



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

Ricardo de Andrade Soares

**Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre o
treinamento físico aeróbico de ratos**

Rio de Janeiro

2017

Ricardo de Andrade Soares

**Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre o
treinamento físico aeróbico de ratos**

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

Orientador : Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende
Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S676 Soares, Ricardo de Andrade.
Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre o treinamento físico aeróbico de ratos / Ricardo de Andrade Soares – 2017.
83 f.

Orientadora: Angela de Castro Resende.
Coorientadora: Dayane Teixeira Ognibene.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Polifenóis - Teses. 3. Antioxidantes – Teses. 4. Açaí – Efeito fisiológico - Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. 6. Biogênese de Organelas. I. Resende, Angela de Castro. II. Ognibene, Dayane Teixeira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 612.766.1:634.613

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

Assinatura

Data

Ricardo de Andrade Soares

**Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre o
treinamento físico aeróbico de ratos**

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

Aprovada em 18 de julho de 2017.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes– UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Renata Frauches Medeiros

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família: Rogéria e Felipe e demais familiares que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me dando forças.

AGRADECIMENTOS

À minha primeira base familiar: Minha mãe e meu irmão, pelo carinho, paciência e apoio em minhas escolhas. Aos demais familiares, tios, tias, primos e primas, agregados e todos aqueles que me circundam, agradeço imensamente pelo apoio.

À Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende, pela oportunidade de desenvolver o projeto no laboratório, aprendi muito nesses últimos dois anos com sua visão meticulosa e correta na execução de um bom trabalho, sou grato por tudo.

À Isabelle Santos Xavier Dias, obrigado pela amizade, companheirismo e pelos momentos divertidos que compartilhamos durante todos esses anos.

À Prof.^a Dra. Dayane Ognibene, sempre lançando um olhar atencioso e efetivo sobre a execução de um trabalho.

À Grazielle Freitas de Bem e Izabelle Barcelos por todo auxílio e apoio nesse período. Sou muito grato por toda ajuda e amizade de vocês.

À Lenize Costa dos Reis Carvalho, por seus ensinamentos e pelo grande apoio no desenvolvimento do trabalho, ensinou-me as bases do trabalho prático, além de ser uma “mãezona” no laboratório. Muito obrigado, mesmo.

Aos grandes amigos durante a faculdade, Camila Cavalieri, Bianca Saguie, Ana Clara Frony, Fabio Sousa, Filipe Gabriel, Juliana Vilhena e Shayane Gomes, sem a ajuda de vocês seria muito difícil chegar aonde cheguei . Obrigada por toda a ajuda e amizade.

Às Professoras Dra. Cristiane Aguiar Costa, e Dra. Ana Paula Rocha pela convivência tranquila e agradável, e por todos os ensinamentos.

À todos os amigos e colegas do LFCPM: Douglas Valquintans, Thamires Barros, Alexandre silva, Michelle Gomes, Anicett Okinga, Viviane Cristino, Beatriz Cardoso, Matheus Pontes, Matheus Henrique, Dafne Lopes, Amanda Medeiros e Julia Mello. Sou muito grato por fazer parte de uma equipe tão amiga, agradável e divertida de se trabalhar. Obrigado a todos.

A todos os meus bons mestres desde meu ensino fundamental até o superior que ajudaram na minha formação pessoal e profissional.

A todos aqueles que contribuíram para esse trabalho de forma direta ou indireta e que não foram citados.

Primeiro o Café. Depois os planos.

Leanna Reese Hieber

RESUMO

SOARES, Ricardo Andrade. **Efeitos do extrato da *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) sobre o treinamento físico aeróbico de ratos.** 2017. 83f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O treinamento físico crônico resulta em adaptação do músculo esquelético que melhora a resposta à demanda metabólica aumentada. Neste contexto, adaptações nos mecanismos de controle vascular, como o aumento da vasodilatação dependente de endotélio, exercem um importante papel no aumento do fluxo sanguíneo para o músculo durante e após o exercício. Sendo assim, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio pode ocorrer como consequência da maior captação de oxigênio. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE), rico em polifenóis, possui propriedades vasodilatadoras e antioxidantes. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar se o tratamento com ASE melhora o desempenho do exercício físico em ratos. Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: Sedentário (dieta padrão), Sedentário + ASE (dieta padrão + ASE 200mg/kg), Treino (dieta padrão + treinamento físico) e Treino + ASE (dieta padrão + ASE 200mg/kg e treinamento físico). O teste de esforço máximo consistiu em um protocolo de exercício físico escalonado em esteira rolante, iniciando em 3m/min, incrementado de 4m/min a cada três minutos até a exaustão do animal. O treinamento físico crônico foi realizado em esteira rolante, durante quatro semanas, cinco vezes por semana, com duração de trinta minutos cada sessão. A intensidade do treinamento foi estabelecida em 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço máximo. Foram avaliados os níveis de glicemia e lactato no plasma, assim como a reatividade vascular em leito arterial mesentérico (LAM), o dano oxidativo e a atividade antioxidante em homogenato de músculo *soleus* e plasma, e os níveis proteicos em homogenato de músculo. A distância (m) e o tempo (s) foram maiores ($p \leq 0.05$) no grupo Treino + ASE comparados ao grupo Treino. Os níveis de lactato (mmol/L) estavam reduzidos ($p \leq 0.05$) no grupo Treino + ASE em relação aos grupos Treino e sedentário. Os níveis de glicose (mg/DL) não diferiram entre os grupos. O treino reduziu ($p \leq 0.05$) a resposta vasoconstritora à noradrenalina (NA) em relação ao grupo sedentário, apenas em doses baixas, já a associação de ASE ao exercício potencializou esta redução. O relaxamento em resposta à ACh foi maior ($p \leq 0.05$) nos grupos que praticaram exercício físico em relação ao grupo sedentário. Em doses baixas a associação do ASE ao exercício potencializou a resposta à ACh. Os níveis de malondialdeído não alteraram entre os grupos nos tecidos analisados, assim como a carbonilação de proteínas. A atividade da enzima superóxido dismutase foi maior no grupo Treino + ASE em relação aos grupos Treino e Sedentário em tecido muscular e da glutatona peroxidase foi maior no plasma dos grupos suplementados com ASE em relação aos controles. Os níveis da proteína PGC1 α foram maiores no grupo Treino em relação aos sedentários. Portanto, o ASE aumentou a distância e o tempo de exercício em ratos submetidos a treinamento físico, sugerindo um efeito benéfico importante do extrato sobre o desempenho desses animais. A redução da resistência vascular e o aumento da capacidade antioxidante provavelmente podem promover uma melhor oxigenação do músculo, reduzindo a produção de lactato e a fadiga muscular.

Palavras-chave: Exercício físico. Polifenóis. Biogênese mitocondrial. Antioxidante.

ABSTRACT

SOARES, Ricardo Andrade. **Effects of *Euterpe oleracea* Mart extract. (Açaí) on the aerobic physical training in rats.** 2017. 83f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The chronic exercise training results in adaptation of skeletal muscle to the increased metabolic demand. Adjustments in vascular control mechanisms plays an important role in increasing blood flow to the muscle during and after exercise. On the other hand, the increase in reactive oxygen species may occur as a result of increased oxygen uptake. Previous studies from our group demonstrated that the hydroalcoholic extract from the seeds of açaí (ASE) has antioxidant and vasodilator properties. Thus, the aim of this study was to evaluate if treatment with ASE, rich in polyphenols improves chronic exercise training. Wistar rats were divided in four groups: Sedentary (standard diet), Sedentary+ASE (standard diet + ASE 200mg/kg), Training (standard diet and, subjected to exercise training) and Training+ASE (standard diet + ASE 200 mg/kg subjected to exercise training). The test consisted of an exercise protocol on a treadmill, with initial speed of 3 m/min, increased to 4m/min every three minutes until exhaustion of the animal, at which no longer maintains the racing standard. The animals trained for 4 weeks, 5 times per week with duration of 30 minutes per session. The training intensity was 60% of the maximum speed reached during maximal incremental test. Blood glucose and lactate were measured in plasma by glucose and lactate meter, the vascular reactivity was studied in perfused mesenteric arterial bed (MAB). Oxidative damage, and antioxidant enzymatic activity were measured in muscle skeletal tissue homogenates and plasma. Western blotting was evaluated in in muscle skeletal tissue homogenates. The distance (m) and exercise time (min) were significantly increased in the Trainings in relation to the training group. The lactate levels were reduced in Training + ASE ASE. The glucose levels were not different between groups. The vascular reactivity to small doses of NOR was reduced in relation to Sedentay group and the vasodilator effect of ACh was increase in training groups. The malondialdehyde level did not change between groups as well as the carbonylation of proteins. The activity of the enzyme superoxide dismutase was significantly higher in the Training + ASE group compared to the Training and Sedentary groups in muscle tissue and the GPx was significant higher in the supplemented groups with ASE compared to the control groups in plasma. The protein expression of PGC1 α was higher in the Training group compared to the sedentary groups. Therefore, ASE increased the distance and exercise time in rats subjected to exercise training, suggesting an important beneficial effect of the extract on the performance of this animals. The reduction of vascular resistance and the increased antioxidant capacity may probably promote better oxygenation of the muscle, reducing the production of lactate and muscle fatigue.

Keywords: Exercise Training. Polyphenols. Mitochondrial biogenesis. Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática da cascata de sinalização da insulina.....	19
Figura 2-	Biogênese mitocondrial induzida pelo exercício.....	24
Figura 3 -	Foto ilustrativa da <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (açai).....	28
Figura 4 -	Perfil de eluição obtido por cromatografia líquida do extrato hidroalcoólico do caroço do açai.....	29
Figura 5 -	Representação esquemática do protocolo experimental.....	34
Figura 6 -	Foto do treinamento em esteira rolante.....	35
Figura 7 -	Isolamento e canulação do Leito arterial mesentérico.....	37
Figura 8 -	Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	38
Figura 9 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício sobre o ganho de peso corporal.....	45
Figura 10 -	Efeito do teste progressivo máximo inicial sobre a distância percorrida e o tempo de exercício.....	46
Figura 11 -	Efeito do tratamento com ASE sobre o tempo de atividade física no teste progressivo máximo.....	47
Figura 12 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a distância percorrida no teste progressivo máximo.....	48
Figura 13 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos.....	49
Figura 14 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas da via de sinalização da insulina.....	50
Figura 15 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato.....	51
Figura 16 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico.....	52

Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico.....	53
Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da noradrenalina em leito arterial mesentérico.....	54
Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas peNOS e Hsp90.....	55
Figura 20 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre os níveis de TBARS.....	56
Figura 21 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre os níveis de carbonilação de proteínas.....	57
Figura 22 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima superóxido dismutase.....	58
Figura 23 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima glutationa peroxidase.....	59
Figura 24 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima catalase.....	60
Figura 25 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas da cascata de sinalização biogênese mitocondrial no tecido muscular esquelético.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
ASE	<i>Açaí Stone Extract</i> (Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí)
BH4	Tetrahidrobiopterina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAT	Catalase
CDC	<i>Centers For Disease Control and Preventions</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDRF	Fator relaxante derivado de endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERR	Receptores relacionados ao estrógeno
Glut- 4	Transportador de glicose4
GMP	Monofosfato cíclico de guanosina
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GSK3	Glicogênio sintase quinase
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KCl	Cloreto de potássio

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MEFs	fatores ativadores de miócitos
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NE	Noraepinefrina
NG	Nitroglicerina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOR	Noradrenalina
NOS	Óxido nítrico sintase
NRFs	Fatores respiratórios Nucleares
ON	Óxido nítrico
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
PDK	Proteínas quinase fosfatidilinositol-dependente
PGC1 α	coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
pH	Potencial hidrogênionico
Pi3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato
pKa	Constante de dissociação ácida
PKC	Proteínas quinases C
PP1	Proteína fosfatase 1
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
Sirt1	Sirtuína-1
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFAM	Fatores de transcrição mitocondrial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVO	31
1.1	Objetivo geral	31
1.2	Objetivos específicos	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Animais utilizados e modelo experimental	32
2.2	Preparo do extrato hidro alcoólico do caroço de açaí	33
2.3	Protocolo de treinamento físico	33
2.4	Dosagens séricas	35
2.4.1	<u>Glicemia</u>	35
2.4.2	<u>Lactato</u>	36
2.5	Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) e do músculo <i>soleus</i> de rato	36
2.6	Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas	37
2.7	Análise da expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i>	39
2.8	Ensaio pró-oxidantes	40
2.8.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</u>	40
2.8.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	41
2.9	Atividade das enzimas antioxidantes	41
2.9.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u>	42
2.9.2	<u>Medida da catalase</u>	42
2.9.3	<u>Medida da glutathione peroxidase</u>	43
2.10	Análise estatística	43
3	RESULTADOS	45
3.1	Efeito do tratamento com ASE e do exercício sobre o ganho de peso corporal	45
3.2	Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo	45
3.3	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de glicemia	49

3.4	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas da via de sinalização da insulina.....	49
3.5	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato.....	50
3.6	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM.....	51
3.7	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM.....	52
3.8	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstrictora da noradrenalina em LAM.....	53
3.9	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis das proteínas peNOS e Hsp90.....	54
3.10	Efeito do Tratamento com ASE e do exercício físico sobre os ensaios pró-oxidantes.....	55
3.10.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</u>	55
3.10.2	<u>Carbonilação de proteínas.....</u>	56
3.11	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade das enzimas antioxidantes.....	57
3.11.1	<u>Superóxido dismutase.....</u>	57
3.11.2	<u>Glutathione peroxidase.....</u>	58
3.11.3	Catalase.....	59
3.12	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial no tecido muscular esquelético.....	60
4	DISCUSSÃO.....	62
	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

A inatividade física é considerada uma das condições primárias para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas (Booth et al. 2012). Diante deste fato, a prática do exercício físico de frequência regular e intensidade moderada tem sido altamente recomendada por diversas associações de saúde como o American College of Sports Medicine, o Center for Disease Control and Prevention, a American Heart Association, o National Institutes of Health, o US Surgeon General, a Sociedade Brasileira de Cardiologia e a Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte (Ciolac et al. 2004), principalmente, por sua capacidade de prevenir e auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares crônicas e no combate à obesidade (Curtis et al. 2017).

Segundo o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), indivíduos adultos, entre 18 e 64 anos, necessitam de duas horas e meia (cento e cinquenta minutos) de atividade física regular e aeróbica por semana para manter-se saudável. Entre crianças e adolescentes o tempo médio é de aproximadamente uma hora por dia (CDC, 2008). Contudo, um recente estudo demonstrou que apenas três minutos de exercício físico de intensidade intermitente por semana seria o suficiente para obter ganhos na sensibilidade à insulina, na frequência cardiorrespiratória e no conteúdo de mitocôndrias no músculo esquelético (Gibala et al. 2016).

A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pela contração da musculatura esquelética, que resulta em um aumento substancial de gasto energético, resultando em um conseqüente aumento do consumo de oxigênio devido à demanda muscular. O termo “exercício físico” é aplicado a diversas práticas físicas as quais diferem quanto à sua intensidade e duração. São movimentos corporais planejados, estruturados e repetitivos, responsáveis pela melhora ou manutenção de um ou mais componentes da aptidão física (Caspersen et al. 1985).

O exercício físico é considerado um estresse fisiológico para o organismo, pois durante a sua prática, ocorre tanto o aumento da demanda energética como a da dissipação de calor, culminando na produção de ajustes homeostáticos integrados denominados respostas fisiológicas ou efeitos agudos do exercício. Entre os efeitos agudos podemos citar a sudorese, o aumento da frequência cardíaca, da

ventilação pulmonar, da sensibilidade à insulina e da secreção de catecolamina, assim como a redução da atividade parassimpática e do fluxo sanguíneo esplâncnico. Após algumas semanas de exposição regular e repetitiva ao exercício físico, adaptações morfofuncionais são desenvolvidas, caracterizando o efeito crônico, que aumenta a capacidade do organismo em responder aos estímulos agudos do exercício. Como exemplos de efeitos crônicos do treinamento aeróbico temos o aumento do consumo máximo de oxigênio, do débito cardíaco máximo e da densidade capilar do músculo esquelético treinado, adaptações periféricas como o aumento do transporte e oxidação de ácidos graxos, da capacidade mitocondrial, além da diminuição da frequência cardíaca de repouso e esforço submáximo. (Nóbrega, 2006; Holloszy et al. 1984 e Calvo et al. 2008).

Sendo assim, adaptações nos mecanismos de controle vascular, como o aumento da vasodilatação dependente de endotélio, exerce um importante papel no aumento do fluxo sanguíneo para o músculo durante e após o treinamento, garantindo assim a manutenção da atividade. (McAllister et al. 2010)

Exercício Físico e a Função Vascular

A prática do exercício físico tem sido amplamente reconhecida como uma excelente estratégia na prevenção da disfunção endotelial em humanos e em modelos animais de hipertensão arterial (Beck et al. 2014). Os efeitos anti-hipertensivos do exercício físico são atribuídos principalmente a adaptações estruturais que geram maior responsividade vascular aos estímulos vasodilatadores. (Cláudio et al. 2017). Estudos em reatividade vascular para agentes vasodilatadores e vasoconstritores tem demonstrado o papel do exercício físico em promover maior relaxamento induzido pela acetilcolina, um vasodilatador dependente de endotélio, em aorta de ratos (Jordão et al. 2017), assim como reduzir a contração provocada por norepinefrina em ratos hipertensos (Araújo et al. 2013). É sabido que o exercício promove melhora na capacidade vasodilatadora dependente de endotélio, principalmente, devido ao aumento da produção e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador (Graham et al. 2004; Green et al. 2004; Walsh et al. 2003). O exercício físico também está associado ao aumento da expressão da

enzima NO sintase endotelial (eNOS), fosforilando o seu principal sítio ativo (ser1177) (Hambrecht et al. 2003) e mantendo-a estável no seu estado dimerizado (Farah et al. 2013; Grijalva et al. 2008). Além disso, há melhora na atividade de enzimas antioxidantes que reduzem os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Gielen S et al. 2010). Sendo assim, não ocorre a reação entre essas espécies e o NO gerado, aumentando a biodisponibilidade do último (Battault S et al. 2016). Portanto, a resposta vascular ao treinamento aeróbico parece estar relacionada ao aumento da biodisponibilidade do NO, o que representa um equilíbrio entre a produção por eNOS e a remoção pelo ânion superóxido (Jordão et al. 2017).

No músculo esquelético, um poderoso regulador da resistência vascular periférica é o sistema nervoso simpático. O aumento da atividade simpática resulta em um aumento da resistência vascular periférica, modulando a pressão sanguínea. A constrição de vasos de resistência via modulação simpática é fundamental para a manutenção da pressão sanguínea em exercícios corporais de alta intensidade. Porém, durante o exercício físico, essa ativação simpática é superada pela produção de agentes vasodilatadores nos eritrócitos, nas células endoteliais e também pela simpatólise funcional no músculo em atividade (Nyberg et al. 2015).

A simpatólise funcional é descrita como uma modulação do efeito da atividade simpática, induzida por compostos formados localmente, reduzindo o efeito vasoconstritor da noradrenalina no músculo ativo (Remensnyder et al. 1962), através principalmente, da dessensibilização de receptores adrenérgicos. Este mecanismo tem sido descrito em numerosos estudos com humanos e animais, sendo apontado como um dos principais mecanismos vasodilatadores durante o exercício físico no músculo ativo. Atribui-se ao ATP, a indução da simpatólise em humanos e ao NO em roedores (Nyberg et al. 2015).

