

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA

Carmem Peres Valgas da Silva

**Efeitos da suplementação com L-Arginina na
biogênese mitocondrial, tolerância ao esforço,
perfil lipídico e estado redox em ratos treinados**

Campinas 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA

Carmem Peres Valgas da Silva

**Efeitos da suplementação com L-Arginina na
biogênese mitocondrial, tolerância ao esforço,
perfil lipídico e estado redox em ratos treinados**

Trabalho de Conclusão de
Curso (Graduação) apresentado à
Faculdade de Educação Física da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Bacharel
em Educação Física

Orientadora: Angelina Zanesco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA MONOGRAFIA DEFENDIDA PELA
ALUNA CARMEM PERES VALGAS DA SILVA, E ORIENTADA
PELA PROF^a. DRA ANGELINA ZANESCO

Assinatura do orientador

Campinas 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ANDRÉIA DA SILVA
MANZATO – CRB8/7292
BIBLIOTECA “PROFESSOR ASDRÚBAL FERREIRA BATISTA”
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA - UNICAMP**

Si38e Silva, Carmem Peres Valgas da, 1990-
Efeitos da suplementação com L-arginina da biogênese mitocondrial, tolerância ao esforço, perfil lipídico e estado redox em ratos treinados / Carmem Peres Valgas da Silva. – Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Angelina Zanesco.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas.

1. Mitocôndria. 2. Óxido nítrico. 3. L-arginina. 4. Exercício físico. 5. Superóxido dismutase. I. Zanesco, Angelina. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of L-arginine supplementation on mitochondrial biogenesis, exercise tolerance, lipid profile and redox state on trained rats.

Palavras-chaves em inglês:

Mitochondrial biogenesis

Nitric oxide

L-arginine

Physical exercise

Superoxide dismutase

Titulação: Bacharelado em Educação Física

Banca examinadora:

Angelina Zanesco [orientador]

Mara Patrícia Traina Chakon-Mikahil

Data da defesa: 10-11-2011

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dra. Angelina Zanesco

Orientadora

Prof^a. Dra. Mara Patrícia Traina Chacon-Mikahil

Titular da banca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que tanto me apoiaram e me deram forças para conseguir chegar a mais esta vitória: aos meus pais Elizabeth e Carlos, meu irmão Felipe e ao meu namorado Thiago.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por tudo que é e sempre foi em minha vida.

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Angelina Zanesco, por toda paciência, ajuda e por confiar na minha capacidade para desenvolver esta pesquisa.

Às minhas co-orientadoras Fernanda Priviero, Maria Andréia Delbin e Ana Paula Davel. A ajuda e paciência de vocês foram imprescindíveis para que eu conseguisse aprender e desenvolver este trabalho.

Agradeço ao doutorando Paolo La Guardia e ao Prof. Dr. Aníbal Vercesi pela disponibilidade e colaboração.

Aos integrantes do laboratório de farmacologia da Unicamp por me ensinarem os passos básicos para aprender o que é pesquisar, em especial ao Julio, Fábio, Priscila, Bau, Celso, Luiz, Mário, Fernanda, Fabíola, Fabiano...entre tantos outros que estiveram dispostos a me ajudar sempre que precisei.

Aos integrantes do laboratório de fisiologia cardiovascular e saúde, coordenado pela Dra Angelina Zanesco, agradeço pelos conselhos e ajuda, em especial ao Carlos, Rodrigo, Iane e Guilherme.

Ao programa FAPESP pela verba disponibilizada para a conclusão da pesquisa.

Quero agradecer à Faculdade de Educação Física da Unicamp com todo o seu corpo docente e funcionários. Os anos de FEF serão inesquecíveis para mim.

Por fim, gostaria de agradecer aos amigos que conheci na FEF, que me proporcionaram momentos muitos felizes e inesquecíveis, além da ajuda nos momentos de sufoco, em especial ao Paulão, Anderson, Henrique, Catú, Felipão, Fábio, Nathasha, Karen, Giu, Grazi...e tantos outros que não estão nesta lista mas são muito especiais para mim.

A todos vocês...Muito obrigada!

VALGAS DA SILVA, Carmem Peres. **Efeitos da suplementação com L-Arginina na biogênese mitocondrial, tolerância ao esforço, perfil lipídico e estado redox em ratos treinados**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RESUMO

O exercício físico e o óxido nítrico (NO) desempenham uma importante função na biogênese mitocondrial pela ativação de alguns cofatores, dentre eles, os fatores de transcrição mitocondrial A (mtTFA), levando à formação de novas mitocôndrias no músculo esquelético e afetando diretamente o metabolismo energético. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do exercício físico aeróbio associado a suplementação de L-Arginina nos marcadores da biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmico de ratos Wistar. Avaliamos também a tolerância ao esforço físico, glicemia, perfil lipídico, e estado redox. **Métodos:** Ratos Wistar foram divididos em grupos sedentários sem e com L-Arginina (SD; SD/LA, respectivamente) e grupos treinados sem e com suplementação (TR; TR/LA, respectivamente). Um programa de exercício físico aeróbio foi realizado em sessões de 60 min., 5 dias na semana durante 8 semanas. A L-Arginina foi administrada de forma oral, por gavagem (62,5 mg/ml/dia/rato) no mesmo período. Testes de esforço com velocidade incremental até a exaustão foram realizados na primeira, quinta e oitava semanas de estudo. Glicose sanguínea, perfil lipídico e malondialdeído (MDA) foram medidos por kits comerciais. As expressões protéicas de mtTFA; ATP sintase C; CuZn-Superóxido dismutase; Mn-Superóxido Dismutase e NO sintase neuronal (nNOS) foram medidas no citoplasma e extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico pela técnica de Western Blot. **Resultados:** Houve significativa queda nos valores plasmáticos de triglicérides em ambos os grupos TR e TR/LA comparado aos grupos SD e SD/LA sem alteração nos níveis de HDL-C entre os grupos. A glicemia do grupo TR foi diminuída em relação aos animais sedentários. Houve mudanças significativas nos valores de MDA no grupo SD/LA em relação a SD. A combinação exercício físico e suplementação de L-Arginina promoveu aumento significativo tanto no citoplasma quanto no extrato de mitocôndrias nas expressões de mtTFA e MnSOD, já o grupo treinado apresentou aumento significativo somente para a CuZnSOD. A enzima ATP sintase C apresentou tendência de modificação em todos os grupos em relação a SD, mas com diferenças significativas apenas no grupo TR/LA. Os valores de NOx foram significativamente aumentados no grupo TR/LA em relação a SD e SD/LA. **Conclusões:** A associação treinamento físico e suplementação com L-Arginina promoveu aumento na biogênese mitocondrial a partir do aumento da expressão de seu principal fator de transcrição, a mtTFA; promoveu melhoria no perfil antioxidante caracterizado pelos valores aumentados da superóxido dismutase. Além disso, o treinamento associado à suplementação de L-Arginina aumentou a tolerância ao esforço de ratos treinados.

Palavras chaves: Mitocôndria; L-Arginina; Óxido nítrico; Exercício Físico

VALGAS DA SILVA, Carmem Peres. **Effects of L-Arginine supplementation on mitochondrial biogenesis, exercise tolerance, lipid profile and redox state in trained rats.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação - Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ABSTRACT

Exercise and nitric oxide (NO) plays an important role on mitochondrial biogenesis through the activation of some cofactors, among them the mitochondrial transcription factor A (mtTFA), leading to the formation of new mitochondria in skeletal muscle and directly affects the energy metabolism. **Objective:** The objective of this study was to investigate the effects of aerobic physical exercise associated with L-arginine supplementation on markers of mitochondrial biogenesis in gastrocnemius muscle of male Wistar rats. We also evaluated the tolerance to physical exercise, blood glucose, lipid profile, and redox state. **Methods:** Male Wistar rats were divided into sedentary groups with and without L-Arginine (SD, SD / LA) and trained groups with and without supplementation (TR, TR / LA). An aerobic exercise program was conducted in sessions of 60 min. 5 days a week for 8 weeks. Exercise tolerance tests with incremental speed to exhaustion were performed in the first, fifth and eighth weeks of study. L-Arginine was administered orally from gavage (62.5 mg / ml / day / mouse) in the same period. Blood glucose, lipid profile and malondialdehyde (MDA) were measured using commercial kits. The protein expression of mtTFA, ATP synthase C-CuZn Superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase and neuronal NO synthase (nNOS) were measured in the cytoplasm and mitochondria-enriched extract of the gastrocnemius muscle by Western Blot. **Results:** A significant decrease in plasma levels of triglycerides in both groups TR and TR / LA compared to SD and SDLA, and there was no significant increase in HDL-C between groups. The glucose group TR was decreased compared to sedentary animals. There were significant changes in MDA values in SD/LA group in relation to SD. The combination of exercise and L-arginine supplementation promoted a significant mtTFA and MnSOD increase in both the cytoplasm and mitochondria-enriched extract and expression as the trained group showed significant increase in CuZnSOD. The enzyme ATP synthase C tended to change in all groups compared to SD, but with significant differences only in group TR/LA. NOx levels were significantly increased in group TR/LA in relation to SD and SD/LA. **Conclusion:** The association training and supplementation with L-Arginine can lead to increased mitochondrial biogenesis by the increased expression of its major transcription factor, the mtTFA; improved the antioxidant profile characterized by increased levels of superoxide dismutase, in addition, training associated with L-Arginine supplementation increased the exercise tolerance of trained rats.

Key words: Mitochondrial biogenesis; L-Arginine; Nitric Oxide; Physical exercise

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Fornecimento de energia celular.....	p.15
FIGURA 2 - Representação esquemática da síntese de novas mitocôndrias.....	p.17
FIGURA 3 - Biogênese mitocondrial induzida por atividade contrátil.....	p.19
FIGURA 4 - Formação do óxido Nítrico.....	p.23
FIGURA 5 - Funções metabólicas do óxido Nítrico.....	p.25
FIGURA 6 - Via da Biogênese mitocondrial ativada pelo NO.....	p.26
FIGURA 7 - Interação NO e AMPK na regulação da PGC-1 α	p.28
FIGURA 8 - Administração oral de L-Arginina.....	p.33
FIGURA 9 - Treinamento de corrida em esteira.....	p.34
FIGURA 10 - Evolução do peso corporal.....	p.39
FIGURA 11 - Massa da gordura epididimal.....	p.40
FIGURA 12 - Ingestão alimentar.....	p.40
FIGURA 13 - Tolerância ao esforço.....	p.42
FIGURA 14 - Rendimento dos grupos TR e TR/LA no teste de esforço 3.....	p.42
FIGURA 15 - Valores de glicemia de jejum.....	p.43
FIGURA 16 - Valores de triglicérides plasmáticos.....	p.44
FIGURA 17 - Valores de colesterol total.....	p.44
FIGURA 18 - Valores de HDL plasmático.....	p.45
FIGURA 19 - Expressão da mtTFA no músculo esquelético.....	p.45
FIGURA 20 - Expressão da ATP sintase C no músculo esquelético.....	p.46
FIGURA 21 - Expressão da nNOS no músculo esquelético.....	p.47
FIGURA 22 - Expressão da eNOS no citoplasma muscular.....	p.48
FIGURA 23 - Valores de nitrito e nitrato plasmáticos.....	p.48
FIGURA 24 - Expressão da CuZnSOD e MnSOD no músculo esquelético.....	p.49
FIGURA 25 - Valores plasmáticos de malondialdeído.....	p.50
FIGURA 26 – Resumo dos resultados e conclusões.....	p.56
TABELA 1 – Sumário dos resultados obtidos.....	p.56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC – Acetil-CoA carboxilase	ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Acetil-CoA - Acetil-coenzima A	eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
Acil-CoA – Colesterol aciltransferase	ERN – Espécie reativa de nitrogênio
AICAR - 5-aminoimidazole - 4 carboxamide-1- β -D-ribonucleoside	ERO – Espécie reativa de oxigênio
AGAT – Amidinotransferase da glicina	ETC – Cadeia de transporte de elétrons
AMP – Adenina monofosfato	FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
AMPK – Proteína quinase ativada pelo AMP	FADH ₂ - Flavina adenosina dinucleotídeo;
ANOVA – Análise de variância	FCM – Faculdade de Ciências Médicas
ASL – Liase argininosuccinato	FMN – Flavina mononucleotídeo
ASS – Sintetase do argininosuccinato	GH – Hormônio do crescimento
ATP - Trifosfato de adenosina	GLUT4–Transportador de glicose tipo 4
BH ₄ – Tetrahidrobiopterina	GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
BSA – Albumina sérica bovina	GPAT – Glicerol-fosfato aciltransferase
Ca ₂₊ – Cálcio	GPx – Glutathione peroxidase
CaMK – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina	HCL – Ácido clorídrico
CAT – Catalase	HDL – Lipoproteína de alta densidade
CEMIB - Centro Multiinstitucional de Bioterismo	HSL – Lipase hormônio sensível
CO ₂ - Dióxido de carbono	iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
CPT-1–Carnitina palmitoil transferase 1	KCL – Cloreto de potássio
CT – Colesterol total	KH ₂ PO ₄ – Hidrogenofosfato de potássio
CuZnSOD – Superóxido dismutase cobre-zinco	L-Arg – L-Arginina
DNA – Ácido desoxirribonucleico	LCAT - Lecitina-colesterol aciltransferase
DTT – Ditioneitol	LDL – Lipoproteína de baixa densidade
ECL - Enhanced chemiluminescence	L-NAME - N ⁰ -nitro-L-arginine methyl ester
EGTA - Ethylene glycol tetraacetic acid	Malonil-CoA – Malonil- coenzima A

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno	SD – Grupo sedentário
MDA – Malondialdeído	SD/LA – Grupo sedentário + L-Arginina
MFEL – Máxima fase estável de lactato	SDS – Sulfato de sódio
MnSOD – Manganês superóxido dismutase	SOD – Superóxido dismutase
mRNA – RNA mitocondrial	TAG – Triglicerídeo
mtDNA - DNA mitocondrial	TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
MtTFA – Fator de transcrição mitocondrial A	TBS-T – Tris buffered saline Tween-20
NaCl – Cloreto de sódio	TCA – Ciclo do ácido tricarbóxico
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo	TFAM – fator de transcrição mitocondrial A
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal	TIM – Translocase de membrana interna
NO - Óxido Nítrico	TOM – Translocase de membrana externa
NO ₂ - - Ânion nitrito	TR – Grupo treinado
NO ₃ - - Ânion nitrato	TR/LA – Grupo treinado + L-Arginina
NOS – Óxido nítrico sintase	UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
NO _x – Nitrito e nitrato	UTR – Região não traduzida 3´
NRF-1 – Fator respiratório nuclear 1	VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
NRF-2 – Fator respiratório nuclear 2	
O ₂ - - Ânion superóxido	
PGC-1 α - coativador 1 α do receptor gama ativado pelo peroxisoma proliferador	
pH - Potencial de hidrogênio iônico	
PKG – Proteína quinase G	
PVDF – Polivinil difluorida	
RBP – Proteínas ligadas ao RNA	
ROS – Reactive oxygen species	

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	p.13
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	p.14
2.1 - A mitocôndria.....	p.14
2.2 - A via da biogênese mitocondrial.....	p.16
2.3 - Exercício físico e biogênese mitocondrial.....	p.17
2.4 – Exercício físico aeróbio: Ação na glicemia, perfil lipídico, peso corporal e defesa antioxidante.....	p.20
2.5 – Óxido nítrico e biogênese mitocondrial.....	p.23
2.6 – Óxido nítrico: ação na glicemia, perfil lipídico, peso corporal e defesa antioxidante.....	p.27
2.7 – L-Arginina.....	p.29
3– HIPÓTESE.....	p.30
4-OBJETIVO GERAL.....	p.31
4.1 – Objetivos específicos.....	p.31
5 - METODOLOGIA.....	p.33
5.1 – Animais.....	p.33
5.2 – Grupos experimentais.....	p.33
5.3 – Suplementação oral com L-Arginina.....	p.33
5.4 – Programa de treinamento físico: Corrida em esteira.....	p.34
5.5 – Teste de esforço.....	p.35
5.6 – Peso corporal e consumo alimentar.....	p.35
5.7 – Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	p.35
5.7.1 – Perfil lipídico.....	p.35
5.7.2 – Determinação nas concentrações de nitrito e nitrato (NO _x ⁻) em tecido muscular e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	p.36
5.8 – Obtenção do extrato enriquecido de mitocôndrias.....	p.36
5.9 – Avaliação da biogênese mitocondrial por Western Blot.....	p.37
5.9.1 – Eletroforese e transferência das amostras.....	p.37
5.9.2 – Incubação com os anticorpos e determinação das proteínas de interesse.....	p.38
6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	p.38

7- RESULTADOS.....	p.39
8- DISCUSSÃO.....	p.51
9- CONCLUSÕES.....	p.57
9.1 Perspectivas.....	p.57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	p.58
ANEXO A.....	p.68

1-INTRODUÇÃO

O sedentarismo há muito tempo tem sido considerado um dos fatores de risco para a mortalidade prematura (BLAIR et. al., 1996). Estudos epidemiológicos têm demonstrado grande relação entre sedentarismo e a presença de fatores de risco para doenças cardiovasculares como a obesidade, resistência à insulina, diabetes, dislipidemias e hipertensão arterial (LAKKA et al., 2003; RENNIE et al., 2003). O conjunto desses fatores é caracterizado como síndrome metabólica.

