
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
(BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA)**

**EFEITOS AGUDOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DO EXERCÍCIO FÍSICO
AERÓBIO NAS RESPOSTAS HEMODINÂMICAS E ENDÓCRINO-METABÓLICAS EM
MULHERES APÓS A MENOPAUSA**

Guilherme Moraes Puga

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de doutor
em Ciências da Motricidade.

Março-2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

Guilherme Morais Puga

Orientadora: Profa Dra. Angelina Zanescó

Rio Claro - SP

574.1 Puga, Guilherme Moraes
P978e Efeitos agudos da suplementação de L-arginina e do exercício físico aeróbio nas respostas hemodinâmicas e endócrino-metabólicas em mulheres após a menopausa / Guilherme Moraes Puga. - Rio Claro : [s.n.], 2013
111 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Angelina Zanesco

1. Fisiologia. 2. Fisiologia cardiovascular. 3. Óxido nítrico. 4. Pressão arterial. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Angelina Zanesco pela oportunidade, confiança e por todo o suporte que me ofereceu para realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório e da universidade pelos momentos de apoio pessoal, profissional e intelectual.

Agradeço aos professores, funcionários e técnicos de outros laboratórios da UNESP- Rio Claro pelo suporte quando necessário.

Agradeço o apoio oferecido pelos laboratórios coordenados pelo professores Edson Antunes e Gilberto de Nucci, da Unicamp - Campinas, e pela professora Cláudia Forjaz, da USP - São Paulo.

Agradeço às voluntárias pela dedicação e solidariedade e também a todas as enfermeiras envolvidas nesse trabalho.

Agradeço à minha família, em especial meu pai e mãe, que sempre acreditaram nas minhas escolhas, me apoiando em todas as decisões.

Agradeço à minha namorada pelo companheirismo, paciência, carinho e amor.

Agradeço aos meus amigos de sempre e às novas amizades aqui seladas durante todo esse período do doutorado.

Agradeço às agências de fomento CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro e por acreditar e investir nesse projeto.

