecidos pulmonar e intestinal (BECK et al., 2004; SPEYER et al., 2003), demonstrando uma possível relação tempo-dependente da resposta inflamatória sobre o efeito benéfico ou deletério do NO na expressão de VEGF.

Nosso próximo passo foi analisar os biomarcadores séricos de dano muscular e hepático após o TR, o efeito da suplementação com L-arginina e o pré-tratamento com aminoguanidina. Para tanto avaliamos a atividade das enzimas ALT, AST, CK, e a produção da CRP. Diversos estudos relatam que exercícios de alta intensidade (exaustivos), promovem aumento na concentração plasmática de ALT, AST e CK (ANTUNES-NETO et al., 2006; BOWERS et al., 1978; HONG; LIEN, 1984, HUANG et al., 2009). Em nosso estudo, observamos um aumento na atividade enzimática de ALT e AST 24 horas pós-exercício, corroborando com a literatura. No presente estudo a suplementação com L-arginina foi capaz de potencializar a atividade enzimática da ALT 24 horas pós-exercício. Em relação à atividade enzimática de ALT, Huang et al. (2009), observaram em seu estudo, que a suplementação com L-arginina foi capaz de diminuir a produção de ALT, o oposto observado em nosso estudo. Uma possível explicação para o aumento da atividade enzimática da ALT (24h) observada deve-se aos diferentes protocolos experimentais utilizados. No presente estudo, os animais foram submetidos a exercício anaeróbio (TR), Huang et al. (2009) submeteu os animais em seu estudo a prática de exercício aeróbio (treadmill), sendo que os diferentes tipo de exercícios desencadeiam diferentes respostas metabólicas, podendo de tal forma, interferir sobre o efeito da suplementação com L-arginina e sobre a atividade enzimática da ALT. Observamos que a inibição do NO durante o período de 24 horas não promoveu nenhuma mudança na atividade enzimática de ALT, no entanto, 48 horas pós-exercício, a inibição do NO potencializou de maneira significativa a atividade enzimática de ALT. Sugerimos que o NO exerce efeito dual sobre a produção de ALT, promovendo mudanças ou não na atividade enzimática, as quais mostraram-se dependentes do período avaliado após o estímulo inflamatório.

Observamos em nosso estudo que a suplementação com L-arginina não promoveu mudança na atividade enzimática da AST (24 e 48h), no entanto,

Huang et al. (2008), observou por meio de seu estudo, que a suplementação com L-arginina foi capaz de diminuir a atividade enzimática de AST. Uma possível explicação para os resultados controversos observados entre os estudos deve-se ao fato da diferença entre os protocolos experimentais, e a faixa etária dos animais. Em nosso estudo, utilizamos ratos jovens, os quais receberam suplementação com L-arginina (1 g/kg) via gavagem e submetidos a prática de treinamento resistido de alta intensidade (anaeróbio), já, no estudo de Huang et al. (2008), foram utilizados ratos senis, os quais receberam suplementação com L-arginina por meio de ração (*ad libitum*) e submetidos a treinamento aeróbio (treadmil). Sugerimos que as diferenças entre os meios de administração de L-arginina possam interferir diretamente na concentração e no efeito promovido (produção de NO) em cada animal, juntamente com os diferentes efeitos promovidos pelos diferentes tipos de exercícios utilizados nos estudos, possa ser um fator responsável pelas diferenças nos dois estudos. Apesar do NO não ser capaz de diminuir a atividade enzimática da AST, conforme observado na atividade da ALT, verificamos que sua inibição (pré-tratamento com aminoguanidina), potencializa a atividade enzimática da AST, sugerindo o envolvimento do NO sobre a modulação desta enzima, pelo menos no período 48 pós-exercício. Os mecanismos envolvidos na modulação da produção de ALT e AST ainda não estão claramente compreendidos, estudos futuros serão necessários para solucionar as questões remanescentes do presente estudo.

A atividade da enzima CK, a qual é amplamente utilizada no meio esportivo, indica de maneira indireta o dano tecidual muscular pós-exercício, possibilitando a obtenção da função e do estado do tecido muscular esquelético (CLARKSON; HBALL, 2002; NOSAKA et al., 2002; BARQUILHA et al., 2009), Os níveis séricos de CK encontram-se aumentados em situações de atividades físicas prolongadas ou exercícios que envolvam contrações excêntricas, onde tais ações levam ao dano tecidual muscular por meio da degeneração do sarcômero e fragmentação da Linha Z (FINK; LUTTGAW, 1976; FINK et al., 1983; PONRAJ; GOPALAKRINSHNAKONE, 1996; LOPES-FERREIRA et al., 2001). Os dados obtidos por meio de nosso estudo demonstraram que o pico da atividade enzimática de CK ocorreu 48 horas pós-exercício, corroborando com a literatura, a qual demonstra que o pico de CK é encontrado geralmente 48 horas



após a atividade física de extremo esforço (UCHIDA et al., 2009; BRANCACCIO et al., 2006; BRUUNSGAARD et al, 1997; BARQUILHA et al, 2009). Em relação à suplementação com L-arginina, observamos que a mesma não foi capaz de diminuir a atividade enzimática de CK em ambos os períodos, diferentemente do observado por Huang et al. (2009), onde em seu estudo, a suplementação com L-arginina promoveu diminuição da atividade dessa enzima após exercício extenuante (aeróbio). Uma possível explicação para a diferença encontrada em relação aos dois estudos pode ser a diferença na metodologia, em relação ao tipo de exercício utilizado. No estudo de Huang et al. (2009), os animais foram submetidos a exercício aeróbio de alta intensidade, já em nosso estudo, os animais foram submetidos a exercício anaeróbico (ER) de alta intensidade. Ambos os exercícios possuem características e respostas metabólicas distintas, as quais, possivelmente, possam influenciar de maneira preponderante sobre o efeito da suplementação de L-arginina em relação a atividade enzimática de CK. A inibição do NO, por meio do pré-tratamento com aminoguanidina foi capaz de potencializar a atividade enzimática de CK (24 e 48 h pós-exercício), corroborando com o estudo de Huang et al. (2009). O dano tecidual muscular está relacionado com o estado de isquemia seguido pela reperusão, e em seguida, afluxo de radicais livres no tecido muscular esquelético, participantes do dano tecidual muscular. Estudos relatam que o NO desempenha papel protetor no tecido muscular, agindo como “scavenger” de radicais livres (HUANG et al., 2008). Portanto, sugerimos que o aumento da atividade da CK observado nos grupos pré-tratados com aminoguanidina indica um maior dano tecidual muscular nestes grupos, possivelmente, devido a ausência do efeito protetor do NO (scavenger) sobre os radicais livres. Nossos dados sugerem que o NO participa da modulação da atividade da CK, porém, verifica-se por meio da literatura, falta de estudos relacionando a suplementação com L-arginina juntamente a prática de treinamento resistido e os efeitos dessa combinação sobre a atividade enzimática de CK. Nossos dados sugerem que o NO participa da modulação da atividade enzimática de CK, porém, os mecanismos responsáveis por tal modulação não estão totalmente esclarecidos. Estudos estão sendo desenvolvidos para responder a questão presente em nosso estudo.

A CRP é uma proteína sintetizada pelos hepatócitos em resposta a citocinas liberadas na circulação pela atividade dos leucócitos durante o

processo inflamatório (TIETZ, 1995). A CRP encontra-se em pequena quantidade no sangue em situações normais de homeostasia, onde sua concentração pode aumentar de 100 a 1000 vezes durante a fase aguda do processo inflamatório, situação essa observada no tecido muscular esquelético após exercícios de alta intensidade (TR), sendo um sensível indicativo do desempenho do sistema imunológico frente ao quadro inflamatório (Haidari et al. 2001, Pepys et al 1983). Diversos estudos relatam o benefício da atividade física sobre a atividade de CRP (CHEYNE et al., 2010; BELLOTO et al., 2010; MARTINS et al., 2010). Estudos elucidam que a prática contínua de treinamento resistido promove diminuição na atividade de CRP (CHEYNE et al., 2010; BELLOTO et al. 2010), e que essa diminuição é dependente do tipo e intensidade do exercício proposto, porém, há controvérsias sobre os estudos reportados pela literatura (LEVINGER et al., 2009). Nossos dados demonstraram que no período (0h), a suplementação com L-arginina potencializou a atividade de CK, enquanto que nos períodos 8 (pico de produção) e 24 horas pós-exercício, a suplementação diminuiu significativamente a atividade de CK. É sugerido que tal efeito dual observado em nosso estudo, esteja relacionado com a produção de citocinas pró-inflamatórias. De acordo com a literatura (TIETZ, 1995), as citocinas são estímulos para a produção de CRP, e em nosso estudo, observamos que a suplementação com L-arginina foi capaz de diminuir significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  (24h), CINC-2 (8h) e infiltração de neutrófilos (24h)) em momentos respectivos à diminuição da produção de CRP (8 e 24 horas pós-exercício), sugerindo que a diminuição destas citocinas pró-inflamatórias, possam promover a diminuição do estímulo para a produção de CRP. Não há estudos direcionados a avaliar o efeito da suplementação de L-arginina sobre a produção de CRP promovida pela prática de TR, dessa forma, nosso estudo é o primeiro a analisar a atividade de CRP sobre tais condições no tecido muscular esquelético.

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a suplementação com L-arginina desempenhou papel protetor sobre o tecido muscular esquelético, sendo capaz de reduzir a inflamação, por meio da diminuição dos mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , CINC-2) liberados após sessão de treinamento resistido de alta intensidade, diminuição de biomarcadores de estresse metabólico (CRP) e aumento na síntese de fatores regenerativos do tecido



muscular esquelético (TGF- $\beta$ , Colágeno tipo 1 e VEGF). Esse efeito protetor deve-se em partes a presença do NO, no entanto, existem outros mecanismos envolvidos que será objeto de futuros estudos por nosso grupo.