No músculo esquelético, a regulação da biogênese mitocondrial é particularmente importante porque as mitocôndrias possuem importantes funções no metabolismo (SCHRAUWEN, HESSELINK, 2004), sendo assim, a disfunção mitocondrial pode provocar diversas desordens que envolvem a produção de energia, como as observadas na síndrome metabólica. (ZANESCO, ANTUNES, 2007; DE MORAES et al., 2008).

A prática regular de exercícios físicos tem sido mostrada como benéfica em muitos parâmetros relacionados à saúde. Estes benefícios incluem melhora na função cardiovascular e metabolismo muscular, aumento da capacidade de trabalho muscular pelo aumento na captação de oxigênio e sua utilização pelas mitocôndrias do músculo esquelético e redução do peso corporal, resultados relacionados a melhorias no fluxo sanguíneo bem como de uma maior quantidade de mitocôndrias dentro da fibra muscular (HOOD, 2009). O exercício físico também está relacionado à melhora do perfil lipídico e redução da glicemia.

Considerando que as mitocôndrias desempenham importante função no metabolismo energético, é de grande relevância investigar as vias que controlam sua síntese e proliferação, e de que forma o exercício físico associado à suplementação alimentar pode interferir nesse processo.

Terapêuticas farmacológicas têm sido relacionadas como fatores contribuintes na prevenção da síndrome metabólica e aumento da biogênese mitocondrial, associadas à prática regular de exercícios físicos. Dentre estas estratégias, alguns estudos mostram as possíveis utilizações da L-arginina - precursora da molécula sinalizadora óxido nítrico (NO) - em associação ao exercício físico aeróbio como fatores de melhora da

função mitocondrial, prevenção de doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas (ZANESCO, ANTUNES, 2007).

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mitocôndria

A mitocôndria é uma organela celular que desempenha funções vitais no metabolismo de todo o organismo. Sua função primária consiste em produzir energia na forma de ATP pela enzima ATP sintase, processo que envolve duas vias metabólicas relacionadas: o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) e a cadeia de transporte de elétrons (POWERS, HOWLEY, 2000), a partir da oxidação de carboidratos, proteínas e β -oxidação de lipídios em um processo denominado respiração celular (ROGGE, 2009). O Ciclo de Krebs tem como objetivo finalizar a oxidação de carboidratos, lipídios e proteínas. Os processos de oxidação de substratos energéticos levam à produção de acetil-CoA que, no ciclo de Krebs, é totalmente oxidado e produz CO_2 e elétrons que são levados à Cadeia Respiratória para a produção aeróbia de ATP (POWERS, HOWLEY, 2000). O fornecimento de energia celular é um processo complexo e envolve múltiplos mecanismos, um resumo é apresentado na figura abaixo (figura 1).

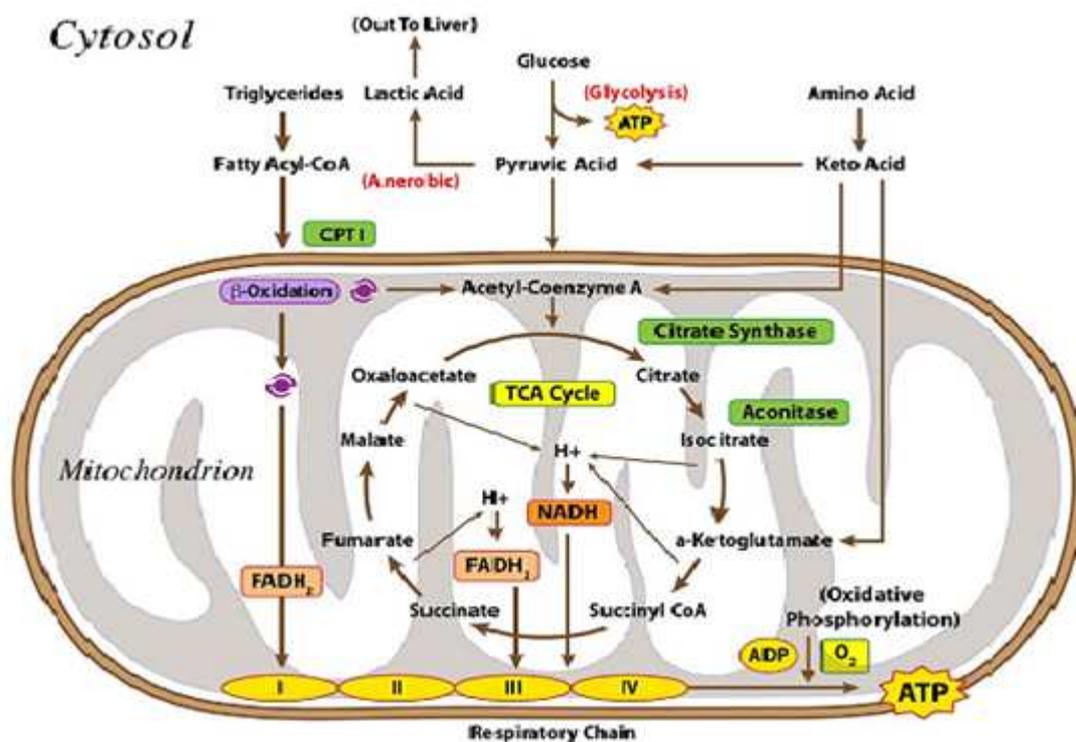


FIGURA 1. Fornecimento de energia celular. Energia é formada dentro das células através do processamento de substratos vindos da alimentação através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou através da β -oxidação de ácidos graxos. A formação de trifosfato de adenosina (ATP) é dirigida por uma série de reações enzimáticas que liberam elétrons de fontes de carboidratos, gorduras e proteínas e doam estes elétrons para a formação de ligações de fosfato de alta energia para ATP utilizável. A β -oxidação de ácidos graxos envolve uma série de quatro etapas, semelhantes às do ciclo TCA, que são repetidas até todos os carbonos do canal de ácidos graxos Acil-CoA sejam convertidos para Acetil-CoA. O direcionamento de um substrato energético ser utilizado para a produção de ATP ou síntese de gorduras ou armazenamento é dependente do Malonil-CoA. Se o citrato aumenta no citosol, mais malonil-CoA é formado e os ácidos graxos são sintetizados para armazenamento.

Fonte: Adaptado de Rogge (2009).

A mitocôndria não é uma organela estática, ela está em constante alteração dentro das células, sendo que a variação de sua massa, quantidade e tamanho é desencadeada por uma série de estímulos fisiológicos, dentre esses, o exercício físico e o óxido nítrico (NISOLI et. al., 2008; VIÑA et. al., 2009).

2.2 A via da biogênese mitocondrial

O controle celular sobre as mudanças adaptativas na quantidade de mitocôndrias requer a capacidade de detectar a necessidade de produção adicional de energia mitocondrial, seguida pelo desencadeamento de vias de sinalização que resultarão em um aumento da expressão de genes para a formação de novas mitocôndrias na célula (CLEMENTI, NISOLI, 2005). O processo de biogênese mitocondrial é complexo, uma vez que a mitocôndria é derivada de genomas nucleares e mitocondriais (HOOD, 2009). Diferentes estímulos, como a ativação simpática, o exercício físico, a queda da temperatura corporal, as espécies reativas de oxigênio, entre outros estímulos podem ativar a biogênese mitocondrial (NISOLI et. al., 2003; NISOLI, 2008; HOOD, 2009; KOWALTOWSKI et. al., 2009). Como apresentado na figura 2, a biogênese mitocondrial ocorre através da ativação do coativador 1α do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxisoma, o PGC- 1α – (Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator (PGC)-1). O PGC- 1α é uma proteína reguladora de uma variedade de processos metabólicos, incluindo a formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos e no coração, bem como o controle da β -oxidação mitocondrial (LIN et. al., 2005, SILVEIRA et. al., 2006), e também controla a resposta celular ao stress oxidativo (ST-PIERRE et. al., 2006). Na biogênese mitocondrial, a PGC- 1α interage com fatores respiratórios nucleares (NRF-1 e NRF-2), os quais são conhecidos reguladores do processo de transcrição e replicação mitocondrial. Com maior importância, o NRF-1 que ativa, entre outras enzimas, o fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA ou TFAM), que é um potente estimulador da duplicação do DNA mitocondrial (VIÑA, 2009).

Todas as proteínas que regulam a transcrição e replicação do DNA mitocondrial são codificadoras nucleares e requerem entrada na organela. Provavelmente a mais importante dessas proteínas a serem transportadas é a mtTFA. A entrada das proteínas para a mitocôndria é um processo complexo que envolve transportadores de proteínas que ficam em compartimentos submitocondriais. Essas proteínas transportadoras são principalmente as Translocases de Membrana Externa, (ou complexo TOM), e as Translocases de Membrana Interna (ou complexo TIM). Na matriz mitocondrial, a

mtTFA leva a um aumento no número de cópias do DNA presente na célula e à replicação da mitocôndria (HOOD, 2009; VIÑA, 2009).

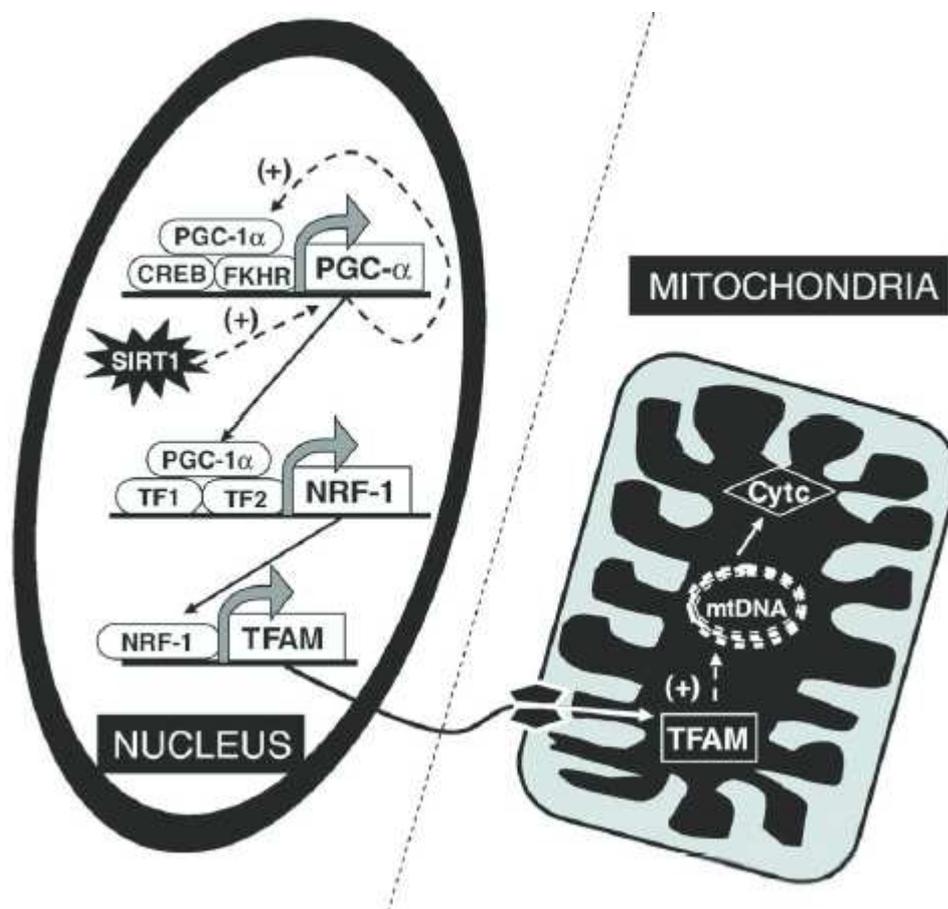


FIGURA 2. Representação esquemática da síntese de novas mitocôndrias.

Fonte: Adaptado de Viña et al., (2009).

2.3 Exercício Físico e Biogênese Mitocondrial

O exercício é um dos estimuladores do processo da biogênese mitocondrial através da ativação de diversas vias de sinalização, como o ciclo de cálcio, turnover de ATP, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção e consumo de oxigênio, ativação de quinases e fosfatases, e pela produção e a modificação de proteínas pós-translacionais (LJUBICIC, HOOD, 2008). Muitas quinases, incluindo a proteína

quinase ativada pelo AMP (AMP-activated protein kinase, AMPK), são ativadas pelo exercício físico. A AMPK age como um “sensor” de energia celular e é ativada por um aumento da formação de AMP através do consumo de ATP, desempenhando diversas ações no metabolismo (KAHN et al., 2005). Assim, a AMPK vai estimular a PGC-1 α , que elevará a atividade dos fatores de transcrição nuclear NRF-1 e NRF-2 o que acarretará aumento nos fatores de transcrição mitocondrial e aumento na biogênese mitocondrial (IRRCHEER et. al., 2008; HOOD, 2009). Um distúrbio metabólico produzido por um tratamento crônico de animais com ácido β -guanidinopropiônico, o qual reduz os níveis celulares de ATP, leva a um aumento nos níveis de NRF-1 ligado subsequente a um aumento do volume e das proteínas mitocondriais (BERGERON et al., 2001; CLEMENTI, NISOLI, 2005). Este tratamento causa também um aumento na quantidade de AMPK – devido à redução da disponibilidade de ATP – mostrando a importância da ação da AMPK sobre a sinalização da biogênese mitocondrial. No músculo esquelético, a ativação desta enzima está associada com o aumento dos níveis de NRF-1, e ao aumento da densidade mitocondrial, o que sugere que uma diminuição dos níveis celulares de ATP aumenta a sinalização para a produção de novas mitocôndrias (BERGERON et al., 2001). Assim, a via de ativação AMPK/ NRF-1 é um importante regulador da biogênese mitocondrial em resposta ao exercício físico. A figura 3 mostra a ativação das vias da biogênese mitocondrial pela atividade contrátil muscular.