APOIO FINANCEIRO

Apoio financeiro: este projeto conta com o auxílio pesquisa da FAPESP, processo número 2009/17751-3 e bolsa FAPESP processo 2011/11457-6.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é formado a partir da L-arginina, e sua formação é dependente da biodisponibilidade deste aminoácido. Baseado nesta relação, vários estudos investigaram os efeitos da suplementação da L-arginina no sistema cardiovascular. Esses possíveis efeitos positivos são similares àqueles produzidos pelo exercício físico. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de L-arginina nas respostas hemodinâmicas e endócrino-metabólicas após uma sessão aguda de exercício físico aeróbio em mulheres hipertensas e normotensas após a menopausa. Participaram deste estudo 16 normotensas e 17 hipertensas. As voluntárias foram submetidas a quatro sessões experimentais de forma aleatória e separadas por no mínimo 72 h, com a suplementação de 9g de L-arginina, ou placebo ou nada (dia controle) dependendo da sessão experimental, e após uma hora desta intervenção, as voluntárias desempenharam exercício aeróbio em esteira ergométrica de 30 minutos, com exceção do dia controle sem suplementação e no dia que houve apenas a suplementação de L-arginina, onde as voluntárias permaneceram em repouso. Sangue venoso foi coletado imediatamente antes e após o exercício, e 45 e 90 min após o término do teste. A pressão arterial foi medida pelo método de medida ambulatorial da pressão arterial (MAPA) por 24 horas e método convencional. Perfil lipídico, glicemia, citocinas pró e anti-inflamatórias, enzimas antioxidantes e ADMA de jejum, além de insulina, nitrito, nitrato, GMP cíclico, marcadores do estresse oxidativo (Superóxido dismutase (SOD), Malondialdeído (MDA) e Catalase (CAT)) e marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF α) do plasma e/ou soro durante as sessões experimentais foram analisados. Nossos resultados mostraram que para o grupo de mulheres normotensas a suplementação de L-arginina aliada à realização de exercício aeróbio reduz de pressão arterial diastólica. Para as mulheres hipertensas essa intervenção conjunta prolongou a redução da PAS após o exercício e reduziu da PAD. Nenhuma alteração foi encontrada nas concentrações de NOx⁻, GMPc e Insulina no grupo de voluntárias normotensas, porém tanto a suplementação de L-arginina, quanto o exercício físico aliado aumentaram os níveis plasmáticos de NOx⁻, GMPc, sem alterações na insulinemia. Nenhuma diferença foi identificada nas concentrações de SOD, CAT, MDA e das citocinas IL-6, IL-10, durante as sessões experimentais em ambos os grupos. Porém IL-10 de jejum foi significativamente menor e a IL6 e IL-1 β maior nas mulheres hipertensas. Assim, a suplementação de L-arginina aliada ao exercício físico aeróbio promove efeitos pressóricos benéficos tanto em mulheres normotensas quanto hipertensas sem alterações nos marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 RESPOSTAS AGUDAS DA PRESSÃO ARTERIAL APÓS O EXERCÍCIO FÍSICO	3
1.2 L-ARGININA E NO	9
1.3 SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DOENÇAS CARDIOMETABÓLICAS	11
1.4 PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO ÓXIDO NÍTRICO NAS RESPOSTAS ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIAS	12
1.5 MENOPAUSA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	16
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO	18
3. OBJETIVOS:	19
3.1 OBJETIVO ESTUDO 1: COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS DOS MARCADORES CARDIOINFLAMATÓRIOS ENTRE NORMOTENSAS E HIPERTENSAS	19
3.2 OBJETIVOS ESTUDO 2: EFEITOS DA INTERAÇÃO EXERCÍCIO FÍSICO/L-ARGININA EM MULHERES NORMOTENSAS	19
3.3 OBJETIVO ESTUDO 3: EFEITOS DA INTERAÇÃO EXERCÍCIO FÍSICO/L-ARGININA EM MULHERES HIPERTENSAS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS:	21
4.1 PARTICIPANTES:	21
4.2 PROCEDIMENTOS:	22
4.3 AVALIAÇÃO DA APTIDÃO AERÓBIA – TESTE DE MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO SANGUÍNEO (MFEL):	22
4.4 SESSÕES EXPERIMENTAIS:	23
4.5 SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E PLACEBO:	25
4.6 EXERCÍCIO AERÓBIO:	25
4.7 MENSURAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA:	25
4.8 COLETA DE SANGUE VENOSO:	26
4.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS:	26
4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO:	32
5. RESULTADOS ESTUDO 1: COMPARAÇÃO ENTRE MULHERES NORMOTENSAS E HIPERTENSAS	33
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS VOLUNTÁRIAS NAS CONDIÇÕES DE JEJUM E REPOUSO:	34
5.2 AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE EXERCÍCIO AERÓBIO	38
6. DISCUSSÃO ESTUDO 1	39
6.1 MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO SANGUÍNEO (MFEL)	39
6.2 AVALIAÇÃO DA NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES CARDIOINFLAMATÓRIOS EM JEJUM E REPOUSO:	40
7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS	45
8. CONCLUSÃO ESTUDO 1	45
9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO 1	45
10. RESULTADOS ESTUDO 2 – AVALIAÇÃO DAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS	46
10.1 MEDIDAS DA PRESSÃO ARTERIAL PARA AS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (NT): MÉTODO CONVENCIONAL	46
10.2 MONITORIZAÇÃO AMBULATORIAL DA PRESSÃO ARTERIAL – MAPA:	49
10.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS – NITRITO/NITRATO (NOX ⁻) E GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICA (GMPc):	53

10.4	ANÁLISES DOS MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS:.....	57
10.5	ANÁLISES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E PERIOXIDAÇÃO LIPÍDICA (MDA):	57
11.	DISCUSSÃO ESTUDO 2	59
11.1	RESPOSTAS HEMODINÂMICAS À SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE L-ARGININA E AO EXERCÍCIO FÍSICO EM MULHERES NORMOTENSAS	59
11.2	ANÁLISE DOS MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS NAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS:	67
11.3	ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES – SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE E MALONDIALDEÍDO (MDA) NAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS:	69
12.	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	72
13.	CONCLUSÃO ESTUDO 2:	73
14.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO 2	73
15.	RESULTADOS ESTUDO 3 – AVALIAÇÃO DAS VOLUNTARIAS HIPERTENSAS 74	
15.1	MEDIDAS DA PRESSÃO ARTERIAL PARA AS VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS (HT): MÉTODO CONVENCIONAL.....	74
15.2	MONITORIZAÇÃO AMBULATORIAL DA PRESSÃO ARTERIAL – MAPA:	77
15.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS – NITRITO/NITRATO (NO _x ⁻) E GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICA (GMPc):.....	81
15.4	ANÁLISES DOS MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS:.....	85
15.5	ANÁLISES DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E PERIOXIDAÇÃO LIPÍDICA (MDA):	85
16.	DISCUSSÃO ESTUDO 3	87
16.1	RESPOSTAS HEMODINÂMICAS À SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE L-ARGININA E AO EXERCÍCIO FÍSICO EM MULHERES HIPERTENSAS	87
16.2	ANÁLISE DOS MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS:	92
16.3	ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES – SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE E MALONDIALDEÍDO (MDA):	93
17.	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	95
18.	CONCLUSÃO ESTUDO 3.....	96
19.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO 3	96
20.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	97