Outro mecanismo de grande importância observado no controle do fluxo sanguíneo é o aumento da dilatação dependente de endotélio tanto de vasos de condutância, como de vasos de resistência na musculatura esquelética de humanos, roedores e porcos após o exercício físico de resistência (McAllister et al. 2010). O NO derivado do endotélio é um poderoso vasodilatador, uma vez que o mesmo estimula a guanilil ciclase solúvel na célula muscular lisa vascular induzindo a formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMP). Esse composto ativa a proteína quinase C, promovendo o reabastecimento do cálcio citosólico para o retículo sarcoplasmático, a expulsão do cálcio para o meio extracelular e a abertura

dos canais de potássio dependentes de cálcio (Carvajal et al. 2000). A diminuição da concentração intracelular de cálcio promove uma redução da fosforilação da miosina via quinase de cadeia leve da miosina, resultando no relaxamento das células musculares lisas. A camada de célula muscular lisa presente em vasos sanguíneos é a responsável pelo movimento de contração e relaxamento do vaso (Zhao et al. 2015)

O NO é produzido pela enzima NO sintase (NOS) utilizando a L-arginina como substrato. Existem três isoformas da enzima: a neuronal (nNOS), a induzível (iNOS) e a endotelial (eNOS) (Alderton et al., 2001). Estudos tem reportado o aumento da expressão e atividade da enzima NO sintase no músculo esquelético de humanos e ratos com a prática do exercício físico crônico (McConnel et al. 2007; Rudnick et al. 2004 e Balon et al. 1997), assim como, o aumento da expressão da eNOS, em vasos de resistência de ratos que praticaram atividade física (McAllister et al. 2005 e Spier et al. 2004). Contudo, ainda é incerto se esse aumento da expressão enzimática necessariamente implica no aumento da produção de NO.

A produção de NO pela NOS requer a presença de diversos cofatores incluindo tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo, calmodulina e ferro protoporfirina IX (heme) (Zhao et al., 2015 e McAllister et al. 2010). Outra proteína acessória que exerce modulação positiva na célula endotelial é a Hsp90 (proteína de choque térmico), uma chaperona que auxilia na estabilização da NO sintase e permitindo uma maior fosforilação da mesma pela Akt, com posterior geração de NO (Fontana et al. 2002). Além disso, a Hsp90 afeta a atividade específica da eNOS por meio do sítio específico com a Akt quinase (Sessa et al. 1998; Thomas et al. 2010). Apesar do importante papel regulatório da Hsp90 na atividade da NOS, poucos estudos avaliaram as alterações dessa proteína no músculo esquelético após treinamento físico crônico, observando aumento (Harris et al. 2008) ou nenhuma alteração de sua expressão (McAllister et al. 2010).

A melhora do fluxo sanguíneo no músculo em exercício, portanto, é um fator primordial, principalmente por fornecer oxigênio e glicose, fundamentais para a manutenção da prática física.

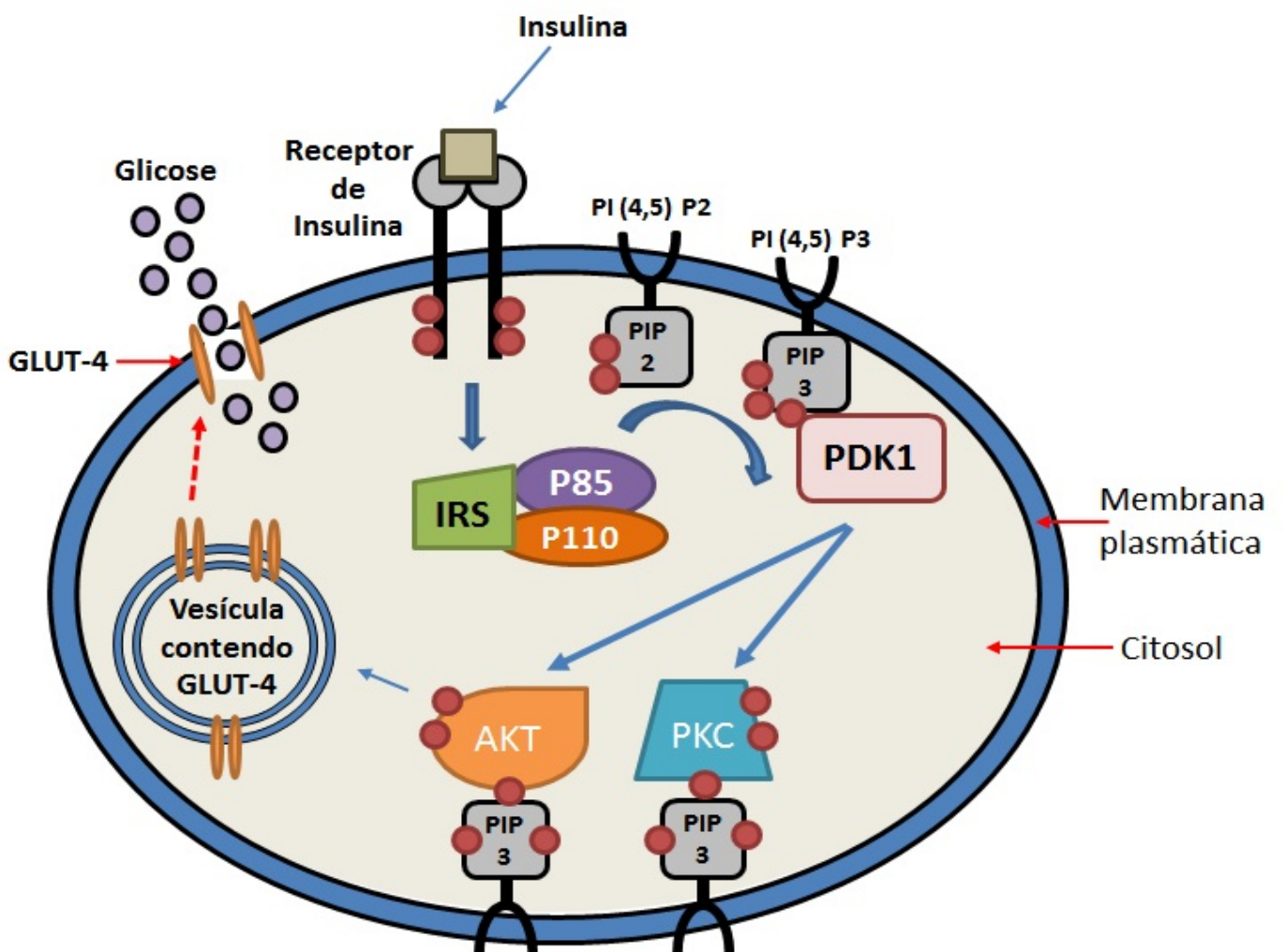
Exercício Físico e a captação de glicose

A captação de glicose no tecido muscular durante o exercício físico é um evento fundamental para a manutenção do mesmo. Essa captação pode ocorrer durante um exercício de alta intensidade ou de longa duração e dependerá de três fatores: a biodisponibilidade de glicose, do transportador de glicose e do metabolismo da glicose. Esta obtenção de glicose no tecido muscular é dependente da translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a membrana plasmática. (Parker et al. 2017). Estudos da literatura demonstram a existência de duas vias principais de sinalização que culminam na translocação do GLUT-4, uma dependente e outra independente de insulina. A insulina possui uma diversidade de ações e atua sobre vários tecidos, através de uma rede complexa de vias intracelulares. Entretanto, se destaca a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) /proteína quinase B (Akt), uma das principais responsáveis por suas ações no metabolismo da glicose sendo esta via a de maior enfoque (Alvim et al., 2014)

Este hormônio peptídico desencadeia seus efeitos biológicos mediante a fosforilação de proteínas. Sua ação celular se inicia através da interação da mesma com o seu receptor (figura 1). O receptor de insulina (IR) é uma proteína heterotetramérica, que possui atividade tirosina quinase intrínseca (Ramalingam et al., 2013). Essa proteína é composta por duas subunidades α extracelulares, as quais contêm o sítio de ligação para a insulina; e duas subunidades β transmembranares. Na porção intracelular, encontram-se os domínios tirosina quinase. A ligação da insulina à subunidade α provoca uma alteração conformacional que resulta na autofosforilação da subunidade β do receptor (Watson e Pessin, 2001), ativando os substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS) (Kanzanki et al. 2004). A porção tirosinaquinase fosforila o substrato do receptor de insulina (IRS1/2) recrutando, desta forma, a proteína PI3K (formada pelo dímero composto por uma subunidade reguladora p85 associado com a subunidade catalítica p110) para a membrana plasmática, onde irá produzir um segundo mensageiro lipídico, o fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato (PIP3), que por sua vez ativa uma cascata de fosforilação serina/treonina (Alessi et al. 1998). Os alvos do PIP3 incluem as proteínas quinase fosfatidilinositol-dependente (PKD1), a AKT e as atípicas proteínas quinases C (PKC) (Powell, 2007). Após essa ligação a PKD1 fosforila a

AKT e as PKCs, promovendo sua ativação (Goodyear et al. 1995). A AKT regula a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática (Saltiel et al. 2001), sendo que no tecido adiposo e na musculatura esquelética o subtipo de GLUT expresso é o GLUT-4 (Thorens et al. 1990). Este é translocado para a membrana plasmática induzido pela AKT ativa, facilitando a entrada de glicose na célula. (Alvim et al. 2014)

Figura 1- Representação esquemática da cascata de sinalização da insulina



Legenda: Translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática através da via dependente insulina.

Fonte: Adaptado de Alvim et al. 2014.

A outra via de sinalização que culmina na translocação do GLUT-4 é independente da insulina, e ativada principalmente pela contração muscular. Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 possuem uma redução na captação de

glicose dependente de insulina devido à resistência insulínica. Porém, esses indivíduos usualmente não apresentam anormalidades na captação de glicose durante a atividade física. Sendo assim, o exercício físico torna-se, reconhecidamente, uma das intervenções mais importantes na estimulação da captação de glicose por via independente de insulina (Alvim *et al.*, 2014). O papel da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) nessa via é de grande importância, pois sua ativação é dependente do decréscimo energético da célula (Hardie, 2003; Kemp *et al.* 2003). Uma vez ativa, a AMPK fosforilada participa de vias que geram o aumento de ATP, tais como a oxidação de ácidos graxos, e além disso, desativa as vias anabólicas que consomem o ATP, como a síntese de ácidos graxos. Durante o exercício físico ocorre o aumento da atividade da AMPK em resposta à demanda para gerar mais ATP, o qual acaba promovendo a translocação das vesículas contendo GLUT-4, facilitando o transporte de glicose para o músculo (Pauli *et al.*, 2009).

Exercício físico e o metabolismo aeróbico e anaeróbico

Durante o exercício físico, a produção de energia é de fundamental importância, pois a demanda energética é alta. Com a continuidade do exercício, as reservas de glicogênio muscular reduzem progressivamente e parte da energia despendida no esforço passa a ser fornecida através de triglicerídeos musculares, por glicose e por ácidos graxos livres circulantes no plasma. A reserva energética de ATP no organismo é limitada, sendo assim o organismo desenvolveu, ao longo dos milênios, a capacidade de ressintetizar o ATP (Knuiman *et al.* 2015) A formação de energia pela via aeróbica é mais lenta, e engloba a participação da via glicolítica, onde a glicose é quebrada formando ácido pirúvico que passa pela mitocôndria, ciclo de Krebs e cadeia respiratória. A via aeróbica tem como aceptor final de elétrons o oxigênio. Portanto, a via aeróbica é dependente de várias enzimas, de oxigênio e da passagem de piruvato para dentro da mitocôndria. Por isso, os exercícios tipicamente aeróbicos são de longa duração e intensidade moderada (Silva *et al.*, 2007). Acredita-se que, durante o exercício cíclico de alta intensidade, o

metabolismo aeróbio exerce a sua predominância a partir do trigésimo segundo (Urso et al. 2013).

Durante um exercício leve, a necessidade de ATP situa-se dentro dos limites de capacidade aeróbica, com isso o ATP é produzido por fosforilação oxidativa, porém conforme a intensidade do exercício aumenta, vias anaeróbicas da produção de energia tornam-se mais importantes. O lactato é conhecido como o produto final da glicólise anaeróbica, via de fundamental importância durante o exercício de alta intensidade (Koho et al. 2002). A via anaeróbica ainda pode ser classificada como alática, onde ocorre a hidrólise dos reservatórios de adenosina trifosfato e fosfocreatina (Urso et al. 2013). A acumulação de lactato nas células musculares inicia uma cascata que eventualmente leva a fadiga muscular. O ácido láctico é a forma ácida do lactato, e isso significa que o mesmo pode atuar doando prótons pela liberação de hidrogênio. Dessa forma, no pH fisiológico do corpo, o ácido láctico que possui um baixo pKa (Constante de dissociação ácida), dissocia-se em lactato (forma estável) e hidrogênio (H⁺), causando redução do pH e produzindo acidose muscular, sendo considerado como uma das possíveis causas de fadiga muscular, durante exercícios de alta intensidade (Hollidge et al. 2000; Sutton JR et al. 1981; Donaldson et al. 1978). Contudo, nos últimos anos a ideia sobre o papel do lactato no exercício tem gradualmente mudado com o surgimento de novas evidências sugerindo que muitas adaptações ao exercício físico podem ser mediadas por lactato, apesar dos mecanismos por trás dessas adaptações ainda não serem totalmente elucidados (Nalbandian, 2016).

Exercício físico e Biogênese Mitocondrial

A biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e a divisão de uma mitocôndria pré-existente. Segundo a teoria da endossimbiose, a origem mitocondrial é de uma α -protobactéria endossimbionte que se tornou bem estabelecida nas células hospedeiras; isso explica o fato de mitocôndrias possuírem o seu próprio genoma e a capacidade de autorreplicação (Clapier et al. 2008). Sendo assim, as proteínas mitocondriais são codificadas não só pelo genoma nuclear da célula hospedeira, como também pelo genoma mitocondrial (Baker et al.

2007). Neste contexto, a biogênese mitocondrial é um processo que requer uma refinada coordenação entre a transcrição no genoma nuclear e mitocondrial.

A transcrição de genes mitocondriais é primeiramente regulada através de um coativador de transcrição chamado coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC1 α). Tem sido atribuído a PGC1 α um papel fundamental na regulação da biogênese mitocondrial no músculo esquelético em resposta a atividade física, por isso, é amplamente utilizada como um marcador da adaptação do músculo esquelético ao exercício físico (Drake et al. 2017). Os membros da família PGC1 são comumente expressos em tecidos ricos em mitocôndrias como no tecido adiposo, tecido muscular cardíaco, e no tecido muscular esquelético de contração lenta (Lin et al. 2005). Uma vez presente no núcleo celular a PGC1 α modula a atividade de muitos fatores de transcrição, incluindo os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), fatores ativadores de miócitos (MEFs), receptores relacionados ao estrógeno (ERR) e fatores respiratórios nucleares (NRFs) (Romanello, 2016). Após a transcrição de NRF1 e NRF2, estes regulam a transcrição do fator de transcrição mitocondrial (TFAM), sendo o mesmo responsável pela replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Clapier et al. 2008) (figura 2).

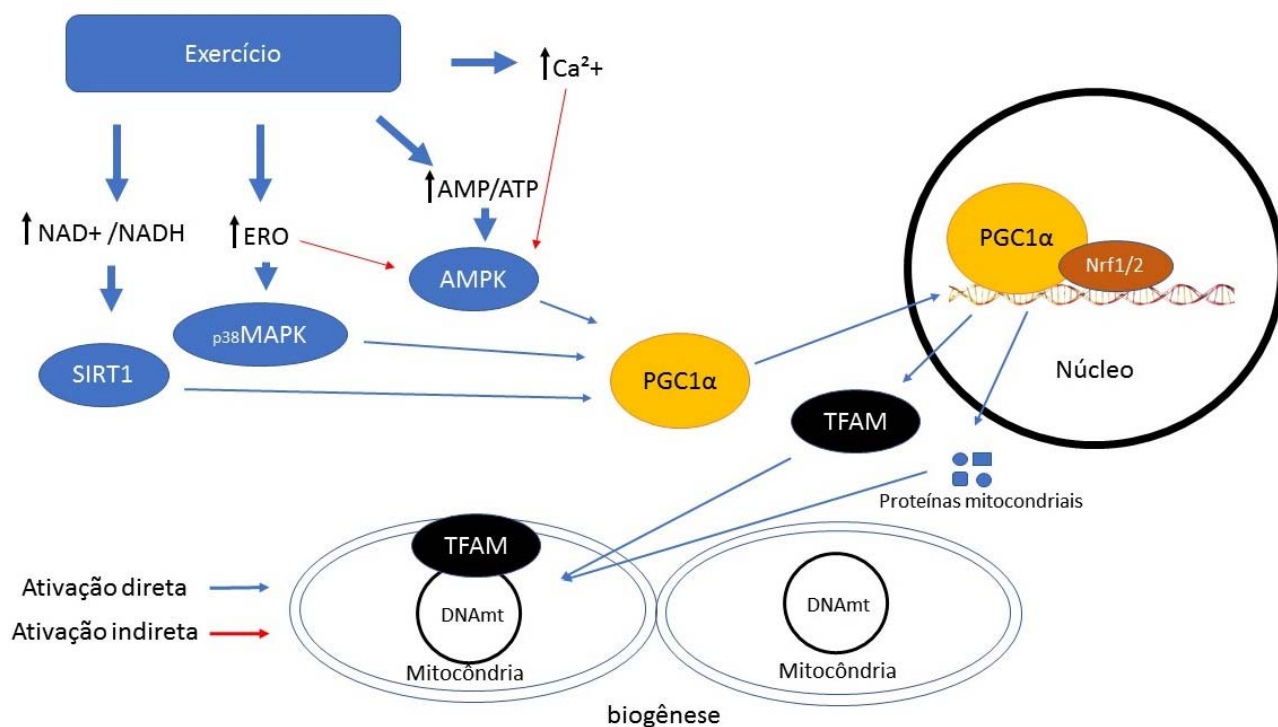
A maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo núcleo celular, sendo transportadas para a mitocôndria via chaperonas moleculares e importadas para a matriz mitocondrial através de translocases (Hood et al. 2016). No interior da mitocôndria, ocorre uma montagem de subunidades derivadas tanto do núcleo como da mitocôndria, sendo esse processo, parte fundamental da biogênese mitocondrial que culminam na fissão ou fusão da mitocôndria. (Clapier et al. 2008 e Drake et al., 2017). A capacidade de sofrer fissão a fusão permite a divisão das mitocôndrias e ajuda a garantir organização adequada da rede mitocondrial durante a biogênese (Clapier et al., 2008).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a proteína quinase ativada por mitógenos p38 (p38MAPK) desempenham papéis importantes na biogênese mitocondrial uma vez que estas ativam por fosforilação a PGC1 α no músculo esquelético (Tang, 2016) (figura 2). Durante o treinamento de alta intensidade os níveis de fosfocreatinina são esgotados rapidamente no tecido muscular. Para a manutenção da atividade física, é necessária a produção de ATP por via glicolítica anaeróbica láctica ou por via aeróbica. No processo de quebra e regeneração do

ATP, outros metabólitos são formados como o ADP, o AMP e a creatina. Esses três metabólitos são responsáveis por afetar a atividade da PGC1 α , uma vez que o aumento desses metabólitos leva a ativação da AMPK. Quando inativada a AMPK encontra-se ligada ao ATP e desfosforilada. Conforme os níveis de ADP e AMP aumentam, eles se ligam a AMPK alostericamente ativando-a e protegendo-a da desfosforilação. Por sua vez, a AMPK em sua forma fosforilada e ativa passa a exercer um papel central na regulação da PGC1 α (Baar, 2014; Hood et al., 2016). Outro mecanismo de ativação da AMPK é através da elevação dos níveis de cálcio citosólico, possivelmente via ERO. Durante a atividade contrátil dos miotubos, a ativação de cálcio e AMPK são críticas para o aumento da atividade transcricional da PGC1 α , bem como de sua atividade promotora (Hood et al. 2016).