O uso de suplementação com L-arginina tem sido utilizado no meio esportivo, dessa forma, vem sendo analisado em diversas pesquisas, as quais demonstram benefícios como o aumento da expressão de GH e aumento do aporte sanguíneo, fatores que podem auxiliar no ganho de massa muscular e conseqüentemente, ganho de força e melhora na performance. Porém, o efeito da suplementação com L-arginina sobre os efeitos decorrentes da prática do TR sobre o sistema imunológico, ainda encontram-se incompreendidos, dessa forma, nosso trabalho está sendo o pioneiro em desvendar os mecanismos envolvidos nessa relação.

---

## 6 Conclusões

Acreditamos que a suplementação com L-arginina seja administrada da mesma maneira ao método atualmente utilizado em relação ao uso da creatina, com período de saturação e manutenção, e com pausas entre os ciclos, e não de maneira contínua.

O que deixamos como mensagem principal em nosso trabalho é que, na prática, a suplementação com L-arginina pode promover uma diminuição do impacto inflamatório sobre o tecido muscular esquelético pós-exercício e induzir aumento da síntese de fatores regenerativos musculares, promovendo diminuição no período de reparo, onde, atletas poderão ser submetidos a novos estímulos fisiológicos em menores intervalos de tempo, possibilitando assim, melhorias sobre diversos aspectos fisiológicos.

ABDEL-ZAHER, A. O. et al. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. **Toxicology**, v. 234, p. 124–134, May 2007.

ACSM – American College Of Sports Medicine. Position Stand: te recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardio respiratory and muscular fitness, and flexibility in health adults. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 30, n. 6, p. 992-1008, 1998.

ACSM – American College Of Sports Medicine. Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults. **Med. Sci. Sports.**, v. 34, n. 2, p.364-80.  
ANDERSEN, P.; HENRIKSSON, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. **J Physiol**, v. 270, p. 677–690, 1977.

ANGELI, A. et al. The overtraining syndrome in athletes: a stress-related disorder. **J Endocrinol Invest**, v. 27, p. 603-12. Jun. 2004.

ANTUNES-NETO, J. M. et al. Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. **Stress**, v. 9, p. 107-115, Jun. 2006.

ASHTON, T. et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. **Soc Sci Med**, v. 46(3), p. 357-67, Feb. 1998.

BADR I. et al. Differences in local environment determine the site of physiological angiogenesis in rat skeletal muscle. *Exp Physiol*, v. 88(5), p. 565-8, 2003.

BARQUILHA, G. et al. Treinamento crônico de força em atletas profissionais de hockey in line: estudo da lesão, inflamação e força. **Revista de Educação Física**. In: 13º simpósio internacional de atividades físicas do rio de janeiro, Rio de Janeiro, v. 147, p. 77-77, 2009.

BECK BREITBACH, K.; WONGPROMPITAK P.; STEINMETZ I. Distinct roles for nitric oxide in resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice to control *Burkholderia pseudomallei* infection. **BMC Immunology**, v. 16, p.12:20, Mar. 2011.

BECK, P. L. et al. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 286(1), p. G137-47, Jan. 2004.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. E.; SORKIN, E. Immune-neuroendocrine interactions. **J Immunol**, v. 135, p. 750s-4s, Aug. 1985.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. **Front Neuroendocrinol**, v. 13, p. 61-94, Jan. 1992.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr Rev**, v.17, p. 64-102. Feb. 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Introduction: immune-neuroendocrine network. **Front Horm Res**, v. 29, p. 1-14. 2002.

BHATNAGAR, S. et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ -activated Kinase 1 Is an Essential Regulator of Myogenic Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 285, nº. 9, p. 6401–6411, Feb. 2010.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunol Today**, v. 15, p. 504-11. Nov. 1994.

BOWERS, W. D. Jr et al. Alterations of rat liver subsequent to heat overload. **Arch Pathol Lab Med**, v. 102, p. 154–157. Mar. 1978.

BRANCACCIO, P. et al. Monitoring of serum enzymes in sport. **Br J Sports Med**, v. 40, p. 96–97, Feb. 2006.

BRUUNSGAARD, H. et al. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **J Physiol**. n.15, p.833–841, Mar.1997.

CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Effects of resistance training on the inflammatory response. **Nutrition Research and Practice**, v. (4), p. 259-269, Aug. 2010.

CANNON, J. G. et al. Increased interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise. **Am J Physiol**, v. 257, p. R451–R455, Aug. 1989.

CANNON, J. G.; St. PIERRE, B. A. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. **Mol Cell Biochem**, v. 179, p. 159–167, Feb. 1998.

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol**, v. 73, p. 369-509, 1999.

CHEYNE, E. D.; DUFFIELD, R.; DRINKWATER, J. Effects of resistance or aerobic training on Interleukin-6, C-Reactive Protein, and body composition. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, p. 304-313, 2010.

CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induce Muscle Damage in Humans. **Am J Phys Rehabil**, v. 81, p. 52-69, Nov. 2002.

COSTA, M. T. **Estudo dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutâneo em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Araçatuba – SP. 2005.

**CRÔNICA DO ENXERTO.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – MG – 2008.

CUZZOLIN, L. et al. Influence on acute exercise on neutrophil and platelet adhesion , nitric oxide plasma metabolites in inactive and active subjects. **Int. J. Sports Med**, v. 21, p. 289-293, May. 2000.

DESOUZA, I. A. et al. Inflammatory mechanisms underlying the rat pulmonary neutrophil influx induced by airway exposure to staphylococcal enterotoxin type A. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, p. 781–791, Sep. 2005.

EVANS, W. J. Functional and Metabolic Consequences of Sarcopenia. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n.5, p. 46-7; 51-3, 1996.

EWART, C. K. Psychological effects of resistive weight training: implication for cardiac patients. *Med Sci Sports Exerc*, v. 21, p. 683-8, 1989.

FAGANELLO, F. R. **Ação do ultra-som terapêutico no processo de regeneração do músculo esquelético.** 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biodinâmica da Motricidade Humana) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

FILLIPIN, L. I. et al. The Role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. **Inflamm Res**, v. 60, p. 347-356, Apr. 2011.

FINK, R. et al. The effect of cellular energy reserves and internal calcium ions on the potassium conductance in skeletal muscle of the frog. *J Physiol*, v. 336, p. 211–228, 1983.

FINK, R.; LUTTGAU, H. C. An evaluation of the membrane constants and the potassium conductance in metabolically exhausted muscle fibres. **J Physiol**, v. 263, p. 215–238, 1976.

FLECK, S. J.; KRAEMER, W. J. **Designing Resistance Training Programs**. 2 ed. Champaign: Human Kinetics, 1997. 275 páginas.

FLUCKEY, J. D. et al. Effects of resistance exercise on glucose tolerance in normal and glucose-intolerant subjects. **J Appl Physiol**, v. 77, p. 1087-92, 1994.

FRANKIEWICZ-JOZKO, A.; FAFF, J.; SIERADZAN-GABELSKA, B. Changes in concentrations of issue free radicals marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 74(5), p. 470-4. 1996.

FROST, R. A.; LANG, C. H.; GELATO, M. C. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. **Endocrinology**, v. 138, p. 4153-4159, Oct. 1997.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. the obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288, p. 373-376, 1980.

GARCIA, C. et al. Effect of dexamethasone on neutrophil metabolism. **Cell Biochem Funct**, v. 21, p. 105-11, Jun. 2003.

GAVIN, T. P. et a. Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. **Acta Physiol**, v. 191, p. 139–146, 2007.

GAVIN, T. P. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. **J Appl Physiol**, v. 88(4), p. 1192-8. Apr. 2000.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **J Appl Physiol**, v. 103(2), p. 693-9. Aug. 2007.

GLEESON, M. Interleukins and exercise. **J Physiol**, v. 529 Pt 1:1, Nov. 2000.

GOLDBERG, A. P. Aerobic and resistive exercise modify risk factors for CHD. **Med Sci Sports Exerc**, v. 21, p. 669-74, 1989.

GOLDBERG, L. D. L. et al. Changes in Lipid and lipoprotein levels after weight training. **JAMA**, v. 252, p. 504-6, 1984.

GOMES, A. C.; TEIXEIRA, M. Aspectos da preparação física no voleibol de alto rendimento. **Treinamento Desportivo**, v. 3, n.2, p. 105-111, 1998.

GOMEZ-CABRERA, M. C. et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **J. Physiol**, v. 567, p.113–120, Aug. 2005.

GUTIN, B.; KASPER, M. J. Can exercise play a role in osteoporosis prevention? A review. **Osteoporosis Int**, v. 2, p. 55-69, 1992.

HAIDARI, M. et al. Evaluation of C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, as a risk factor for stable coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 309–315, Jun. 2001.

HAMES, B.; GLOVER D. **Molecular Immunology, in frontiers in molecular biology**. 2<sup>a</sup> ed. USA: Oxford University Press, 1996. 408 p.

HARMAN, E. The biomechanics of resistance exercise. In: Baechle TR. 2<sup>nd</sup> ed. Earle RW editors. **Essential of strength training and conditioning**. Champaign, IL: Human Kinetics; 2000.

HEINEMEIER, K. M. et al. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **J Physiol**, v. 582 (Pt 3), p. 1303-16. Aug. 2007.



HNIA, K. et al. L-Arginine Decreases Inflammation and Modulates the Nuclear Factor-kappa $\beta$ /Matrix Metalloproteinase Cascade in Mdx Muscle Fibers. **The American Journal of Pathology**, v. 172, p. 1509-19, Jun. 2008.