Lista de Esquemas:

ESQUEMA 1: FORMAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO, A PARTIR DO METABOLISMO DA ARGININA PELA ATIVAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE. ADAPTADO DE ZANESCO E ANTUNES (2007).	11
ESQUEMA 2: VIA DE SINALIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MUSCULATURA LISA VASCULAR (ADAPTADO DE FRANCIS ET AL 2010).	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ESQUEMA 3: DESIGN DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	24
ESQUEMA 4: PROCESSO DE RECRUTAMENTO E PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO	33
ESQUEMA 5: PERCENTUAL DE VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS QUE FAZIAM USO DE POLITERAPIA (A) E MONOTERAPIA (B). DIU – DIURÉTICOS; AT1 - BLOQUEADORES DO RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II; ECA - INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA; BETA - BETA BLOQUEADORES; CA - INIBIDOR DO CANAL DE Ca^{+2}	35

Lista de Figuras:

- FIGURA 1: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (A) E PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (B) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (N=16) NOS MOMENTOS: REPOUSO (R), PRÉ EXERCÍCIO (PRÉ Ex.) E 15, 30, 45, 60, 75 E 90 MINUTOS APÓS EXERCÍCIO. * $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO AO R; # $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO AO PRÉ Ex.; ^A $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO À SESSÃO ARG, ^B $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO À SESSÃO EXE; ^C $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO À SESSÃO A-E. OS VALORES ESTÃO REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM. 47
- FIGURA 2: DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (A) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA (B) E DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (C) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA DURANTE (D) AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (N=16) NOS MOMENTOS: PRÉ EXERCÍCIO (PRÉ Ex.) E 15, 30, 45, 60, 75 E 90 MINUTOS APÓS EXERCÍCIO. & $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO ÀS SESSÕES SEM A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO (CON E ARG). OS VALORES ESTÃO REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM. 48
- FIGURA 3: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (ACIMA), PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (ABAIXO) NO PERÍODO DE 24 HORAS APÓS AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS: CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (N=16). & $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO AO REPOUSO PARA TODAS AS SESSÕES (CON, ARG, EXE, A-E). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA DO DELTA \pm EPM. 50
- FIGURA 4: DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (A) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA (B), DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (C) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA (D) NO PERÍODO DE 24 HORAS APÓS AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS: CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (N=16). & $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO ÀS SESSÕES SEM A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO (CON E ARG). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM..... 51
- FIGURA 5: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS – COLUNA DA ESQUERDA) E PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD COLUNA DA DIREITA) DURANTE O PERÍODO TOTAL DE 24 HORAS (ACIMA) PERÍODO DE VIGÍLIA (MEIO) E PERÍODO DE SONO (ABAIXO) PARA O GRUPO DE MULHERES NORMOTENSAS (N=16), DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM. 52
- FIGURA 6: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NOX⁻ (NITRITO/NITRATO) NO REPOUSO (REP), IMEDIATAMENTE (PE-0'), 45 MINUTOS (PE-45') E 90 MINUTOS (PE-(90')) APÓS A O

TEMPO PARA A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO (A) PARA O GRUPO DE MULHERES NORMOTENSAS (N=16) E RESPECTIVAS ÁREA ABAIXO DA CURVA (AUC) DAS CONCENTRAÇÕES DE NOX⁻ AO LONGO DO TEMPO (B) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). 54