Além da fosforilação, outra mudança pós-transcricional da PGC1 α é a acetilação, que ocorre em seu resíduo de lisina sendo catalisada pelo ubiquitina histona acetiltransferase de controle geral do aminoácido de síntese 5 (GCN5). Nesse estado, a PGC1 α juntamente com proteínas acessórias que auxiliam sua atividade transcricional, são envolvidas dentro de corpos nucleares pontuais, impedindo a sua atividade e tornando-a inativa (Dominy et al., 2010). A desacetilação da PGC1 α torna-a ativa aumentando a atividade transcricional de genes alvos no núcleo celular (Dominy et al. 2010). Estudos tem demonstrado que a desacetilação da PGC1 α é dependente da atividade da sirtuína 1 (SIRT1) (Tang, 2016). A SIRT1 é uma proteína desacetilase dependente de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺) que tem sido implicada em diversos processos fisiológicos em mamíferos. (Picard et al. 2004). Devido a importância da SIRT1 em aumentar a atividade transcricional da PGC1 α via desacetilação, estudos tem focado em suas interações na regulação metabólica e na biogênese mitocondrial (Tang, 2016). Este achado tem aumentado o interesse no desenvolvimento de fármacos que tenham como alvo o complexo SIRT1-PGC-1 α , para mimetizar ou potencializar os efeitos do exercício físico para o tratamento de doenças cardiometabólicas (Narkar et al. 2008; Rasbach et al. 2008).

Figura 2 – Biogênese mitocondrial induzida pelo exercício



Legenda: Via de ativação da biogênese mitocondrial na musculatura esquelético induzida pelo exercício físico.

Fonte: Adaptado de Hood *et al.*, 2016 e Drake *et al.*, 2017

Exercício físico e estresse oxidativo

O exercício aumenta a utilização de oxigênio pelo corpo e, portanto, aumenta a produção de ERO (Belvirandal *et al.* 2012). Durante a prática da atividade física, a captação do oxigênio pelo tecido muscular sofre aumento significativo da ordem de cem a duzentas vezes. Devido a tamanha alteração no metabolismo de oxigênio, a geração de radicais livres e/ou espécies reativas não-radicalares é favorecida. A atividade física intensa é capaz de gerar as ERO, por meio da ativação de, pelo menos, três mecanismos principais: produção mitocondrial, citoplasmática e favorecida pelos íons ferro e cobre (Barbosa *et al.* 2010). Esta constante produção de ERO no músculo esquelético, requer a ação de um sistema de defesa endógeno

onde múltiplos mecanismos evoluíram para detectar e responder a produção oxidante elevada (McLeay et al. 2017).

Os diversos mecanismos de defesa que atuam na neutralização das ações dos radicais livres são chamados de antioxidantes. De acordo com sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos. Grande parte dos antioxidantes não enzimáticos tem origem exógena, sendo os principais: vitaminas lipossolúveis (Vitamina A, E e betacarotenos); hidrossolúveis (Vitamina C e Vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O sistema de defesa enzimático é composto por diversas enzimas, onde podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). Este sistema é o primeiro a atuar, evitando assim o acúmulo de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Os agentes antioxidantes estão situados no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana (Kojo, 2004; Valko et al. 2007)

A SOD é a primeira linha de defesa da célula vascular. Três isoformas estão presentes nos mamíferos: a SOD-cobre-zinco (SOD 1) presente principalmente no citosol, SOD-manganês (Mn-SOD, SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD-extracelular (ECSOD, SOD3) (Paravicini, 2008). A SOD desempenha seu papel antioxidante, catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Ross, 1991).

A GPx tem ação fundamentalmente citosólica e catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos através da utilização da glutathione (GSH), que atua como co-substrato da GPx, com propriedades de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada através da glutathione redutase (GR) com a transferência do hidrogênio do NADPH (Masella et al. 2005; Valko et al. 2007; Paravicini, 2008).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. A catalase é efetiva em altos níveis de estresse oxidativo e protege as células do acúmulo de peróxido de hidrogênio, sendo que a suplementação com catalase exógena previne a oxidação da GSH (Ferreira, 1997; Heck et al. 2010).

Quando a capacidade de defesa antioxidante endógena for superada pelo aumento das ERO, ocorre o estresse oxidativo, potencialmente resultando em

oxidação prejudicial das membranas celulares, proteínas funcionais e DNA (McLeay et al. 2017).

A prática da atividade física leva ao aumento na produção de ERO tanto durante como após o exercício, devido ao aumento da captação de oxigênio, aumento nos níveis de catecolaminas, aumento na produção de ácido láctico e hipertermia (Osorio RA et al. 2003). Como consequência da produção aumentada de ERO, o dano oxidativo em lipídeos, proteínas e DNA tem sido relatado após exercício agudo (Radak et al. 1995; Belvirandal et al. 2012). Entretanto, tem sido relatado que o estresse oxidativo após exercício regular e não exaustivo é reduzido no sangue e nos tecidos (Finaud et al. 2006).

Paradoxalmente, as ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) podem exercer uma atividade redox com um papel crítico na sinalização celular de vias responsáveis pela adaptação do músculo ao exercício, em um fenômeno conhecido como *hormesis*. (Ji et al. 2016; McLeay et al. 2017).

Contudo, concentrações muito elevadas de ERO podem ir além do seu papel benéfico e causar efeitos prejudiciais sobre o desempenho físico. Durante um treinamento de resistência com carga mais pesada, a capacidade antioxidante endógena não pode atender a geração de ERO, resultando em um estado de estresse oxidativo e consequente dano celular. Neste contexto, a suplementação dietética com agentes antioxidantes pode ter um papel benéfico. (McLeay et al. 2017).

Exercício físico e suplementação antioxidante

A defesa antioxidante endógena já exerce um papel protetor contra o aumento de ERO no organismo durante a prática física, entretanto a suplementação com dietas ricas em antioxidantes, contribui criando uma rede de defesa cooperativa entre moléculas endógenas e exógenas prevenindo tanto o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, assim como reduzindo a fadiga física (Braaukhins, 2015; Teng et al. 2017). Contudo, estudos tem destacado que uma dieta antioxidante rica em vitamina C pode reduzir as adaptações ao treinamento físico dependente de ERO, além de reduzir o desempenho em doses superiores a 1g/dia.

Diante dos potenciais efeitos negativos da vitamina C sobre o desempenho físico, alguns pesquisadores sugeriram mecanismos pelos quais outros antioxidantes tais como vitamina E e polifenóis poderiam melhorar a performance (Braaukhins, 2015)

Os polifenóis são encontrados principalmente em comidas e bebidas derivadas de plantas, fornecendo cor e sabor, além de exercer um papel de defesa contra o estresse provocado por radiação ultravioleta, patógenos e danos físicos. Sua estrutura varia de fenóis simples até moléculas complexas com alto nível de polimerização. Podem ser divididos em fenóis simples, flavonoides e não flavonoides tais como estilbeno (resveratrol), saponina, curcumina e taninos. Já os flavonoides podem ser subdivididos em flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (quercetina e miricetina), antociniadinas (cianidina e delphinidina), flavonas (naringenina e hesperetina) e chalconas (floreтина) (Laher et al. 2012).

Estudos com polifenóis sugerem seus efeitos benéficos quando aliados a prática física. Epicatequina, sozinha ou integrada ao exercício, aumenta a resistência à fadiga muscular e a capacidade oxidativa em músculo esquelético de ratos (Nogueira et al. 2011). Um flavonóide natural como a quercetina pode desempenhar efeito ergogênico em ratos que praticam atividade física (Casuso et al. 2013). Um estudo com resveratrol demonstrou sua capacidade de melhorar a resistência e a performance física de ratos promovendo a biogênese mitocondrial (Hart et al. 2013). Polifenóis também aumentam a produção de NO no endotélio, via NO sintase, melhorando o fluxo sanguíneo (Bailey et al. 2009).

Sendo assim, somam-se diversas evidências sugerindo que a suplementação com polifenóis pode auxiliar na prática da atividade física.

Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)

A *Palmácea* da família *Aracaceae*, popularmente conhecida como açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma planta importante no agronegócio da região Amazônica para extração da polpa de frutos e palmito (Figura 3), sendo amplamente encontrada, nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces e é muito consumida no Brasil. Aproximadamente 10.000 toneladas de extrato aquoso

gelado são consumidas no Brasil e em 2015, o Pará exportou mais de 6 mil toneladas do mix de açaí (mistura da fruta com banana e guaraná) para os Estados Unidos e Japão, que representam 90% das exportações do açaí (Ministério da Agricultura, 2016).

Figura 3 - Foto ilustrativa da *Euterpe oleracea* Mart. (açaí)



Euterpe oleracea Mart.
(Palmácea conhecida como açaizeiro)

Legenda: Palmácea da *Euterpe oleracea* Mart (açaí)
Fonte: Edson Grandisoli

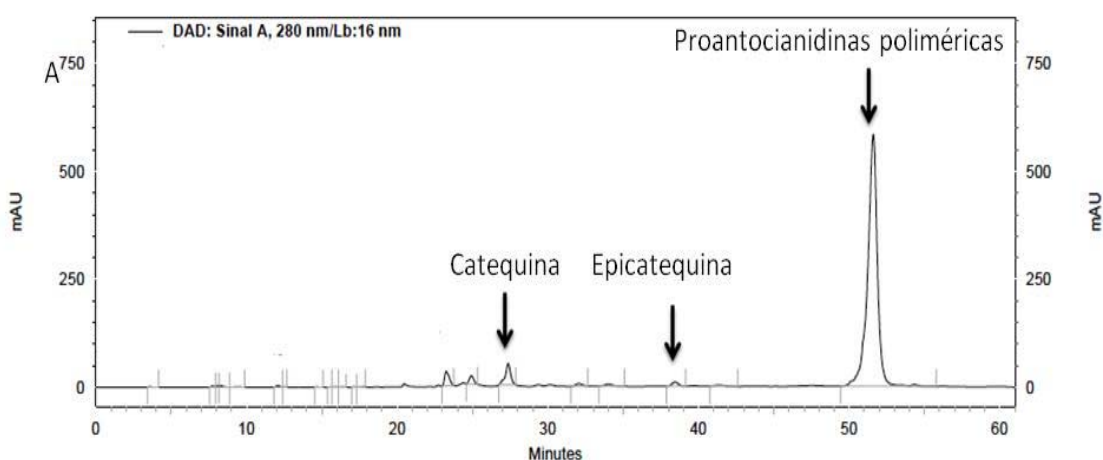
Relatos populares indicam os efeitos positivos do uso medicinal do suco de açaí, principalmente entre pessoas das regiões norte e nordeste, sendo utilizado em casos de febre, dor e gripe (Matheus et al. 2006).

Estudos químicos demonstram que o açaí é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (Bobbio et al. 2000; Pozo-Isfran et al. 2004; Gallori et al. 2004).

Estudos pioneiros realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcolólico do caroço do açaí (ASE), uma parte habitualmente negligenciada do fruto é rico em catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas (de Oliveira

et al., 2015) (figura 4), apresentando conteúdo polifenólico mais expressivo que a polpa, e ainda uma ação vasodilatadora mais intensa do que a obtida com o extrato de polpa de açaí (Rocha et al. 2007).

Figura 4 - Perfil de eluição obtido por cromatografia líquida do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí



Nota: Análise por HPLC do ASE. Os picos marcados a 27, 38 e 51 minutos correspondem a catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas respectivamente, como confirmado por injeção de padrões e por comparação do espectro de absorção no ultravioleta. Mais evidências sobre a estrutura dos compostos presentes no ASE foram fornecidos por espectrometria de massa positiva modo de electrospray.

Fonte: de Oliveira et al., 2015.

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ASE, cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), assim como, no Patent Cooperative Treaty (PCT), induz um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha et al, 2007, de Oliveira et al. 2010; da Costa et al. 2012; de Bem et al. 2014) e efeitos anti-hipertensivo (Rocha et al. 2008, da Costa et al. 2012, Cordeiro et al. 2015), anti-hiperglicêmico (de Oliveira et al. 2010) e hipolipidêmico (de Oliveira et al. 2015). Demonstramos ainda que o ASE reduz o dano oxidativo, em modelos experimentais de hipertensão, de enfisema pulmonar e programação metabólica (Rocha, et. al. 2008; da Costa et al. 2012; Moura et al. 2011, de Oliveira et al. 2010,2015; de Bem et al. 2014) e possui propriedades anti-inflamatórias (Moura et al. 2012). Estes

achados demonstram um efeito benéfico do extrato ASE, como uma planta medicinal, apresentando uma importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares.

A ação vasodilatadora dependente de endotélio do ASE mostrou ser, em parte, mediada pela produção e liberação do NO nas células endoteliais e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Rocha *et al.*, 2007). Também foi demonstrado que o efeito vasodilatador dependente de NO do ASE teria a participação da guanilato ciclase solúvel (Waldman, 1987) e também dos canais de K⁺ (Tare *et al.* 1990) independente da liberação de prostanoídes (Rocha *et al.* 2007).

Um estudo preliminar realizado pelo nosso grupo demonstrou que animais saudáveis que realizaram treinamento físico moderado e foram tratados com ASE tiveram um aumento significativo no tempo e na distância percorrida durante o exercício, indicando um importante efeito estimulante sobre a atividade física. Com base nas propriedades do ASE já descritas, criamos a hipótese de que a possível melhora do desempenho físico pelo ASE possa envolver sua ação vasodilatadora com efeito direto na função circulatória, ação antioxidante e possível ação sobre a biogênese mitocondrial no músculo esquelético.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre os benefícios do tratamento com o extrato do caroço do açaí, avaliamos os efeitos do ASE no desempenho físico de ratos submetidos a exercício físico moderado e uma possível associação desse efeito com a melhora da função vascular, do estado oxidativo e da biogênese mitocondrial muscular.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com ASE em ratos Wistar submetidos à prática regular de exercício sobre:

- a) o ganho de peso, os níveis de ácido láctico e glicose;
- b) a função endotelial e do músculo liso vascular em resposta a agentes vasodilatadores e vasoconstritores, em leito arterial mesentérico (LAM) de rato;
- c) os níveis da proteína p-eNOS (ser1177) muscular e sua associação com os níveis das proteínas reguladoras Hsp90, Akt e pAkt, assim como com os dos marcadores da captação de glicose (PI3K, Akt e Glut4), no músculo esquelético;
- d) os níveis de marcadores da biogênese mitocondrial (PGC1 α e AMPK), no músculo esquelético;
- e) o dano oxidativo e a atividade enzimática antioxidante em músculo esquelético e plasma.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais utilizados e modelo experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ (Nº CEUA/006/2017). Para este estudo foram utilizados 40 ratos wistar (300-350g) machos. Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/ IBRAG/UERJ. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura média de ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($60 \pm 10\%$) controladas. O ciclo de sono-vigília foi de 12 h, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã.

Para realização do estudo foram formados 4 grupos experimentais, com 10 animais por grupo ($n=10$), sendo eles:

- a) Sedentário: animais não tratados que receberam dieta padrão;
- b) Sedentário + ASE: animais que receberam dieta padrão e suplementação com 200 mg/kg/dia de ASE por gavagem intragástrica;
- c) Treino: animais que receberam dieta padrão para ratos e treinaram em esteira rolante (5 dias/semana);
- d) Treino + ASE: animais que receberam tanto dieta padrão para rato como suplementação com 200mg/kg/dia de ASE por gavagem intragástrica e treinaram em uma esteira rolante (5 dias/semana).

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança digital. Para a obtenção do número de animais ($n=40$) para o desenvolvimento do protocolo experimental e a obtenção dos resultados.

2.2 Preparo do extrato hidro alcoólico do caroço de açaí

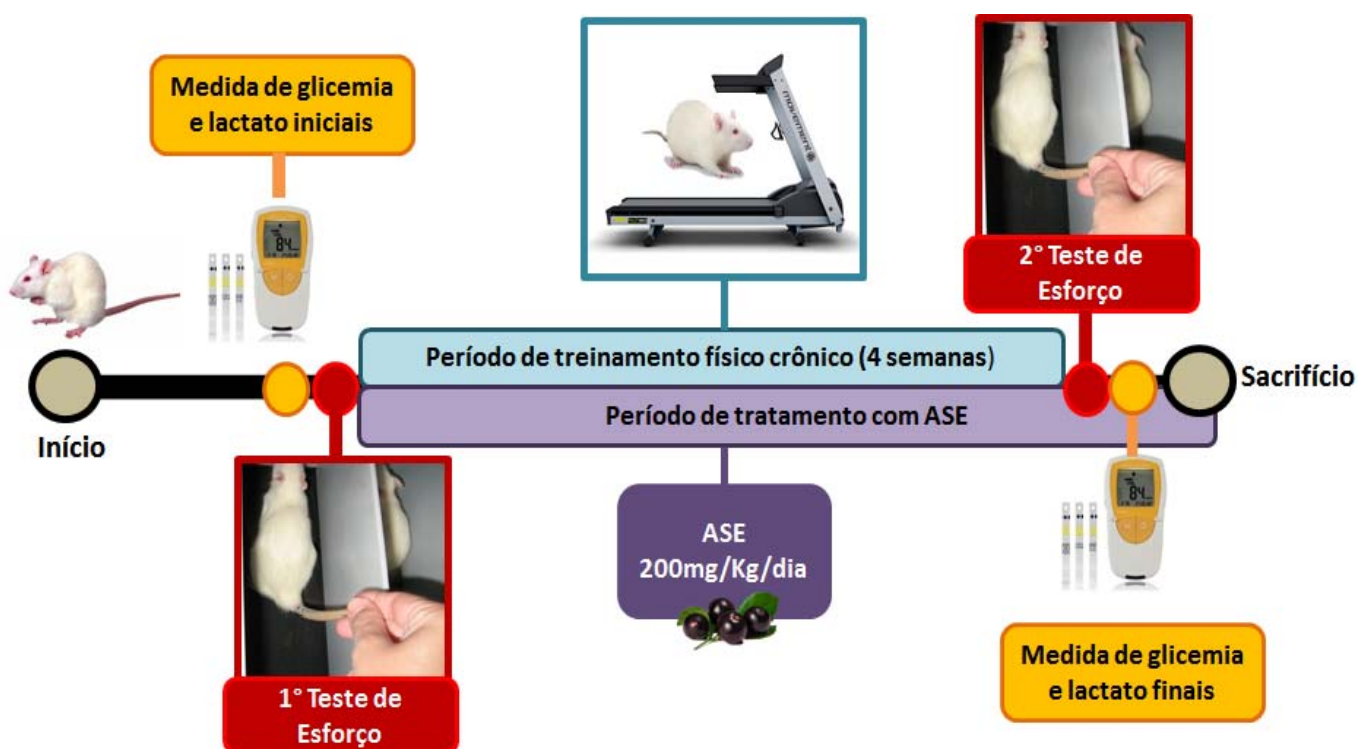
Utilizamos frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açaí), provenientes de Belém, fornecidos pelo nosso colaborador Professor Dr. Pergentino José Cunha Souza, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará. Após a lavagem dos frutos, aproximadamente 200 g de caroço foram separados, triturados, embebidos em 400 mL de água destilada, e então fervidos por cinco minutos. Imediatamente após a fervura acrescentou-se 400 mL de etanol. O extrato hidroalcoólico foi guardado em geladeira e agitado periodicamente por 2 a 4 h ao longo de 10 dias. Ao final deste período, o extrato foi filtrado em papel de filtro comum e posteriormente em papel de filtro tipo Whatman número 1. Posteriormente, todo o etanol foi evaporado à baixa pressão na temperatura de 50° a 60°C. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20°C até o uso (Rocha et al. 2007). Após o preparo de todos os extratos, o conteúdo de polifenóis foi medido pelo método colorimétrico determinado por (Singleton, 1965) usando o reagente Folin Ciocalteau, assim como o seu potencial vasodilator verificado através da reatividade vascular. Essas medidas são utilizadas como controle de qualidade e viabilidade do extrato para a posterior utilização. A dose tóxica de administração do ASE é a partir de 1,5 g/kg (dados não publicados).