HONG, C.Z. and Lien, I.N. Metabolic effects of exhaustive training of athletes. **Arch. Phys. Med. Rehabil**, v.65, p. 362-365, Jul. 1984.

HORNBERGER, T. A. J.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Can. J. Appl. Physiol**, v. 29(1), p. 16-31, 2004.

HUANG, C. C. et al. Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. **Chin J Physiol**, v. 52(5), p. 306-15, Oct. 2009.

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(6), p. 571-7, Mar 2008.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, v. 61, n. 6, p. 866-879, 1987.

IZQUIERDO M. et al. Cytokine and hormone responses to resistance training. **Eur J Appl Physiol**, v. 107(4), p. 397-409, Nov. 2009.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. 59, n° 4, p. 533-547, 1995.

Jl, LL et al.. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effect of fiber type and exercise intensity. **J Appl Physiol**, v. 73, p. 1854-1859. Nov. 1992.

Jl, LL.; FU, R. Response of Glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J Appl Physiol**, v. 72, p. 549-554, Feb. 1992.

JONSDOTTIR, I. H. Exercise immunology: neuroendocrine regulation of NK-cells. **Int J Sports Med**, v. 21(Suppl 1), p.S20-3. May 2000.

KABOURIDIS, S. P. et al. Inhibition of NFkappa B activity by a membrane-transducing mutant of I kappa B alpha. **J Immunol**, v. 169, p. 2587–2593, Sep. 2002.

KAGAN, H. M.; LI, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. **J Cell Biochem**, v. 88, p. 660–672. Mar. 2003.

KARAGOUNIS, L. G. et al. Contraction-induced changes in TNF- $\alpha$  and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 109, p. 839–848, Jul. 2010.

KATCH, F. I.; DRUM, S. S. Effects of diferente models of strength training on body composition and antropometry. **Clin Sports Med**, v. 4, p. 413-59, 1986.

LAGRANHA, C. J. et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, p. 210-7, 2004.

LAYNE, J. E.; NELSON, M. E. The effect of progressive resistance training on bone density: a review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, p. 25-30, 1999.

LAYNE, M. D.; FARMER, S. R. Tumor necrosis factor-alpha and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts. **Exp Cell Res**, v. 249, p. 177-187, May 1999.

LEANDRO, C. G. et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte** – Vol. 13, p. 343 – 348, Set/Out. 2007.

LEVINGER, I. et al. Inflammation, hepatic enzymes and resistance training in individuals with metabolic risk factors. **Diabetic Medicine**, v. 26, p. 220–227. Mar. 2009.

LIAO, P. et al. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Am J Physiol Integr Comp Physiol**, v. 298, p. R599-R607, Mar. 2010.

LIN, Y. S.; JAN, M. S.; CHEN, H. I. The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. **Int J Sports Med**, v.14, p. 86-92. Feb. 1993.

LIU, D.; BLACK, B. L.; DERYNCK, R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. **Genes Dev**, v. 15, p. 2950–2966. Nov. 2001.

LLOYD, P. G.; YANG, H. T.; TERJUNG, R. L. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281(6), p. H2528-38, Dec. 2001.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of thalassophryne nattereri (niquim) fish venom in mice. **Int J Pathol**, v. 82, p. 55–64, 2001.

LUSTER, M. I. et al. Tumor necrosis fator alpha and toxicology. **Crit Ver Toxicol**, v. 29, p. 491-511, 1999.

MAIOR, A. L. **Fisiologia dos exercícios resistidos**. 1 ed. São Paulo: Phorte, 2008. 191 páginas.

MARTINS, R. A. The effect of aerobic versus strength-based training on high-sensitivity C-reactive protein in older adults. **Eur J Appl Physiol**, v. 110(1), p.161-9, Apr. 2010.

MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, v. 6, p. 597–641, 1990.

MCLENNAN, I. S.; KOISHI, K. Cellular localisation of transforming growth factor-beta 2 and beta 3 (TGF-beta2, TGF-beta3) in damaged and regenerating skeletal muscles. **Dev Dyn**, v. 208, p. 278–289, Feb. 1997.

MILKIEWICZ, M. et al. Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289(1), p. H336-43, 2005.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2495-2501, 1988.

MOROZOV, V. I. et al. The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. **Eur. J. Appl. Physiol**, v. 97, p. 716–722, Aug. 2006.

NAKAGAWA, H. et al. Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2 alpha and CINC-2 beta, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. **Biochem J**, v. 301(Pt 2), p. 545–550, Jul.1994.

NETO, J. C. R. et al. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 106, p. 697–704, Jul. 2009.

---

NEUMAN, G. La struttura della prestazione negli sport di resistenza. **Revista di Cultura Sportiva**, v. 20, p. 66-72, 1990.

NIELSEN, A. R.; PEDERSEN, B. K. The Biological roles of exercise induced cytokines: IL-6, IL-8 and IL-15. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32(5), p. 833-9, Oct. 2007.

NIELSEN, S.; PEDERSEN, B. K. Skeletal muscle is as an immunogenic organ. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, p. 346-351, Jun. 2008.

NIEMAN, D. C. et al. Cytokine changes after a marathon race. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 109–114, Jul. 2001.

NIESS, A. M. et al. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 38, p. 111-5, Jun. 1998.

NISHINA, K. et al. Expression of CINC-2beta Is Related to the State of Differentiation of Alveolar Epithelial Cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 33, p. 505–512, Nov. 2005.

NOSAKA, K.; NEWTON, M.; SACCO, P. Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 12, p. 337–346, Dec. 2002.

OHISHI, S. et al. The effect of exhaustive exercise on the antioxidant enzyme system in skeletal muscle from calcium-deficient rats. **Pflugers Arch**, v. 435(6), p.767-74, May 1998.

OSTROWSKI, K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J. Physiol**, v.515, p. 287 – 291, Feb 1999.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, p. C947–C970, May 2002.

PEDERSEN B. K.; FEBRARIO M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, p. 1379-406, Oct. 2008.

PEDERSEN, B. K. et al. Modulation of natural killer cell activity in peripheral blood by physical exercise. **Scand J Immunol**, v.27, p. 673-8, Jun. 1988.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**, v. 80, p. 1055-81. Jul. 2000.

PEPYS, M. B.; BALTZ, M. L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. **Adv Immunol**, v. 34, p.141–212. 1983.

PERES, C. M.; OTTON, R.; CURI, R. Modulation of lymphocyte proliferation by macrophages and macrophages loaded with arachidonic acid. *Cell Biochem Funct*. Nov-Dec. Exercise immunology: neuroendocrine regulation of NK-cells. **Cell Biochem Funct**, v. 23(6), p. 373-81. Nov-Dec. 2005.

PETERSON, M. P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 101, p. 1394-1399, Nov. 2006.

PLATONOV, V. N.; BULATOVA, M. M. **La preparación física: Deporte e entrenamiento**. [S.l]: Paidotribo, 1998. 233 páginas.

PONRAJ, D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Establishment of an animal model for myoglobinuria by use of a myotoxin from *pseudechis australis* (king brown snake) venom in mice. **Lab Anim Sci**, v. 46, p. 393–398, 1996.

POWERS, S. K. et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 266, p. R375-R380, Feb. 1994.

---

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho**. 5ª ed. Barueri – SP: Manole.2005. 598 páginas.

POWERS, S. K.; JI, LL.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, p. 987-997, Jul. 1999.

RADAK, Z. et al. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. **Pflugers Arch**, v. 435(3), p. 439-41. Feb 1998.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 181-187, 1987.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circulation Research**, v. 52, n. 3, p. 352-357, 1983.

RATAMESS, N. A. et al. Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults (position stand). **Med Sci Sports Exerc**, v. 41(3), p. 687-708, Mar. 2009.

RUS, A. et al. Endogenous Nitric Oxide Can Act as Beneficial or Deleterious in the Hypoxic Lung Depending on the Reoxygenation Time. **The anatomical record**, v. 293(12), p. 2193–2201, Dec. 2010.

RUTTER, M. K. et al. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. **Circulation**, v. 110, p. 380–385. Jul. 2004.

SALTIN, B. et al. Response to exercise after bed rest and after training. **Circulation**, v. 38, p. VII1–VII78, 1968.

SCHACHNIK, N. C. C. **USO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE ÓXIDO NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM NEFROPATIA.**

SCHMIDTBLEICHER, D. Training for power events. In: Komi, P. V. (ed). **Strength and Power in Sport.** Oxford: IOC Medical commission, 1992.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, Vol. 10, Nº 4, p. 308-313, Jul/Ago. 2004.

SCHULENBURG, H.; KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. **Immunol Rev**, v. 198, p. 36-58, Apr. 2004.

SHIBATA, F. et al. Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2 alpha, CINC-2 beta and CINC-3. **Eur J Biochem**, v. 231, p. 306–311, Jul. 1995.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, H. Gene structure, cDNA cloning, and expression of the rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) gene. **Cytokine**, v. 10, p.169–174, Mar. 1998.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 25, p.1058-71. 1986.

SMITH, C. A. et al. Transforming growth factor- $\beta$  following skeletal muscle strain injury in rats. **J Appl Physiol**, v. 102, p. 755–761, Feb. 2007.

SPEYER, C. L. et al. Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. **Am. J. Pathol**, v. 163, p. 2319–2328, Dec. 2003.



TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Comp Integr Comp Physiol**, V. 288, p. R345-R353, Feb. 2005.

TIETZ, R. W. **Clinical Guide to laboratory Tests**. 3<sup>rd</sup> Ed. 1995:178.

TOFT, A. D. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids do not affect cytokine response to strenuous exercise. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 2401–2406, Dec. 2000.

TRABELSI, F.; LAVOIE, J. M. Arginine-induced pancreatic hormone secretion during exercise in rats. **J Appl Physiol**, v. 81, p. 2528-2533, Dec.1996.