FIGURA 7: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc) NO REPOUSO (REP), IMEDIATAMENTE, (PE-0') E 45 MINUTOS (PE-45') APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO (A) PARA O GRUPO DE MULHERES NORMOTENSAS E RESPECTIVAS ÁREA ABAIXO DA CURVA (AUC) DAS CONCENTRAÇÕES DE GMPc AO LONGO DO TEMPO (B) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). 56

FIGURA 8: VALORES PLASMÁTICOS INSULINA NO REPOUSO (REP), IMEDIATAMENTE, (PE-0'), 45 MINUTOS (PE-45') E 90 MINUTOS (PE-90') APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO PARA O GRUPO DE MULHERES NORMOTENSAS (N=16) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). & P<0,05 EM RELAÇÃO AO REPOUSO EM TODAS AS SESSÕES. 66

FIGURA 9: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (A) E PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (B) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS (N=17) NOS MOMENTOS: REPOUSO (R), PRÉ EXERCÍCIO (PRÉ Ex.) E 15, 30, 45, 60, 75 E 90 MINUTOS APÓS EXERCÍCIO. * P≤ 0,05 EM RELAÇÃO AO R; # P≤0,05 EM RELAÇÃO AO PRÉ Ex.; ^A P≤0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO ARG, ^B P≤0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO EXE; ^C P≤0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO A-E. OS VALORES ESTÃO REPRESENTAM MÉDIA ± EPM. 75

FIGURA 10: DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (A) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA (B) E DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (C) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA DURANTE (D) AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS (N=17) NOS MOMENTOS: PRÉ EXERCÍCIO (PRÉ Ex.) E 15, 30, 45, 60, 75 E 90 MINUTOS APÓS EXERCÍCIO. * P≤ 0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO CON; # P≤ 0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO ARG. OS VALORES ESTÃO REPRESENTAM MÉDIA ± EPM. 76

FIGURA 11: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (ACIMA), PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (ABAIXO) NO PERÍODO DE 24 HORAS APÓS AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS: CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS (N=17). * P≤ 0,05 EM RELAÇÃO AO REPOUSO EM CADA SESSÃO; ^B P≤ 0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO EXE; ^C P≤ 0,05 EM RELAÇÃO À SESSÃO A-E; & P≤ 0,05 EM RELAÇÃO AO

REPOUSO PARA TODAS AS SESSÕES (CON, ARG, EXE, A-E). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA DO DELTA \pm EPM. 78

FIGURA 12: DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (A) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA (B), DELTA DA PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (C) E SUA RESPECTIVA ÁREA ABAIXO DA CURVA (D) NO PERÍODO DE 24 HORAS APÓS AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS: CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA E EXERCÍCIO (A-E) PARA AS VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS (N=17). & $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO ÀS SESSÕES SEM A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO (CON E ARG). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM..... 79

FIGURA 13: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS – COLUNA DA ESQUERDA) E PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD COLUNA DA DIREITA) DURANTE O PERÍODO TOTAL DE 24 HORAS (ACIMA) PERÍODO DE VIGÍLIA (MEIO) E PERÍODO DE SONO (ABAIXO) PARA O GRUPO DE MULHERES HIPERTENSAS (N=17), DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). OS VALORES REPRESENTAM MÉDIA \pm EPM. & $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO ÀS SESSÕES SEM A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO (CON E ARG). 80

FIGURA 14: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NOX^- (NITRITO/NITRATO) NO REPOUSO (REP), IMEDIATAMENTE (PE-0'), 45 MINUTOS (PE-45') E 90 MINUTOS (PE-(90')) APÓS A O TEMPO PARA A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO (A) PARA O GRUPO DE MULHERES HIPERTENSAS (N=17) E RESPECTIVAS ÁREA ABAIXO DA CURVA (AUC) DAS CONCENTRAÇÕES DE NOX^- AO LONGO DO TEMPO (B) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). & $P \leq 0,05$ EM RELAÇÃO ÀS SESSÕES SEM A REALIZAÇÃO DE EXERCÍCIO (CON E ARG). 82

FIGURA 15: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc) NO REPOUSO (BASELINE), IMEDIATAMENTE, (PE-0') E 45 MINUTOS (PE-45') APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO (A) PARA O GRUPO DE MULHERES HIPERTENSAS E RESPECTIVAS ÁREA ABAIXO DA CURVA (AUC) DAS CONCENTRAÇÕES DE GMPc AO LONGO DO TEMPO (B) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). 84