2.3 Protocolo de treinamento físico

Antes do início do treinamento físico aeróbico em esteira rolante os 40 animais foram divididos em 4 grupos experimentais: controles sedentários (n=10), sedentário + ASE (n=10), Treino (n=10) e Treino + ASE (n=10). Os animais dos grupos treino e treino + ASE foram submetidos a um teste progressivo máximo para a determinação da intensidade de treinamento (teste de esforço). O teste consistiu em um protocolo de exercício físico escalonado em esteira rolante, com velocidade inicial de 3m/min, incrementada de 4m/min a cada três minutos até a exaustão do animal, momento em que não é mais mantido o padrão de corrida. Após a definição da velocidade pelo teste de esforço, o treinamento físico crônico foi realizado em

esteira rolante durante quatro semanas, cinco vezes por semana, com duração de trinta minutos cada sessão. A velocidade do treinamento físico crônico foi progressivamente aumentada de 50% até 60% da velocidade máxima atingida durante o teste progressivo máximo, que corresponde a uma intensidade moderada de treinamento (Matsuura et al. 2010). O teste progressivo máximo foi repetido mais uma vez ao final das quatro semanas de tratamento para verificar as alterações no tempo e na distância percorrida, ocasionadas pelo treinamento físico.

Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental



Fonte: O autor, 2017.

Figura 6 - Foto do treinamento em esteira rolante



Fonte: O autor, 2017.

2.4 Dosagens séricas

2.4.1 Glicemia

A medida da glicemia de jejum foi realizada uma vez antes e outra após as quatro semanas de treinamento crônico. A medida foi realizada com os animais em jejum de doze horas, a partir de amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do animal e com o auxílio de um aparelho medidor automático para a determinação de glicose (Accutrend® Plus Roche).

2.4.2 Lactato

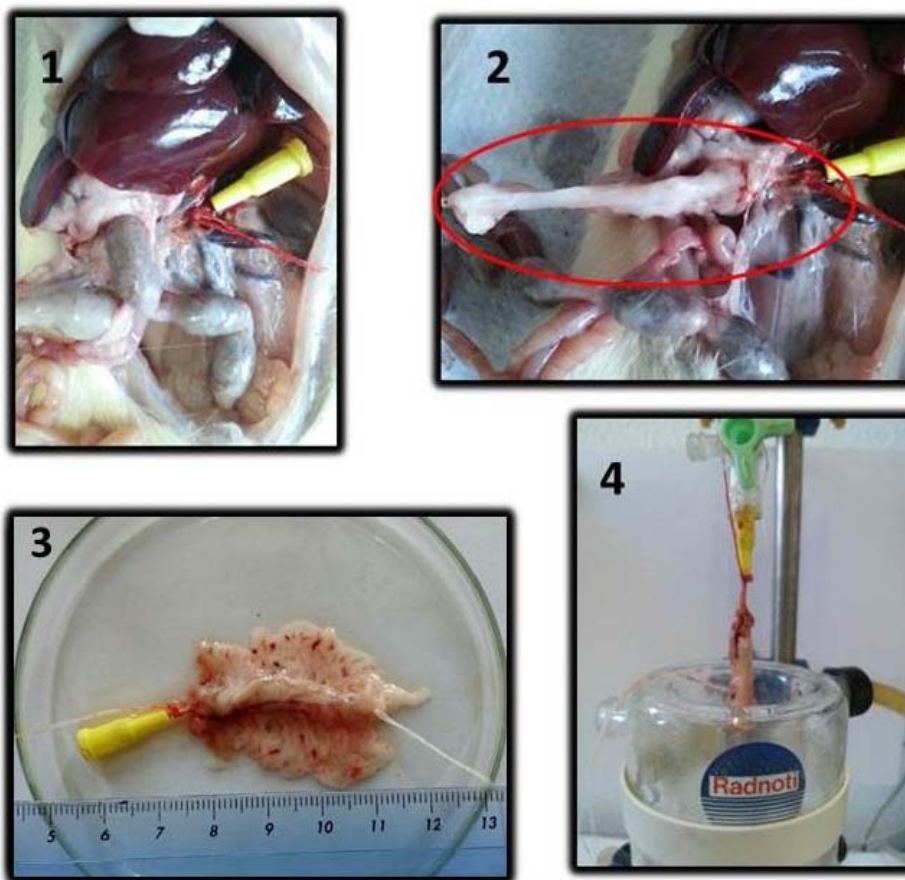
A medida de lactato foi realizada uma vez antes e outra após as quatro semanas de treinamento crônico. A medida foi realizada com os animais em jejum de doze horas com o auxílio de um aparelho monitor para a determinação de lactato (Accutrend® Plus Roche).

2.5 **Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) e do músculo *soleus* de rato**

Após o período experimental, os ratos foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg) sendo sua administração por via intraperitoneal, para a coleta de sangue arterial através da aorta abdominal, e em seguida submetidos a laparotomia. O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umidecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl 1 M, KCl 0,5 M, CaCl₂.2H₂O 0,5 M, MgSO₄ 0,1 M, KH₂PO₄ 0,1 M, NaHCO₃ 1,86 g, C₆H₁₂O₆ 1,42 g (Resende et al. 1997). Os ramos pancreático-duodenal, íleocólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

Os músculos *soleus* dos membros inferiores direito e esquerdo foram dissecados e excisados com a ajuda do material cirúrgico. Após sua retirada, os músculos foram pesados em balança analítica e posteriormente armazenados em freezer -80.

Figura 7 – Isolamento e canulação do Leito arterial mesentérico



Legenda. Esquema de isolamento do leito arterial mesentérico (1). Artéria mesentérica sendo canulada (2). Isolamento do leito arterial mesentérico (3). Leito arterial mesentérico canulado e isolado (4). Leito arterial mesentérico no sistema de perfusão e medida da reatividade vascular.

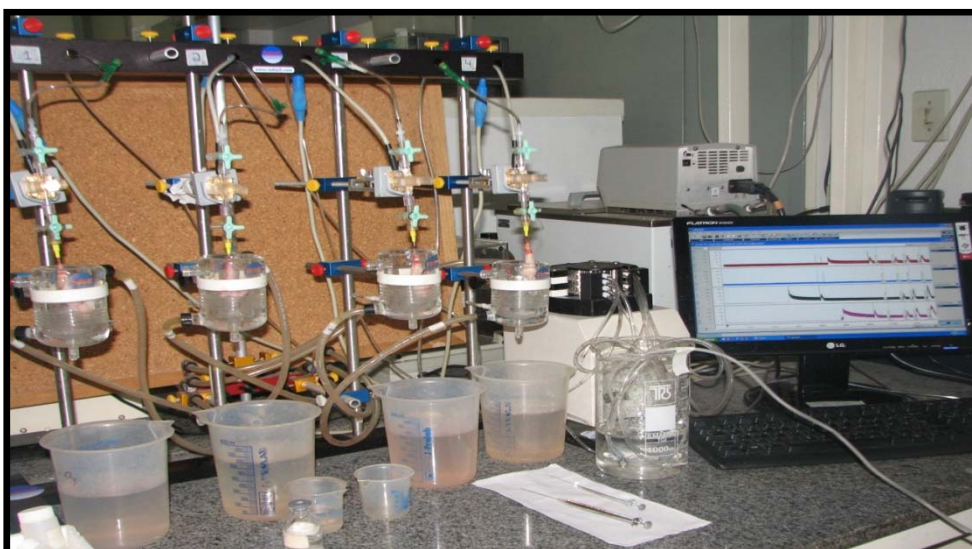
Fonte: O autor, 2017.

2.6 Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) foi infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa

(PowerLab 4/30). Os experimentos foram precedidos de um período de trinta minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 e 40 mmHg (Resende et al. 1997) e então foram administradas injeções de 120 μ mol de KCl de dez em dez minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a noradrenalina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30 μ M) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg.

Figura 8 - Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico



Fonte: O autor, 2017.

Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de ACh (1-1000 pmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Avaliamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de nitroglicerina (NG) 1-1000 nmol, substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. Em seguida, com o objetivo de avaliar a reatividade vascular a um agente vasoconstritor, a preparação vascular foi perfundida com solução de Krebs pura, ou seja sem NE, para que a pressão de perfusão voltasse aos níveis basais. Após um

período de 10 minutos de estabilização foram realizadas curvas dose-resposta à NE (1-3000 nmol). A resposta aos agentes vasodilatadores foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela NE e a resposta pressora da NE foi expressa pelo % de contração subtraído da pressão basal. As injeções “in bolus” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de microseringas Hamilton de 10 e 100µl. O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente cinco minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 µL.

2.7 Análise dos níveis de proteínas por *Western Blotting*

O tecido muscular esquelético do músculo *soleus* (250 mg) foi homogeneizado em 1000 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1 µl de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados (13000 rpm, 4°C por 25 min) e sonificado por 5 segundos. A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico do kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 min. As amostras foram analisadas em condição desnaturante por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram aplicados 20 µg de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em (*Tween 20 + tris-buffered saline*) T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpos policlonais

primários específicos para cada proteína (*overnight*, a 5°C): anti-AKT (1:1000); anti-pAKT (1:1000); anti-GLUT-4 (1:1000); anti-HSP90 (1:500); anti-PI3K (1:500); anti-PGC1 α (1:500); anti-pENOS (s1177) (1:500); anti-AMPK (1:500); anti-pAMPK (1:500). O controle para normalização do conteúdo de proteínas totais em cada amostra, foi realizado através do anticorpo anti- β tubulina (1:1000) em homogenato de tecido muscular esquelético. Após este período de incubação, utilizamos um anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário: anti-*rabbit* (1:1000) e (1:5000), anti-*mouse* (1:1000) e anti-*goat* (1:1000) (anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA). Antes da revelação, todas as membranas foram lavadas três vezes com T-TBS por dez minutos a cada lavagem. A revelação foi realizada com o auxílio do reagente de detecção quimioluminescente altamente sensível (Amersham ECL Prime Western Blotting, GE Healthcare, UK). As imagens foram captadas usando o ChemiDoc XRS+ (BIORAD Inc; CA). As bandas foram analisadas quantitativamente por densitometria no software Adobe Photoshop CS6 (Adobe System Inc; CA).

2.8 Ensaio pró-oxidantes

2.8.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsossomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma e homogenato de músculo *soleus*. Foram utilizados 200 μ L de homogenato do tecido muscular esquelético para 400 μ L de ácido tricloroacético (TCA). Para o plasma, foram utilizados 200 μ L de amostra, diluídos em 600 μ L de TCA. As amostras foram centrifugadas por dez min em 1000

rpm à 4°C. Separou-se 500 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500 µL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por trinta minutos. Deixou-se esfriar por cinco minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)

2.8.2 Carbonilação de proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos de proteínas, (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 380 nm usando um coeficiente 22.0000 molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foram utilizados 200µL de homogenato de tecido muscular esquelético em duplicata. Foram realizadas lavagens com solução de HCL-acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-acetato de etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min a 600 g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCl 2 M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M a 60°C por trinta minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro (380 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.9 **Atividade das enzimas antioxidantes**

A medida da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase (CAT) e GPx foi realizada em amostras de plasma, e em homogenato de tecido muscular

esquelético preparados com tampão fosfato (NaCl 5,84 g, NaH₂PO₄ 13,8 g, Na₂HPO₄ 26,8 g, KCl 7,45 g, EDTA 2,28 g) em pH:7,4.

2.9.1 Medida da superóxido dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo ânion superóxido. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister e Calabrese (1982) para a medida no plasma e homogenato de músculo esquelético. Foram utilizados 40, 60 e 80 µL de cada amostra de plasma; 20, 40 e 60 µL de cada amostra de homogenato de tecido muscular esquelético em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970 µL tampão glicina (3,75mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19 mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20 µL da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o peróxido de hidrogênio formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de cento e oitenta segundos.

2.9.2 Medida da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, formando oxigênio molecular e água. A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação. Foram utilizados 40 µL de amostra de plasma, 200 µL de amostra de homogenato de tecido muscular esquelético em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria

(240 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de sessenta segundos (Aebi, 1984).

2.9.3 Medida da glutathiona peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do (H_2O_2) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm. Foram utilizados 50 μ L de amostra de plasma, 200 μ L de homogenato de tecido muscular esquelético em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800 μ L de tampão fosfato, glutathiona reduzida (2 mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, H_2O_2 (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e Gunzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados.

2.10 **Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). O programa SPSS IBM Statistics (IBM corporation softwares, Inc., Chicago, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e para obtenção dos gráficos foi utilizado GraphPad Prism 6 (GraphPad softwares, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se Two-way analysis of variance (ANOVA), para comparar as diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Tukey e Bonferroni, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

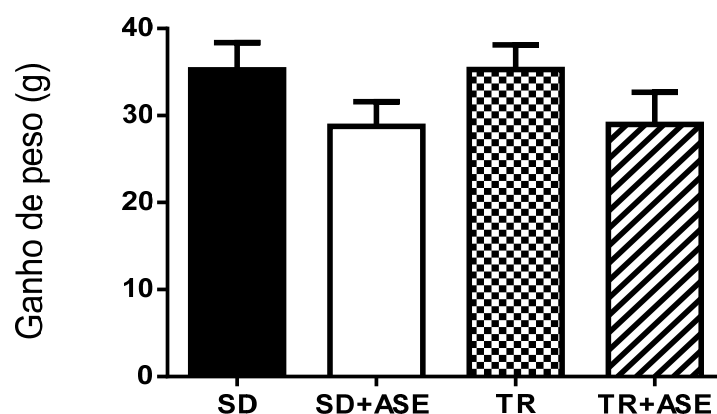
Para as análises referentes ao teste de esforço foi utilizado o Teste-t para comparar as diferenças entre o mesmo grupo (pareado) e os dois grupos distintos (não pareado).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do tratamento com ASE e do exercício sobre o ganho de peso corporal

Não houve diferença do ganho de peso corporal entre os animais dos diferentes grupos estudados durante as 4 semanas de estudo (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o ganho de peso corporal



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE).

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

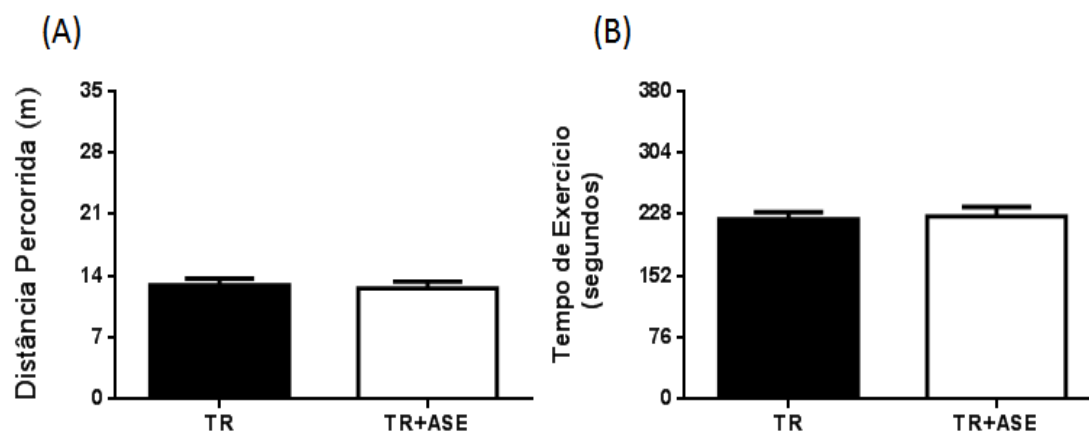
Fonte: O autor, 2017.

3.2 Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo

No primeiro teste progressivo máximo, realizado antes do início do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico, nenhuma diferença estatística foi

observada entre os grupos treino e treino+ASE para a distância percorrida (Figura 10A) e o tempo de exercício (Figura 10B).

Figura 10 - Efeito do teste progressivo máximo inicial sobre a distância percorrida e o tempo de exercício



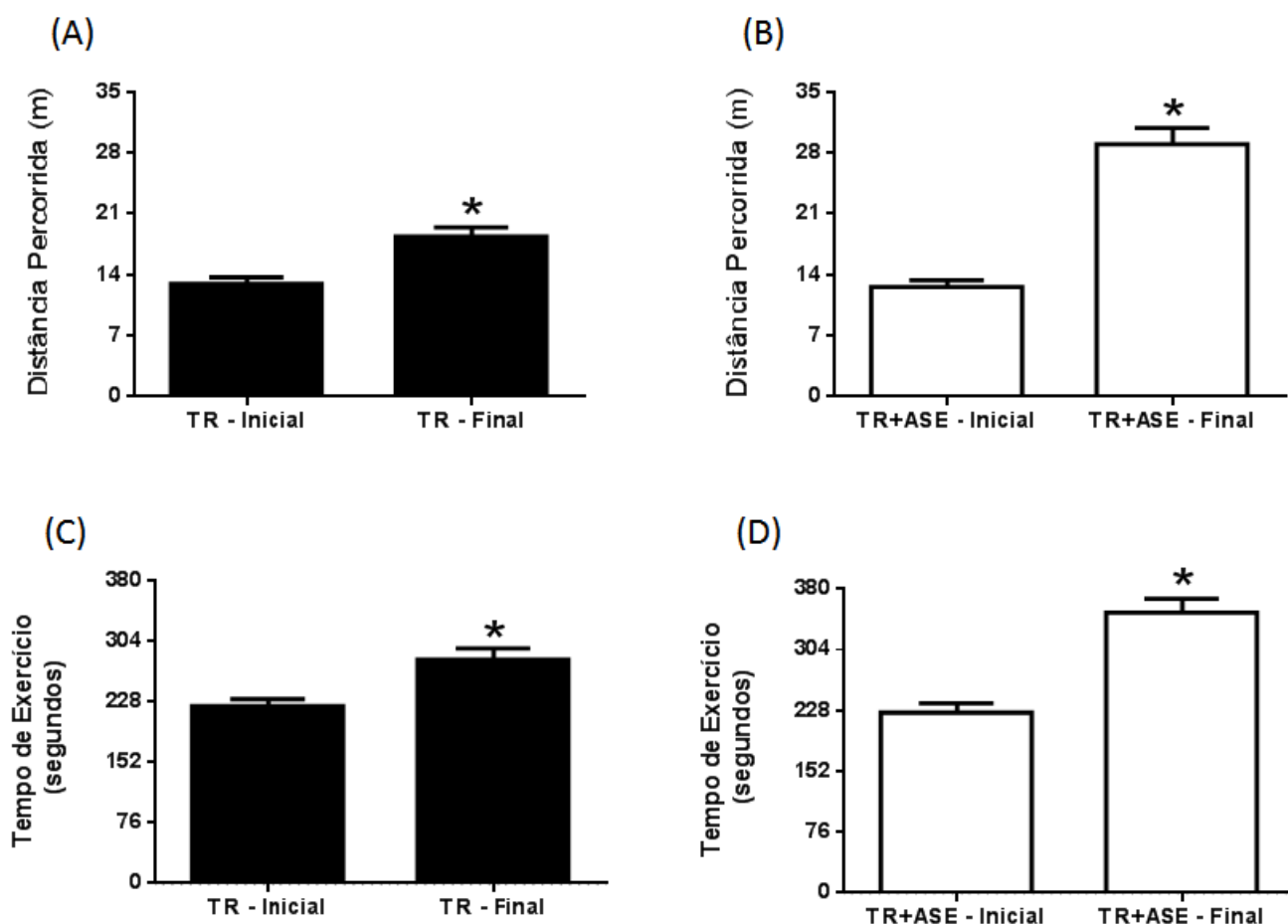
Legenda: Treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Distância percorrida (A) e tempo de exercício (B) durante o teste de esforço (inicial)

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos wistar machos por grupo. Testes-t não pareado e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

Após quatro semanas de tratamento com ASE e de atividade física regular, no final do experimento, foi realizado o segundo teste progressivo máximo. Neste teste foi constatado, que os animais do grupo treino e treino+ASE percorreram uma distância maior e se exercitaram por mais tempo ($p<0,05$) na esteira rolante, quando comparados aos seus respectivos testes de esforços iniciais (Figura 11A ,11B, 11C e 11D).