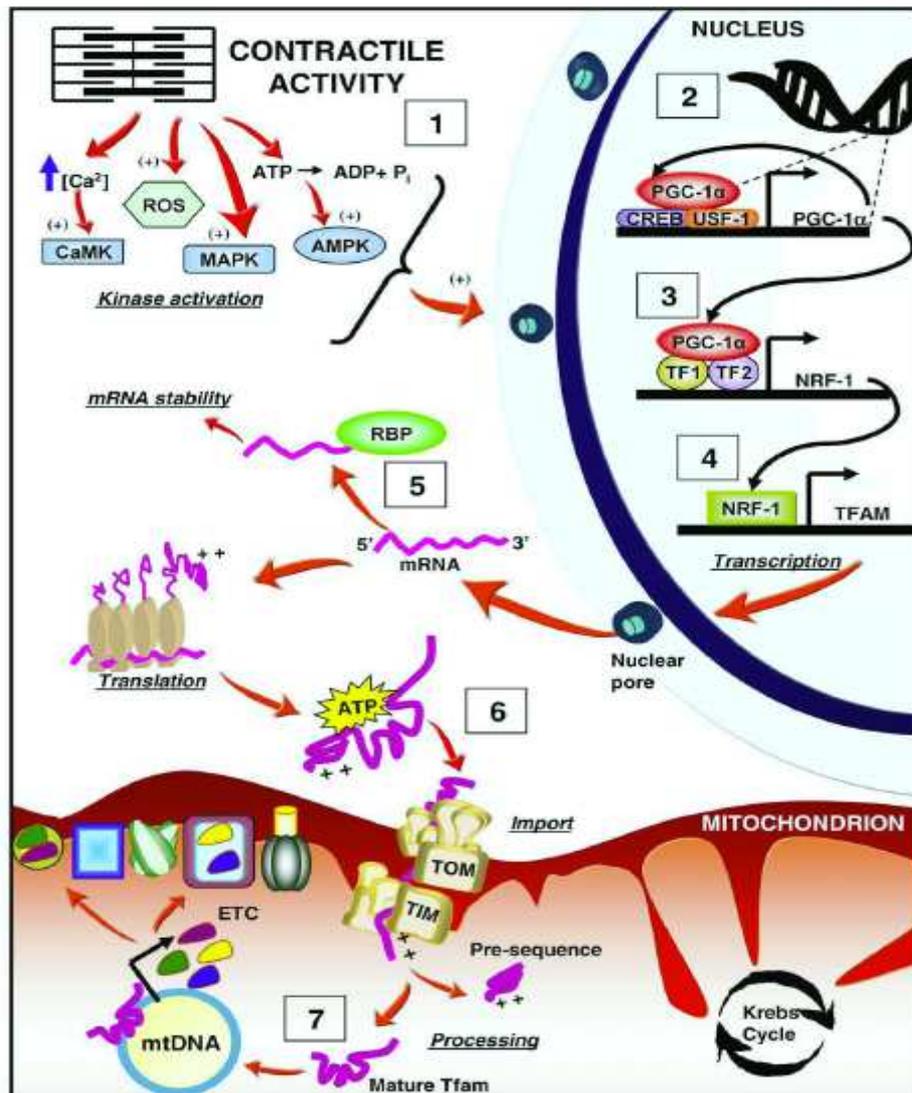


FIGURA 3. Biogênese mitocondrial induzida por atividade contrátil. (1) Uma única sessão de atividade contrátil resulta na ativação de múltiplas vias de moléculas de sinalização e quinases. Elevação no cálcio intracelular está associada com a subsequente ativação da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e AMP quinase (AMPK) também constituem diversas disposições de vias de sinalização que são elevadas pela atividade contrátil. (2) Essas múltiplas cascatas de sinalização induzem a ligação de fatores de transcrição à região promotora do PGC-1 α e obtém sua transcrição. A PGC-1 α auto regula sua própria transcrição e (3) se liga à região promotora de seus genes alvo como os fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) e estimula sua expressão. (4) NRF-1 trans-ativa genes codificadores nucleares codificando proteínas destinadas à mitocôndria como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM). (5) Estas proteínas destinadas às mitocôndrias são transcritas no núcleo e exportadas para o citoplasma onde o mRNA transcrito poderá ser estabilizado ou desestabilizado para a ligação das proteínas ligadas ao RNA (RBP) para a região não traduzida 3' (UTR) do mRNA. (6) Após a tradução, muitas proteínas mitocondriais são sintetizadas como proteínas precursoras com cliváveis pré-seqüências N-terminais. Estas são importadas pelas maquinarias de importação proteica que consistem nas translocases da membrana externa (TOM) e translocases de membrana interna, (TIM). Uma vez importadas, as proteínas precursoras são processadas para produzir a forma madura. (7) TFAM, um fator de transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA), pode induzir a expressão de proteínas codificadas mtDNA que, juntamente com DNA nuclear transcrita proteínas, são montadas para formar complexos de multisubunidades que se tornam parte da cadeia de transporte de elétrons (ETC).

Fonte: Adaptado de Ljubicic et al., (2008).

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

2.4 Exercício físico aeróbio: Ação na glicemia, perfil lipídico, peso corporal e defesa antioxidante

O exercício físico aeróbio é também conhecido como uma forma de prevenção para a síndrome metabólica (DURSTINE, HASKELL, 1994; WAREHAM et al., 1998), pois age diretamente em seus fatores de risco como alterações da tolerância a glicose, hipertensão arterial e dislipidemias. Vários trabalhos mostram que o exercício aeróbio é capaz de promover perda de peso através do aumento do gasto energético e maior utilização dos substratos energéticos pelas mitocôndrias (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2001; CIOLAC, GUIMARÃES, 2004). O aumento da atividade simpática no exercício pode também aumentar a oxidação de ácidos graxos em relação ao uso de carboidratos, visto que a adrenalina estimula o aumento da lipólise (SMITH et al., 2000). O exercício físico é conhecido por aumentar o conteúdo mitocondrial, melhorando a capacidade do tecido para o consumo de oxigênio e formação de ATP.

Muitos estudos têm demonstrado relação direta entre atividade física, menor resistência à insulina e aumento do transporte de glicose no músculo esquelético independente de insulina. Durante o exercício, o transporte de glicose na célula muscular aumenta, assim como a sensibilidade da célula à ação da insulina. Muitos fatores determinam a maior taxa de captação da glicose como, por exemplo, maior circulação sanguínea (débito cardíaco aumentado e liberação de fatores relaxantes dependentes de endotélio – como o NO), permitindo que este substrato seja utilizado pela musculatura (IRIGOYEN et al., 2003; ZAGO, ZANESCO, 2006). O transporte de glicose no músculo esquelético ocorre principalmente por difusão facilitada, através de proteínas transportadoras (GLUT's) cujos principais ativadores são a insulina e o exercício físico. Existem evidências de que o exercício físico aumenta o transporte de glicose para o músculo esquelético através da translocação da GLUT 4, e isso acontece com a presença ou não de insulina (HIRSHMAN et al., 1998), um dos mecanismos pelo qual o exercício promove o aumento da captação de glicose pelo músculo é através da ativação da AMPK, sendo que esta estimula a translocação do GLUT-4 e transporte da glicose no músculo esquelético (LI et al., 2004), mostrando que o exercício é eficaz na utilização de glicose pelo músculo em pessoas saudáveis e/ou com resistência à insulina. O exercício apresenta tanto um efeito agudo quanto crônico sobre a sensibilidade à insulina, o que reforça a necessidade da prática de atividades físicas com regularidade (PERSGHIN et al., 1996).

Além de seus efeitos sobre a captação da glicose, os efeitos do exercício físico sobre o perfil lipídico e lipoproteínas também são bem conhecidos. Os indivíduos fisicamente ativos apresentam maiores valores de HDL colesterol e menores valores de triglicerídeos, LDL e VLDL colesterol, se comparado às pessoas sedentárias (DURSTINE, HASKELL, 1994; CIOLAC, GUIMARÃES, 2004). Essa melhora é atribuída a vários fatores, dentre eles, observamos que o exercício físico aumenta a atividade da enzima lípase lipoprotéica, ampliando a capacidade do músculo esquelético de consumir ácidos graxos (BLOMHOFF, 1992). O exercício físico também aumenta a atividade da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) que tem a função de formar HDL colesterol a partir do colesterol livre (FORTI, DIAMENT, 2006). Além disso, pela ativação da AMPK há a ativação da HSL (lipase hormônio sensível) que é responsável pelo aumento da hidrólise de TAG no tecido adiposo (TANSEY et al., 2004). Através da AMPK há também a inibição de vias que ativariam a lipogênese e

diminuição da lipólise, no caso a inativação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) enzima que muda o excesso de acil-CoA para malonil-CoA (uma molécula que é convertida para a síntese de ácidos graxos e é um inibidor alostérico da CPT-1) -. Como resultado, o nível de malonil-CoA é diminuído em resposta à AMPK, aumentando a atividade da CPT-I (carnitina palmitoil transferase I - enzima que é responsável pela transferência de ácidos graxos de cadeias longas para a entrada na mitocôndria para β -oxidação) e estimulando a oxidação de ácidos graxos no fígado (WINDER et al., 1996; WELS et al., 2005). Mais ainda, a AMPK também inativa a glicerol-fosfato-acil transferase (GPAT), que é uma enzima que participa da produção de TAG. A longo prazo, a AMPK atua diminuindo a expressão de genes lipogênicos e neoglicogênicos (ZHOU et al., 2001).

Substâncias oxidantes e antioxidantes são geradas em vários processos de reações de óxido-redução, onde a oxidação implica em perda de elétron e a redução, em ganho. Sendo que a geração e a ação de substâncias oxidantes e antioxidantes dependem desse sistema de óxido-redução, muitos autores têm atualmente usado o termo desequilíbrio do sistema *redox* para se referir ao estresse oxidativo (SANTOS, TANAKA, WOSNIAK, et al., 2009 ; FERREIRA et al., 2011). Nosso organismo, constantemente produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), e essa produção é aumentada no exercício, como citado anteriormente. Fisiologicamente, as EROs e ERNs são produzidas em baixas concentrações e funcionam como sinalizadores moleculares para manter a integridade vascular e como reguladores da função endotelial (TOUYZ, 2004 ; RUSH et al., 2005;). Por outro lado, temos um eficiente sistema antioxidante, que inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que possui a função de dismutar o ânion superóxido (O_2^-) - ERO que possui um alto poder de destruição celular através da peroxidação lipídica de suas membranas celulares - em peróxido de hidrogênio e água (ZAGO, KOKUBUN, BROWN, 2009). As SODs são encontradas no citoplasma (CuZnSOD) e também nas mitocôndrias (MnSOD). Nosso organismo possui também outras importantes enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). No entanto, em algumas condições patológicas como a obesidade, diabetes, dentre outras, há uma produção elevada de EROs, onde o sistema antioxidante não consegue combater, e muitas vezes se encontra reduzido (ANTUNES NETO, PAULA, 2011; FERREIRA et al., 2011). Essa produção elevada pode resultar em danos oxidativos nas membranas celulares e DNA de diversas células e organelas, como nas

mitocôndrias, levando à diminuição de sua capacidade de trabalho e à exacerbação de processos patológicos.

Alguns trabalhos mostram também a ação benéfica do exercício físico no aumento de algumas enzimas antioxidantes no músculo esquelético, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), sendo essa uma adaptação visível já em 5 semanas de treinamento de corrida de intensidade moderada em seres humanos (MAJERCZAK et al., 2010).

2.5 Óxido Nítrico e Biogênese mitocondrial

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

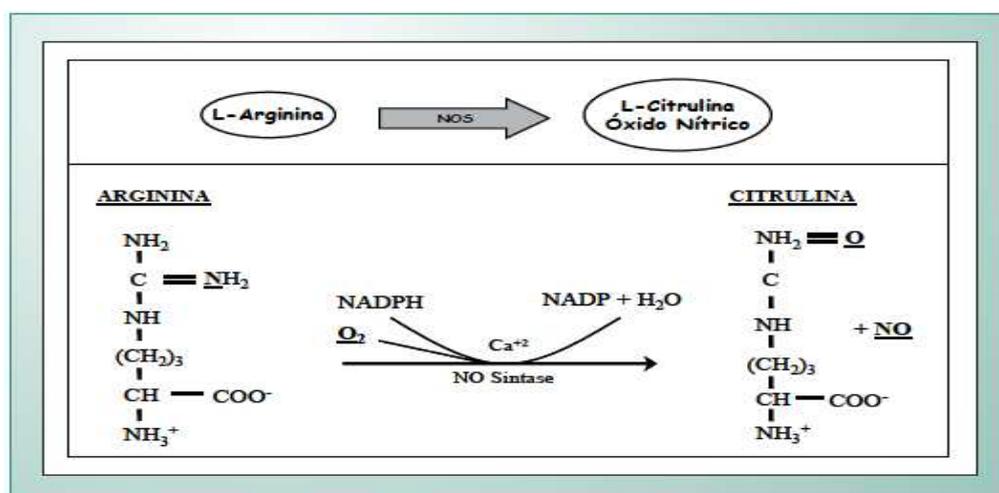


FIGURA 4. Formação no Óxido Nítrico. Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase.

Fonte: Adaptado de Zago, ZanESCO (2006).

Existem 3 isoformas de NOS: a eNOS, localizada principalmente nas células endoteliais, onde se encontra primeiramente na membrana plasmática e citoplasma da célula; nNOS, descoberta inicialmente nos tecidos nervosos, é localizada na mitocôndria e no citoplasma celular; e a iNOS, a qual foi inicialmente encontrada por ser induzível sobre certas condições patológicas nos macrófagos e hepatócitos, é localizada no citoplasma (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Além disso, uma isoforma de NOS mitocondrial, provavelmente a nNOS, tem sido descrita como uma proteína constitutiva no interior da membrana mitocondrial que gera NO na reação Ca_2^+ dependente (GHAFOURIFAR, CADENAS, 2005). A síntese de NO não é regulada unicamente pela quantidade de NOS, e sim pela disponibilidade de cofatores que participam desta síntese -NADPH, BH_4 , cálcio e L-Arginina. (WU, MENINGER, 2002).

O óxido nítrico é uma molécula pequena, relativamente instável. É um radical livre que, dependendo da sua quantidade pode ter efeitos benéficos ou maléficos para o organismo. O NO liga-se à guanilato ciclase solúvel (que é o maior receptor para níveis fisiológicos de NO), esta ligação ativa o segundo mensageiro GMPc que realiza suas funções através da ativação da proteína kinase dependente de GMPc, a PKG. (RUSSWURN, KOESLING, 2002). Na musculatura lisa vascular a PKG reduz os níveis de cálcio intracelular, levando ao relaxamento das fibras musculares lisas.

Entre as funções metabólicas do NO em concentrações fisiológicas no organismo, mostradas na figura 5 temos: o aumento da oxidação de ácidos graxos por reduzir a disponibilidade de malonil-CoA, redução da síntese de triacilgliceróis por inibição da GPAT (enzima que regula a síntese de triacilglicerol), elevação da lipólise basal; estimulação do transporte de glicose nos músculos esqueléticos e tecido adiposo aumentando a oxidação de glicose, redução da síntese de glicogênio hepático e da lipogênese no tecido adiposo (JOBGEN et al., 2006).



FIGURA 5. Funções metabólicas do óxido Nítrico. Funções metabólicas onde o NO está envolvido.