FIGURA 16: VALORES PLASMÁTICOS INSULINA NO REPOUSO (REP), IMEDIATAMENTE, (PE-0'), 45 MINUTOS (PE-45') E 90 MINUTOS (PE-(90')) APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO PARA O GRUPO DE MULHERES HIPERTENSAS (N=17) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E). & $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO REPOUSO EM TODAS AS SESSÕES. 92

Lista de Tabelas:

TABELA 1: RELAÇÃO DOS TIPOS DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS PELAS VOLUNTÁRIAS DE AMBOS OS GRUPOS DE MULHERES NORMOTENSAS E HIPERTENSAS.	34
TABELA 2: CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICOS, CARDIOVASCULARES E DE PERFIL LIPÍDICO DAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS NA CONDIÇÃO BASAL DE JEJUM.	36
TABELA 3: CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS MARCADORES CARDIOVASCULARES E INFLAMATÓRIOS DAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS NA CONDIÇÃO DE JEJUM.	37
TABELA 4: CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS MARCADORES E INFLAMATÓRIOS DAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS NA CONDIÇÃO BASAL PRÉ TESTE.	38
TABELA 5: MEDIDA DA INTENSIDADE, DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO SANGUÍNEO ([BLAC]), DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) E DA PERCEPÇÃO SUBJETIVA DE ESFORÇO (PSE) CORRESPONDENTES À MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO (MFEL) PARA AS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (NT) E HIPERTENSAS (HT).	38
TABELA 6: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NOX^- (NITRITO/NITRATO) NO REPOUSO, IMEDIATAMENTE, (PE-0'), 45 MINUTOS (PE-45') E 90 MINUTOS (PE-(90')) APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO PARA O GRUPO DE MULHERES NORMOTENSAS (N = 16) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E).	53
TABELA 7: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc) NO REPOUSO, IMEDIATAMENTE, (PE-0') E 45 MINUTOS (PE-45') APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO PARA O GRUPO DE MULHERES NORMOTENSAS (N = 16) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E).	55
TABELA 8: NÍVEIS DOS MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS NOS PERÍODOS DE REPOUSO (REP) E 45 MINUTOS APÓS O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO (PE) E SUAS VARIAÇÕES (Δ) DURANTE AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS AGUDAS EM VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (N=16).	57
TABELA 9: CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD), DA ATIVIDADE DA CATALASE E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MALODIALDEÍDO (MDA) NOS PERÍODOS DE REPOUSO (REP) E 45 MINUTOS APÓS O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO (PE) E SUAS VARIAÇÕES (Δ) DURANTE AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS AGUDAS EM VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS (N=16).	58
TABELA 10: RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS DO ESTUDO 2	72

TABELA 11: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NO_x^- (NITRITO/NITRATO) NO REPOUSO, IMEDIATAMENTE, (PE-0'), 45 MINUTOS (PE-45') E 90 MINUTOS (PE-(90')) APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO PARA O GRUPO DE MULHERES HIPERTENSAS (N=17) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E).	81
TABELA 12: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc) NO REPOUSO, IMEDIATAMENTE, (PE-0') E 45 MINUTOS (PE-45') APÓS A REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO PARA O GRUPO DE MULHERES HIPERTENSAS (N=17) DURANTE AS SESSÕES AGUDAS CONTROLE (CON), ARGININA (ARG), EXERCÍCIO (EXE) E ARGININA + EXERCÍCIO (A-E).	83
TABELA 13: NÍVEIS DOS MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS NOS PERÍODOS DE REPOUSO (REP) E 45 MINUTOS APÓS O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO (PE) E SUAS VARIAÇÕES (Δ) DURANTE AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS AGUDAS EM VOLUNTÁRIAS E HIPERTENSAS (N=17).	85
TABELA 14: CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD), DA ATIVIDADE DA CATALASE E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MALODIALDEÍDO (MDA) NOS PERÍODOS DE REPOUSO (REP) E 45 MINUTOS APÓS O PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO (PE) E SUAS VARIAÇÕES (Δ) DURANTE AS QUATRO SESSÕES EXPERIMENTAIS AGUDAS EM VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS (N=17).....	86
TABELA 15: RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS DO ESTUDO 3	95