UCHIDA, M. C. et al. Effect of bench press exercise intensity on muscle soreness and inflammatory mediators. **Journal of Sports Sciences**, v. 27(5), p. 499- 507, Mar. 2009.

UCHIYAMA, S. et al. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. **Pflugers Arch**, v. 452(1), p. 109-16. Apr. 2006.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, v. 92(8), p.827-39, May 2003.

VIZI, E. S. Receptor-mediated local fine-tuning by noradrenergic innervation of neuroendocrine and immune systems. **Ann N Y Acad Sci**, v. 851, p. 388-96, Jun. 1998.

WANNAMETHEE, S. G et al. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2913–2918, Dec. 2005.

WILLIAMSON, D. L.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Acute treatment with TNF- $\alpha$  attenuates insulin-stimulated protein synthesis in culture of C2C12 myotubes through a MEK1- sensitive mechanism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, p. E95-E104, Jul. 2005.

---

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80(5), p. 617-53, May 2000.

WOODS, J. A. Immune Response to Resistance Exercise. **American Journal Lifestyle Medicine**, v. 4, p. 244-252, Jun. 2010.

WOODS, J. A.; VIEIRA, V. J.; KEYLOCK, K. T. Exercise, Inflammation and Innate Immunity. **Immunity Immunol Allergy Clin N Am**, v. 29, p. 381-393, 2009.

YEH, C. L. et. Effect of arginine on cellular adhesion molecule expression and leukocyte transmigration in endothelial cells stimulated by biological fluid from surgical patients. **Shock**, v. 28, p. 39-44. Jul. 2007

---

---

**L-ARGININE DECREASE TNF- $\alpha$ , NEUTROPHIL RECRUITMENT AND UP-REGULATES REGENERATIVES FACTORS OF SKELETAL MUSCLE ARISING OF A SINGLE BOUT OF HIGH INTENSITY RESISTANCE EXERCISE**

Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes<sup>1,2</sup>, Wagner Garcez de Mello<sup>1,2</sup> and Sandra Helena Penha de Oliveira<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>The Multicentric Graduate Studies Program in Physiological Sciences – SBFis,

<sup>2</sup>Departament of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

**Running head:** L-arginine decrease inflammatory mediators of skeletal muscle.

**Address Correspondence and Offprint Request to:**

Sandra Helena Penha de Oliveira

Dept of Basic Sciences

School of Dentistry of Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Rua José Bonifácio, 1193.

Vila Mendonça, Araçatuba, Sao Paulo, Brazil.

16018-805

Phone: +55 18 3636-2814

e-mail.: [shpoliv@foa.unesp.br](mailto:shpoliv@foa.unesp.br)

---

**Abstract:** The mechanisms of muscular adaptation to aerobic exercise has previously been described in several studies. This adaptation occurred through a repair process following tissue damage (inflammatory process). The aim of this study was to analyze the effect of L-arginine supplementation on the production of inflammatory mediators and regenerative factors in acute phase post a high intensity resistance exercise (RE), and the possible protective role of L-arginine supplementation in the effects of RE in skeletal muscle tissue. Males Wistar rats (200g) were divided into 5 groups (n=10 per group) (control group (C), post-exercise (0), 8, 24 and 48 hours post-exercise), with L-arginine (1 g/kg) one hour before training began or aminoguanidine (50 mg/kg), 30 minutes before starting training, both by gavage. The animals were subjected to RE practice for 4 days, through a staircase, with the overload apparatus corresponding to 80% relative to the body weight only on the fourth day. Peripheral blood plasma samples, skeletal muscle (extensor digitorum longus) were collected for analysis of myeloperoxidase, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Collagen type 1 and VEGF by RT-PCR and ELISA. L-arginine promoted a great reduction in neutrophil migration ( $p<0.0001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p<0.0001$ ) and up-regulated the TGF- $\beta$  ( $p<0.0001$ ), collagen type 1 ( $p<0.001$ ) and VEGF ( $p<0.001$ ). The aminoguanidine pre-treatment reversed the process. L-arginine supplementation (nitric oxide precursor) played a protective role in the skeletal muscle tissue and increased the expression of regenerative factors after a single bout high intensity of resistance exercise. We suggest that this protection is related to the nitric oxide pathway.

**Key words:** Muscle damage, cytokines, nitric oxide, skeletal muscle repair.

## Introduction

A single bout of high intensity resistance exercise (RE) promotes a large number of changes in homeostasis, especially in skeletal muscle tissue. The RE (strength training, resistance training or power training), is characterized by dynamic movements (concentric and eccentric) or statics (isometric), against a given load (mechanical, body weight) (Ratamess *et al.* 2009), and the continuous practice, promotes gain in strength through neural adaptations and structural modifications in the skeletal muscle system.

Previous studies have shown that high intensity exercises (acute phase), may be characterized as a stress factor to immune system, promoting an increase in the circulating inflammatory cells (neutrophils, monocytes and lymphocytes) (Lira *et al.* 2009), and that this migration is promoted by the contractile activity of RE, which results in skeletal muscle damage, promoting the release of cytokines (myokines) (Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), initiating the inflammatory process in skeletal muscle tissue (SMT) (Vizzi, 1998; Gleeson, 2000; Pedersen *et al.* 2001, Pedersen *et al.* 2003; Steensberg *et al.* 2003). The contractile activity of RE is linked not only to inflammatory mediators and myokines, but also to regenerative factors. For example, after a high intensity session of RE, enhanced expression of Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) was observed, and consequently, the stimulation of collagen production after muscle injury, these being two important factors present in skeletal muscle repair and remodeling (Smith *et al.* 2007; Czarkowska-Paczek *et al.* 2009).

Exercise acts as an immunological modulator in the injury and repair processes, however, the relationship between the effects of high intensity of RE practice and its influence on the inflammatory mediators, myokines and regenerative

factors of skeletal muscle tissue is not completely understood (Izquierdo *et al.* 2009; Angeli *et al.* 2004; Lagranha *et al.* 2004; Niess *et al.* 1998).

Several studies have investigated the possible protective role of nitric oxide (NO) in the effects of high intensity exercises on the organs and tissues. In addition, the muscle-derived NO seems to be an important regulator of muscle damage and inflammation promoted by invading inflammatory cells, and serves as a shield against muscle damage by inhibiting the expression and adhesion of molecules that are necessary for leukocyte interaction with vascular endothelial cells (Tidball *et al.* 2005). In another study, L-arginine supplementation increased and decreased the ability to repair damage caused by high intensity aerobic exercises in the pulmonary system and heart, respectively (Huang *et al.* 2008), however, the effect of L-arginine supplementation on skeletal muscle tissue subjected a single bout of high intensity RE, and which inflammatory mediators are involved in the process, was not all clear.

There are controversies about the mechanisms and the possible protective role of NO inhibition in the potential migration of inflammatory cells that are related to the regenerative process of muscle fibers. NO may play a positive role in skeletal muscle tissue regeneration of the effects of RE and physical stress. Thus the objective of this study was to investigate the role of L-arginine supplementation upon the inflammatory mediators and regenerative factors released during repair and tissue damage of skeletal muscle after a high intensity RE session.

## **Material and Methods**

### **Animal Characteristics**

All methods used were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the State University of São Paulo (CEAA-FOA/UNESP) (2009-002045), in

accordance with the ethical principles of animal experimentation (COBEA). **One hundred and ten** male rats Wistar weighing from 180 to 200 g were used. Animals were kept in the Animal room at Department of Basic Sciences during the experimental trials. These animals were housed in temperature-controlled rooms with an exhaust system, with a light/dark cycle of 12 hours, and received water and food *ad libitum*.

## **Experiment Design**

### **Resistance Exercise**

The animals underwent the RE on a ladder with the following dimensions: (1.13 m x 0.18, 2 cm grid), 80° tilt in the top location (home) measuring 20 x 20 x 20 cm”) where they rested during the climbs (Hornberger & Farrar 2004). The resistance exercise proposed lasted four days. On the first 3 days the animals consecutively performed 8, 10 and 12 series of exercises, timed with 30 seconds rest between sets, no extra load. On the fourth day, two tubes of load (containing steel balls) were strapped to each animal, representing 80% of its body weight. The animals had to perform repetitions with the same time interval as applied on the first three days, until concentric failure (muscle fatigue) occurred. The animals were divided according to the time of skeletal muscle tissue regeneration: Control group (C), post-exercise group (0), 8 hours post-exercise group (8), 24 hours post-exercise group (24) and 48 hours post-exercise group (48). With regard to L-arginine and Aminoguanidine supplementation, 10 animals from each group received the supplement and were submitted to training, while the RE groups received only the carrier vehicle so that both were subjected to same stress.

## **Supplementation Protocol**

The L-arginine group received L-arginine supplementation (Sigma Aldrich A5006-500g) (nitric oxide precursor) by gavage (1 g/kg, pH=7.4) dissolved in TRIS buffer (pH=8.8) (Trabelsi & Lavoie 1996), 1mL/animal one hour before the RE. Pretreatment with Aminoguanidine (Sigma Aldrich A7009-100g) (selective inhibitor of iNOS) was administrated by gavage (50 mg/kg) dissolved in NaCl 0,9% (pH=7.4) (Abdel-Zaher *et al.* 2007) 1 mL/animal, thirty minutes before the RE proposed, and the control group received NaCl 0.9% (1mL/animal) only on days when the animals were subjected to the proposed training.