Fonte: Modificado de Jobgen et al., (2006)

Na mitocôndria, o NO age em diversos níveis, devido sua propriedade vasodilatadora, ele regula o fluxo sanguíneo para vários tecidos, e por isso indiretamente aumenta a disponibilidade de substratos respiratórios para a mitocôndria. Sendo que o exercício físico aumenta a disponibilidade de NO induzido pelo *shear stress* (KINGWELL, 2000). Além disso, o NO regula diretamente a ligação do oxigênio e sua liberação pela hemoglobina (WOLZT et. al., 1999). O NO também tem sua função na adaptação à hipóxia. Em situações de baixas concentrações de oxigênio, o NO liga-se de forma reversível ao citocromo c oxidase, competindo com o oxigênio, modulando a fosforilação oxidativa levando a uma melhor redistribuição do oxigênio às células vizinhas (CLEETER et. al., 1994; BROWN, COOPER, 1994; SCHWEIZER, RICHTER, 1994; CLEMENTI et. al., 1999; HAGEN et. al., 2003; MONCADA, BOLANOS, 2006). O NO, por fim, possui efeitos benéficos na formação de novas mitocôndrias, sendo que a biogênese mitocondrial induzida pelo NO é considerada um sistema de regulação do metabolismo celular a longo prazo (CLEMENTI, NISOLI, 2005). Tratamento com doadores de NO aumenta a quantidade de mitocôndrias. Este processo é mediado via ativação do GMPc, que ativa a expressão de PGC-1 α , a qual em

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

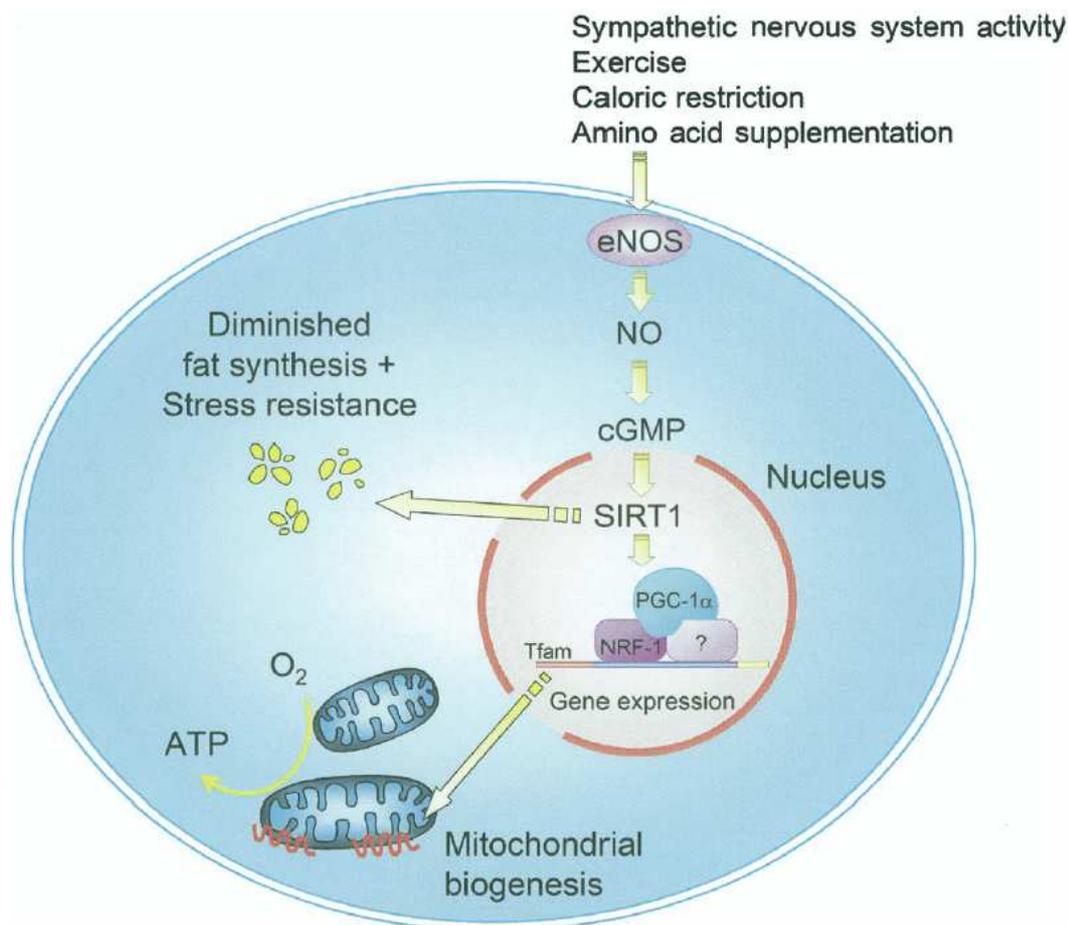


FIGURA 6. Via da biogênese mitocondrial ativada pelo NO. Diferentes estímulos, incluindo a ativação do sistema nervoso simpático, atividade física, restrição calórica e suplementação de aminoácidos, em especial a L-Arginina, podem induzir à produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) através de um aumento nos níveis da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nos músculos esqueléticos e cardíacos. Os genes mitocondriais envolvidos na biogênese mitocondrial são ativados como consequência, levando ao aumento da biogênese mitocondrial e do aumento da produção de ATP.

Fonte: Adaptado de Nisoli et al., (2005).

O NO é assim um sinalizador para a biogênese mitocondrial, em ação coordenada com a mitocôndria para atender as necessidades de energia da célula (WU et. al., 1999; NISOLI et. al., 2003; NISOLI et. al., 2004). A suplementação na dieta com L-arginina,

a qual aumenta a concentração sérica de NO e PGC-1 α tem sido mostrada como uma possibilidade para aumentar a expressão de NOS endotelial e produção de NO, levando à melhora da biogênese mitocondrial (NISOLI et. al., 2008). O exercício físico é também um dos estimuladores para a produção de NO, sendo uma das vias para a biogênese mitocondrial a sua ativação através do exercício, como mostrado na figura 6. No entanto, não encontramos trabalhos relacionando a suplementação de L-Arginina com o treinamento aeróbio crônico na expressão das proteínas mitocondriais.

2.6 Óxido Nítrico: Ação na glicemia, perfil lipídico, peso corporal e defesa antioxidante

Como citado anteriormente, o NO em condições basais tem a capacidade de otimizar a β -oxidação de ácidos graxos pelo músculo esquelético, aumentando a lipólise e diminuindo a lipogênese, acarretando redução da massa gorda em ratos (FRUHBECK, GOMEZ-AMBROSI, 2001; JOBGEN et al., 2006).

Há evidências que o NO potencializa a captação de glicose pelo músculo esquelético durante a contração (McCONNELL, WADLEY, 2008), podendo contribuir em conjunto com a atividade física para prevenir a hiperglicemia em indivíduos com resistência à insulina. O NO também pode mediar o efeito da insulina na estimulação do transporte da glicose no músculo esquelético (JOBGEN et al., 2006), mecanismo dependente da regulação da expressão de GLUT-4 via ativação da AMPK (LIRA et al., 2007). Estudos mostraram que a administração de N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS, prejudicou a secreção de insulina e resultou na reduzida tolerância à glicose em ratos (ROY et al., 1998) e humanos (LAAKSO et al., 1992). Níveis fisiológicos de NO estimulam a oxidação de glicose no músculo esquelético, caracterizando a importância de mais estudos utilizando o NO e o exercício em relação à utilização da glicose e glicemia.

Como podemos verificar, muitas ações no metabolismo atribuídas ao exercício e ao NO são semelhantes e estão interligadas. Isso pode ser exemplificado pelo fato que o exercício é um poderoso estímulo para a produção de NO, tanto pela tensão de cisalhamento nas artérias durante o exercício (*shear stress*) citado anteriormente, quanto pelo fato que há evidências que a AMPK controla a produção de NO (FRYER et al.,

2000). A eNOS é fosforilada pela AMPK que é estimulada durante o exercício físico (CHEN et al., 2003). A nNOS também é fosforilada pela AMPK durante o exercício, mecanismo associado ao aumento da captação de glicose no músculo (CHEN et al 2003; McCONNEL, KINGWELL, 2006). Logo, há também concretas evidências de que doadores de NO aumentam a atividade e expressão da AMPK (DESHMUKH et al., 2010), sendo assim, as vias para os efeitos do óxido nítrico e do exercício no metabolismo parecem estar interligadas (figura 7).

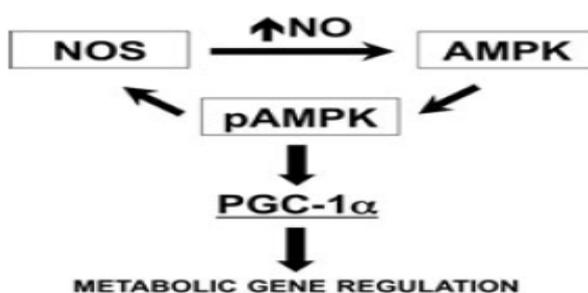


FIGURA 7. Interação NO e AMPK na regulação da PGC-1 α . Trabalho anterior promove evidências para propor um feedback positivo entre a produção de NO e a ativação da AMPK, que resulta no aumento da expressão da PGC-1 α , genes mitocondriais e GLUT-4. Embora tanto a AMPK quanto as enzimas NOS podem ser reguladas por múltiplos mecanismos, dados anteriores com inibidores da NOS sugerem que a inibição da NOS impede a estimulação da biogênese mitocondrial mediada por doadores de AMPK, como a AICAR.

Fonte: Modificado de Lira et al., (2010).

A partir da associação teórica do exercício e do óxido nítrico em vários parâmetros metabólicos, realizar uma pesquisa que avalie se a associação do exercício físico com a L-Arginina, que é o principal substrato para a produção do NO, potencializaria os efeitos benéficos na formação de novas mitocôndrias, perfil lipídico, peso corporal, tolerância ao esforço físico aeróbico e estado redox de animais é interessante para pensarmos novas formas de planejar um programa de atividades físicas visando a prevenção dos sintomas relacionados à Síndrome Metabólica.

2.7 L-Arginina

Sintetizada pelo organismo a partir do L-glutamato e L-glutamina, a L-Arg é um aminoácido não essencial que participa de diversas funções críticas no organismo, como a regulação do pH, a despolarização da membrana da célula endotelial, o metabolismo dos macronutrientes e no ciclo da uréia (MORRIS, 2007). Na última década, a L-Arg tornou-se largamente reconhecida no âmbito da pesquisa cardiovascular por ser a precursora para a síntese do óxido nítrico (COOKE, 2003).

Estudo recente mostra que a fadiga leva à redução dos níveis plasmáticos e cerebrais de arginina e outros aminoácidos, embora sem redução de seu conteúdo no músculo (JIN et al., 2009). A suplementação com L-Arg pode aumentar a biodisponibilidade do NO, e um estudo mostrou que a suplementação oral com L-Arg reduz a massa gorda e aumenta a expressão de genes chaves responsáveis pela oxidação de glicose e ácidos graxos (FU et al., 2005). O que sugere que a L-Arg pode contribuir para os mecanismos de β -oxidação e, portanto, melhorar a capacidade energética durante o exercício físico.

Existem quatro vias que competem para a utilização da L-Arginina, a via da sintase de NO (NOS) para a formação de NO e de citrulina; a via da descarboxilase da L-Arginina para a formação de agmatina, poliaminas, ureia e aldeídos; a via da amidinotransferase da glicina (AGAT) para a formação de creatina; e a via da arginase para a formação de ornitina, ureia, poliaminas, prolina e glutamato, além disso, a L-Arginina é um poderoso secretagogo de vários hormônios como GH, insulina, glucagon e prolactina (WU, MORRIS, 1998).

3-JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Prejuízos na função mitocondrial são observados em diversas desordens metabólicas que envolvem baixa produção de energia na forma de ATP e a alta ingestão calórica, como a obesidade, doença que acarreta diversas co-morbidades como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemias (ZANESCO, ANTUNES. 2007; MORAES et. al., 2008). Sabe-se que o exercício físico promove importantes adaptações no músculo esquelético exercitado, aumentando a quantidade de mitocôndrias ativas, o que aumenta sua capacidade de captação de oxigênio e de trabalho (HOOD, 2009). Além de melhorar parâmetros sanguíneos como a glicemia de jejum e o perfil lipídico, caracterizado, dentre outros, por aumento nos valores de HDL e redução dos triglicerídeos plasmáticos. Sendo assim, a consequente melhora da biogênese mitocondrial, do perfil lipídico, glicemia de jejum, redução do peso corporal, expressão de enzimas antioxidantes, como a SOD, e aumento da tolerância ao esforço físico induzida pelo exercício físico somada a uma suplementação que permita maior produção de NO – que conhecidamente age benéficamente nestes fatores - também pode trazer benefícios à saúde, pois promoveria energia para manter a função celular normal (VIÑA et. al., 2009). Dessa forma, investigar terapêuticas alternativas que permitam uma melhor função celular e utilizá-las como prevenção e/ou tratamento de desordens endócrino-metabólicas relacionadas a um prejuízo da função mitocondrial e fatores de risco como dislipidemias, e valores elevados de glicemia, é de extrema relevância para reduzir a alta prevalência de obesidade e de outros fatores de risco para a síndrome metabólica na população, bem como promover melhor condição de saúde. Nossa hipótese é que a associação exercício físico e suplementação de L-arginina teria efeitos adicionais na expressão de enzimas relacionadas à biogênese mitocondrial e traria efeitos benéficos sobre o peso corporal, perfil lipídico, glicemia dos animais, estado redox e tolerância ao esforço físico de animais saudáveis. Assim os objetivos deste trabalho foram:

1- OBJETIVO GERAL

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

4.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

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

- PGC-1 α ;
- mtTFA
- Subunidade C da ATP sintase
- NOS endotelial
- NOS neuronal
- CuZnSOD
- MnSOD

2. Através de análises bioquímicas, analisar diferentes parâmetros sanguíneos de jejum como:

- Colesterol total
- Colesterol HDL
- Triglicerídeos sanguíneos
- Glicemia de jejum

- Nitrito e nitrato
- MDA

3. Através de teste de esforço físico por velocidade incremental, avaliar a tolerância ao esforço físico dos animais caracterizado pelo máximo tempo de permanência no teste físico em esteira.

5-METODOLOGIA

5.1 Animais

Ratos Wistar (270-290 g, n=40) provenientes do Centro Multi-institucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), ficaram alojados no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de ciências médicas (FCM) em gaiolas coletivas. Ração foi fornecida *ad libitum* (Ração Padrão Labina, Purina). O biotério dispõe de ciclo claro/escuro (12/12 h).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética animal (CEUA – UNICAMP), protocolo 2069-1 de 28 de junho de 2010. (vide anexo A).

5.2 Grupos Experimentais

Para este protocolo, os animais foram divididos em 4 grupos com 10 animais em cada:

1. Grupo controle sedentário (SD)
2. Grupo sedentário + L-arginina (SD/LA)
3. Grupo treinado (TR)
4. Grupo treinado + L-arginina (TR/LA)

5.3 Suplementação oral com L-Arginina

Os animais receberam, durante 8 semanas, suplementação oral de L-Arg, que foi administrada por entubação orogástrica, utilizando-se seringas de 1 ml e agulhas de gavage (figura 8), onde foi administrada uma dose diária de 62,5 mg/ml/dia/rato (YANG et al., 1998).



FIGURA 8 - Administração oral de L-Arginina.

5.4 Programa de Treinamento Físico: Corrida em esteira

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

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



FIGURA 9 - Treinamento de corrida em esteira.

5.5 Teste de esforço

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

5.6 Peso corporal e consumo alimentar

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

Após o sacrifício, a gordura epididimal foi isolada e pesada para estimar o acúmulo de gordura tecidual (FU, et al., 2005).

5.7 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos

As amostras de sangue que foram processadas para obtenção de plasma para as dosagens bioquímicas foram coletadas após jejum noturno de aproximadamente 14 horas. A glicose sanguínea de jejum foi mensurada utilizando uma gota de sangue caudal e os valores foram constatados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, São Paulo, SP, Brasil) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche, São Paulo, SP, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Logo após a dosagem da glicemia, os animais foram anestesiados com halotano e através de uma incisão longitudinal no abdômen do animal foi coletado o sangue arterial (7 ml), pelo ramo descendente da artéria aorta.

5.7.1 Perfil lipídico

Os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TAG) foram medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico (LABORLAB). O HDL-colesterol (HDL) foi determinado pelo método da precipitação utilizando também kit específico (LABORLAB).

5.7.2 Determinação das concentrações de nitrato e nitrito (NO_x^-) em tecido muscular e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

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

A técnica de TBARS, para analisarmos o conteúdo de MDA plasmático ocorreu também pelo método ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) conforme instruções do fabricante.

5.8 Obtenção do extrato enriquecido de mitocôndrias

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

mitocondrial e re-suspensão da fração de mitocôndrias em meio contendo 225mM de manitol; 75mM de sacarose; 10mM de Tris HCl; 0,1mM de EDTA; 10mM de KH_2PO_4 e 10 mM de KCL; pH 7,4.

5.9 Avaliação da biogênese mitocondrial por Western Blot

As amostras de extrato citoplasmático e enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico foram utilizadas para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), e então a quantidade necessária para aplicar 75 μg de proteína no gel de acrilamida foi calculada para cada amostra. Em seguida foi preparado o gel em um sistema Mini-Protean (BioRad) para detecção proteínas de interesse para a realização do projeto.

Além das isoformas de NOS, as proteínas de interesse para avaliação da biogênese mitocondrial foram a mtTFA e subunidade c da ATP sintase (proteína mitocondrial participante do mecanismo de produção de ATP, cujo aumento indica maior número de mitocôndrias). A expressão da CuZn-SOD ocorreu apenas nas amostras citoplasmáticas e da MnSOD apenas no extrato enriquecido de mitocôndrias.