Figura 11 – Efeito do tratamento com ASE sobre a distância percorrida e o tempo de atividade física no teste progressivo máximo



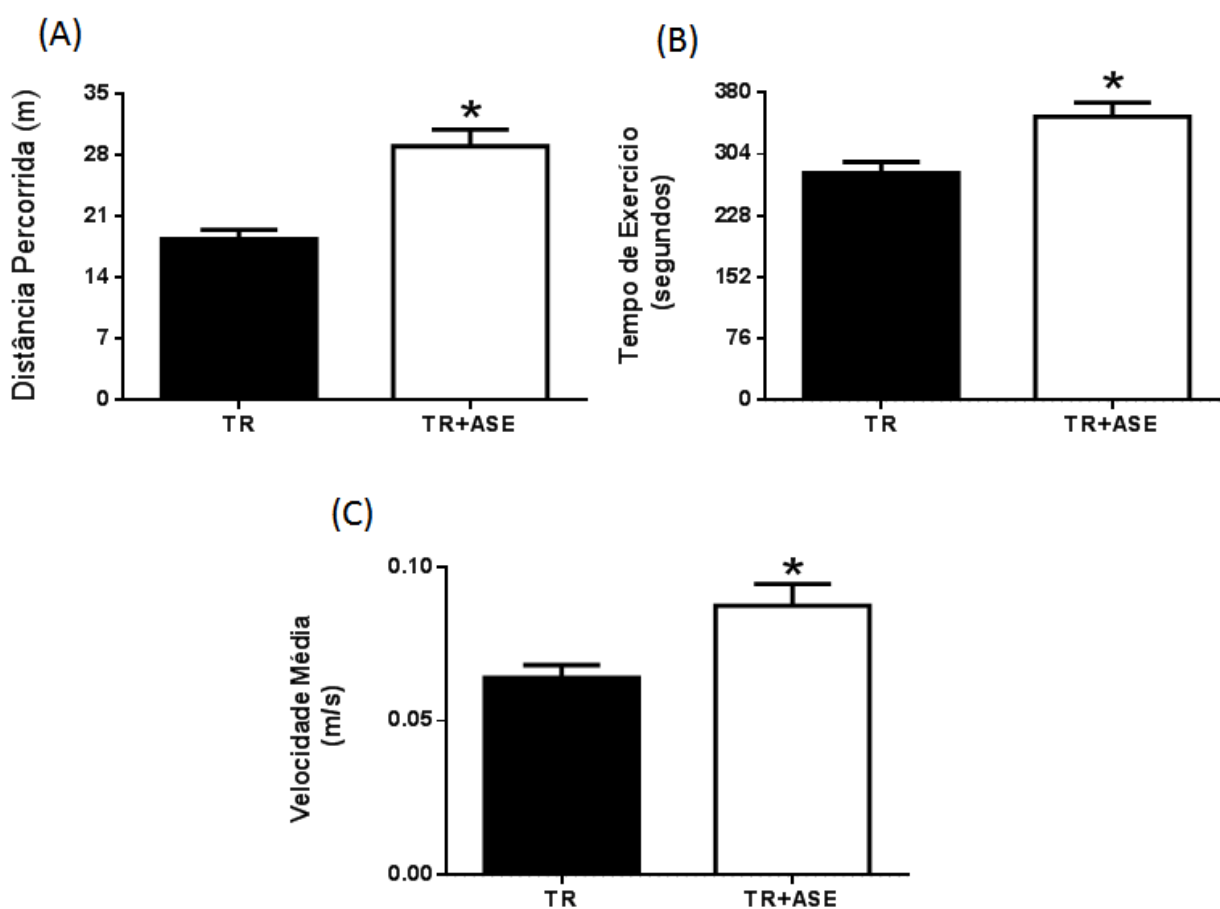
Legenda: treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Tempo de exercício durante o teste de esforço (inicial) e ao final do treinamento físico crônico na ausência de tratamento (A) e (C) ao final do tratamento com ASE (B) e (D).

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. Letra (A) e (B) *p<0,05 em relação a distância percorrida inicial conforme determinado pelo Testes-t. pareado. Letra (C) e (D) *p<0,05 em relação ao tempo inicial conforme determinado pelo Testes-t. pareado.

Fonte: O autor, 2017.

Após quatro semanas de tratamento com ASE e de atividade física regular observamos também um aumento na distância percorrida, do tempo de exercício e da velocidade média quando comparado ao grupo treino ($p < 0,05$). (Figura 12A, 12B e 12C).

Figura 12 – Comparação do efeito do tratamento com ASE sobre a distância percorrida, o tempo de exercício e a velocidade média no teste



progressivo máximo.

Legenda: treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Comparação da distância percorrida final (A), do tempo de exercício final (B) e da velocidade média final (C) entre os grupos treino e treino+ASE.

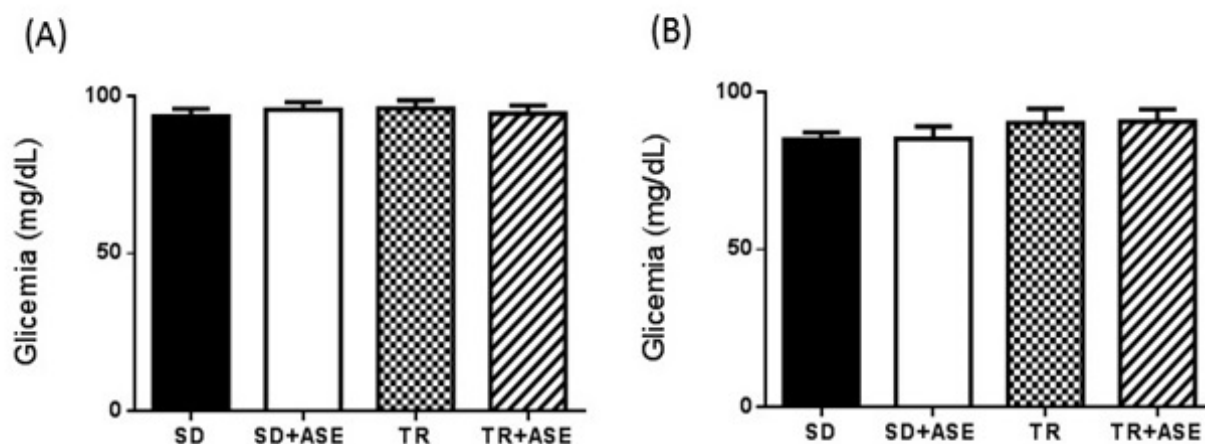
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos wistar machos por grupo. Letra (A), (B) e (C) $*p < 0,05$ em relação ao grupo controle conforme determinado pelo Testes-t não pareado.

Fonte: O autor, 2017.

3.3 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de glicemia

Os níveis de glicose foram mensurados uma vez antes e outra após as quatro semanas de treinamento crônico. Não houve diferença dos níveis glicêmicos entre os animais dos diferentes grupos estudados, tanto na medida inicial (Figura 13A), como na medida final (Figura 13B).

Figura13 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). (A) medida de glicemia antes e (B) após o tratamento com ASE e o treinamento físico crônico

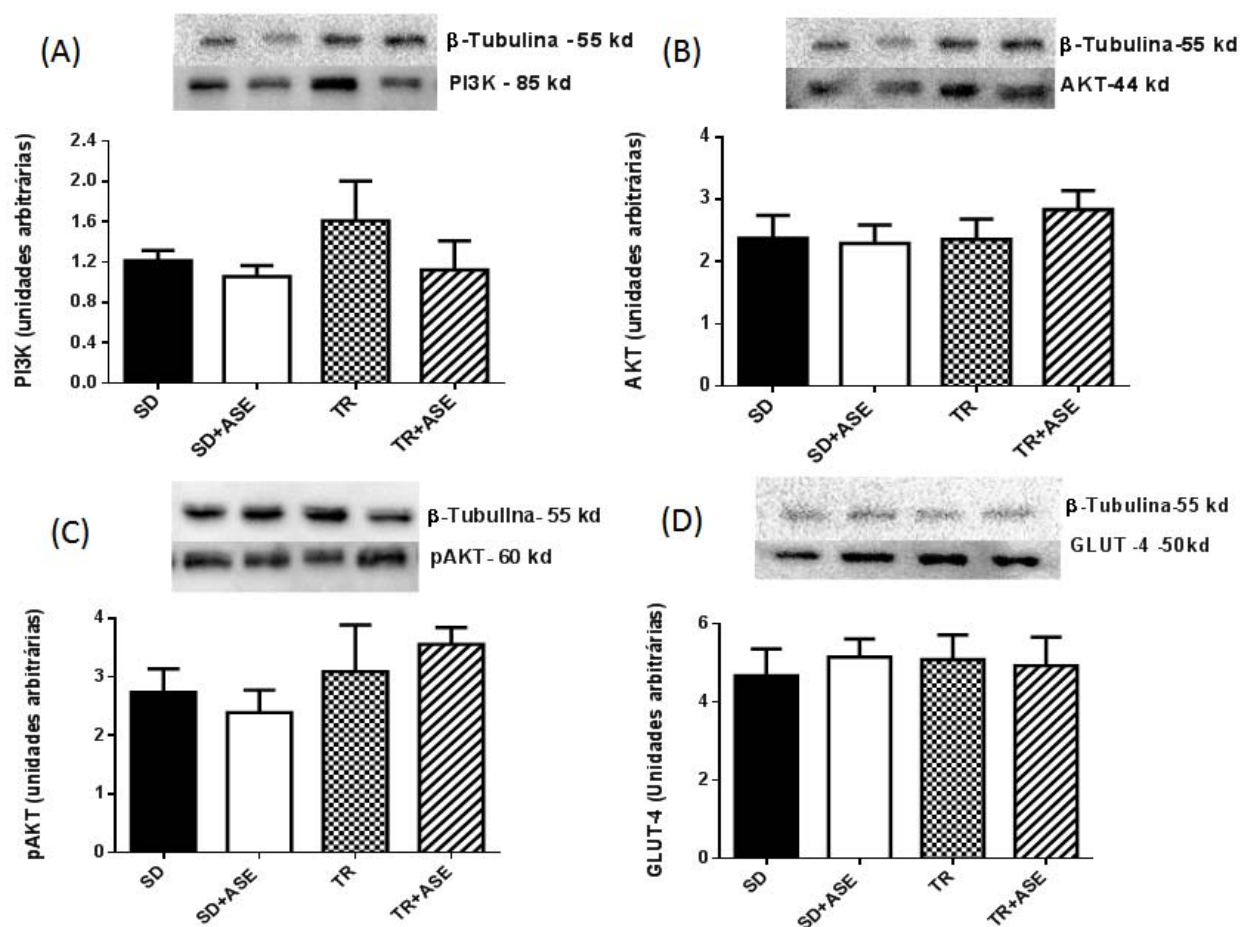
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.4 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas da via de sinalização da insulina

Não houve diferença significativa nos níveis das proteínas PI3K, Akt, pAkt, e Glut4 nos diferentes grupos estudados.

Figura 14 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Níveis proteicos de PI3K (A), AKT (B), pAKT (C) e Glut-4 (D).

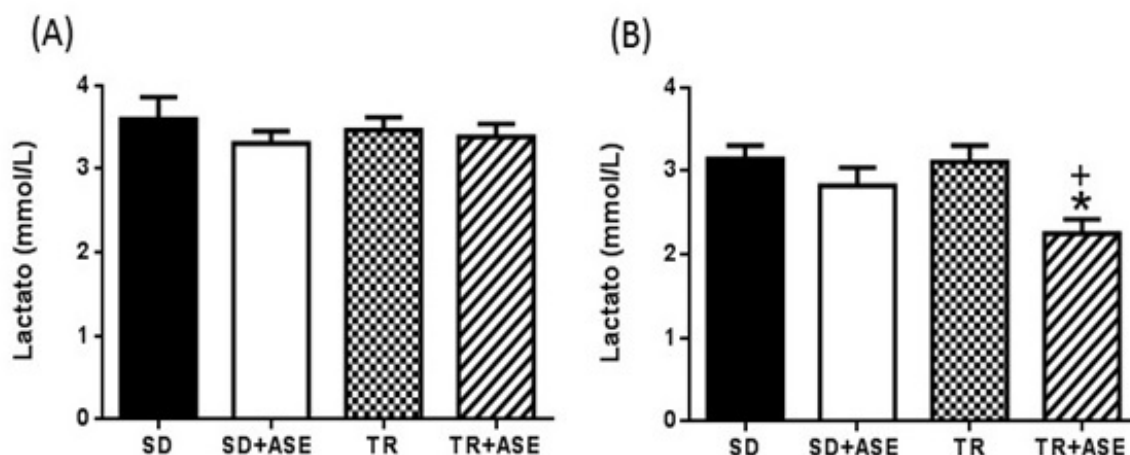
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. $p < 0,05$ conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.5 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato

Os níveis de lactato foram mensurados uma vez antes e outra após as quatro semanas de treinamento crônico. A medida inicial não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 15A). Ao final do treinamento físico crônico, os níveis de lactato foram reduzidos de maneira significativa ($p < 0,05$), no grupo Treino+ASE (TR+ASE) em relação aos grupos Treino (TR) e Sedentário (SD) (Figura 15B).

Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). (A) medida de lactato antes do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico e (B) após o final do mesmo.

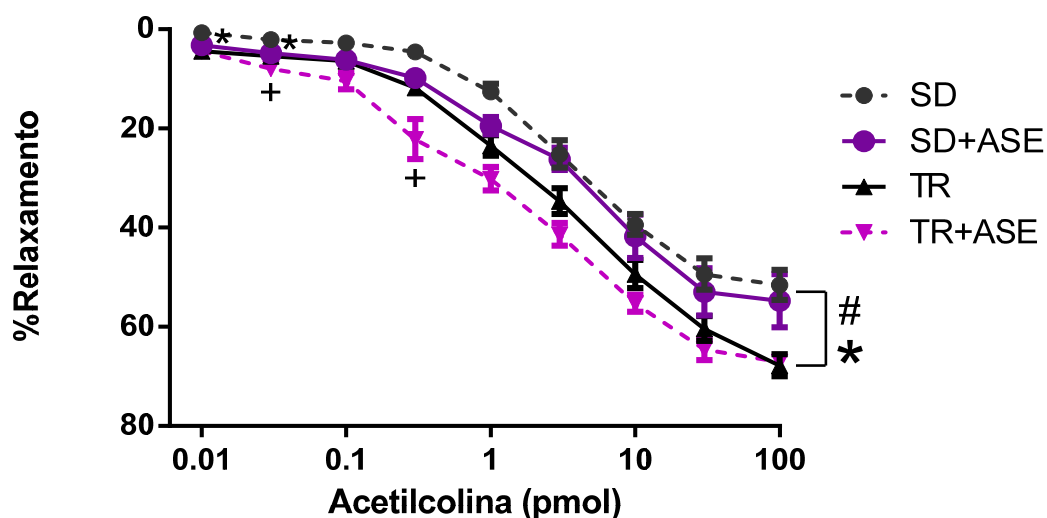
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sedentário; + $p < 0,05$ em relação ao grupo Treino, conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni

Fonte: O autor, 2017.

3.6 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM

A acetilcolina (ACh) produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi maior ($p < 0,05$) em LAM isolado de animais dos grupos Treino e Treino+ASE, quando comparados aos grupos sedentários. O tratamento com ASE aumentou ($p < 0,05$) a resposta vasodilatadora da ACh nos animais do grupo sedentário+ASE em relação ao grupo Sedentário nas duas primeiras doses. Nas doses menores de 0,03pmol e 0,3 pmol, o treinamento físico associado ao suplemento com ASE potencializou ($p < 0,05$) a resposta vasodilatadora da ACh em relação ao grupo Treino.

Figura 16 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE).

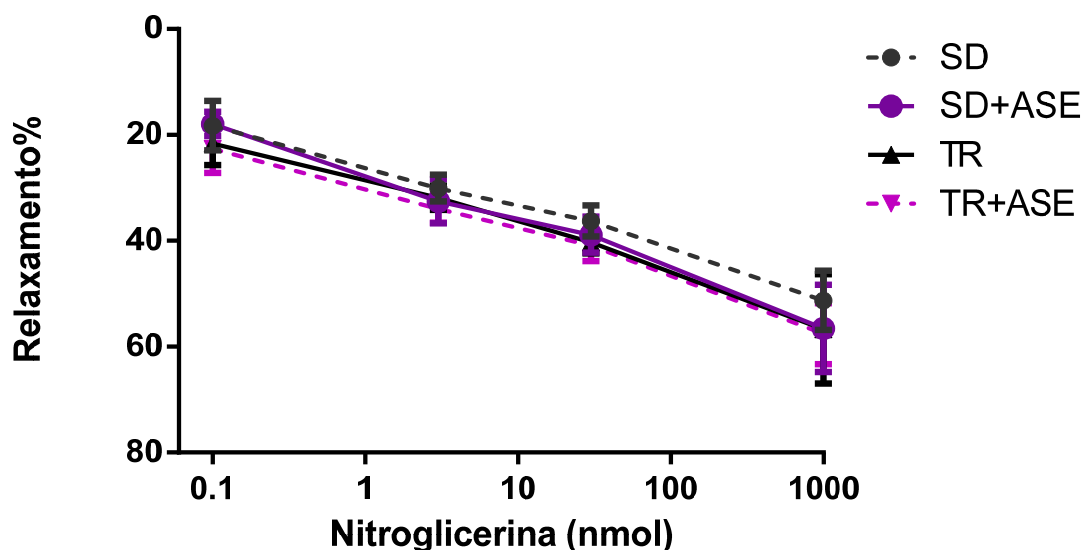
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo SD, # p<0,05 em relação ao grupo SD+ASE; +p<0,05 em relação ao grupo TR, conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.7 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM

Não houve alteração na resposta vasodilatadora induzida pela nitroglicerina (NG) em LAM dos animais dos diferentes grupos estudados (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE).