## **Collection of peripheral blood plasma and the skeletal muscle tissue.**

After four days of the RE, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg/mL) and with xylazine hydrochloride (10 mg/mL). The peripheral blood samples were obtained through the abdominal aorta in 10 mL collection tubes using heparinized tubes at the time intervals of 0, 8, 24 and 48 hours after the last training session offered (fourth day). Blood samples were then centrifuged at 1811 x g for 15 min at 4° C. The serum was removed, and frozen at -80°C for later analysis. The skeletal muscles (extensor digitorum longus (EDL)), removed at the time intervals of 0, 8, 24 and 48 hours after the last training session offered (fourth day) were cut in half, and one half of the skeletal muscle tissue were snap frozen in liquid nitrogen, and stored in Eppendorfs containing 1 mL of TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA), and frozen at -80°C. The other half of skeletal muscle tissues were snap frozen in liquid nitrogen and stored in Eppendorfs and frozen at -80°C.

## **Evaluation of myeloperoxidase concentration in the skeletal muscle tissue**



The analysis of neutrophil infiltration into the skeletal muscle tissue after the proposed RE was performed by collecting the extensor digitorum longus (EDL), which was weighed and placed in a buffer 1 (NaCl 0.1M (5.84 g/L) + Na<sub>2</sub>EDTA 0.015M (5.58 g/L) in NaPO<sub>4</sub> 0.02M (pH 4.7)) for a total of 2 mL/1g tissue sample. After this it was homogenized three times with the aid of a Polytron and centrifuged for 15 minutes at 15700 x g, and the supernatant was discarded. The same volume of buffer 1 was added and homogenized. Next, 800 µL of 0.2% NaCl was added for 30 seconds, then 800 µL 1.6% NaCl + 5% Glucose was added. The samples were centrifuged for 15 minutes at 15700 x g, and the supernatant was discarded again. The same volume of buffer 1 (described above) was added of buffer 2 (1 g H-TAB (0.5%)/ 200 mL NaPO<sub>4</sub> 0.05M (pH 5.4)), then the samples were homogenized by vortex, and frozen and thawed in liquid nitrogen twice. After the next step, the samples were centrifuged for 15 minutes at 9300 x g. In the last step, the supernatant was collected for measurement of myeloperoxidase. In a 96-well plate, 5 µL of sample was incubated with 45 µL of NaPO<sub>4</sub> 0,08 M. After this 25 µL of TMB solution was added to each well for 5 minutes. Right after this, 100 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4M) was added to each well for 5 minutes to stop the reaction. The readout was taken at an absorbance of (OD 450 nm) in an ELISA reader (spectrophotometer). Results were expressed as neutrophils per total sample and the standard curve performed with 3000 neutrophils at the first point.

#### **Analysis of skeletal muscle tissue mRNA expression: RNA isolation, reverse transcription and PCR.**

Total RNA was isolated from the EDL using TRIzol reagent according to the manufacturer's (Invitrogen, CA, USA) guidelines, with the aid of a Polytron, repeated

three times. Next 200  $\mu\text{L}$  of chloroform was added to each sample tube and centrifuged at  $15700 \times g$  for 15 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . After centrifugation, RNA was transferred to new tubes and 500  $\mu\text{L}$  of isopropyl alcohol was added to it, and then stored overnight at  $-20^\circ\text{C}$ . The next day, the tubes were centrifuged at  $15700 \times g$  for 15 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was removed and 500  $\mu\text{L}$  75% ethanol was added. After this, the sample tubes were centrifuged at  $15700 \times g$  for 10 minutes at  $4^\circ\text{C}$ , and all the supernatant was discarded. The liquid was poured out of the sample tubes until they were dried out. After drying, the pellets were resuspended in 20  $\mu\text{L}$  1% DEPC water and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

The RNA concentration was determined by optical density at 260/280 nm (using an OD260 unit equivalent). The total RNA concentration in the muscle was calculated on the basis of total RNA yield and the weight of the analyzed sample. The RNA samples were stored frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and were used subsequently in relative RT-PCR procedures. For reverse transcription, 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was typically used in a reaction containing 1  $\mu\text{L}$  of oligo-DT (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , Invitrogen), 4  $\mu\text{L}$  of each dNTP (2.5  $\mu\text{M}$ , Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  of DTT (0.1M/500  $\mu\text{L}$ , Invitrogen), 4  $\mu\text{L}$  of 5x first-strand buffer (250mM, Invitrogen), and 1  $\mu\text{L}$  of reverse transcriptase (SuperScript II, 200U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen). The transcriptase reverse reaction was performed in according to the following amplification profile: pre-denaturation at  $70^\circ\text{C}$  for 10 minutes, amplification (denaturation at  $4^\circ\text{C}$  for 5 minutes; annealing at  $42^\circ\text{C}$  for 60 minutes; extension at  $90^\circ\text{C}$  for 5 minutes) for 30 cycles. After thermal cycling the sample tubes were stored at  $4^\circ\text{C}$  for later analysis. For the polymerase chain reaction (PCR), 1  $\mu\text{L}$  of cDNA was used in a reaction containing 4  $\mu\text{L}$  of DEPC water, 2  $\mu\text{L}$  of dNTP (2.5  $\mu\text{M}$ , Invitrogen), 2.5  $\mu\text{L}$  of 10x PCR Rxn Buffer (- $\text{MgCl}_2$ , Invitrogen),  $\text{MgCl}_2$  (50nM, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  of specific primer 10  $\mu\text{M}$ , 12.9  $\mu\text{L}$  of ultrapure water (Invitrogen) and 0.1  $\mu\text{L}$  of Taq DNA

polymerase (Invitrogen). The primer sets for rats used were  $\beta$ -actin (sense: 5' – GAA GCT GTG CTA TGT TGC CCT AGA - 3', antisense: 5' – GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT – 3', 445 bp), TGF- $\beta$ 1 (sense: 5' – GGT TAT GAC TTC AGC TTC CTG CCT - 3', antisense: 5' - ATG TAG GCT ACG CTG TTC TTG – 3' CAG, 387 bp), Collagen type 1 (sense: 5' – GGT TAT GAC TTC AGC TTC CTG CCT – 3', antisense: 5' – ATG TAG GCT ACG CTG TTC TTG CAG, 548 bp), VEGF (sense: 5' – ACC CTG GCT TTA CTG CTG TAC CTC – 3', antisense: 5' – TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA, 614 bp). One microliter of each cDNA was then subjected to polymerase chain reaction according to the following amplification profile: pre-denaturation at 94 °C for 40 s, amplification (denaturation at 94 °C for 40 s; annealing at 60 °C for 40 s; extension at 72 °C for 1 min) for 30 cycles, with final extension at 72 °C for 10 min for all primers used. The results for mRNA concentrations are expressed as a ratio over beta actin, which was amplified as a housekeeping gene. Representation of the TGF- $\beta$ / $\beta$ -actin, Collagen type 1/ $\beta$ - actin and VEGF/ $\beta$ -actin ratio was determined by means of densitometric analysis using Scion Image software.

#### **Determination of TNF- $\alpha$ and TGF- $\beta$ by enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA).**

Muscle EDL was collected and kept in frozen liquid nitrogen in order to measure the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and transform growth factor (TGF- $\beta$ ) production. One day before the experiment, samples were homogenized in PBS plus protease inhibitor tablets using a Polytron. The samples were centrifuged at 1811 x g for 10 minutes at 4°C. After centrifugation, the supernatant was collected and stored at -80°C until use. The 96-well plate was coated with monoclonal antibody to TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . Samples and recombinant TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were added to the wells and

after 2 h, unbound proteins were washed away and an enzyme-linked polyclonal antibody was added to the wells; this antibody acted as a link between TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  and a dyeing agent. A color change proportional to the amount of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  was observed. This was quantified by comparing the optical densities of the samples with those of known dilutions using a plate reader at 450 nm. The concentration of each TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  was calculated from a standard curve in pg/mL

### **Statistical analysis**

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism (version 5.0) statistical program. The data are expressed as the means $\pm$ SE. intergroup comparisons were performed by using the one-way ANOVA test, with Bonferroni correction. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

### **Results**

#### **Neutrophil recruitment into the skeletal muscle in animals submitted to a single bout of high intensity resistance exercise**

Neutrophil recruitment into the skeletal muscle after RE peaked at 24 hours post-exercise compared with 0, 8 and 48-hour groups. In the groups that received L-arginine supplementation, the number of neutrophils did not change except at 24 hours post-exercise (Figure 1A) when a great reduction of neutrophil infiltration into the skeletal muscle was observed when comparison to RE group at the same period (Figure 1A). At 24 hours, it was observed that aminoguanidine promoted the opposite effect to that obtained in the L-arginine groups, as it enhanced neutrophil infiltration

(Figure 1B). At 48 hours, not statistical significance was observed in the RE and RE+L-arg groups, however, the group was received pre-treatment with aminoguanidine showed an increase of neutrophil infiltration into the skeletal muscle (Figure 1B).

### **TNF- $\alpha$ production in the skeletal muscle in animals submitted single bout of high intensity resistance exercise**

In order to investigate which inflammatory mediators are involved in neutrophil accumulation in the skeletal muscle after RE, the TNF- $\alpha$  production was evaluated. The peak of TNF- $\alpha$  production occurred at 24 hours post-exercise in RE group in comparison with the 0, 8 and 48-hour groups. The groups that received L-arginine supplementation at 24 and 48 hours post-exercise, showed a reduction in TNF- $\alpha$  production in comparison to RE groups at the respective moments (Figure 2A). In opposite was observed in relation to L-arginine supplementation, aminoguanidine pre-treatment promoted an enhance in the production of TNF- $\alpha$  in both moments, 24 and 48 hours post-exercise (Figure 2B).