5.9.1 Eletroforese e transferência das amostras

As alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia- 0,5 mM; SDS- 0,17 mM; DTT- 39 μM ; Tris- HCL pH=8 - 0,01 M e Azul de bromofenol- 0,5%) e mantidas a 99°C durante 4 minutos e, em seguida, estas amostras foram aplicadas no gel com SDS a 3% (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese em gel com 7,5 % de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema Mini-Protean II (Eletrophoresis Cell, BioRad) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 100 Volts (Power Pac 200, BioRad). Junto com as amostras foi aplicado no gel um padrão de proteínas “marcadores de peso molecular” (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada, durante 20 segundos, com metanol. Para a transferência o gel, a membrana e o papel Whatman foram colocados em um sistema de *sandwich* e imersos em uma cuba (Mini-Protean II, Modulo de Transferência, BioRad) contendo a solução de transferência

(Tris- 25 mM; Glicina- 190 mM; SDS-0,05 % e Metanol- 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA (Power Pac 200, BioRad), durante 18 horas. A transferência foi confirmada através da coloração do gel com Ponceau (ROMERO-CALVO et al., 2010). As proteínas das membranas foram fixadas e coradas com ácido acético 1%, por 5 minutos, e coradas com Ponceau- 1%; ácido acético-1% durante 05 minutos. A descoloração das membranas foi feita com uma sequência de lavagens iniciada com água destilada seguida por finalização com o TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %). As membranas foram então incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e sob agitação com uma solução bloqueante (leite desnatado 5%, Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %).

5.9.2 Incubação com os anticorpos e detecção das proteínas de interesse

Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas durante 15 horas com anticorpo primário contra as isoformas da NOS (eNOS e nNOS) e das proteínas relacionadas a biogênese mitocondrial, mtTFA e subunidade c da ATP sintase, além da MnSOD e CuZnSOD, em solução bloqueante, à temperatura de 4°C e sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos com TBS-T (Tris- 10 mM, NaCl- 100 mM e Tween 20- 0,1 %), sob agitação. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com anticorpos secundários, diluídos em solução bloqueante e incubados por 90 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Ao final, o excesso dos anticorpos secundários foram lavados com solução de TBS-T em 3 lavagens sucessivas de 10 minutos cada. As proteínas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Life Science). A seguir, as membranas foram colocadas em contato com um filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham Life Science), e as bandas impregnadas foram posteriormente reveladas. A razão da coloração de Ponceau foi realizada para normalização da expressão das proteínas de interesse (ROMERO-CALVO et al., 2010). A análise densitométrica das bandas das proteínas separadas pela técnica de *Western blot* foram feitas pela gravação dos filmes por um *scanner*. Para análise e quantificação das bandas foi utilizado o programa de análise de imagens Scion Image.

6-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M) para n experimentos. Foram realizadas análise de variância (ANOVA *one-way*) para determinação das diferenças entre os grupos e pós-teste de Tuckey, utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0, e foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$.

7-RESULTADOS

O peso corporal dos ratos e os valores de ração ingerida foram avaliados semanalmente. O peso da gordura epididimal foi avaliado após sua retirada depois do sacrifício dos animais. Os resultados são mostrados na Figura 10, 11 e 12. O treinamento físico promoveu menor ganho de peso corporal quando comparado aos animais sedentários, e este efeito foi observado após a segunda semana de treinamento até o final do estudo, que não foi dependente de L-arginina. Os grupos SD/LA, TR e TR/LA apresentaram menor quantidade da gordura epididimal em relação aos animais SD, sendo esse efeito mais pronunciado nos animais do grupo TR. Os animais treinados também apresentaram menores valores de ração ingerida (fig. 12).

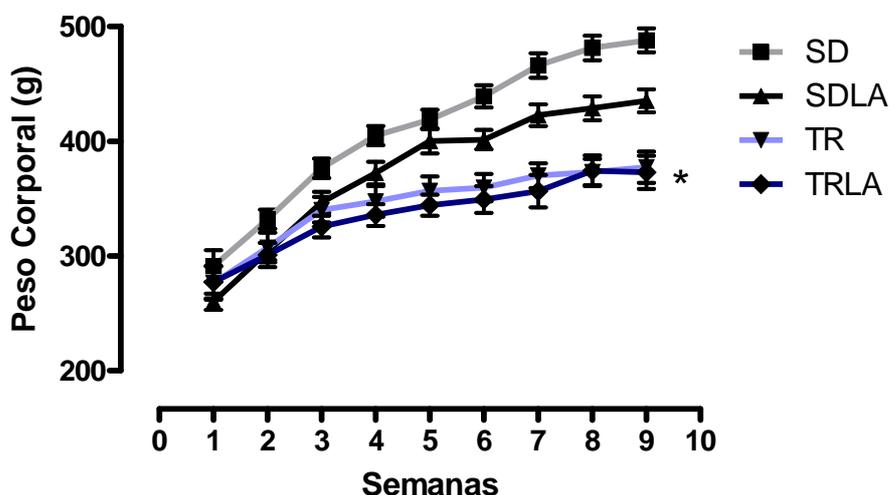


FIGURA 10. Evolução do peso corporal de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SD/LA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TR/LA). * $p < 0,05$ TR e TR/LA comparados ao grupo sedentário (SD).

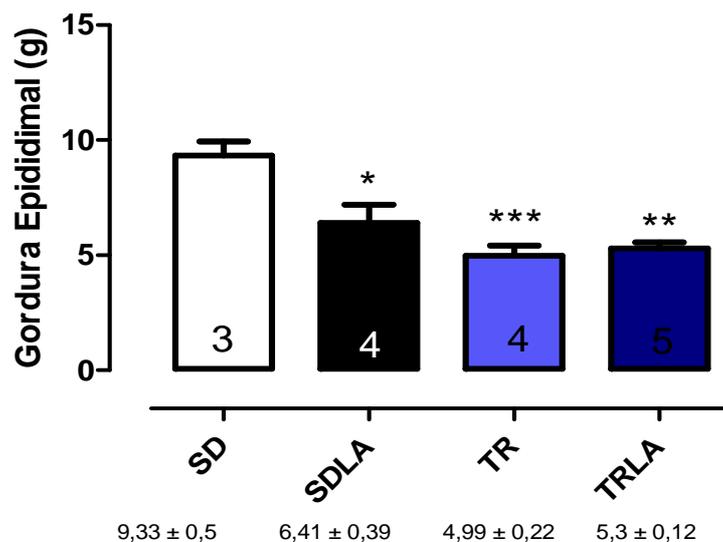


FIGURA 11. Massa da gordura epididimal de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SD/LA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TR/LA) retirada após o sacrifício. * $p < 0,05$ SD/LA comparado ao grupo sedentário (SD); ** $p < 0,01$ TR/LA comparado ao grupo SD; *** $p < 0,001$ TR comparado ao grupo SD.

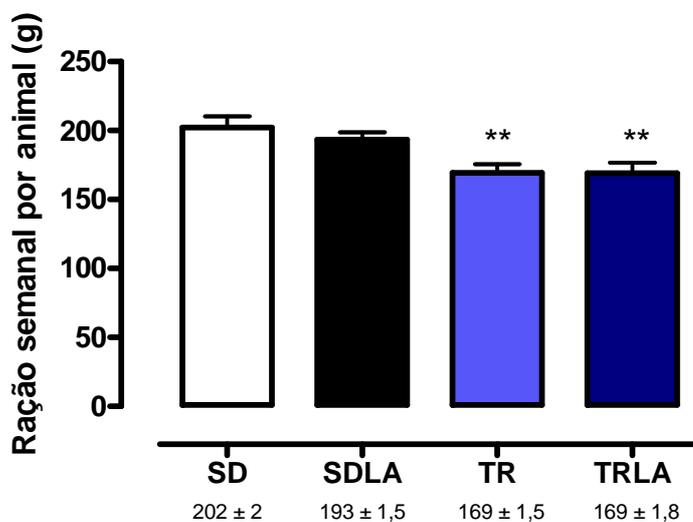


FIGURA 12. Ingestão alimentar dos grupos animais de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SDLA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TRLA). ** $P < 0,01$ TR e TRLA comparado ao grupo SD.

A tolerância ao exercício físico foi avaliada através de um teste de esforço realizado na esteira, com velocidade incremental de 0,3 Km/h a cada 3 minutos, até a exaustão. Os testes foram realizados em 3 etapas: o primeiro teste foi realizado pré-tratamento/treinamento físico, após a primeira semana de adaptação à esteira de todos

os animais. Ao término da 5^a. e da 8^a. semanas de estudo, todos os grupos foram novamente submetidos a um novo teste de esforço, nas mesmas condições.

A figura 13 mostra que os animais selecionados para os grupos treinados eram mais tolerantes ao exercício físico, permanecendo na esteira por tempo superior aos tempos alcançados pelos ratos do grupo controle. Após a 5^a. e 8^a. semanas de estudo, observamos que os ratos sedentários apresentaram uma queda na tolerância ao exercício físico, sendo capazes de manter a atividade física por uma média de apenas 4 minutos, para as 5^a. e 8^a. semanas, do tempo observado no início do estudo. A suplementação com L-arginina preveniu esta redução observada nos animais sedentários, uma vez que não houve diferença significativa entre o tempo de exaustão nos testes de esforço nas 5^a e 8^a semanas em relação à semana 1. Por outro lado, os animais treinados apresentaram aumento na tolerância ao esforço muito mais pronunciado. Nos animais submetidos ao treinamento físico sem suplementação com L-arginina, houve uma tendência de melhora na tolerância ao exercício após 5 e 8 semanas de estudo, cujo exercício físico foi mantido em minutos por 20 ± 1 e 23 ± 3 respectivamente. A associação exercício físico e suplementação com L-arginina promoveu aumento significativo na tolerância ao exercício físico nas 5^a. e 8^a. semanas de estudo, onde os ratos se mantiveram em exercício por 20 ± 2 min. e 27 ± 2 min., apresentando o teste da 8^a semana diferença significativa tanto em relação às semanas 5 e 1 do mesmo grupo, quanto em relação ao teste da 8^a semana dos animais TR. A figura 14 mostra o rendimento em porcentagem dos animais TR e TR/LA do terceiro teste em relação ao primeiro. Há um claro aumento de rendimento nos grupos treinados, em especial o grupo Treinado + L-arginina (75,5%), sendo que o grupo treinado apresentou melhora de 27,5%, contribuindo para os dados apresentados na figura 13.

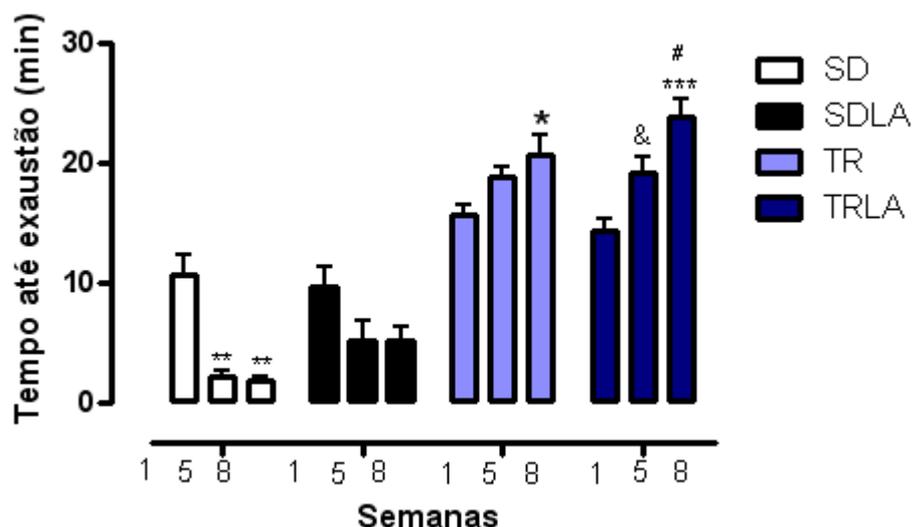


FIGURA 13. Tolerância ao esforço avaliada através de teste de esforço com velocidade incremental até a exaustão, em ratos sedentários e treinados, submetidos ou não à suplementação oral com L-Arginina. * $P < 0,05$ TR semana 8 em relação à semana 1; ** $p < 0,01$ SD semanas 8 e 5 em relação à semana 1; & $p < 0,05$ TR/LA semana 5 em relação à semana 1; *** $p < 0,001$ TR/LA semana 8 em relação à semana 1; # $p < 0,05$ TR/LA semana 8 em relação a TR semana 8.

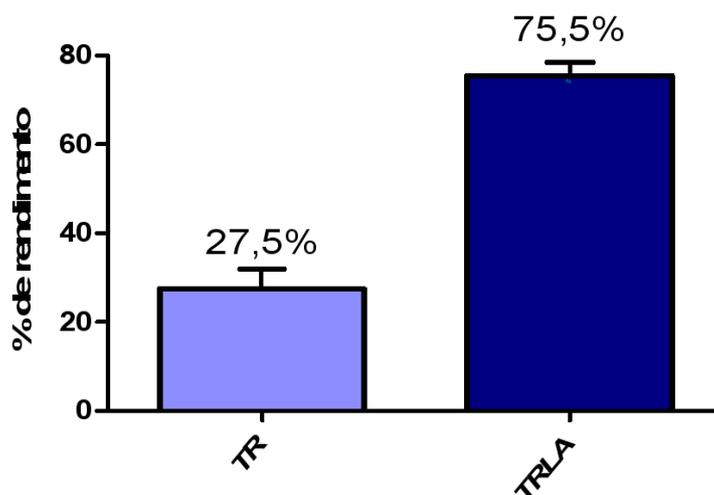


FIGURA 14. Rendimento dos grupos TR e TRLA no teste de esforço. Percentual de rendimento dos animais TR e TR/LA no teste de esforço da semana 8 em relação à semana 1.

Após as 8 semanas de estudo e 12 horas de jejum, a glicemia foi dosada no sangue periférico (através de glicosímetro modelo accu-chek performa, Roche, Brasil) e imediatamente após o sacrifício, amostras de sangue arterial foram coletadas com anti-coagulante, centrifugadas para a separação do plasma, e subsequente dosagem do perfil lipídico (kits de triglicérides, colesterol total e HDL - colesterol, Laborlab, Brasil). As figuras 15, 16, 17 e 18 mostram que os animais submetidos ao treinamento físico apresentaram valores significativamente menores da glicemia e dos triglicérides em

relação aos animais do grupo sedentário. Valores aumentados nos níveis plasmáticos de colesterol total foi observado apenas em relação aos animais sedentários suplementados com L-Arginina, não havendo modificação nos valores de HDL - colesterol. A suplementação com L-arginina não teve efeito sobre o perfil lipídico dos animais sedentários. No entanto, em relação aos animais treinados há valores mais altos da glicemia, sendo estes ainda considerados dentro do padrão aceitável, ou seja, até 100 mg/dl (AMERICAN DISEASE ASSOCIATION, 2011). Nos animais treinados, a suplementação com L-Arginina reduziu os níveis de triglicérides em relação aos grupos SD e SD/LA, no grupo TR essa alteração se deu apenas em relação ao grupo SD/LA.

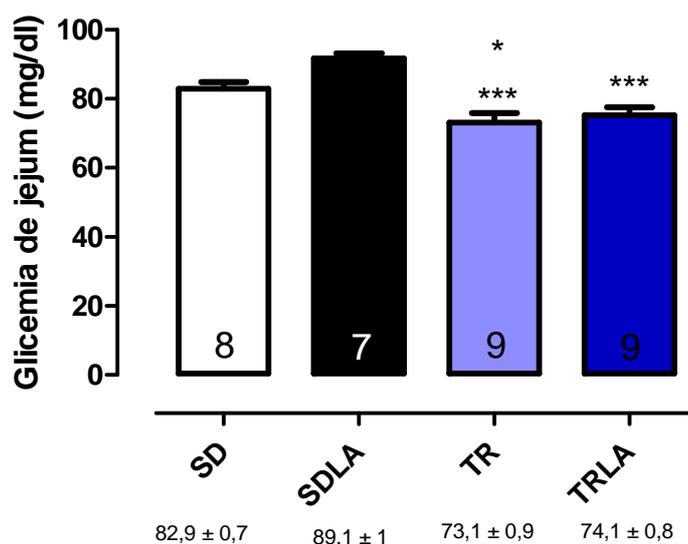


FIGURA 15. Glicemia de jejum de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SD/LA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TR/LA). * $p < 0,05$ TR em relação a SD; *** $p < 0,001$ TR e TR/LA em relação a SD/LA.