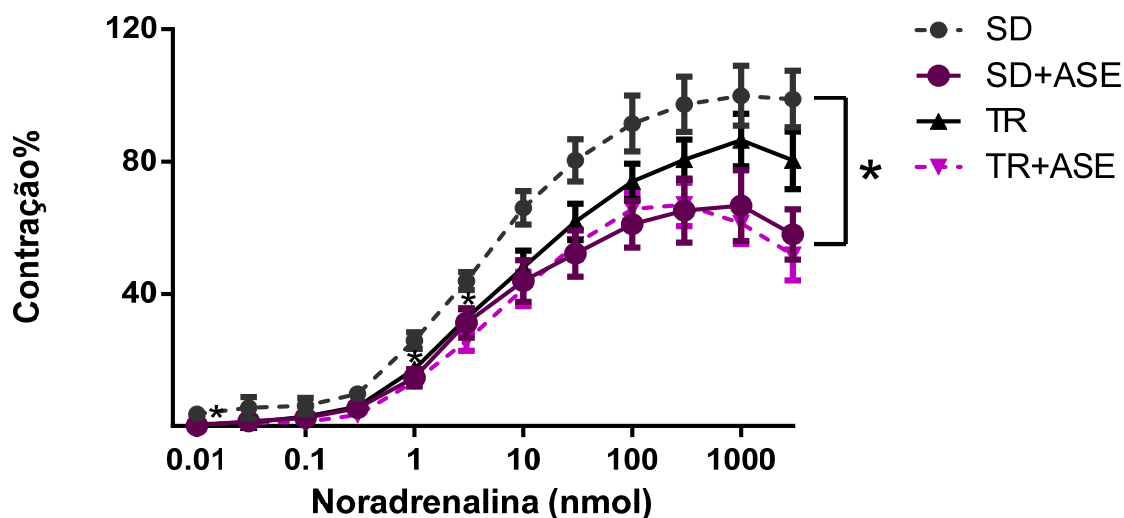
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.8 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstrictora da noradrenalina em LAM

A noradrenalina produziu uma resposta vasoconstrictora dose-dependente que foi maior ($p < 0,05$) em LAM isolado de animais do grupo sedentário, quando comparada aos grupos Sedentário + ASE e Treino + ASE. O treinamento físico isoladamente reduziu ($p < 0,05$) a resposta vasoconstritora da noradrenalina nas doses menores de 0,01nmol, 1nmol e 3nmol em relação ao grupo sedentário. Não houve diferença entre os grupos Treino e Treino+ASE.

Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da noradrenalina em leito arterial mesentérico



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE).

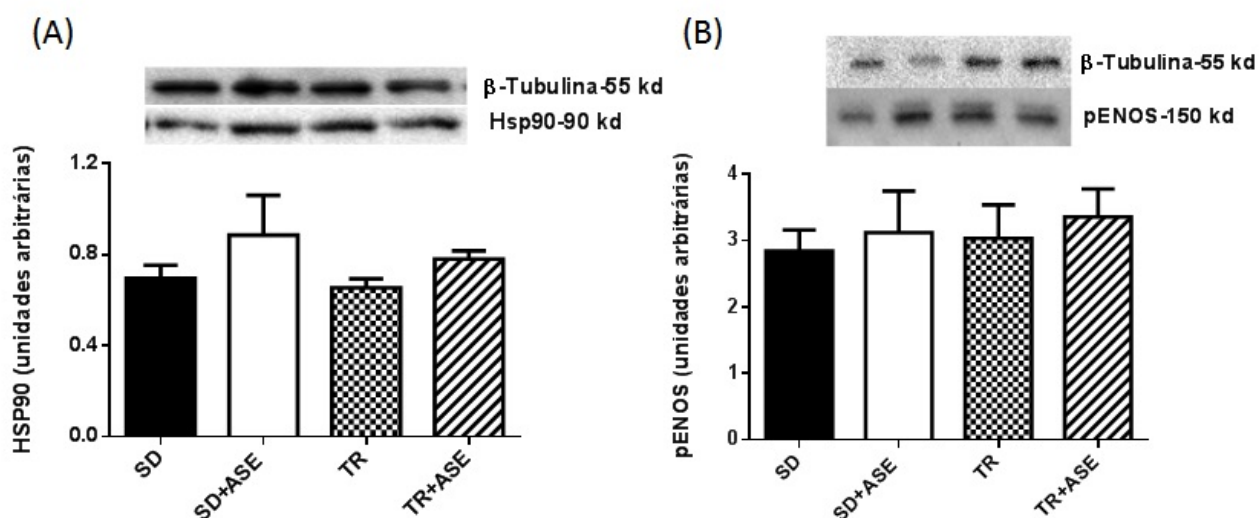
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos Wistar machos por grupo. $*p<0,05$ em relação ao grupo SD, conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.9 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas p-eNOS e Hsp90

Não houve diferença significativa nos níveis da p-eNOS (Figura 16B) e da proteína acessória Hsp90 (Figura 16A) nos diferentes grupos estudados.

Figura 19 – Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas peNOS e Hsp90



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Níveis proteicos de Hsp90(A), peNOS(B),

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. $p < 0,05$ conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

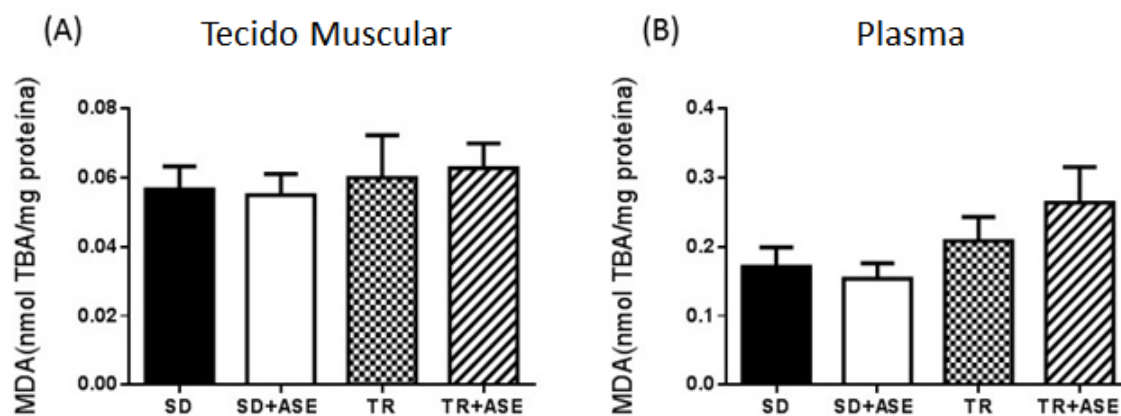
Fonte: O autor, 2017.

3.10 Efeito do Tratamento com ASE e do exercício físico sobre os ensaios pró-oxidantes

3.10.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Não foi observada diferença na formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica em amostras de tecido muscular esquelético e plasma dos grupos estudados.

Figura 20 – Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre os níveis de TBARS



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Em amostras de tecido muscular esquelético (A) e plasma (B).

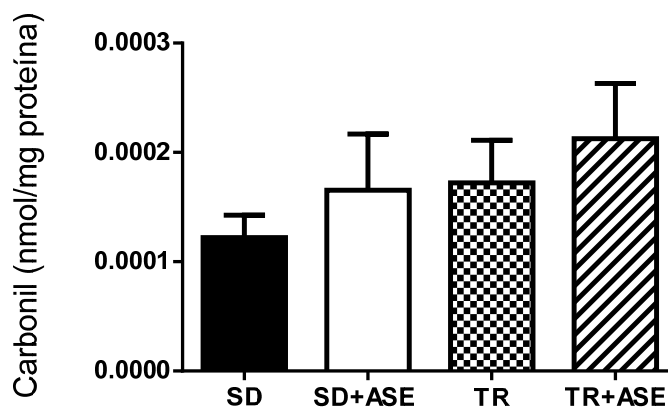
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos wistar machos por grupo. *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.10.2 Carbonilação de proteínas

Não foi observada diferença na carbonilação de proteínas em amostras de tecido muscular nos grupos estudados.

Figura 21 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre os níveis de carbonilação de proteínas



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE).

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos wistar machos por grupo. *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

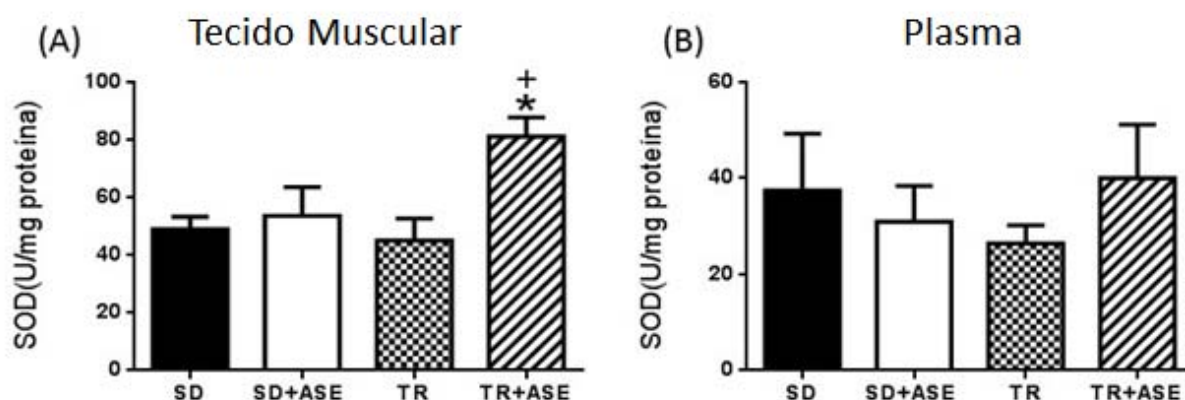
3.11 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade das enzimas antioxidantes

3.11.1 Superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD foi maior ($p < 0,05$) em amostras de tecido muscular esquelético dos animais do grupo Treino + ASE quando comparada a dos grupos Treino e Sedentário (Figura 22A).

Observamos também que a atividade da SOD não foi diferente em amostras de plasma entre os grupos diferentes grupos estudados (Figura 22B).

Figura 22 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima superóxido dismutase



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Em amostras de tecido muscular esquelético (A) e plasma (B).

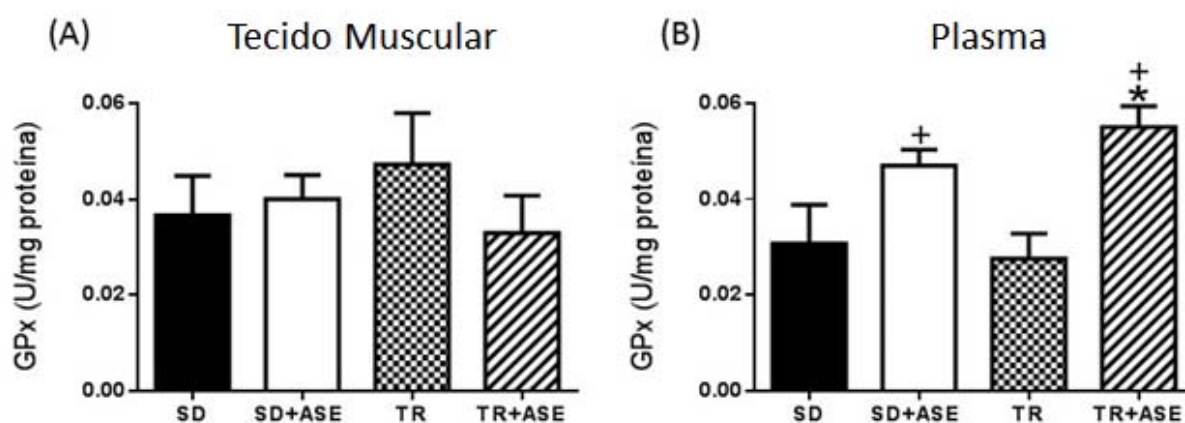
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos wistar machos por grupo. Exceção letra (A) * $p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário; + $p<0,05$ em relação ao grupo Treino, conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.11.2 Glutathiona peroxidase

Não foi observada diferença na atividade da enzima GPx em amostras de tecido muscular esquelético dos diferentes grupos estudados (Figura 23A). A atividade da enzima GPx foi maior ($p<0,05$) em amostras de plasma dos animais do grupo Treino + ASE quando comparada a dos grupos Sedentário e Treino. O tratamento com ASE isoladamente aumentou a atividade da GPx ($p<0,05$) em relação ao grupo Treino. (Figura 23B).

Figura 23 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima glutationa peroxidase



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Em amostras de tecido muscular esquelético (A) e plasma (B).

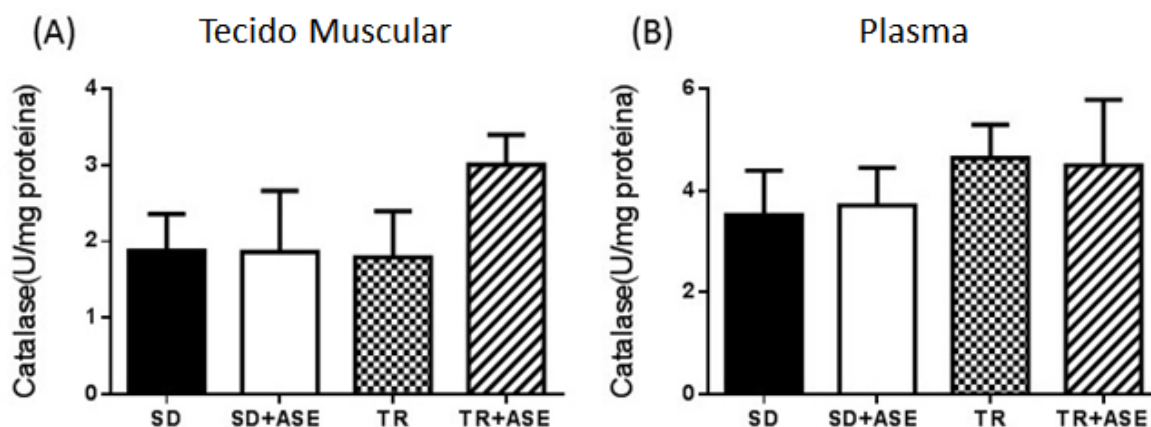
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos wistar machos por grupo. Exceção letra (A) $*p<0,05$ em relação ao grupo Sedentário; $+p<0,05$ em relação ao grupo Treino, conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.11.3 Catalase

Não houve diferença na atividade da enzima catalase em amostras de tecido muscular esquelético (Figura 24A) e plasma (Figura 24B) dos diferentes grupos estudados.

Figura 24 - Efeito do tratamento do ASE e do exercício físico sobre a atividade da enzima catalase



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Em amostras de tecido muscular esquelético (A) e plasma (B).

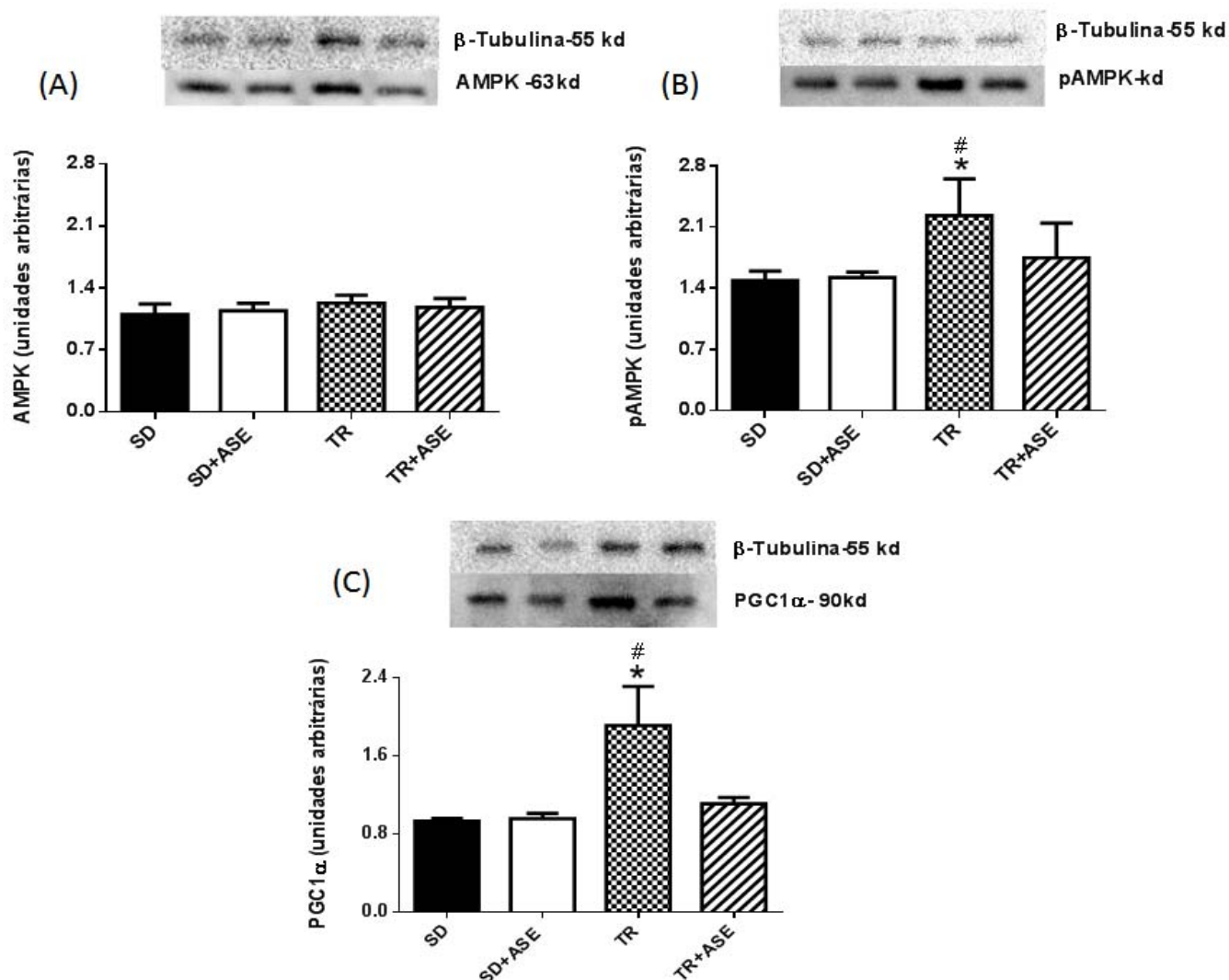
Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos Wistar machos por grupo. *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

3.12 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial no tecido muscular esquelético

Os níveis das proteínas AMPK e pAMPK não foram alteradas entre os diferentes grupos estudados (Figura 25A e 25B). O treinamento físico isolado aumentou a expressão da proteína PGC1 α ($p<0,05$) em relação aos grupos Sedentário e Sedentário + ASE, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos Treino e Treino+ASE. (Figura 25C).

Figura 25 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de proteínas da cascata de sinalização biogênese mitocondrial no tecido muscular esquelético



Legenda: Sedentários (SD), sedentários tratados com ASE (SD+ASE), treino (TR) e treino tratados com ASE (TR+ASE). Níveis proteicos de AMPK(A) pAMPK (B) e PGC1α (C).

Nota: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=10 ratos Wistar machos por grupo. Letra (B) *p<0,05 em relação ao grupo Sedentário; #p<0,05 em relação ao grupo Sedentário+ASE conforme determinado pelo Teste-t não pareado. Letra (C) *p<0,05 em relação ao grupo Sedentário; #p<0,05 em relação ao grupo Sedentário+ASE conforme determinado pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey e Bonferroni.

Fonte: O autor, 2017.

4 DISCUSSÃO

Em um estudo preliminar realizado pelo nosso grupo em ratos, observamos que a associação do exercício físico com o ASE melhorou o desempenho físico e alguns parâmetros metabólicos (dados não publicados). Com base nessas observações e nas propriedades do ASE já descritas, testamos a hipótese de que a possível melhora do desempenho físico induzida pelo ASE possa envolver a função vascular, ação antioxidante e a participação da biogênese mitocondrial no tecido muscular esquelético.