### **TGF- $\beta$ mRNA expression and production in the skeletal muscle in animals submitted to a single bout of high intensity resistance exercise**

In the next step TGF- $\beta$  mRNA expression and production in skeletal muscle was investigated. The results of this study demonstrated the peak of TGF- $\beta$  expression at 48 hours post-exercise, in comparison with the 0, 8 and 24-hour groups (Figure 3A). The pretreatment with L-arginine, promoted an increase in the TGF- $\beta$  expression as early as 0, 8 and 24 hours post-exercise in relation to RE groups in the respective time intervals (Figure 3A). In comparison with L-arginine

supplementation, aminoguanidine pre-treatment was able to decrease TGF- $\beta$  mRNA expression and production at 24. However, at 48 hours, the pre-treatment with aminoguanidine was not altered the TGF- $\beta$  mRNA expression and production when compared with the L-arginine supplementation group (Figure 3B and 3C).

### **Collagen type 1 and VEGF mRNA expression in the skeletal muscle in animals submitted to a single bout of high intensity resistance exercise**

In continuation of the analysis, the expression of regenerative factors of skeletal muscle tissue was evaluated by measurement of Collagen type 1 and vascular endothelial growth factor (VEGF). The peak of Collagen mRNA expression was observed at 48 hours post-exercise in RE group when compared with the C, 0, 8 and 24-hour groups. The increases in the L-arginine supplementation groups occurred in a time-dependent manner from 0, 8, 24 and 48 hours, with statistical significance only at 8, 24 and 48 hours post-exercise (Figure 4A). Aminoguanidine pre-treatment was able to inhibit collagen mRNA when compared with the L-arginine supplementation group at 24 but not at 48 hours. (Figure 4B). With regard to VEGF expression, at 24 and 48 hours post-exercise the RE groups demonstrated practically the same standard of expression (Figure 4C). At 24 and 48 hours after L-arginine supplementation, VEGF mRNA expression increased, however, aminoguanidine pre-treatment was potentiated at 24 hours and inhibited at 48 hours after RE (Figure 4C).

### **Discussion**

The results of the present study demonstrated that a single session of high intensity resistance exercise promoted an increase in inflammatory markers and directly affected the modulation of regenerative factors in skeletal muscle. Several

evidences have indicated that exhaustive exercise stimulates neutrophils to release Myeloperoxidase (MPO), which induces severe oxidative damage in tissues by reactive oxygen species (ROS). Furthermore, other authors have observed that neutrophils rapidly invade muscle cells and cause muscle damage after strenuous exercise-induced tissue damage (Huang *et al.* 2008).

The neutrophil migration evaluated in the present study indicated that the inflammatory peak promoted by the RE practice occurred 24 hours post-exercise. In the Morozov *et al.* (2006) study, the peak of inflammation occurred at 24 hours after the practice of high intensity resistance exercise. An important observation in the present study was that L-arginine supplementation diminished neutrophil migration at the peak of inflammation in skeletal muscle. Data from literature have demonstrated that L-arginine, a substrate for nitric oxide (NO) production, reduced neutrophil transmigration in post-surgical patients (Yeh *et al.* 2007). Cuzzolin *et al.* (2000) showed that the impairment of NO production promoted a significant increase in neutrophil adhesion after acute exercise, corroborating the results of the present study. The reduction in neutrophil infiltration observed in the present study would occur by the apoptosis and decrease in neutrophil adhesion, due to the fact that L-arginine acts a precursor of nitric oxide, which interacts in migration and apoptosis of neutrophils (Secco *et al.* 2003).

Another possibility as regards the protective role of L-arginine was described by Huang *et al.* (2008), suggesting that NO probably plays a protective role by scavenging free radicals, inhibiting ROS action in skeletal muscle. Future studies are being conducted to answer this question in the present study. To confirm the protective role of nitric oxide, the animals were pre-treated with aminoguanidine, an

inducible nitric oxide synthase inhibitor, which reversed the positive effect of L-arginine supplementation.

The present study showed a greater increase in TNF- $\alpha$  protein content in skeletal muscle at 24 hours after resistance exercise (peak), and similar results were observed in other studies (Neto *et al.* 2009; Karagounis *et al.* 2010; Liao *et al.* 2010). The release of TNF- $\alpha$  is linked to exhaustive exercise promoting changes in the metabolic demand of muscle (Neto *et al.* 2009), inducing proteolysis and promoting the inflammatory process by ROS production from adherent neutrophils, which may enhance the activation of NF- $\kappa$ B (greater release of pro-inflammatory cytokines) and ICAM-1 pathways. These data suggest a possible mechanism of TNF- $\alpha$  action mediating the inflammatory process (Peterson *et al.* 2006; Frost *et al.* 1997; Layne & Farmer 1999; Williamson *et al.* 2005). The eccentric contractions of skeletal muscle, characteristics of RE practice have been reported to induce TNF- $\alpha$  expression, and this expression, promoted significant changes in the inflammatory situation, inducing neutrophil and macrophage accumulation, producing reactive oxygen species, promoting the release of proteases and myokines, which may contribute to muscle damage (Neto *et al.* 2009; Cassatella, 1999; Luster *et al.* 1999). In the present study, data from TNF- $\alpha$  production showed that pre-treatment with L-arginine was able to significantly diminish TNF- $\alpha$  production at 24 and 48 hours post-exercise, as observed in RE group. In other study, L-arginine supplementation promoted decreases in pro-inflammatory cytokine levels, with special significance in TNF- $\alpha$  production (Hnia *et al.* 2008).

Previous studies have suggested that L-arginine promotes an inhibitory effect on total NF- $\kappa$ B and concomitant inhibition of the I $\kappa$ B- $\alpha$  pathway, (Kabouridis *et al.* 2002; Hnia *et al.* 2008), by NO production, promoting a reduction in the levels of pro-



inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, CINC-2). The aminoguanidine pre-treatment (NO inhibition) induced in the present study promoted the opposite effect of L-arginine supplementation, corroborate the data of literature, suggesting that the NO promotes down-modulation of TNF- $\alpha$  production in the skeletal muscle tissue.

In order to verify the influence of RE and L-arginine supplementation on regenerative factors in skeletal muscle, TGF- $\beta$ , Collagen type 1 and VEGF expression was evaluated in the skeletal muscle tissue after a high intensity RE session. The data of the present study showed that the highest expression of TGF- $\beta$  was observed in RE groups at 48 hours post-exercise. This increase is related to the injury of skeletal muscle (Smith *et al.* 2007; McLennan *et al.* 1997). Several studies have shown that TGF- $\beta$  plays a dual role in the inflammatory and regenerative processes in skeletal muscle. The negative role involved a decrease in protein synthesis, fibrosis, and a decrease in myogenic differentiation and myoblast fusion (Liu *et al.* 2001; Smith *et al.* 2007). Whereas, TGF- $\beta$  promoted collagen synthesis, fibroblast proliferation, angiogenesis (Cannon & Pierre 1998; Massague, 1990; Smith *et al.* 2007) and enhanced the transcription factors in skeletal muscle (Myogenic regulatory factors (MyoD)) thus increasing the myogenic differentiation of satellite cells, the main cells responsible for regeneration of skeletal muscle fibers (Bhatnagar *et al.* 2010). In the present study, pre-treatment with L-arginine already promoted an increase in post-exercise TGF- $\beta$  expression and shortly after the last session of high intensity RE, declining to control levels at 48 hours post-exercise. Confirming the data of the present study, Filippin *et al.* (2011), evaluated the influence of L-NAME (a constitutive NOS inhibitor) in TGF- $\beta$  protein content, and noted a moderate TGF- $\beta$  expression in skeletal muscle post trauma, supporting the idea of a low NO leading to high TGF- $\beta$  levels. In the present study a pre-treatment

with inducible NOS inhibitor, aminoguanidine was used, and the great reduction in TGF- $\beta$  expression and production at 24 hours post-exercise was observed exactly at the peak of inflammation, as demonstrated by neutrophil infiltration into the tissue. However at 48 hours post-exercise, TGF- $\beta$  expression was not dependent on NO, since the aminoguanidine was not able to inhibit its expression and production, thus it is suggested that NO increases control of TGF- $\beta$  expression, but it is also controlled by other mechanisms in addition to NO. One possible explanation about the situation observed in the aminoguanidine groups at 48 h, may be due to decrease in TGF- $\beta$  production and expression observed at 24 h promoted by the NO inhibition. Possibly, this inhibition was able to induce a reduction in the blood flow, and consequently, diminishing the protein and signaling of regenerative factors in skeletal muscle tissue. It is suggested that the enhanced TGF- $\beta$  production and expression in comparison with the L-arginine group at 48 h, may be a compensatory effect caused by skeletal muscle fibers to promote a balance in regenerative factors, due to the diminished expression observed at 24h, so that the muscle regeneration could occur correctly.

There are many studies related the effect of NO on diverse tissues and organs, however, the role of NO in the regulation of TGF- $\beta$  production in the skeletal muscle tissue after a single bout of high intensity of RE has not previously been studied. Therefore, for the first time the present study shows the role of TGF- $\beta$  production in the skeletal muscle under high intensity RE.