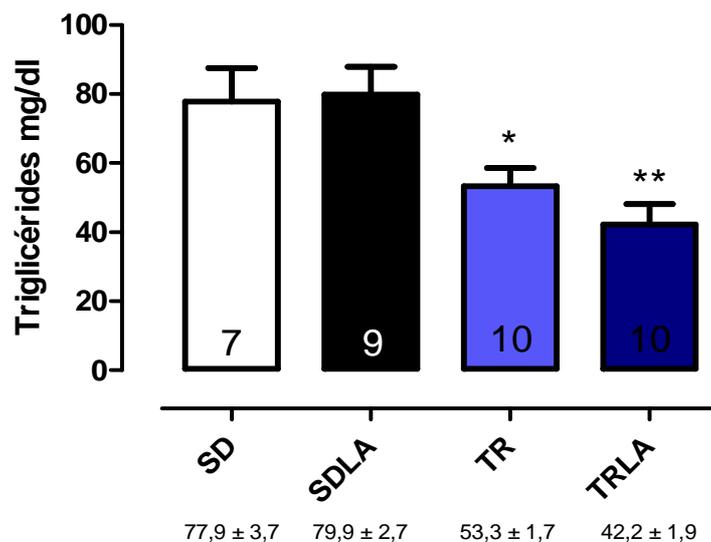


FIGURA 16. Triglicerídeos plasmáticos de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SD/LA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TR/LA). * $p < 0,05$ TR em relação a SD/LA; ** $p < 0,01$ TR/LA em relação a SD e SD/LA.

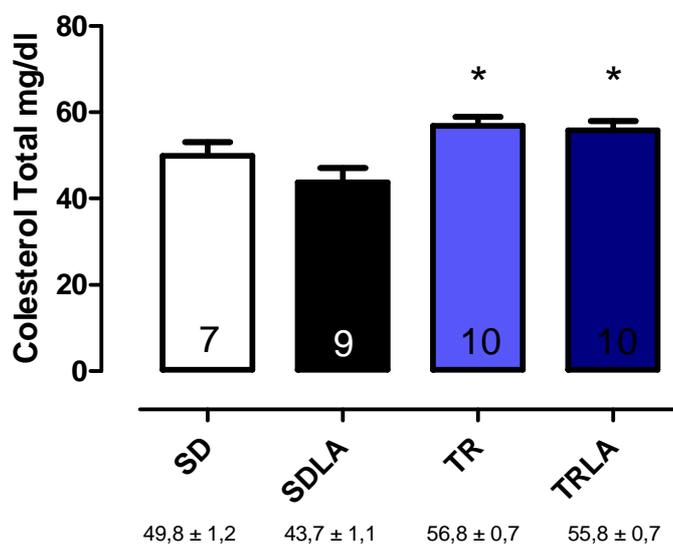


FIGURA 17. Colesterol total de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SD/LA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TR/LA). * $p < 0,05$ TR e TR/LA em relação a SD/LA.

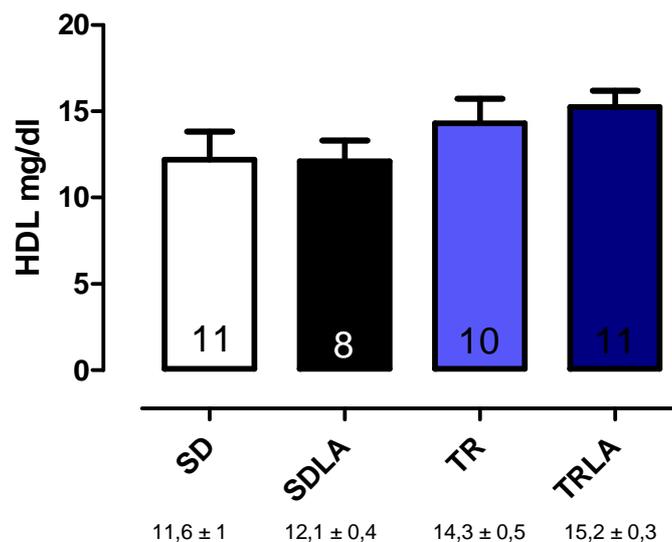


FIGURA 18. Valores de HDL colesterol plasmático de ratos sedentários (SD), sedentários suplementados com L-arginina (SD/LA), treinados (TR) e treinados suplementados com L-arginina (TR/LA).

Através da técnica de Western Blotting foram quantificadas as expressões protéicas da mtTFA; ATP sintase C; nNOS endotelial e neuronal; CuZnSOD e MnSOD do extrato citoplasmático e enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico dos grupos animais.

A figura 19 mostra que o treinamento físico associado à suplementação com L-Arginina aumentou os valores de mtTFA no extrato citoplasmático e enriquecido de mitocôndrias relação aos animais sedentários. Embora haja uma clara tendência de aumento da mtTFA nos grupos SD/LA e TR também em relação a SD no extrato de mitocôndrias e um aumento significativo da mtTFA do citosol no grupo TR, a análise de ANOVA não detectou diferença estatística.

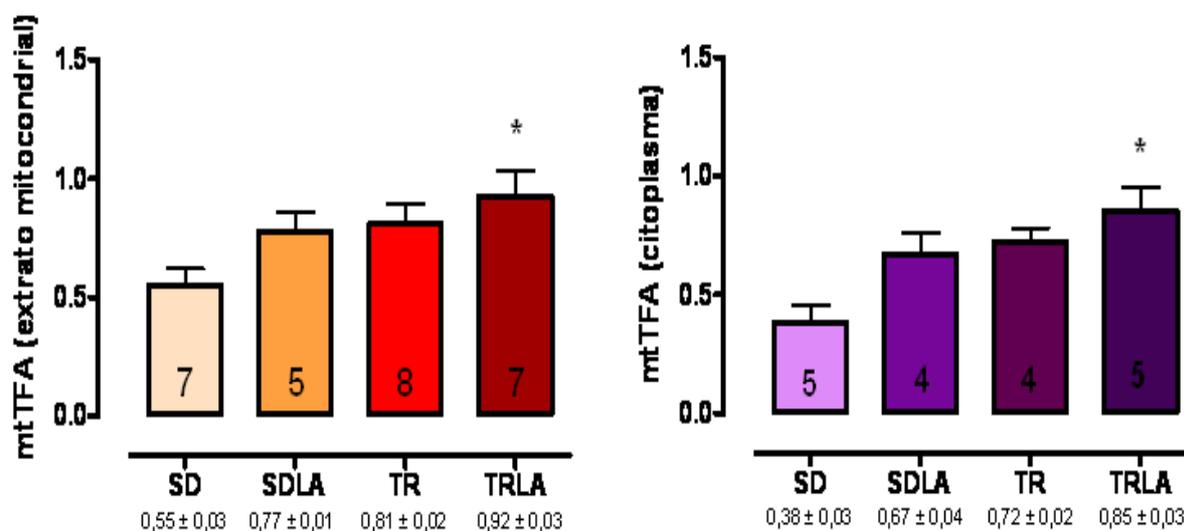


FIGURA 19. Expressão do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA) no extrato citoplasmático e no extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico dos ratos SD, SD/LA, TR e TRLA. Mitocôndria: * $p < 0,05$ TR/LA em relação a SD. Citoplasma: * $p < 0,05$ TR/LA em relação a SD.

A figura 20 mostra a expressão protéica da ATP sintase subunidade C. Podemos observar que a associação treinamento físico e suplementação com L-arginina promoveu valores significativamente maiores da expressão dessa enzima em mitocôndrias de músculo esquelético quando comparado aos demais grupos (SD, SDLA, TR).

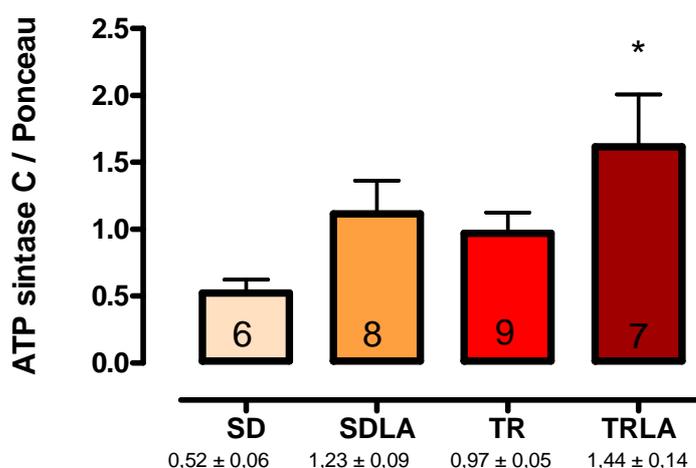


FIGURA 20. Expressão da ATP sintase subunidade C no extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico dos ratos SD, SD/LA, TR e TRLA. * $p < 0,05$ TR/LA em relação a SD.

A figura 21 apresenta os valores da expressão protéica da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) no citoplasma e extrato enriquecido de mitocôndrias. Podemos verificar que existe uma tendência de aumento da nNOS no citoplasma nos grupos experimentais em relação ao grupo controle (SD). No entanto, somente no grupo TR/LA essa diferença atingiu significância estatística. Em extrato enriquecido de mitocôndrias não observamos nenhuma diferença entre os grupos para a expressão protéica da nNOS.

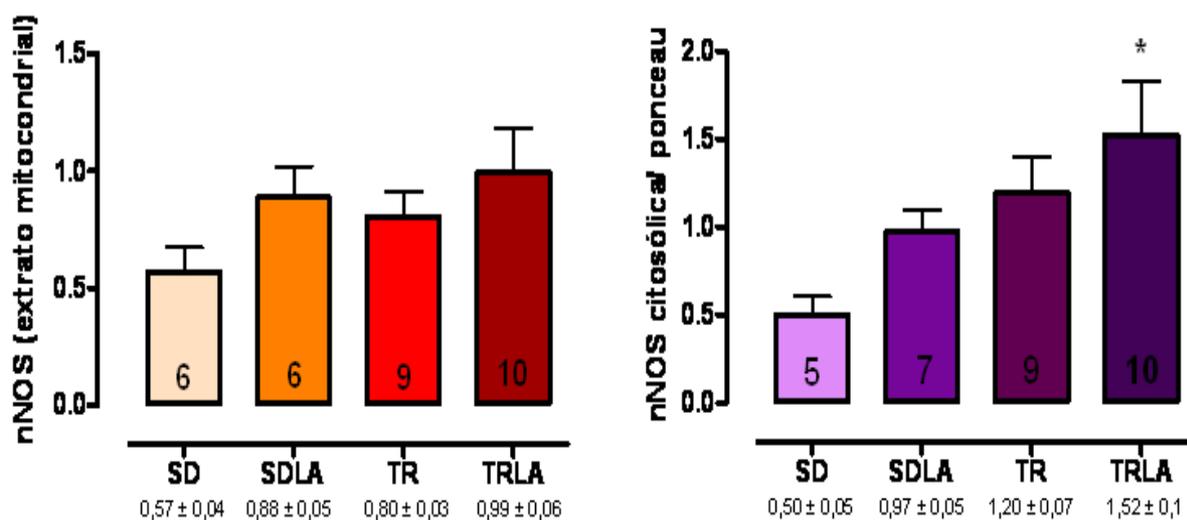


FIGURA 21. Expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no extrato citoplasmático e extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico dos ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA. * $p < 0,05$ TR/LA em relação a SD.

Com relação à expressão protéica da enzima eNOS, podemos observar que sua expressão não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais no citoplasma de músculo esquelético (Figura 22).

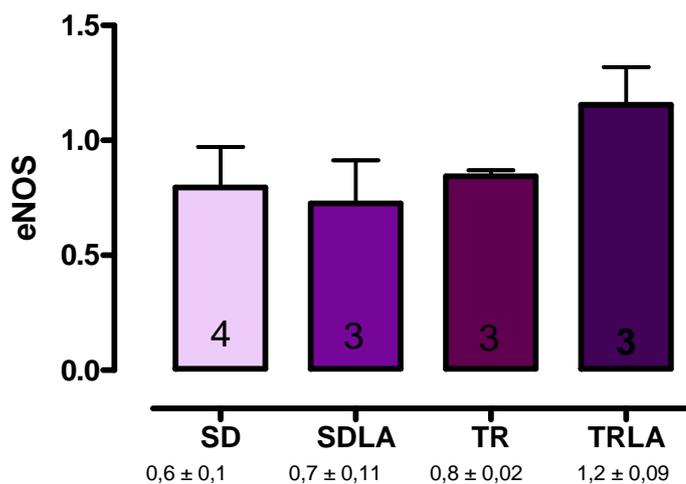


FIGURA 22. Expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no extrato citoplasmático do músculo gastrocnêmico dos ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA

A figura 23 mostra os valores citoplasmáticos de nitrito e nitrato que foram determinados pelo método ELISA. O gráfico mostra que houve aumento significativo nas concentrações citoplasmáticas de NO_x nos animais treinados e suplementados com L-arginina quando comparados aos demais grupos.

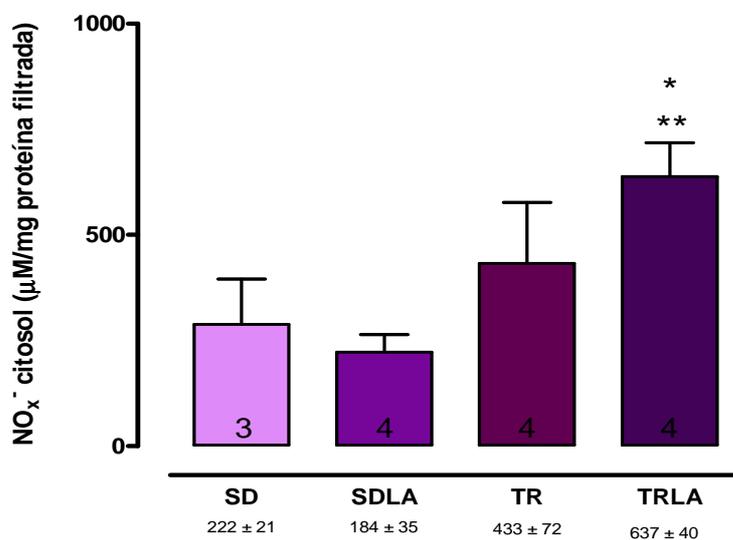


FIGURA 23. Valores plasmáticos e citoplasmáticos de Nitrito e nitrato (NO_x) de ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA. *p<0,05 TR/LA em relação a SD; **P<0,01 TR/LA em relação a SD/LA.

A expressão protéica da enzima antioxidante superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD) e mitocondrial (MnSOD) são mostradas na figura 24. O

treinamento físico promoveu aumento significativo da expressão da CuZnSOD em relação aos animais SD, sendo este efeito mais pronunciado nos animais do grupo TR ($1,67 \pm 0,13$). No extrato enriquecido de mitocôndrias, apenas os animais TR/LA apresentaram elevação da expressão protéica da enzima MnSOD.