O Exercício físico aeróbico é considerado uma excelente estratégia para o controle e manutenção do peso corporal (Donnelly et al. 2009; Jakicic et al. 2008). Estudos da literatura demonstram que o treinamento físico contínuo de duas horas/dia, durante oito semanas, produziu uma redução significativa no ganho de peso em ratos saudáveis (Martinez et al. 2017), e o exercício físico de baixa intensidade em esteira rolante, 20 minutos a cada 3 dias, preveniu o ganho de peso em ratos alimentados com sacarose (Rooney et al. 2012). Embora o exercício físico aeróbico se configure como uma importante ferramenta na perda ou controle de peso e ganho de massa corporal, a intensidade e o tempo da atividade, juntamente com a dieta também exercem um papel fundamental. No presente estudo, não encontramos diferenças significativas no ganho de peso entre os grupos estudados. Os animais de todos os grupos foram alimentados com dieta padrão para rato, o que não contribuiu para um elevado ganho de peso entre os animais. Somado a isso, o tempo de exercício por dia praticado, de intensidade moderada, poderia também contribuir como um fator limitador na redução do ganho de peso. Outros dados da literatura demonstram que a associação do exercício físico de intensidade moderada com suplementação de polifenóis não provocam impactos significativos sobre o peso corporal de animais, tanto com o chá verde (Murase et al. 2006), quercetina (Casuso et al. 2013) ou o consumo de polifenóis presentes na maçã (Nakazato et al. 2007), o que corrobora nossos resultados. Estudos anteriores do nosso grupo em ratos normais ou diabéticos, também não observaram redução significativa do peso corporal dos animais pelo ASE, isoladamente ou associado a prática física aeróbica de intensidade moderada (dados não publicados).

No presente estudo evidenciamos um aumento significativo tanto no tempo quanto na distância percorrida pelos animais, no teste progressivo máximo após as semanas de treinamento físico crônico. Este achado é corroborado por estudos da literatura sobre a regularidade do exercício como um promotor da melhora do desempenho físico em modelos animais. Briito et al. (2013), observaram que ratos wistar saudáveis que praticaram exercício físico aeróbico em esteira rolante, durante cinco semanas, apresentaram aumento na velocidade máxima alcançada no teste de esforço máximo. Além disso, podemos citar estudos que observaram melhora no desempenho físico em ratos espontaneamente hipertensos (Caponi et al. 2013) e ratos diabéticos induzidos por estreptozocina (Rodrigues et al. 2007). Sendo assim, nossos dados reforçam que o exercício físico aeróbico de intensidade moderada, por si só, promove melhora do desempenho físico em modelo animal.

Em nossos resultados não observamos diferenças significativas no nível de glicemia em jejum entre os grupos estudados. O índice glicêmico é a presença da glicose na circulação sistêmica e sua posterior captação pelos tecidos periféricos sendo que a elevação destes níveis em jejum é associada com desenvolvimento de patologias como o diabetes mellitus (Gross et al. 2001). Evidências apontam que o exercício físico reduz os níveis glicêmicos em animais e humanos diabéticos, sendo altamente recomendado para os portadores dessa síndrome (Delavar, 2016; Grisé et al. 2016).

Da mesma forma que o exercício, evidências recentes têm sugerido que os polifenóis possuem propriedade hipoglicemiante (Babu et al. 2013), que é corroborada por resultados do nosso grupo, que tem demonstrado que o tratamento preventivo com o ASE reduz os níveis glicêmicos em modelo de síndrome metabólica de maneira isolada (de Oliveira et al. 2010; 2015), assim como em modelo de hipertensão associada ao diabetes (Cordeiro et al. 2017). No entanto, o fato de não observarmos alteração significativa na glicemia entre os grupos estudados se deve, possivelmente, ao fato de que os animais utilizados neste modelo experimental não possuíam nenhuma anormalidade dos níveis glicêmicos, constatando que o exercício físico, o ASE ou a associação de ambos, mantiveram a normoglicemia destes animais.

Neste contexto, avaliamos a expressão das proteínas na cascata de insulina, como a Pi3K, Akt, pAkt e o Glut-4 no tecido muscular esquelético. Não observamos diferenças significativas na expressão dessas proteínas entre os grupos estudados.

Ao mesmo tempo, a atividade física regula a transcrição de genes como o IRS-1 e a expressão pós-transcricional da Pi3K (Sato et al. 2003), bem como, aumenta a expressão do Glut-4 (Christ-Roberts et al. 2004), efeitos fundamentais para a melhora da sensibilidade à insulina. Nesse aspecto, nosso extrato já demonstrou a capacidade de promover melhora na via de captação de insulina em animais diabéticos submetido ao exercício físico (dados não publicados). Contudo, grande parte desses trabalhos utiliza modelo animal com síndrome metabólica (Dong et al. 2013; Gandhi et al. 2013; Ishak et al. 2013). Em adição, um estudo da literatura com ratos submetidos ao exercício físico em esteira rolante demonstrou que houve aumento na expressão do transportador Glut-4 após uma hora de exercício, porém a expressão dessa proteína era reduzida após três horas na membrana plasmática em homogenato de músculo, retornando aos seus níveis basais (Kido et al. 2016). Assim, o modelo animal utilizado e o tempo de coleta das amostras podem ter limitado a visualização ou alteração desta via.

No modelo experimental estudado encontramos ao final do tratamento que o treinamento físico crônico associado ao ASE promoveu uma redução nos níveis de lactato sanguíneo quando comparados aos grupos sedentário e treino. A presença elevada do lactato no sangue pode ser considerada um dos fatores da fadiga muscular, pois é um subproduto da glicólise anaeróbica (Koho et al. 2002), onde alguns estudos sugerem que sua presença possa causar acidose muscular (Nalbandian, 2016). Esse processo de produção de energia é fundamental nos momentos iniciais do exercício físico (Urso et al. 2013), porém, em exercícios físicos de intensidade moderada e longa duração, o metabolismo glicolítico aeróbio, onde o oxigênio é o aceptor final, é predominante (Silva et al. 2007). Com isso a vasodilatação no tecido muscular esquelético reduz a resistência periférica ao fluxo sanguíneo otimizando a distribuição de oxigênio pelos tecidos em atividade (Monteiro, 2004). Nosso extrato é um potente vasodilatador dependente de endotélio, principalmente por estimular a síntese de NO (Rocha et al. 2007). Este agente desempenha um papel importante na fisiologia do exercício por participar do processo de vasodilatação no músculo ativo (Nyberg et al. 2015). Deste modo, sugerimos que o ASE promove uma melhora na perfusão sanguínea no músculo em atividade via secreção de NO, permitindo assim um maior aporte de oxigênio e conseqüentemente maior captação do mesmo pelo tecido muscular, e auxiliando a produção energética pela via aeróbica.

Contudo, para um melhor diagnóstico do processo, é necessário que outros marcadores biológicos como a expressão das enzimas lactato desidrogenase e creatina fosfoquinase possam ser mensurados. Ainda neste contexto, não observamos diferenças significativas nos níveis de lactato entre o grupo treino e os grupos sedentários, demonstrando assim que o modelo de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada reproduzido respeitou os limites do índice de lactato estável (Voltarelli et al. 2002).

Robustas evidências literárias sugerem que o exercício físico induz um processo de adaptação fisiológica do músculo esquelético com melhora da captação do oxigênio (Nóbrega, 2006; Holloszy, 1984 e Calvo et al. 2008), aumento na síntese de glicogênio (Dos Santos et al., 2010), e da biogênese mitocondrial, com melhora da eficiência das mitocôndrias (Krieger et al. 1980), sendo estes processos primordiais na adaptação do músculo esquelético ao exercício físico aeróbico (Clapier et al. 2008 e Drake et al. 2017). Portanto, a melhora observada no desempenho físico tanto na melhora da distância percorrida como no tempo de exercício nos animais submetidos ao teste de esforço máximo pode ser atribuída aos diversos parâmetros anteriormente citados. Com um maior volume de oxigênio captado e transportado para a microcirculação presente no músculo esquelético, associado ao maior conteúdo mitocondrial e com melhor eficiência, o músculo pode realizar a fosforilação oxidativa para a geração de energia, reduzindo a fadiga muscular e promovendo uma melhora no desempenho físico.

Em nosso estudo observamos pela primeira vez, uma melhora tanto no tempo de exercício como na distância percorrida no teste de esforço máximo em animais que praticaram exercício físico aeróbico suplementados com o ASE. Esta melhora na *performance* foi de aproximadamente 57% superior na distância percorrida, cerca de 25% superior no tempo de exercício e 33% superior na velocidade média quando comparada aos animais do grupo treino sem tratamento. Corroborando estes achados, estudos com polifenóis tem demonstrado que os mesmos podem promover ganhos no desempenho físico, como a quercetina, um flavonol encontrado em plantas, o qual promove um ganho significativo na *performance* física em humanos (Nieman et al. 2010; Mac Hae et al. 2006) e a catequina que promove uma melhora no desempenho físico, principalmente, em não atletas, por aumentar a capacidade de resistência e o volume de oxigênio máximo (Malaguti et al. 2013). Vale ressaltar que a catequina é um dos polifenóis encontrados no ASE.

Portanto, a utilização de polifenóis como potencializadores do desempenho físico, torna-se atraente, entretanto os mecanismos envolvidos ainda não são bem estabelecidos. A geração de NO pelos polifenóis poderia ser uma explicação para uma possível ação vasodilatadora na microcirculação da maquinaria contrátil dos miócitos, no tecido muscular esquelético (Wadley, 2007). A capacidade do ASE em estimular a formação de NO em células endoteliais em cultura, via ativação da enzima NO sintase foi demonstrada em estudos anteriores do nosso grupo (Rocha *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2008). Ainda nesse contexto, a presença do NO estimulado pelo ASE poderia auxiliar na manutenção da vasodilatação no músculo esquelético ativo, em resposta a ação vasoconstritora exercida pelo sistema nervoso simpático, permitindo um melhor fluxo sanguíneo e difusão de oxigênio no tecido muscular (Remenynsder *et al.* 1962; Roseguini BT *et al.* 2007).

Outras evidências da literatura evidenciam a característica dos polifenóis de exercer proteção em um ambiente de estresse oxidativo, como no estudo com extrato de *blueberry* que demonstrou um efeito protetor dose-dependente contra o dano oxidativo em cultura de células musculares esqueléticas (Hurst *et al.* 2010), assim como os polifenóis da maçã que exercem uma proteção das fibras musculares contra o dano oxidativo, promovendo o aumento da resistência muscular (Nakazato *et al.* 2007). Somado a estas evidências, alguns trabalhos sugerem que o consumo de bebidas ricas em polifenóis reduz a utilização de hidratos de carbono, poupando glicogênio e conseqüentemente resultando no aumento da execução de exercícios de resistência (Murase *et al.* 2005; Murase *et al.* 2006). Da mesma forma a suplementação com extrato da casca de romã não só promoveu uma melhora na *performance* física de ratos submetidos ao treinamento físico como também um aumento no conteúdo de glicogênio e ATP muscular (Swamy *et al.* 2011).

No presente trabalho, estudamos o papel do exercício físico e do ASE sobre a modulação vascular, avaliando a resposta a agentes vasodilatadores e vasoconstritores em leito arterial mesentérico, como um possível mecanismo de melhora do desempenho do exercício. Encontramos uma melhor resposta vasodilatadora em resposta a acetilcolina, um vasodilatador dependente de endotélio, nos grupos treino e treino suplementado com ASE comparadas ao grupo sedentário. Corroborando estes achados, trabalhos da literatura sugerem que a prática física pode melhorar a função endotelial. Em modelo animal, ratos hipertensos obtiveram melhor resposta vascular para a acetilcolina em leito arterial

mesentérico com o exercício físico em piscina por 1 hora/dia durante seis semanas (Kuru et al. 2009). Da mesma forma, ratos saudáveis submetidos a uma única sessão de exercício físico em esteira rolante (60 minutos, com velocidade de 60% da capacidade do teste de esforço máximo) apresentaram melhor resposta vasodilatadora para a acetilcolina em anéis de aorta devido à maior biodisponibilidade de NO (Tanaka et al. 2015).

A inibição da NO sintase pode reduzir a resposta vasodilatadora da acetilcolina (Jen et al. 2002) ou parcialmente (Tanaka et al., 2015), em ratos submetidos a uma única sessão de atividade física. Neste contexto, o exercício físico promove um aumento da expressão ou atividade da NO sintase (Harris et al. 2008; McAllister et al. 2010), sendo esse um dos principais mecanismos pelos quais, o exercício previne a disfunção endotelial (Ghisi et al. 2010). Assim, nossos dados reforçam o papel do exercício físico em promover uma melhora em resposta a agentes vasodilatadores dependente de endotélio, em animais saudáveis, possivelmente pela produção de fatores vasodilatadores induzidos pela prática física, como o NO, promovendo uma proteção ao endotélio vascular. Apesar de estudos anteriores do nosso grupo demonstrarem efeito anti-hipertensivo e melhora da função endotelial em animais hipertensos tratados com ASE (Costa et al. 2012, Cordeiro et al. 2015), o tratamento de animais saudáveis com o extrato isoladamente não alterou de maneira significativa a resposta do leito arterial mesentérico à acetilcolina em relação ao grupo sedentário. Somente a associação do extrato com o exercício produziu uma redução significativa em relação aos grupos sedentários, e uma pequena melhora em relação ao grupo treino, principalmente em doses menores. Neste contexto, o papel do exercício físico tem maior impacto que o ASE na melhora da resposta vasodilatadora, sendo que a associação de ambos promovem uma leve potencialização dessa resposta em relação ao grupo treino, possivelmente, pelo somatório das propriedades vasodilatadoras tanto do extrato como do exercício (Rocha et al. 2007; Rocha et al. 2008; Harris et al. 2008; McAllister et al. 2010).

Nossos resultados mostram uma resposta vasoconstritora mais exacerbada da noradrenalina (NE), no grupo sedentário em relação aos demais grupos, o que está de acordo com dados da literatura (Araújo et al. 2013; Faria et al. 2017). Embora tenhamos observado uma redução dessa resposta no grupo treino, os grupos suplementados com ASE, tanto isoladamente como associado ao

treinamento físico apresentaram uma redução mais expressiva da reatividade à NE. Nesse caso, destacamos uma maior eficácia do ASE, comparado ao exercício, na proteção contra a vasoconstrição induzida pela NE. Como outrora mencionado, os efeitos vasodilatador do ASE via NO e EDHF (Rocha et al. 2007; 2008) e a ação antioxidante (Rocha et al. 2008; Oliveira et al. 2010; de Moura et al. 2011; Moura et al. 2012; da Costa et al. 2012; de Bem et al. 2014) devem contribuir para o aumento da biodisponibilidade do NO, e exercer um efeito protetor no endotélio vascular. A resposta vasodilatadora independente de endotélio promovido pela nitroglicerina não foi diferente entre os grupos estudados, indicando não haver alteração da responsividade do músculo liso. Estes dados em conjunto demonstram que tanto o exercício físico como o ASE exercem um papel protetor na função endotelial, e que a associação de ambos tende a potencializar essa proteção o que pode contribuir para a melhora do desempenho após treinamento físico.

Ao observar nossos resultados em relação a atividade ao quadro oxidativo, não encontramos alterações na peroxidação lipídica, assim como na carbonilação de proteínas em plasma e no homogenato muscular entre os grupos estudados, indicando que a atividade física regular e de intensidade moderada não resultou em dano oxidativo nos tecidos estudados. Este resultado é corroborado por um estudo no qual os níveis de MDA e de carbonilação de proteínas em atletas que praticavam atividade regular tanto aeróbica como anaeróbica, não apresentaram alterações nesses marcadores de dano oxidativo, demonstrando o papel adaptativo do exercício físico no combate ao dano oxidativo (Park et al. 2016).

A atividade elevada da enzima antioxidante SOD no grupo treino suplementado com ASE em homogenato muscular e GPx nos grupos suplementados com ASE no plasma indicam uma potencialização da defesa antioxidante induzida pelo extrato nesses grupos. Considerando que o músculo soleus é um dos mais ativos durante a prática física de corrida com alto conteúdo mitocondrial (Khani et al. 2017), a atividade aumentada da SOD pode representar uma resposta adaptativa ao desempenho mais desgastante do último teste de esforço, devido a maior distância e tempo percorrido por esses animais e consequentemente, com maior consumo de oxigênio e aumento da geração de ERO. Um estudo realizado com extrato antioxidante de tomilho foi capaz de melhorar em até 4 vezes a *performance* física de ratos, porém houve aumento dos níveis de peroxidação lipídica devido a atividade física mais extenuante e a falha do

extrato em melhorar a defesa enzimática antioxidante dos animais suplementados. (Khani et al. 2017). Em nosso estudo a melhora da atividade de enzimas antioxidantes pelo ASE, sugere que o extrato conseguiu prevenir o dano oxidativo mesmo em uma atividade mais extenuante, devido a sua capacidade de melhorar a defesa antioxidante como já foi demonstrado por nosso grupo, em lavado bronquioalveolar e pulmão de camundongos expostos a fumaça de cigarro (Moura et al. 2011; Moura et al. 2012); em plasma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica (de Oliveira et al. 2010); em homogenato de vasos mesentéricos em modelo de hipertensão renovascular (da Costa et al. 2012) e espontânea (Cordeiro et al. 2015); e em plasma e homogenato de rim em modelo de programação metabólica com dieta hipoprotéica durante a gestação (de Bem et al. 2014).

Com o objetivo de avaliar um possível papel do ASE na biogênese mitocondrial, estudamos a expressão de proteínas responsáveis pela regulação da biogênese mitocondrial, no tecido muscular esquelético. Dentre elas, destacamos o aumento significativo da PGC1 α no grupo treino em relação aos grupos sedentários. É sabido que a expressão dessa proteína tem um papel primordial na biogênese mitocondrial sendo este processo responsável pela adaptação do músculo esquelético ao exercício físico (Clapier RV et al. 2008), e conseqüentemente pela melhora do desempenho físico (Drake et al. 2016), o que corrobora nossos resultados. Além disso, observamos uma maior expressão da pAMPK no grupo treino em relação aos grupos sedentários. Com base nas evidências de que a AMPK exerce um papel importante na fosforilação e ativação da PGC1 α (Hood et al. 2016), nosso estudo reforça o papel adaptativo do exercício físico sobre o músculo esquelético, possivelmente, pelo aumento da biogênese mitocondrial. O grupo treino suplementado com ASE não apresentou diferenças significativas tanto na expressão da AMPK como da PGC1 α em relação aos demais grupos, demonstrando que a melhora do desempenho físico observada com o ASE, em nosso estudo não está necessariamente relacionada com a via da biogênese mitocondrial, e conseqüente potencialização da capacidade adaptativa do músculo esquelético promovida pelo exercício físico.

Embora esta seja uma via bastante investigada como potencial alvo para a melhora do desempenho físico, outros estudos da literatura demonstram que extratos antioxidantes que apresentaram melhora no desempenho físico tiveram pouco ou nenhum impacto em potencializar esta via. Um estudo com extrato

antioxidante de tomilho promoveu uma significativa melhora do desempenho físico, porém apresentou redução na expressão da proteína PGC1 α , (Khani et al. 2017), assim como suplementação com n-acetilcisteína reduz a expressão de PGC1 α , PGC1 β , TFAM e NRF-1 em camundongos submetidos ao exercício em esteira rolante (Sun et al. 2015). Camundongos que realizaram uma dieta hiperlipídica suplementada com quercetina e foram submetidos ao exercício físico não apresentaram alterações da PGC1 α e Tfam. (Khow et al. 2014). Estes e outros estudos (Acuña CS et al. 2014) sugerem melhora do desempenho físico através da melhora da capacidade cardiovascular e do efeito antioxidante. Ainda neste contexto, um estudo demonstrou que camundongos knockout para a PGC1 α apresentaram atividade de corrida regular mesmo com a atividade mitocondrial basal reduzida, sugerindo que embora seja útil, a biogênese não é um evento essencial para um bom desempenho em um exercício de resistência (Adheihetty et al. 2009). Contudo, não descartamos que a suplementação com o ASE esteja interferindo na sinalização redox, mediada por ERO, responsável pela ativação da PGC1 α (Hood et al. 2016), uma vez que a defesa enzimática mostrou-se aumentada no grupo treino suplementado com ASE em relação ao grupo treino. A menor biodisponibilidade de ERO poderia resultar em uma interferência na via da biogênese mitocondrial. Tal efeito pode estar relacionado com a dose utilizada ou até a ingestão crônica do extrato. Outras análises são necessárias para adequar a dose correta do ASE que promova melhora do desempenho com o mínimo de interferência nesta via.