In continuation of these analyses, the present study evaluated the Collagen type 1 expression in the skeletal muscle, and observed that peak expression occurred at 48 hours post-exercise in RE groups. Collagen is an important factor in the transfer of force from muscle cells to bone, participating in tendon and skeletal muscle composition (Heinemeier *et al.* 2007). Acute exercise induces collagen

synthesis both in tendon and muscle, and it seems that the eccentric contractions were significantly greater in comparison with the concentric contractions (Heinemeier *et al.* 2007). The data of the present study showed that the expression of collagen type 1 and TGF- $\beta$  appears to occur inversely; while at (0) and 8 hours post-exercise, there is a strong expression of TGF- $\beta$ , it decreases at 24 and 48 hours. The expression of collagen type 1 is slight at (0) and 8 hours post-exercise, and a high expression was observed at 24 and 48 hours post-exercise. By this observation, it is possible to consider that the periods of skeletal muscle tissue injury ((0) and 8 hours post-exercise) are the main time intervals of signaling for collagen production; the amount of TGF- $\beta$  is higher. This may be because fibroblasts have been stimulated, thus raising the levels of collagen, which occurs during the peak of inflammation at 24 hours post-exercise. This increased production of collagen is extremely important for the skeletal muscle tissue repair during regeneration. The contractile activity of skeletal muscle can promote changes in the expression of enzymes involved in collagen processing, such as lysyl oxidase (LOX), which facilitates cross-linking of collagen, and matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors, which regulate degradation of collagen molecules, however, the mechanisms of this adaptation, as well as enzymes related to collagen processing, are not completely clear (Heinemeier *et al.* 2007; Kagan & Li 2003; Visse & Nagase 2003). The L-arginine supplementation promoted an increase in collagen expression at 24 and 48 hours post-exercise in comparison with RE group. The literature does not report any studies evaluating the effect of L-arginine on high intensity RE in skeletal muscle regeneration. It is suggested that this increase was promoted by TGF- $\beta$  signaling, whose expression was increased by L-arginine supplementation, through to NO production. To confirm our hypothesis, pre-treatment with aminoguanidine was used,

which promoted a high reduction in collagen expression at 24 and 48 hours post-exercise. From the data of the present study, it is suggested that NO is involved in the increase in collagen expression at 24 h. However, the increase in collagen expression that occurred at 48 hours post-exercise was not dependent on the NO pathway. This suggests that this increase may have occurred due to the demands of muscle regeneration and repair, and that it occurred through other mechanisms independent of NO. Further studies are being conducted to answer this question.

VEGF expression in the skeletal muscle tissue was the next analysis performed in the present study in order to verify the link between this factor and skeletal muscle regeneration. The angiogenesis is characterized by several coordinated steps that are required to promote an increase in the number of capillaries, and two pathways are involved, the VEGF and angiopoietin (Papetti & Herman 2002; Gavin *et al.* 2007). Data from the literature have described that high intensity exercises promote several changes in skeletal muscle tissue, including, increases in oxidative enzymes, enhanced numbers of capillaries surrounding muscle fibers and increase in VEGF and VEGF receptors, mainly VEGFR-2, the major angiogenesis pathway (Saltin *et al.* 1968; Andersen & Henriksson 1977; Gavin *et al.* 2007). The data of the present study showed that VEGF expression at 24 and 48 hours post-exercise in RE and L-arginine groups showed the same pattern of expression. On the other hand, pre-treatment with aminoguanidine potentiated VEGF expression at 24 hours post-exercise and decreased significantly at 48 hours post-exercise. Previous studies have suggested that NO is important in VEGF gene regulation, through the enhancement of VEGF transcription, increase in VEGF half-life and up-regulation of VEGFR-2 and VEGF (Gavin *et al.* 2000; Milkiewicz *et al.* 2005; LLoyd *et al.* 2001). One possible explanation for the increased expression of

VEGF observed at 24 hours post-exercise in the aminoguanidine group is probably due to the increased requirement of blood supply to the site of inflammation, which is the main role of constitutive nitric oxide synthase. Whereas, at 48 hours after exercise, a decrease in the VEGF expression was observed in aminoguanidine group. At this time, the VEGF expression induced by RE after L-arginine supplementation is dependent on NO, suggesting that the inhibition of iNOS promoted down-regulation of VEGF expression (Gavin *et al.* 2000; Badr *et al.* 2003). However, another possibility is that the increase in VEGF expression observed at 24 hours post-exercise was sufficient to support the angiogenesis of skeletal muscle tissue, thus promoting down-regulation of VEGF expression at 48 hours post-exercise. Data from the literature has shown that the VEGF expression is increased by NO, and that the intensity and type of stimulus of exercise influenced VEGF expression, indicating that VEGF expression is increased or decreased by other mechanisms, inclusively by skeletal muscle demand and activity, in addition to NO.

In conclusion, taken together, supplementation with L-arginine was able to reduce the inflammation and production of pro-inflammatory mediator (TNF- $\alpha$ ) released by a high intensity session of RE, and to up-regulate the regenerative factors of skeletal muscle tissue (TGF- $\beta$ , collagen type 1 and VEGF). These findings may be of great significance in high performance sports, in which L-arginine supplementation plays a protective role against skeletal muscle injury and enables fast repair and regeneration of skeletal muscle after high intensity exercises, therefore being a possible tool for increasing performance.

---

## References

1. **Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MM, Hafez MM & Omran FM.** Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology* 234: 124–134, 2007.
  2. **Andersen P, Henriksson J.** Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol* 270: 677–690, 1977.
  3. **Angeli A, Minetto M, Dovoio A, Paccotti P.** The overtraining syndrome in athletes: a stress-related disorder. *J Endocrinol Invest* 27: 603-12, 2004.
  4. **Badr I, Brown MD, Egginton S, Hudlická O, Milkiewicz M, Verhaeg J.** Differences in local environment determine the site of physiological angiogenesis in rat skeletal muscle. *Exp Physiol* 88(5): 565-8, 2003.
  5. **Bhatnagar S, Kumar A, Makonchuk DY, Li H, Kumar A.** Transforming Growth Factor- $\beta$ -activated Kinase 1 Is an Essential Regulator of Myogenic Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 6401–6411, 2010.
  6. **Cannon JG, St. Pierre BA.** Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem* 179: 159–167, 1998.
-

7. **Cassatella MA.** Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73: 369-509, 1999.
  8. **Cuzzolin L, Lussignoli S, Crivellente F, Adami A, Schena F, Bellavite P, Brocco G, Benoni G.** Influence on acute exercise on neutrophil and platelet adhesion , nitric oxide plasma metabolites in inactive and active subjects. *Int. J. Sports Med* 21: 289-293, 2000.
  9. **Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartlomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J.** The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. *J Physiol Pharmacol* 60(4): 157-62, 2009.
  10. **Fillipin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM.** The Role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle. *Inflamm Res* 60: 347-356, 2011.
  11. **Frost RA, Lang CH, Gelato MC.** Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. *Endocrinology* 138: 4153-4159, 1997.
  12. **Gavin TP, Drew JL, Kubik CJ, Pofahl WE & Hickner RC.** Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta Physiol* 191: 139–146, 2007.
-

- 
13. **Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC & Wagner PD.** Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *J Appl Physiol* 88(4): 1192-8.
14. **Gleeson M.** Interleukins and exercise. *J Physiol* 529: Pt 1:1, 2000.
15. **Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, Schjerling P.** Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol* 582(Pt 3): 1303-16, 2007.
16. **Hnia K, Gayraud J, Hugon G, Ramonatxo M, Porte S, Matecki S, Mornet D.** L-Arginine Decreases Inflammation and Modulates the Nuclear Factor-kappa $\beta$ /Matrix Metalloproteinase Cascade in Mdx Muscle Fibers. *The American Journal of Pathology* 172: N $^{\circ}$  6, 2008.
17. **Hornberger TAJ, Farrar RP.** Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. *Can. J. Appl. Physiol* 29(1): 16-31, 2004.
18. **Huang CC, Tsai SC, Lin WT.** Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. *Experimental Gerontology* 43: 571–577, 2008.
-



- 
19. **Izquierdo M, Ibañez J, Calbet JA, Navarro-Amezqueta I, González-Izal M, Idoate F, Häkkinen K, Kraemer WJ, Palacios-Sarrasqueta M, Almar M, Gorostiaga EM.** Cytokine and hormone responses to resistance training. *Eur J Appl Physiol* 107(4): 397-409, 2009.
20. **Kabouridis SP, Hasan M, Newson J, Gilroy WD, Lawrence T.** Inhibition of NFkappa B activity by a membrane-transducing mutant of I kappa B alpha. *J Immunol* 169: 2587–2593, 2002.
21. **Kagan HM, Li W.** Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88, 660–672, 2003.
22. **Karagounis LG, Yaspelkis III BB, Reeder DW, Lancaster GI, Hawley JA, Coffey VG.** Contraction-induced changes in TNF- $\alpha$  and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 109: 839–848, 2010.
23. **Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, Silva EP, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC.** Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med Sci Sports Exerc* 36: 210-7, 2004.
24. **Layne MD, Farmer SR.** Tumor necrosis factor-alpha and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res* 249: 177-187, 1999.
-

- 
25. **Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y.** Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 298: R599-R607, 2010.
26. **Lira FS, Koyama CH, Yamashita AS, Rosa JC, Zanchi NE, Jr MLB, Seelaender MC.** Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell Biochem Funct* 27: 458–461, 2009.
27. **Liu D, Black BL, Derynck R.** TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15: 2950–2966, 2001.
28. **Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL.** Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(6): H2528-38, 2001.
29. **Luster MI, Simeonova PP, Galluci R, Matheson J.** Tumor necrosis factor alpha and toxicology. *Crit Ver Toxicol* 29: 491-511, 1999.
30. **Massague J.** The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597–641, 1990.
-

- 
31. **McLennan IS, Koishi K.** Cellular localisation of transforming growth factor-beta 2 and beta 3 (TGF-beta2, TGF-beta3) in damaged and regenerating skeletal muscles. *Dev Dyn* 208: 278–289, 1997.
32. **Milkiewicz M, Hudlicka O, Brown MD, Silgram H.** Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): H336-43, 2005.
33. **Morozov VI, Tsyplenkov PV, Goldberg ND, Kalinski MI.** The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. *Eur J Appl Physiol* 97: 716–722, 2006.
34. **Neto JCR, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita AS, Jr MLB, Nascimento CMO, Seelaender M.** Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol* 106: 697–704, 2009.
35. **Niess AM, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, Dickhuth HH.** Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness* 38: 111-5, 1998.
36. **Nishina K, Zhang F, Nielsen LD, Edeen K, Wang J, Mason RJ.** Expression of CINC-2 beta is related to the state of differentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 505–512, 2005.
-