Lista de abreviações:

[bLac]	Lactatemia
A-E	Sessão com exercício e com suplementação
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AKt	Proteína cinase B
ANOVA	Análise de variância
ARG	Sessão sem exercício e com suplementação
AUC	Área abaixo da curva
BH ₄	tetrahidrobiopterina
C-C	Circunferência da cintura
C-Q	Circunferência do quadril
CAT	Catalase
CON	Sessão controle
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ELIZA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Sintetase endotelial do óxido nítrico
ERNs	Espécies reativas ao nitrogênio
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
EXE	Sessão com exercício e sem suplementação
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FC	Frequência cardíaca
FSH	Hormônio folículo estimulante
GMP _c	Guanosina Monofosfato cíclica
GPX	Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Sintetase induzível do óxido nítrico
IP ₃	inosol trifosfato
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LH	Hormônio luteinizante
LL	Limiar de Lactato
MAPA	Medida ambulatorial da pressão arterial
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito
MDA	Malondialdeído
MFEL	Máxima fase estável de lactato
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
NFκB	Fator nuclear Kappa B
nNOS	Sintetase neuronal do óxido nítrico
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NOx ⁻	Nitrito/Nitrato
NTS	Núcleo do trato solitário
O ₂ [•]	Ânio superóxido
ONOO ⁻	Peróxido nitrito
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
PE	Pós exercício
PGI ₂	Prostaciclina
PKG	Proteína cinase G
PSE	Percepção subjetiva de esforço
RCQ	Razão cintura-quadril
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de consentimento de livre consentimento
TLR	Receptor <i>Toll like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM	Molécula de adesão vascular

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é caracterizada pelo aumento da pressão arterial (PA) acima dos níveis normais e é um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares. Está bem estabelecido que o seu tratamento e/ou sua prevenção diminui significativamente o risco de acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca congestiva (Lewington et al., 2002; Chiong, 2008).

Essa patologia apresenta uma natureza complexa, com etiologia multifatorial e poligênica, e está associada à alterações endócrino-metabólicas e fenômenos tróficos (hipertrofias cardíaca e vascular). Essa doença apresenta custos socioeconômico elevados, decorrentes principalmente de lesões em órgãos alvos, tais como: coração, cérebro, vasos sanguíneos, rins e retina (Beevers et al., 2001; Singh et al., 2010).

A hipertensão arterial pode ser classificada em hipertensão essencial ou hipertensão primária e hipertensão secundária. A hipertensão essencial responde por mais de 95% dos casos de hipertensão arterial e não possui uma causa conhecida. Já a secundária é resultante de causas identificáveis, como problemas renais, coartação da aorta, hiperaldosteronismo primário, síndrome de Cushing, feocromocitoma, entre outras (Beevers et al., 2001; Singh et al., 2010).

O produto do débito cardíaco e resistência periférica total determina os níveis da pressão arterial. Por isso, tanto os mecanismos centrais quanto os humorais são reguladores e responsáveis pela gênese da hipertensão arterial (Beevers et al., 2001; Singh et al., 2010). O sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) associado aos barorreceptores, quimiorreceptores e mecanorreceptores fazem parte deste controle central da PA, controlando o débito cardíaco e também o volume e o fluxo de sangue entre o coração e o vasos sanguíneos. Outro sistema importante nesse controle da pressão arterial - e diretamente relacionado com o desenvolvimento da hipertensão arterial - é o sistema renina-angiotensina-aldosterona, que regula, além do fluxo de fluidos corporais, a contração e relaxamento dos vasos, interferindo diretamente na resistência periférica total. Além disso, substâncias vasoativas presentes na circulação ou sintetizadas pelas células endoteliais participam na regulação da pressão arterial através do controle no tono vascular, modulando a resistência vascular periférica e o remodelamento celular (Chiong, 2008; Singh et al., 2010).