Em nossos resultados demonstramos que a expressão da p-eNOS (ser1177) não foi alterada entre os grupos no tecido muscular. O aumento da eNOS após o exercício físico tem sido reportado na literatura (McAllister et al. 2010). Contudo, o aumento da expressão da enzima não corresponde necessariamente a uma maior produção de NO (Fulton et al. 2001). Como já mencionado a ação do ASE é dependente de endotélio pela secreção de NO (Rocha et al. 2007), no entanto, os mecanismos que levam o extrato a aumentar a biodisponibilidade de NO ainda não estão elucidados, podendo ser atribuída em parte à sua ação antioxidante. Sendo assim, outros mecanismos de modulação da eNOS poderiam influenciar na sua eficiência sem necessariamente aumentar sua expressão (Fulton et al. 2001).

Entre eles, analisamos a expressão tanto da Akt como da Hsp90 no tecido muscular, no qual não encontramos diferenças significativas. Harris et al, observou o aumento da expressão da Hsp90, porém não da eNOS e associou a melhora da

atividade da enzima a maior expressão da Hsp90 (Harris et al. 2008). Contudo, outro estudo com ratos que praticaram exercício em esteira rolante, as expressões da Hsp90 e da AKt não foram afetadas (McAllister et al. 2010). Da mesma forma, o conteúdo de mRNA da Hsp90 não foi alterado em ratos que praticaram atividade física em esteira inclinada (Lomonosova et al. 2014). Apesar do seu possível efeito sobre a modulação da NO sintase, há poucas evidências da literatura sugerindo que a associação de ambas resulte efetivamente em uma maior produção de NO e maior biodisponibilidade do último, sendo que nossos resultados se somam a outros que não observaram aumento da expressão, tanto do exercício físico, assim como do extrato. Os diferentes protocolos experimentais podem ter influência nos resultados conflitantes observados.

CONCLUSÃO

Com base nesses resultados demonstramos a propriedade do ASE em potencializar o desempenho físico de ratos Wistar, possivelmente devido a ação vasodilatadora e antioxidante do extrato, promovendo melhora do fluxo sanguíneo no músculo ativo, e reduzindo a fadiga muscular. Outras análises são necessárias para melhor adequação do tempo de ingestão do extrato no qual tenha impacto mínimo na adaptação do músculo esquelético aos efeitos benéficos do exercício físico aeróbico.

REFERÊNCIAS.

- Acuña CS, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly 5 emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2014)
- Adihetty PJ, Ugucioni G, Leick L, Hidalgo J, Pilegaard H, Hood DA. The role of pgc-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297:C217–25
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-126
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615
- Alessi DR, Downes CP. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta*.1998; 1436:151-164.
- Alvim RO, Cheuhen RM, Machado RS. General aspects of muscle glucose uptake. *Acad Bras Cienc*. 2015 Mar;87(1):351-68
- Araújo AJS, Santos ACV, Souza KS. Resistance Training Controls Arterial Blood Pressure in Rats with L-NAME- Induced Hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(4):339-346
- Baar K. Nutrition and the Adaptation to Endurance Training. *Sports Med*. 2014 May;44 Suppl 1:S5-12
- Babu PV, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem*. 2013; 24: 1777-1789.
- Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2009;107(4):1144–55.
- Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol* 2007
- Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 1997 Jan;82(1):359-63.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*.1982;32: 131-138.
- Barbosa KBF, Costa BNM, Alfenas RCG. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr., Campinas*, 23(4):629-643, jul./ago., 2010

Battault S, Singh F, Gayraud S. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertens Res.* 2016 Feb;39(2):70-8

Beck DT, Martin JS, Casey DP, Braith RW. Exercise training improves endothelial function in resistance arteries of young prehypertensives. *J Hum Hypertens* 2014; 28: 303–309

Belvirandal M, Gokbel H, Okudan N. Effects of grape seed extract supplementation on exercise-induced oxidative stress in rats. *Br J Nutrition* 108:249-256, 2012

Boor luen tang. Sirt1 and the mitochondria. *Mol Cells.* 2016 Feb 29; 39(2): 87–95.

Booth F W, Roberts C K, Laye M J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol.* 2012 Apr;2(2):1143-21

Brady MJ, Bourbonais FJ, Saltiel AR. The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 1998; 273: 14063-14066.

Braakhuis AJ e Hopkins GW. Impact of Dietary Antioxidants on Sport Performance: *Sports Med.* 2015 Jul;45(7):939-55

Brito VWH, Halsberghe MJE, Schwantes MLB. Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. *Braz. J. Biol.*, 2014, vol. 74, no. 2, p. 444-449

Calvo JA, Daniels TG, Wang X. Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol* 104:1304-1312, 2008.

Caponi PW, Lehnen AM, Pinto GH. Aerobic exercise training induces metabolic benefits in rats with metabolic syndrome independent of dietary changes. *Clinics (Sao Paulo).* 2013 Jul; 68(7): 1010–1017.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000.

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985; 100:126-131.

Casuso RA, Amat AM, Lopez EJM. Ergogenic effects of quercetin supplementation in trained rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2013, 10:3

Ciolac GE e Guimarães VG. Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte _ Vol. 10, Nº 4 – Jul/Ago, 2004*

Clapier RV, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research* (2008) 79, 208–217

Cláudio ERG, Almeida SA, Mengal V. Swimming training prevents coronary endothelial dysfunction in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 2017 Jan 16;50(1):e5495.

Costa CA, Oliveira PR, de Bem GF, *et al.* Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012, 385:1199-9.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995; 378: 785-789.

Curtis LG, Chughtai M, Khlopa A. Impact of Physical Activity in cardiovascular and musculoskeletal Health: Can motion Be Medicine? *J Clin Med Res.* 2017;9(5):375-381

Delavar R, Heidarianpour A. The Effect of Aerobic Exercise Training on Plasma Apelin Levels and Pain Threshold in T1DM Rats. *Iran Red Crescent Med J.* 2016 Sep; 18(9): e31737

de Bem GF, Costa CA, Oliveira PR, *et al.* Protective effect of Euterpe oleracea Mart (açai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. *J Pharm Pharmacol.* 2014, 66:1328-38.

de Moura RS, Pires KM, Ferreira TS, *et al.* Addition of açai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011, 49: 855-63.

de Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF. Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010 Dec;56(6):619-26.

Dong H, Wang JH, Lu FE, Xu LJ, Gong YL, Zou X. Jiaotai Pill enhances insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in skeletal muscle of diabetic rats. *Chin J Integr Med.* 2013; 19: 668-674

Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2009 Feb;41(2):459-71

Dos-SANTOS JW, de MELLO MAR. Endurance Swimming Periodized Training in Rats. *Journal of Exercise Physiologyonline (JEPonline)* Volume 13 Number 5 October 2010

Donaldson, S.K.B.; Hermansen, L. Differential, Direct Effects of H⁺ on Ca²⁺ +- Activated Force of Skinned Fibers from the Soleus, Cardiac and Adductor Magnus Muscles of Rabbits. *Pflügers Arch.* 1978, 376, 55–65.

Drake Cj, Wilson RJ, Yan Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *FASEB J*. 2016 Jan;30(1):13-22

Faria TO, Angeli JK, Mello LGM. A Single Resistance Exercise Session Improves Aortic Endothelial Function in Hypertensive Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2017 Mar; 108(3): 228–236.

Ferreira AL, Matsubara LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Méd Brasil*. 1997; 43: 61-68.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36:327-358, 2006

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 114-121.

Fontana J, Fulton D, Chen Y. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90:866–873 (2002)

Fulton D, Gratton J-P, Sessa WC (2001) Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299:818–824

Gandhi GR, Stalin A, Balakrishna K, Ignacimuthu S, Paulraj MG, Vishal R. Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830: 2243-2255.

Gibala MJ, Gillen JB, Martin JB. Twelve Weeks of Sprint Interval Training Improves Indices of Cardiometabolic Health Similar to Traditional Endurance Training despite a Five-Fold Lower Exercise Volume and Time Commitment. *PLoS One*. 2016 Apr 26;11(4):e0154075

Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training molecular mechanisms. *Circulation* 2010; 122: 1221–1238.

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3- kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*. 1995; 95: 2195-204

Graham DA, Rush JWE. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 2004; 96: 2088–2096.

Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 2004; 561: 1–25.

Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, Edwards JG. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc Diabetol* 2008; 7: 34.

Grisé KN, Olver TD, McDonald M. High Intensity Aerobic Exercise Training Improves Deficits of Cardiovascular Autonomic Function in a Rat Model of Type 1 Diabetes Mellitus with Moderate Hyperglycemia. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 8164518

Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL. Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification and Glucose Control Evaluation. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46/1:16-26)

Hambrecht R, Adams V, Erbs S. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107: 3152–3158.

Hardie DG, 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179-5183.

Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1203: 120-125.

Hollidge-Horvat, M.G.; Parolin, M.L.; Wong, D.; Jones, N.L.; Heigenhauser, G.J. Effect of induced metabolic alkalosis on human skeletal muscle metabolism during exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000, 278, E316–E329.

Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 56(4):831-838, 1984.

Hood DA, Tryon LD, Carter ND. Unravelling the mechanisms regulating muscle mitochondrial biogenesis. *Biochem. J.* (2016) 473, 2295–2314

Hurst RD, Wells RW, Hurst SM. Blueberry fruit polyphenolics suppress oxidative stress induced skeletal muscle cell damage in vitro. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 353–363

Ishak NA, Ismail M, Hamid M, Ahmad Z, Abd Ghafar SA. Antidiabetic and Hypolipidemic Activities of *Curculigo latifolia* Fruit:Root Extract in High Fat Fed Diet and Low Dose STZ Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 601838.

Jakicic JM, Marcus, B. H, Lang, W. & Janney, C. Effect of exercise on 24-month weight loss maintenance in overweight women. *Arch. Intern. Med.* 168, 1550–1559 (2008).

Jen CJ, Chan HP, Chen HI. Acute exercise enhances vasorelaxation by modulating endothelial calcium signaling in rat aortas, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282 (2002) H977–H982

Ji LL, Zhang Y, Kang C. Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radic. Biol. Med.* (2016)

Jordão CP, Fernandes T, Tanaka LY. Aerobic Swim Training Restores Aortic Endothelial Function by Decreasing Superoxide Levels in Spontaneously Hypertensive Rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017 May; 72(5): 310–31

Kane S, Sano H, Liu SC, Asara JM, Lane WS, Garner CC, Lienhard GE. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTP ase activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem*. 2002; 277: 22115-22118.

Kanzanki M, Mora S, Hwang JB, Saltier AR, Pessin JE. Atypical protein kinase C is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J Cell Biol*. 2004; 164: 279-290.

Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ. 2003. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 31: 162-168.

Khani M, Motamedi P, Dehkhoda MR. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 α content and endurance exercise performance in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2017

Kido K, Ato S, Yokokawa T. Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. *Physiol Rep*, 4 (16), 2016, e12907

Knuiman P, Hopman MTE, Mensink M. Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. *Nutrition & Metabolism* (2015) 12:59

Koho MN, Vaihkonen LK, Poso AR. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. *Equine Vet J Suppl.* 2002 Sep;(34):555-9

Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2004; 11: 1041-1064.

Krieger DA, Tate CA, Booth FW. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1980 Jan;48(1):23-8.

Kuru O, Senturk UK, Koçer G. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Sep;107(3):896-902

Kwon SM, Park HG, Jun JK, Lee WL. Exercise, but not quercetin, ameliorates inflammation, mitochondrial biogenesis, and lipid metabolism in skeletal muscle after strenuous exercise by high-fat diet mice. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2014;18:51.

Lin J, Handschin C, Spiegelman, BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 1,361–370 (2005).

Laher I, Andriantsitohaina R, Auger C. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *British Journal of Nutrition* (2012)

Levine RI, Garland D, Oliver CN, Amici A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990;186: 464-478.

Lomosova YN, Shenkman BS, Nemirovskaya TL. Signaling effects of substrate stimulation of nNOS in rat soleus after eccentric exercise. *Dokl Biochem Biophys.* 2013 Sep;452(1):271-5

MacRae HS, Mefferd KM. Dietary antioxidant supplementation combined with quercetin improves cycling time trial performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2006;16:405–19

Malaguti M, Angeloni C, Hrelia S. Polyphenols in Exercise Performance and Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 825928

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 577-586.

Matheus ME, de Oliveira Fernandes SB, Silveira CS. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107: 291-296.

Martinez EJ, Taiepeiro FE, Chies AB. Effects of Continuous and Accumulated Exercise on Endothelial Function in Rat Aorta. *Arq Bras Cardiol.* 2017; 108(4):315-322.

Matsuura C, Brunini TM, Carvalho LC, Resende AC, Carvalho JJ, de Castro JP, Mendes- Ribeiro AC. Exercise training in doxorubicin-induced heart failure: effects on the L-arginine- NO pathway and vascular reactivity. *J Am Soc Hypertens.* 2010; 4: 7-13.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 577-586.

McAllister RM, Price EM. Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats. *Eu J Appl Physiol* 110:1019-1027, 2010.

McAllister RM, Jasperse JL, Laughlin MH. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 98:753–761 2005

McConell GK, Bradley SJ, Stephens TJ. Skeletal muscle nNOS mu protein content is increased by exercise training in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(2)

McLeay Y, Stannard S, Houtham S. Dietary thiols in exercise: oxidative stress defence, exercise performance, and adaptation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* (2017)

Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1550 –R1556, 2006

Nakazato K, Song H, Waga T. Dietary Apple Polyphenols Enhance Gastrocnemius Function in Wistar Rats. *Med Sci Sports Exerc* 39:934-940, 2007

Nalbadian M e Takeda M. Lactate as a Signaling Molecule That Regulates Exercise-Induced Adaptations. *Biology* 2016

Narkar VZ, Downes M, Yu RI *et al.* AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics *Cell* 134:405-415, 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.06.051.

Nieman DC, Williams AS, Shanely RA. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc.* 2010 Feb;42(2):338-45

Nóbrega. O conceito de efeitos sub-agudos do exercício. *Rev. bras. Educ. Fís. Esp.*, São Paulo, v.20, p.85-86, set. 2006. Suplemento n.5.

Nogueira L, Sanchez IR, Perkins GA. (–)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J Physiol* 589.18 (2011) pp 4615–4631

Nyberg M, Gliemann L, Hellsten Y. Vascular function in health, hypertension, and diabetes: effect of physical activity on skeletal muscle microcirculation. *Scand J Med Sci Sports* 2015; 25 (Suppl. 4): 60–73

Osorio RA, Christofani JS, D'Almeida V. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135, 89–95. (2003)

Paravicini T, Touyz R. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31: 170-180.

Park SY, Kwak YS. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *J Exerc Rehabil.* 2016 Apr; 12(2): 113–117

Parker L, Shaw SC, Stepto KN. Exercise and Glycemic Control: Focus on Redox Homeostasis and Redox-Sensitive Protein Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 May 5;8:87

Pauli JR, Cintra DE, Souza CT. New mechanisms by which physical exercise improves. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53/4 insulin resistance in the skeletal muscle

Picard F, Kurtev M, Chung N. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004;429:771–776

Powell K. obesity: the two faces of fat. *Nature*. 2007; 447: 525-527.

Ramalingam L, Oh E, Thurmond DC. Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 2815-2834.

Rasbach KA, Scnellman RG. Isoflavones Promote Mitochondrial Biogenesis *JPET* 325:536-543, 2008.

Remensnyder JP, Mitchell JH, Sarnoff SJ. Functional sympatholysis during muscular activity. Observations on influence of carotid sinus on oxygen uptake. *Circ Res* 1962; 11: 370–380.

Resende AC, Ballejo G, Leite R, Salgado COM. Role of NO-dependent mechanisms in bradykinin-induced vasodilation in the rat mesenteric bed. *Pharmacol Rev Commun*. 1997; 9:269-278.

Resende AC, Emiliano AF, Cordeiro VS, de Bem GF, de Cavalho LC, de Oliveira PR, Neto ML, Costa CA, Boaventura GT, de Moura RS. Grape skin extract protects against programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal high-fat diet during lactation. *J Nutr Biochem*. 2013; 24: 2119-2126.

Rocha AP, Resende AC, Sousa MVA,. Antihypertensive effects and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *Euterpe Oleracea* Mart. (Açaí). *J Pharmacol Toxicol*. 2008; 3: 435-448.

Rocha APM, Carvalho LCRM, Sousa MVA. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol*. 2007;46: 97-104.

Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 6: 38.

Rooney k, Yan C, Chan Y. Low-volume exercise can prevent sucrose-induced weight gain but has limited impact on metabolic measures in rats. *Eur J Nutr*, 2012.

Roseguini BT, Narro F, Oliveira AR. Estimation of the lactate threshold from heart rate response to submaximal exercise: the pulse deficit. *International journal of sports medicine* 28 (06), 463-469 (2007)

Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press. 1991; 151-170.

Rudnick J, Puttmann B, Tesch PA. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1–3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J.* 2004; 18(11):1228–1230.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414:799-806.

Sessa WC, Cardena GG, Fan R; Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824 (23 April 1998)

Singleton VL, Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*, v.20, n.2, p. 144-158, 1965.

Silva LAE, Fernandes TC, Oliveira RD. Muscle glycogen metabolism during exercise: mechanism of regulation. *Rev. Nutr.* vol.20 no.4 Campinas July/Aug. 2007

Spier SA, Delp MD, Meininger CD. Effects of aging and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol.* 2004 May

Sun Y, Qi Z, He Q, Cui D, Qian S, Ji L, Ding S. The effect of treadmill training and nac intervention on biogenesis of cytochrome c oxidase (cox). *Free Radic Biol Med.* 2015;87:326–35.

Sutton, J.R.; Jones, N.L.; Toews, C.J. Effect of PH on muscle glycolysis during exercise. *Clin. Sci.* 1981, 61,331–338.

Swammy MSL, Singsit SND, Khanum F. Anti-fatigue effects of polyphenols extracted from pomegranate peel. *IJIB*, 2011, Vol. 11, No. 2, 69

Tanaka LY, Bechara LRG, Santos AM. Exercise improves endothelial function: A local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Nitric Oxide* (2015)

Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol. Cells* 2016; 39(2): 87-95

Tare M, Parkington HC, Coleman HA. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature.* 1990 Jul 5;346(6279):69-71

Teng YS, Wu Di. Anti-fatigue effect of green tea polyphenols Epigallocatechin3Gallate(EGCG). *Phcog Mag* 2017

Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol.* 1990; 259: 279-285.

Urso PR, Cavalcante MDS, Oliveira CRC; Determination of lactic and alactic metabolisms of the anaerobic capacity using oxygen uptake. *hum.* vol.15 no.5 Florianópolis Sept./Oct. 2013

Valko M, Leibfritz D, Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44-84

Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2002) 35: 1389-1394

Wadley GD, McConell GK. Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2007; 102: 314-320.

Walsh JH, Bilsborough W, Maiorana A, Best M, O'Driscoll GJ, Taylor RR, Green DJ. Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol* 2003; 95: 20–25.

Watson RT, Pessin J. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res*. 2001; 56: 175-194.

Zhang Y, Ji LL, Kang C. Exercise-induced hormesis and skeletal muscle health. *Free Radic Biol Med*. 2016 Sep;98:113-22.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (2015) 83-94