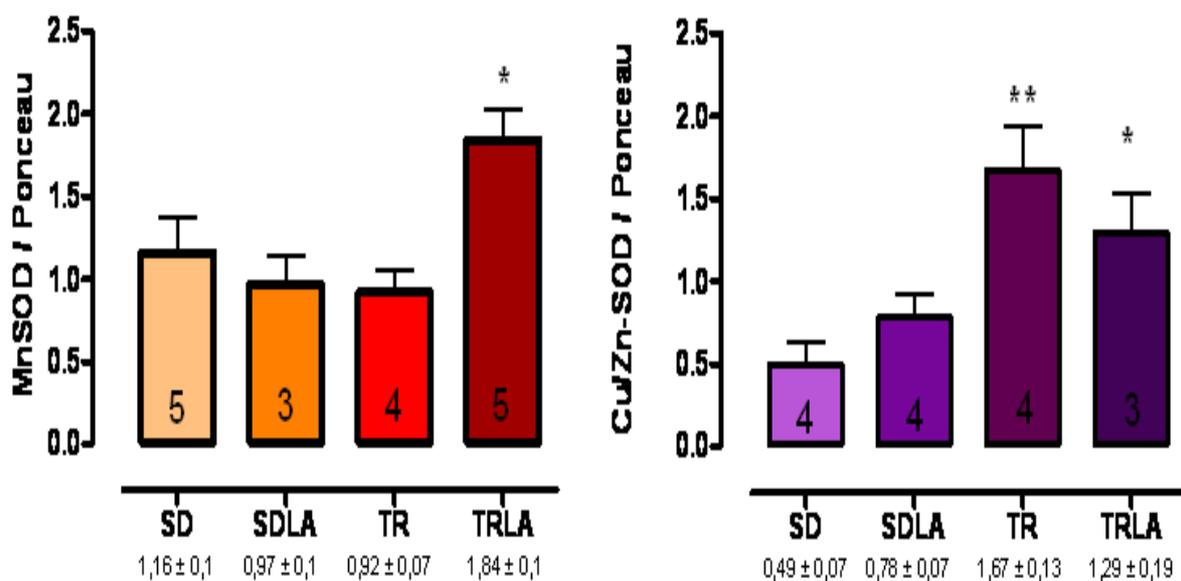


FIGURA 24. Expressão da CuZnSOD no extrato citoplasmático e da MnSOD no extrato enriquecido de mitocôndrias do músculo gastrocnêmico de ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA. * $p < 0,05$ TR/LA em relação a SD no extrato citoplasmático e * $p < 0,05$ TR/LA em relação a SD, SD/LA e TR no extrato enriquecido de mitocôndrias. ** $p < 0,01$ TR em relação a SD.

Com relação aos valores de malondialdeído, um dos marcadores de dano celular causado pelo stress oxidativo, somente os animais que receberam L-arginina apresentaram seus níveis elevados (grupo SD/LA) em relação aos demais grupos (figura 25).

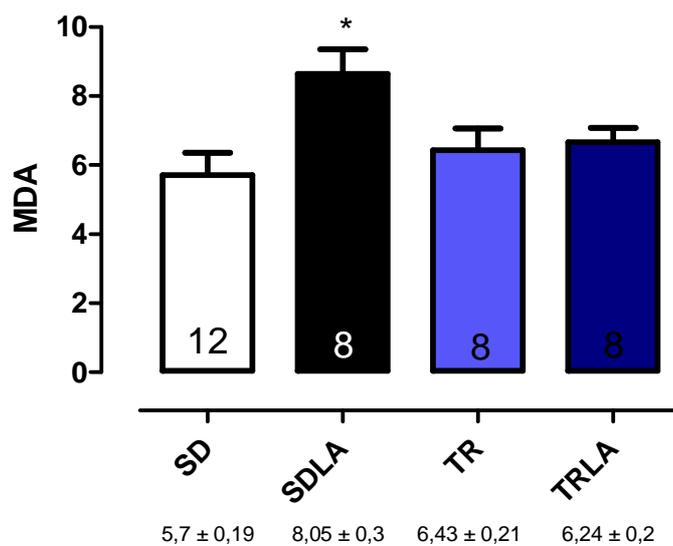


FIGURA 25. Valores de malondialdeído plasmático de ratos SD, SD/LA, TR e TR/LA. * $p < 0,05$ SD/LA em relação a SD.

8-DISCUSSÃO

A partir dos resultados apresentados, observamos menor ganho de peso corporal, de massa de gordura epididimal e de ingestão alimentar nos animais submetidos ao treinamento físico. Esses achados podem ser devidos a maior utilização de substratos energéticos e dispêndio de energia para contração muscular. Além disso, os ratos sedentários tratados com L-arginina apresentaram tendência a menor ganho de peso corporal e menor massa da gordura epididimal em relação aos ratos do grupo sedentário, o que corrobora com o estudo de Fu et al., (2005), que demonstrou que a suplementação de L-Arginina (administrando-se 1,51% de L-Arg- HCL na água de beber) por 10 semanas reduziu o peso corporal e a massa de gordura epididimal em ratos Zucker diabéticos e obesos (ZDF). Assim, estes dados indicam que a via L-Arginina/NO poderia ser capaz de aumentar a lipólise no tecido adiposo e β -oxidação de lipídios para produção de energia, além da diminuição da lipogênese, uma vez que trabalhos prévios mostraram que o NO também regula o metabolismo dos nutrientes (JOBGEN et al., 2006). Por outro lado, não houve diferença no ganho de peso corporal entre os ratos treinados com e sem suplementação com L-Arginina, sugerindo que em ratos treinados saudáveis, a suplementação com L-Arginina não tem efeito adicional. Trabalho anterior realizado em nosso laboratório (SILVA, 2009) demonstrou que a suplementação de L-Arginina (administrada na água de beber, 1,25g/l, correspondente a uma dose semelhante que a administrada neste trabalho) por 4 semanas, associada ao treinamento físico reduziu significativamente o peso corporal de ratos. No entanto, deve-se enfatizar que além da dose, os animais tratados por SILVA et al (2009) tiveram a L-arginina na água de beber com menor controle da ingestão do que em nosso estudo, que foi por gavage e individual, o que poderia explicar a diferença nos resultados relacionados ao peso corporal. Em relação à ingestão alimentar, os animais treinados apresentaram menor consumo semanal de ração, resultado similar ao estudo de SILVA et al. (2009). TITCHENAL (1988) pesquisou as diferenças de consumo alimentar em ratos treinados, mostrando que ratos Wistar treinados apresentam menor consumo alimentar. A diferença na ingestão alimentar pode ser um dos fatores para o menor ganho de peso corporal nos grupos treinados.

O desempenho físico foi avaliado através de testes de esforço, onde verificamos a menor tolerância ao exercício em ratos sedentários, observada pelo menor tempo de exercício obtido neste grupo no teste intermediário e final, mostrando que com o avanço

da idade e o ganho de peso corporal, ocorre redução da capacidade dos ratos em se exercitar. De fato, estudo prévio mostra que danos metabólicos causados pelo sedentarismo, excesso de peso e obesidade, levam a menor desempenho físico, refletindo uma deficiência na utilização da energia (para revisão, ver ROGGE, 2009). Esses menores níveis de energia dependem de uma série de distúrbios causados pelo sedentarismo e adiposidade como: diminuição da oxidação de ácidos graxos e baixas concentrações basais de ATP com prejuízo na função mitocondrial. Em nosso estudo, a suplementação com L-Arginina preveniu esta redução da tolerância ao esforço devido ao fato de não haver diferenças significativas entre os testes de esforço nas semanas 1, 5 e 8. No entanto, os efeitos benéficos da suplementação isolada são menores que os efeitos observados nos grupos submetidos a exercício físico somente ou associado à suplementação, uma vez que nos ratos submetidos ao exercício físico sem suplementação, foi observada uma tendência de melhora na tolerância ao exercício no decorrer dos 3 testes. Trabalho anterior em nosso laboratório mostrou que ratos submetidos ao treinamento físico apresentam maior tempo de corrida até a exaustão (GOMEZ-CAMPOS, 2010). Esses resultados confirmam os benefícios do treinamento aeróbio na redução da fadiga nos parâmetros periféricos - oxidação dos substratos pela musculatura e maior consumo de oxigênio - (MCARDLE et al., 2002).

A partir da análise da glicemia de jejum podemos verificar que nenhum grupo teve os parâmetros glicêmicos acima dos valores considerados normais, sendo esses até 100 mg/dl (AMERICAN DISEASE ASSOCIATION, 2011). O treinamento físico produziu redução da glicemia sugerindo que a captação de glicose possivelmente foi melhorada pelo exercício físico. Por outro lado, os animais sedentários tratados com L-Arginina apresentaram valores superiores da glicemia em relação a ambos os grupos treinados e treinados com suplementação. No entanto, essa variação manteve os valores glicêmicos dentro dos parâmetros considerados aceitáveis, e não houve diferença significativa em relação ao grupo sedentário não suplementado. Sabe-se que a L-Arginina é um importante secretagogo de diversos hormônios como o GH e insulina (SPINAS, 1999; SMUKLER et al., 2002). Assim, o aumento da glicemia pela suplementação de L-arginina poderia ser devido a maior ação do GH, um hormônio hiperglicemiante em relação à insulina (KANALEY et al., 1997; CHROMIAK, ANTONIO, 2002; KANALEY, 2008). No entanto, medidas desses hormônios precisam ser feitas para que nossa hipótese seja confirmada.

O treinamento físico apresentou efeitos benéficos na redução dos triglicerídeos plasmáticos, sendo este efeito mais pronunciado com a suplementação de L-Arginina, contudo, sem haver diferenças entre os grupos treinados. Estudos em seres humanos (WOOD et al., 1979; CASELLA-FILHO et al., 2011) também demonstram essa redução após treinamento físico a longo prazo. Embora trabalhos mostrem que a suplementação com L-Arginina diminui os valores plasmáticos de TAG (JOBGEN et al., 2006), só encontramos este efeito benéfico quando a suplementação foi associada ao treinamento físico. Sabe-se que o exercício físico tem a função de diminuir a atividade da enzima GPAT, que é responsável pela formação de TAG no tecido adiposo. Além disso, o exercício faz com que haja maior utilização de ácidos graxos pelas mitocôndrias, diminuindo a concentração desses no plasma. Portanto, o treinamento físico empregado por nós foi benéfico na redução desse parâmetro.

Com relação aos valores de colesterol total, os valores aumentados desse parâmetro encontrados nos grupos TR e TR/LA podem ser explicados ao fato de que o treinamento físico aumenta a mobilização de ácidos graxos para a circulação sanguínea causada pelo aumento da lipólise. Esses ácidos graxos formam acetil-CoA, que seria utilizado para a β -oxidação de ácidos graxos. Dentro da mitocôndria, parte do acetil-CoA forma Acetoacetil-CoA, e depois HMG-CoA, que é um precursor para a síntese do colesterol e da formação de corpos cetônicos (LIMA, 2007). Da mesma forma, há uma tendência da redução do colesterol total a partir da suplementação com L-Arginina, mostrada em trabalhos anteriores (WU, MEININGER, 2000; JOBGEN et al., 2006), onde a produção do NO a partir da suplementação com L-Arginina teria um efeito hipocolesterolêmico (KUROWSKA et al., 1998). Não houve diferença estatística nos valores de HDL colesterol entre os grupos. Estudos mostram que o exercício físico tem a capacidade de aumentar o HDL (DESPRÈS, LEMARCHE, 1994). Entretanto, trabalho anterior onde o treinamento de natação associado à suplementação de L-Arginina também não mostrou haver diferenças significativas nos valores de HDL colesterol (CHIYODA et al., 2009).

Os resultados de Western Blotting apresentados mostram que o treinamento físico associado à suplementação com L-arginina foi efetivo em promover elevação da expressão protéica de mtTFA tanto no citoplasma quanto no extrato enriquecido de mitocôndrias, com similar magnitude, indicando os efeitos benéficos desse tratamento na biogênese mitocondrial. No entanto, são necessários mais estudos para a verificação da quantidade e tamanho das mitocôndrias por microscopia eletrônica, para vermos se

esse aumento da sinalização para a biogênese mitocondrial resultou, de fato, no aumento no número e tamanho das mitocôndrias dos animais treinados e suplementados com L-Arginina. De maneira similar aos achados de mtTFA, a expressão protéica da enzima ATP sintase C foi aumentada nos animais do grupo TR/LA. Em conjunto, esses dados mostram que o treinamento físico associado à suplementação com o doador de NO, L-Arginina apresentam a capacidade de aumentar a sinalização da biogênese mitocondrial e possivelmente aumentar a produção de ATP. Choi et al., (2001) citam a mtTFA como o fator primordial para a regulação ao mtDNA, e seus níveis seriam proporcionais ao mtDNA, o que reforça nossa hipótese de que a associação exercício físico e suplementação com L-Arginina aumentam a biogênese mitocondrial.

Em relação à nNOS citoplasmática e do extrato enriquecido de mitocôndrias, nossos resultados mostram que a suplementação com L-Arginina associada ao treinamento promoveram aumento da expressão da nNOS no extrato citoplasmático, que foi positivamente associado à maior concentração de nitrito e nitrato citoplasmáticos nesse grupo, mas nenhuma alteração foi observada na expressão protéica de nNOS em mitocôndria. Estudos anteriores mostraram aumento da expressão da nNOS como efeito do treinamento físico, mas não foram encontrados estudos que apresentassem a associação do treinamento com a suplementação de L-Arg. (VASSILAKOPOULOS et al., 2002; HUBER-ABEL, 2011). Trabalhos mostram a importância da NOS na biogênese mitocondrial basal, mas não na biogênese mitocondrial induzida pelo exercício (WADLEY, CHOATE, McCONNELL, 2007; WADLEY, McCONNELL, 2007; McCONNELL et al., 2009), sendo que nesses experimentos a inibição da NOS causou redução da biogênese mitocondrial basal, mas não atenuou a biogênese mitocondrial induzida pelo exercício.

Com relação à eNOS, nenhuma alteração foi observada nessa enzima em músculo esquelético. Estudos com ratos idosos (SONG et al., 2009) também não mostraram aumento na expressão da eNOS com o treinamento físico. No entanto, em ratos saudáveis submetidos a 4 semanas de treinamento aeróbio, Vassilakopoulos et al., (2002) encontrou aumento na expressão tanto da nNOS quanto da eNOS no músculo gastrocnêmico. Mostrando a necessidade de mais estudos avaliando a expressão da eNOS associada ao treinamento e à L-Arginina.

Em conjunto, nossos dados indicam que o treinamento físico associado a suplementação de L-arginina promove maior produção de NO, através da nNOS, que

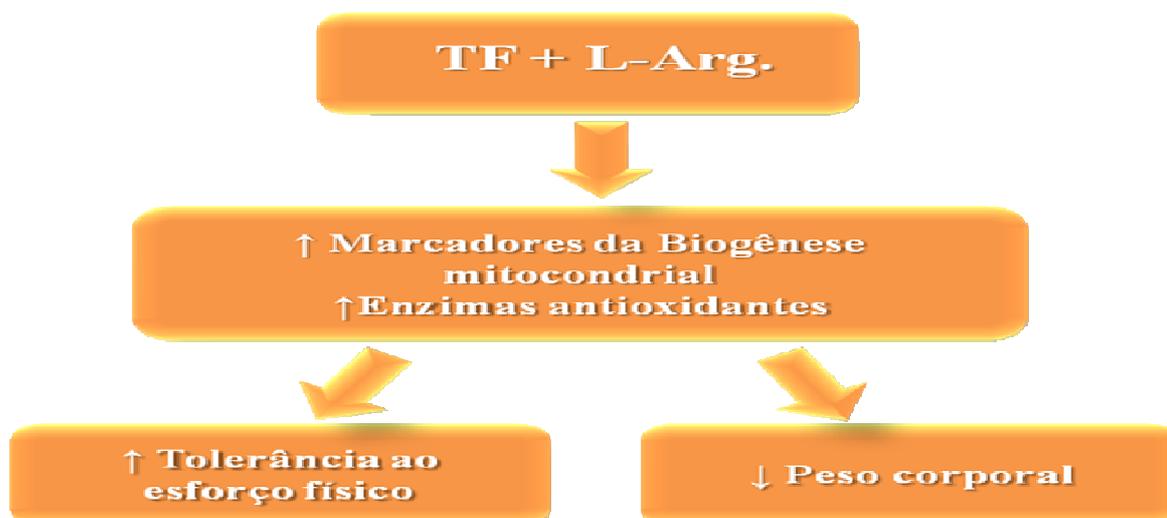
por sua vez poderia elevar os níveis de mtTFA e ATP sintase C, acarretando em aumento na biogênese mitocondrial.

A expressão da enzima antioxidante CuZnSOD foi aumentada com o treinamento físico e com o treinamento associado à suplementação, mas esses resultados são mais pronunciados no grupo TR. Corroborando com estudos que mostram aumento da expressão dessa enzima com o treinamento físico (JI, FU, 1992; ALESSIO, 1993) sugerindo uma adaptação dos animais treinados ao aumento das EROs produzidas pelo exercício.