Dentre esses fatores causadores da hipertensão arterial, a deficiência na produção dos fatores vasodilatadores dependente do endotélio vem sendo bastante estudada, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (ZanESCO e Antunes, 2007; Förstermann, 2010). Isso se deve porque as células endoteliais desempenham papel altamente relevante na regulação cardiovascular produzindo vários agentes vasoativos locais como o óxido nítrico (NO), a prostaciclina, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e, mais recentemente, o sulfeto de hidrogênio (Beevers et al., 2001, Chiong, 2008, Skovgaard et al., 2011). A disfunção endotelial caracteriza-se por deficiência na produção e/ou biodisponibilidade de NO, gerando menor relaxamento da musculatura lisa dos vasos (Cai e Harrison, 2000). Essa menor biodisponibilidade de NO pode ser resultante da redução na expressão da enzima sintetase do NO endotelial (eNOS), deficiência de substratos ou de co-fatores para a atividade da eNOS, alteração da sinalização celular (GMPc) ou maior degradação de NO por espécies reativas ao oxigênio (Harrison, 1997; Cai e Harrison, 2000).

Várias estratégias de intervenção não medicamentosas, como dieta e exercício físico, são utilizadas para o combate e prevenção da hipertensão arterial. Particularmente, o exercício físico desempenha papel muito importante no controle da pressão arterial. Os efeitos benéficos do exercício físico, principalmente o aeróbio, são caracterizados por reduções dos valores de repouso da PA, tanto cronicamente, decorrente do treinamento com exercícios físicos, quanto agudamente, pois há uma redução da pressão arterial abaixo dos níveis iniciais de repouso, decorrente de uma sessão de exercício físico. A magnitude dessa redução da pressão arterial logo após uma sessão de exercício físico é dependente de vários fatores, como intensidade e duração do exercício, grau de comprometimento causado pela patologia em pacientes com doenças cardiovasculares e dos níveis iniciais de pressão arterial antes da realização do exercício físico (MacDonald, 2002; Forjaz et al., 2000; Casonatto et al., 2011; Halliwill et al., 2013). Segundo MacDonald (2002) fatores que afetam o débito cardíaco e a resistência vascular periférica também estão diretamente relacionados aos mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos agudos do exercício físico sobre a pressão arterial. Em especial, a regulação autonômica e hemodinâmica do débito cardíaco e fatores relaxantes, derivados do endotélio e que controlam a resistência periférica total e atuam no controle da pressão arterial após o exercício físico (MacDonald, 2002; Anunciação e Polito, 2010; Chen e Bonhan 2010).

A redução da pressão arterial logo após o exercício físico pode estar associada à melhora da disfunção endotelial através da maior biodisponibilidade de NO, decorrente da elevação do *shear stress* e ativação de proteínas sensíveis ao fluxo sanguíneo presentes nas células endoteliais (Goto et al., 2007; Zanesco e Antunes, 2007). O NO está diretamente ligado à vasodilatação e, conseqüentemente, à melhora da função endotelial durante o exercício físico (Goto et al., 2007). Desta maneira, estratégias como o aumento da biodisponibilidade de NO através da suplementação de L-arginina (aminoácido precursor da formação do NO), tem sido utilizada para melhorar o fluxo sanguíneo, aumentar a vasodilatação e melhorar a regulação da pressão arterial (Gokce, 2004; Lucotti et al., 2006; Börger, 2007; Puga et al., 2011).

Poucos estudos investigaram os efeitos decorrentes da suplementação aguda de L-arginina visando melhorias na saúde cardiovascular e metabólica (Lekakis et al., 2002; Neri et al., 2010; Álvares et al., 2012). Além disso, a associação desta intervenção com a realização de exercícios físicos ainda carece de novos estudos para verificar seus efeitos conjuntos. Essas estratégias poderiam beneficiar a regulação da pressão arterial principalmente para populações que possuam algum comprometimento no endotélio vascular, como hipertensos e mulheres após a menopausa. Após a menopausa, as mulheres apresentam maior prevalência de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial - decorrente do aumento da massa gorda corporal, sedentarismo e deficiência hormonal de estrógeno - em relação às outras fases anteriores. Assim, neste estudo, iremos abordar os efeitos agudos da suplementação de L-arginina aliada à realização de exercício físico aeróbico em mulheres após a menopausa, visando suas respostas cardiometabólica e inflamatórias e os possíveis efeitos benéficos desta intervenção nessas mulheres.