- 
37. **Papetti M, Herman IM.** Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947–C970, 2002.
38. **Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febrario M, Saltin B.** Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate?. *J Muscle Res Cell Motil* 24:113–119, 2003.
39. **Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Ostrowski K, Schjerling P.** Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exerc Immunol Rev* 7: 18–31, 2001.
40. **Peterson MP, Feedback KD, Bass JH & Pizza FX.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 101: 1394-1399, 2006.
41. **Ratamess NA, Alvar BA, Evetoch TK.** Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults (position stand). *Med Sci Sports Exerc* 41(3): 687-708, 2009.
42. **Saltin B, Blomqvist G, Mitchell JH, Johnson RL Jr, Wildenthal K, Chapman CB.** Response to exercise after bed rest and after training. *Circulation* 38: VII1–VII78, 1968.
-

- 
43. **Secco D, Paron JA, Oliveira SHP, Ferreira SH, Silva JS, Cunha FQ.** Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* 9: 153–164, 2003.
44. **Shibata F, Konishi K, Nakagawa H.** Gene structure, cDNA cloning, and expression of the rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) gene. *Cytokine* 10: 169–174, 1998.
45. **Shibata F, Konishi K, Kato H, Komorita N, al-Mokdad M, Fujioka M, Nakagawa H.** Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2 alpha, CINC-2 beta and CINC-3. *Eur J Biochem* 231: 306–311, 1995.
46. **Smith CA, Stauber F, Waters C, Alway SE, Stauber WT.** Transforming growth factor- $\beta$  following skeletal muscle strain injury in rats. *J Appl Physiol* 102: 755–761, 2007.
47. **Steensberg A.** The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism. *Exerc Immunol Rev* 9: 40–47, 2003.
48. **Tidball JG.** Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Comp Integr Comp Physiol* 288: R345-R353, 2005.
49. **Trabelsi F, Lavoie JM.** Arginine-induced pancreatic hormone secretion during exercise in rats. *J Appl Physiol* 81: 2528-2533, 1996.
-

50. **Visse R, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8): 827-39, 2003.
51. **Vizi ES.** Receptor-mediated local fine-tuning by noradrenergic innervation of neuroendocrine and immune systems. *Ann N Y Acad Sci* 851: 388-96, 1998.
52. **Williamson DL, Kimball SR, Jefferson LS.** Acute treatment with TNF- $\alpha$  attenuates insulin-stimulated protein synthesis in culture of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes through a MEK1- sensitive mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E95-E104, 2005.
53. **Yeh CL, Hsu CS, Chen SC, Hou YC, Chiu WC, Yeh SL.** Effect of arginine on cellular adhesion molecule expression and leukocyte transmigration in endothelial cells stimulated by biological fluid from surgical patients. *Shock* 28: 39-44, 2007.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Leonardo Bellini, Daniel Galera Bernabe and Caril Constante Ferreira do Amaral for technical support in this study. The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

### Grants

This work was supported by São Paulo State Research Foundation- FAPESP (grants to 2006/59794-2-0 SHPO) and CAPES (fellowship of SRLM).

## Figures Legends

**Figure 1:** - Neutrophils recruitment into skeletal muscle tissue (EDL) after high intensity resistance exercise.

**Panel A:** The animals were divided into 5 groups (time intervals): Control group (C), non-supplemented and exercised group (RE) and supplemented and exercised with L-arginine (1 g/kg) (RE+L-arg) and evaluated at 0, 8, 24 and 48 hours post-exercise. \* $p < 0,001$  RE vs. C; \*\* $p < 0,001$  RE+L-arg vs. RE (24h). **Panel B:** The animals were divided into 4 groups: Control group (C-sedentary), exercised group (RE), supplemented with L-arginine and exercised (RE+L-arg) trained and pre-treatment with aminoguanidine (50 mg/kg) (RE+Amino) trained at 24 and 48 hours post-exercise. \* $p < 0,001$  RE (24 e 48h) vs. C, \*\* $p < 0,001$  RE+L-arg vs. RE (24h), \*\*\* $p < 0,001$  RE+amino (24 e 48h) vs. RE+L-arg. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM with  $n=10$  animals per group of three independent experiments, with similar results obtained each time (ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison test).

**Figure 2:** TNF- $\alpha$  and CINC-2 production in skeletal muscle tissue (EDL) after high intensity RE session.

**Panel A:** TNF- $\alpha$  production from skeletal muscle tissue evaluated at 0, 8, 24 and 48 hours post-exercise and supplemented with or without L-arginine and trained (1 g/kg) (RE+L-arg) and trained (RE). \* $p < 0,001$  RE (24h) vs. RE (0, 8 and 48h) and \* $p < 0,05$  (8 and 24h) vs. RE (0h) vs. RE (8,24 e 48 h); \*\* $p < 0,001$  (24 h) and \*\* $p < 0,05$  (48 h) RE+L-arg vs. RE. **Panel B:** TNF- $\alpha$  production from skeletal muscle tissue evaluated at 24 and 48 hours post-exercise and trained (RE), supplemented with L-arginine (1 g/kg) (RE+L-arg) or aminoguanidine (50 mg/kg) (RE+Amino). \* $p < 0,05$  RE (8h) vs. RE (0, 24 e 48 h), \*\* $p < 0,01$  RE+L-arg (8h) vs. RE (8 h). The results represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments,  $n = 10$  animals per group, with similar results obtained each time (ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test).

**Figure 3:** TGF- $\beta$  mRNA expression and production in skeletal muscle tissue (EDL) after a high intensity RE session

**Panel A:** TGF- $\beta$  mRNA expression (EDL) at 0, 8, 24 and 48 hours post-exercise, and trained (RE) and supplemented with L-arginine and trained (1 g/kg) (RE+L-arg). \* $p < 0,05$  RE (8h) vs. RE (0 and 24h) and \* $p < 0,05$  RE (48h) vs. RE (0,8 and 24h); \*\* $p < 0,01$  (0h) and \*\* $p < 0,05$  (8 and 24h) RE+L-arg vs. RE. **Panel B:** TGF- $\beta$  mRNA (EDL) at 24 and 48 hours post-exercise and trained group (RE) supplemented or not with L-arginine (RE+L-arg) or aminoguanidine (50 mg/kg) (RE+Amino). TGF- $\beta$ /  $\beta$ -actin ratio determined by means of densitometric analysis. \* $p < 0,001$  RE vs. C; \*\* $p < 0,05$  (24h) and \*\* $p < 0,01$  (48h) RE+L-arg vs. RE;  $\alpha$   $p < 0,0001$  RE+Amino vs. RE+L-arg (24h). **Panel C:** TGF- $\beta$  production (EDL) at 0, 8, 24 and 48 hours post-exercise by ELISA. \* $p < 0,05$  RE vs. C; \*\* $p < 0,01$  (24h) and \*\* $p < 0,001$  (48h) RE+L-arg vs. RE;  $\alpha$   $p < 0,01$  RE+Amino vs. RE+L-arg (24 h). The results represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, with similar results obtained each time (ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test).

**Figure 4:** – Expression of Collagen type 1 and VEGF in skeletal muscle tissue after high intensity RE session. **Panel A:** Collagen type 1 mRNA expression (EDL) at 0, 8, 24 and 48 hours, and trained group (RE) and supplemented or not with L-arginine (1 g/kg) (RE+L-arg). \* $p < 0,001$  (48h), \* $p < 0,01$  (0 and 8h) and \* $p < 0,05$  (24h) RE vs. C; \*\* $p < 0,001$  (24 h) and  $p < 0,05$  (8 and 48h) RE vs. RE+L-arg. **Panel B:** Collagen type 1 mRNA expression (EDL) at 24 and 48 hours after the proposed exercise and trained group (RE) and supplemented or not with L-arginine (RE+L-arg) or aminoguanidine (50 mg/kg) (RE+Amino). TGF- $\beta$ /  $\beta$ -actin ratio determined by means of densitometric analysis. \* $p < 0,001$  (24h) and \* $p < 0,0001$  (48h) RE vs. C; \*\* $p < 0,01$  (24h) and \*\* $p < 0,05$  (48h) RE vs. RE+L-arg; \*\*\* $p < 0,0001$  RE+Amino (24h) vs. RE+ L-arg. **Panel C:** VEGF mRNA expression (EDL) at 24 and 48 hours, and trained group (RE), and supplemented or not with L-arginine (1 g/kg) or aminoguanidine (50 mg/kg). Collagen type 1/ $\beta$ -actin and VEGF/ $\beta$ -actin ratio determined by means of densitometric analysis. \* $p < 0,001$  RE vs. C; \*\* $p < 0,01$  RE (24 and 48h) vs. RE+L-arg (24 and 48h), \*\*\* $p < 0,5$  (24h) and  $p < 0,001$  (48h) RE+Amino vs. RE+L-arg. The results represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, with similar results obtained each time (ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test).

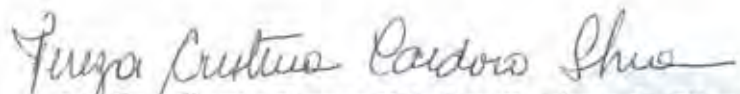


*COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)*

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto **“ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO TNF- $\alpha$ , CINC-2 E NO EM RATOS SUBMETIDOS A UM TREINAMENTO RESISTIDO. PAPEL DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA”** sob responsabilidade do **Profa. Ass. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira** e colaboração de **Samuel Rodrigues Lourenço de Moraes** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 19/03/2009 de acordo com o protocolo 2009-002045.

Araçatuba, 19 de Março de 2009

  
**Prof.<sup>a</sup> Adjunta Tereza Cristina Cardoso da Silva**  
Presidente da CEEA- FOA/UNESP