A enzima MnSOD só foi aumentada no grupo TR/LA mostrando que a suplementação associada ao treinamento físico levou a uma maior adaptação antioxidante na mitocôndria, sendo benéfica, já que deficiência na MnSOD leva a aumento no stress oxidativo e diminuição na função mitocondrial (LUSTGARTEN et al., 2011). Considerando todos esses efeitos na expressão protéica das enzimas antioxidantes, podemos concluir que o sistema de tamponamento de espécies reativas de oxigênio estava melhorado e assim, era esperado que os níveis plasmáticos de MDA, que mede indiretamente o estresse oxidativo, não estivessem alterados no grupo TR/LA, o que confirmou nossa hipótese. No entanto, no grupo SD/LA houve aumento nos níveis de MDA. Trabalho prévio mostrou efeitos positivos da L-Arginina na diminuição de MDA em ratos sedentários, treinados e diabéticos (HUANG et al., 2009; MOHAMEDIN et al., 2007), embora as concentrações de L-Arginina tenham sido discrepantes entre os dois estudos e o estudo do nosso grupo de pesquisa (2% Arg na dieta; 300mg/kg; 62,5mg/ml, respectivamente). Assim, não é claro ainda a razão dessa elevação encontrada nesse grupo.

TABELA 1 - Sumário dos resultados

Parâmetro	Resultado
Ganho de peso corporal	↓TR e TR/LA
Massa da gordura epididimal	↓SD/LA, TR e TR/LA
Tolerância ao esforço (último teste)	↑TR/LA
Glicemia de jejum	↓TR e TR/LA
Triglicérides plasmáticos	↓TR e TR/LA
Colesterol Total	↑TR e TR/LA
HDL Colesterol	Não houve diferenças
MnSOD	↑TR/LA
NOx citoplasmático	↑TR/LA
MtTFA (citoplasmática e mitocondrial)	↑TR/LA
ATP sintase C	↑TR/LA
nNOS (citoplasmática)	↑TR/LA
nNOS (mitocondrial)	Não houve diferenças
CuZnSOD	↑TR e TR/LA
MDA	↑SD/LA

FIGURA 26 – Resumo dos resultados e conclusões

9-CONCLUSÕES

A suplementação com L-Arginina, associada a um programa de treinamento físico aeróbio traz benefícios no que diz respeito ao aumento do marcador da biogênese mitocondrial mtTFA, na expressão da ATP sintase C, da nNOS citoplasmática e de defesa antioxidante, caracterizada pelo aumento da MnSOD, além de aumentar a tolerância ao esforço físico.

O treinamento físico se mostrou eficiente na redução da glicemia de jejum, triglicérides plasmáticos e aumento na CuZnSOD, embora tenha havido aumento no colesterol total em ambos os grupos submetidos ao treinamento.

9.1 Perspectivas

Mais estudos são necessários para avaliarmos a real importância da nNOS na biogênese mitocondrial induzida pelo exercício e pela suplementação com L-Arginina, além da expressão da AMPK total e fosforilada, para verificarmos o quanto que o treinamento físico associado à suplementação é capaz de ativar essa enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTS, B. *Biologia molecular da célula*. 3. ed. **Artes Médicas**. Porto Alegre. 1997.

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

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

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

BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quim. Nova.** v.29, n.6, p.1352-1360, Dez.2006.

BERGERON R. et al., Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 281, n.6, p.1340-1346, Dez. 2001.

BLAIR, S.et al. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. **JAMA.** v.276 (3), n.17, p.205-210, Jul.1996.

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

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

BROWN, G. C.; COOPER, C. E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. **FEBS.** v.356, n.19, p. 295-298, Dez.1994.

CASELLA-FILHO, A. et al. Effect of exercise training on plasma levels and functional properties of high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome. **Am J Cardiol.** v.107, n.8, p.1168-1172, Abr. 2011.

- CHEN, H. et al. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. **J Biol Chem.** v.278, n.45, p.45021-45021, Nov.2003.
- CHEN, Z.P. et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. **Diabetes.** v.52, n.9, p.2205-2212, Set.2003.
- CHIYODA, A. et al. Efeito da suplementação oral de arginina sobre a secreção de GH e metabolismo de lipídios em ratos Wistar treinados. **Motricidade.** v. 5, n.4, p.1-11, Dez. 2009.
- CHROMIAK, J.A.; ANTONIO, J. Use of amino acids as growth hormone-releasing agents by athletes. **Nutrition.** v.18, n.7-8, p.657-661, Jul/Ago. 2002.
- CIOLAC,E.G., GUIMARÃES,G.V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev. Bras. Med. Esporte.** v. 10, n.4, Jul/Ago.2004.
- CLEETER, M. W. et. al., Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS**, v. 345, n. 23, p. 50-54, Mai.1994.
- CLEMENTI, E. NISOLI, E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**v.142, n.2, p.102-110, Out. 2005.
- CLEMENTI, E.; NISOLI, E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. **Comp. Biochem. Physiol. a Mol. Integr. Physiol.** v. 142, n.2, p. 102-110, Out. 2005.
- DE MORAES et. al. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.** v. 29, p. 8-12, Mai.2008.
- DESHMUKH, A.S. et al. Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK) alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. **Diabetologia.** v. 53, n.6, p. 1142-1150, Jun. 2010.
- DESPRÈS, J.P. LAMARCHE, B. Low-intensity endurance exercise training, plasma lipoproteins and the risk of coronary heart disease. **J Intern Med.** v.236, n.1, p.7-22, Jul. 1994.
- DURSTINE, J.L, HASKELL, W.L. The influence of exercise on plasma lipids and lipoproteins. **Exerc Sport Sci Rev.** v.22, p. 477-521, 1994.
- FERREIRA, A.L.A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Rev Bras Clin Med.** v. 9, n.1, p. 54-61, Jan/Fev. 2011.

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

FRUHBECK, G.; GOMEZ-AMBROSI, J. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. **Cell Signal.** v.13, n.11, p.827-833, Nov. 2001.

FU, W.J. et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. **J Nutr.** v.135, n.4, p.714-721, Abr.2005.

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

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

GOMEZ-CAMPOS, R.A. **Efeitos da suplementação com L-Carnitina sobre a fadiga muscular do gastrocnêmio e a composição corporal de ratos tratados com dieta hiperlipídica.** 2010. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências da Motricidade) – Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

HAGEN, T. et al. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1a. **Science.** v. 302, n. 5652, p. 1975-1978, Dez. 2003.

HIRSHMAN, M.F. et al. Acute exercise increases the number of plasma membrane glucose transporters in rat skeletal muscle. **FEBS Lett.** v.238, n.2, p. 235-239, Out. 1998.

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

IRRCHER, I. et al. AMP-actived protein kinase-regulated activation of the PGC-1 alpha promoter in skeletal muscle cells. **PLoS One.** v.3, n.10, Out. 2008.

JOBGEN, W.S. et al. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. **J Nutr Biochem.** v.17, n.9, p.571-588, Set. 2006.

KAHN, B.B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab.** v.1, n.1, p.15-25, Jan. 2005.

KINGWELL, B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB J.** v.14, n.12, p. 1685-1696,

Set. 2000.

LAAKSO, M. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. **Diabetes**. v. 41, n.9, p.1076-1083, Set. 1992.

LAKKA, T.A, et al. Sedentary life style, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Med Sci Sports Exerc**. v.35, n.8, p.1279-1286, Ago. 2003.

LI, J. et al. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.287, n.5, p.834-841, Nov. 2004.

LJUBCIC, V.; HOOD, D.A. Kinase-specific responsiveness to incremental contractile activity in skeletal muscle with low and high mitochondrial content. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 295, n.1, p.195-204, Jul. 2008.

LJUBCIC, V. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. **Biochim Biophys Acta**. v.1800, n.3, p.223-234, Mar. 2010.

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

PRADO, E.;DANTAS, E. H. M. Efeitos dos exercícios Físicos Aeróbio e de Força nas Lipoproteínas HDL, LDL, e Lipoproteína (a).**Arq Bras Cardiol**. v.79, n.4, p.429-433,Out. 2002.

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

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, n.5, p.306-315, Out.2009.

HUBER-ABEL, F.A. et al. Exercise-induced angiogenesis correlates with the up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**. v.8, n.6, p.1-22, Abr.2011.

JI, L.L, FU, R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J Appl Physiol**. v.72, n.2, p.549-554, Fev.1992

KANALEY, J.A. et al. Human growth hormone response to repeated bouts of aerobic exercise. **J Appl Physiol**. v.83, n.5, p.1756-1761, Nov.1997.

KANALEY, J.A. Growth hormone, arginine and exercise. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.11, n.1, p.50-54, Jan. 2008.

KOHLMEIER, M. Minerals and trace elements. **ed. Nutrient metabolism**. New York: Academic Press, 2003.

KONTUREK, S.K, KONTUREK, P.C. Role of nitric oxide in the digestive system. **Digestion**. v.56, n.1, p.1-1, 1995.

KOWALTOWSKI, J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**. v. 47, n. 4, p. 333-343, Mai. 2009.

KUROWSKA, E.M, CARROLL, K.K. Hypocholesterolemic properties of nitric oxide. In vivo and in vitro studies using nitric oxide donors. **Biochim Biophys Acta**. v.1392, n.1, p.41-50, Mai.1998.

LIMA, I.P. **Correlación de glucose y colesterol em pacientes adultos mayores**. 2007. Tese de doutorado (Doutorado em farmácia) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Del Peru, Lima, 2007.

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

LIRA, V.A. et al. Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells. **J. Physiol**. v. 15, n.588, p.3551-3566, Jul. 2010.

LIRA, V.A. et al. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. v.293, n.4, p.1062-1068, Out. 2007 .

LUCOTTI, P. et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.291, n.5, p.E906-912, Nov. 2006.

LUSTGARTEN, M.S. et al. MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging. **Aging Cell**. v.10, n.3, p.493-505, Jun.2011.

MAJERCZAK, J. et al. Effect of 5-week moderate intensity endurance training on the oxidative stress, muscle specific uncoupling protein (UCP3) and superoxide dismutase (SOD2) contents in vastus lateralis of young, healthy men. **J Physiol Pharmacol**. v.61, n.6, p.743-751, Dez.2010.

MANCHADO, F.B. et al., Maximal lactate steady state in running rats. **J Exerc Physiol online**. v. 8, p. 1-8, Ago. 2005.

MCCONELL, G.K.; B.A. KINGWELL. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? **Exerc. Sport Sci. Rev.** v. 34, n. 1, p. 36–41, Jan. 2006.
MCCONELL, G.K., WADLEY, G.D. Potential role of Nitric Oxide in contraction-stimulated glucose uptake and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.35, n.12, p.1488-1492, Dez.2008.

MOHAMEDIN, A.M. et al. Can nitric oxide-generating compounds improve the oxidative stress response in experimentally diabetic rats? **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.34, n.7, p.586-593, Jul.2007.

MONCADA et al. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v.43, n.2, p.109-142, Jun.1991.

MONCADA, S.; BOLANOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J Neurochem**. v.97, n.6, p.1676-1689, Jun.2006.
NICASTRO et al. A suplementação de L-Arginina promove implicações ergogênicas no exercício físico? Evidências e considerações metabólicas. **Rev. Bras. Ci e Mov.** v.16, n.1, p.115-122, Jan.2008.

NISOLI, E. et al. Amino Acids and Mitochondrial Biogenesis. **Am J Cardiol**. v.101, n.11A, p.22E-25, Jun.2008.

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

NISOLI, E. et. al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. **Science**. v.299, n.5608, p.896-899, Fev.2003.

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

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

OLMOS, Y. et. al. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1 alpha in the induction of oxidative stress genes. **J Biol Chem**. v.284, n.21, p.14476-14484, Mai.2009.

PERSGHIN, G. et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med**. v.335, n.18, p.1357-1362, Out.1996.

POWERS SK, HOWLEY ET. Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho. 3. ed. São Paulo: **Manole**, 2000

POWERS, S. K., HOWLEY, E. T. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3 ed. **Manole**, São Paulo. 2000

QI, Z.et al. Physical exercise regulates p53 activity targeting SCO2 and increases mitochondrial COX biogenesis in cardiac muscle with age. **PLoS One**. v.6, n.7, p.1-12, Jul.2011.

RENNIE, K.L. et al. Association of metabolic syndrome with both vigorous and moderate physical activity. **Int J Epidemiol**. v.32, n.4, p.600-606, Ago.2003.

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

RORIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**. v.6, n. 38, p. 1-7, Dez. 2007.

ROY, D. et al. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. **Am J Physiol**. v.274, n.4, p.E692-699, Abr.1998.

RUSH, J. W. et al. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. **Can. J. Appl. Physiol**. v. 30, n. 4, p. 442-474, Ago.2005.

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

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

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M.K. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? **Proc Nutr Soc**. v. 63, n.2, p.287-292, Mai.2004.

SCHWEIZER, M.; RICHTER, C. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. **Biochem Biophys Res Commun**. v.204, n.1, p.169 175, Out.1994.

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

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

SMITH, S.R. et al. Concurrent physical activity increases fat oxidation during the shift to a high-fat diet. **Am J Clin Nutr.**v.72, n.1,p.131-138, Jul.2000.

SMUCKLER, S.R. Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release. **Diabetes.** v.51, n.12, p.3450-60, Dez.2002.

SONG, W. et al. Exercise training modulates the nitric oxide synthase profile in skeletal muscle from old rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v.64, n.5, p.540-549, Mai.2009.

SPINAS, G.A. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet beta-Cells. **News Physiol Sci.** v.14, p.49-54; Abr.1999.

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

SUBUDHI, A.W. et al. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.** v.11, n.1, p.32-41, Mar.2001.

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

TANSEY, J.T. et al. The central role of perilipin in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. **IUBMB Life.** v.56, n.7, p.379-385, Nov. 2004.

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

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, v. 44, n. 3, p. 248-252, Set.2004.

VASSILAKOPOULOS, T. et al. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.284, n.3, p.L452-457, Mar.2003.

VIÑA, J. et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. **Adv Drug Deliv Rev.** v.61, n.14, p.1369-1374, Nov.2009.

WADLEY, G.D, CHOATE J, McCONNELL, G.K. NOS isoform-specific regulation of basal but not exercise-induced mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle. **J Physiol.** v.585, n.15, p.253-262, Nov. 2007.

WADLEY, G.D, McCONNELL, G.K. Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. **J Appl. Physiol.** v. 102, n.1, p314-320, Jan. 2007.

WAREHAM,N.J. et al. A quantitative analysis of the relationship between habitual energy expenditure, fitness and the metabolic cardiovascular syndrome. **Br J Nutr.** v.80, n.3, p.235-241, Set.1998.

WELLS, B.J. et al. Association between dietary arginine and C-reactive protein. **Nutrition.** v.21, n.2, p.125-130, Fev.2005.

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

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

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

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

WU, G. MEININGER, C.J. Impaired arginine metabolism and NO synthesis in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat. **Am J Physiol.** v.269, n.4, p.H1312-1318, Out.1995.

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

WU, Z. et. al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell.** v. 98, n.1, p.115-124, Jul.1999.

YOUNG, M.E. et al. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. **Biochem J.** v.322, n.15, p.223-228, Fev.1997.

YOUNG, M.E.; LEIGHTON, B. Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP-evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. **FEBS Lett.** v.424, n.1-2, p.79-83, Mar.1998.

ZAGO, A. S.; KOKUBUN, E.; BROWN, M. D. Exercício físico como estímulo para o aumento da Produção e Biodisponibilidade do Oxido Nítrico e seu efeito no controle da Pressão Arterial. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 13, n. 1, p. 59-66, jan./abr. 2009.

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

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

ZHOU, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J Clin Invest.** v.108, n.8, p.1167-1174, Out.2001.

ANEXO A-PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2069-1, sobre "Avaliação da biogênese mitocondrial no músculo esquelético de ratos submetidos ao exercício físico e suplementação com L-Arginina", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Angelina ZanESCO / Profa. Dra. Fernanda B. M. Privero / Carmem Peres Valgas da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 28 de junho 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2069-1, entitled "Mitochondrial biogenesis evaluation in the skeletal muscle from rats submitted to physical exercise and supplemented with L-Arginine", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 28, 2010.

Campinas, 28 de junho 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>