1.1 Respostas agudas da pressão arterial após o exercício físico

O exercício físico é uma estratégia importante na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, em especial na regulação da pressão arterial e na prevenção de doenças cardiometabólicas. Os efeitos benéficos da prática de exercícios físicos estão relacionados tanto à prática regular (efeitos crônicos) quanto aos seus efeitos agudos (Forjaz et al., 2000; MacDonald, 2002; Anunciação e Polito, 2010). Tanto os exercícios aeróbicos quanto os resistidos proporcionam efeitos benéficos no controle da pressão arterial e são sugeridos como agentes de prevenção para doenças cardiovasculares.

Porém, os exercícios aeróbios parecem ter melhores efeitos que os exercícios resistidos, até mesmo pela escassez de trabalhos sobre os efeitos do exercícios resistidos em comparação com os exercícios aeróbios nas respostas cardiovasculares (Anunciação e Polito, 2010). Neste estudo iremos abordar apenas as respostas dos exercícios aeróbios na saúde cardiovascular e endócrino-metabólica.

Desde o final do século 19 e início do século 20, autores já demonstraram que a pressão arterial é reduzida após algum trabalho muscular para abaixo dos valores anteriores de repouso (Hill, 1898; Bowen, 1904). No entanto, foi apenas a partir do final do século 20 que especialistas focaram na relevância clínica desse fenômeno. Vários estudos foram realizados para uma melhor compreensão dos fatores que interferem nessa redução da pressão arterial após a realização de exercícios físicos e nos mecanismos envolvidos em tal fenômeno (Fitzgerald, 1981; MacDonald, 2002; Anunciação e Polito, 2010; Halliwill et al., 2013)

Esses mecanismos de redução/regulação da pressão arterial após a realização do exercício físico são melhores evidenciados em indivíduos hipertensos. Porém, eles também ocorrem em indivíduos normotensos e saudáveis, de ambos os gêneros, contribuindo para a prevenção de eventos cardiovasculares futuros, como infarto do miocárdio e doença arterial encefálica (MacDonald, 2002; Anunciação e Polito, 2010; Chen e Bonhan 2010).

Alguns autores mostraram que exercícios físicos aeróbios realizados em diferentes intensidades não determinam a magnitude da alteração da pressão arterial após o exercício físico (Pescatello et al., 1991; MacDonald et al., 2002; Jones et al., 2007; Cassonato et al., 2011). Porém, esses resultados ainda são contraditórios pois alguns autores mostraram que os efeitos anti-hipertensivos podem sim estar ligados à dose resposta do exercício (Pescatello et al., 2004; Anunciação e Polito, 2010; Eicher et al., 2010). Em contrapartida, o volume desse exercício parece ter maior influência na magnitude e duração da redução de pressão arterial após sua realização. (Bennett et al., 1984; MacDonald et al., 2001). Entretanto, o trabalho total desempenhado (relação entre intensidade e tempo de execução do exercício) deve ser levado em consideração para estimar a magnitude das resposta da pressão arterial após o exercício físico (Jones et al., 2007; Anunciação e Polito, 2010).

A redução da pressão arterial após o exercício aeróbio inicia-se imediatamente no primeiro minuto e pode estender-se por algumas horas após a sua execução, como demonstrado em vários estudos (Bronw et al., 1994; MacDonald et al., 1999; MacDonald, 2002; Anunciação e Polito, 2010). Devido a dificuldade de mensuração e controle das

atividades de vida diária dos indivíduos avaliados, a maioria dos estudos monitoram a pressão arterial nas primeiras horas após a realização do exercício. No entanto, evidências demonstraram que a redução da pressão arterial pode prolongar-se por até 24 horas após sua execução. (Forjaz et al., 2000; MacDonald, 2001; Ciolac et al., 2009).

Os mecanismos exatos causadores da redução ou regulação da pressão arterial logo após o exercício físico nos seres humanos ainda não estão claros tanto por questões metodológicas, quanto pela complexidade dos mecanismos de controle da pressão arterial. Evidências mostram que mecanismos regulatórios centrais e humorais parecem contribuir para a gênese da hipertensão arterial. As alterações no volume sanguíneo, na atividade do sistema nervoso simpático, nos níveis plasmáticos de prostaglandinas, na adrenalina e noradrenalina, na atividade do sistema renina angiotensina, na termoregulação, na vasopressina, na liberação de histamina e nos outros fatores relaxantes derivados do endotélio, têm sido associados aos mecanismos pelos quais o exercício físico pode controlar a pressão arterial (MacDonald et al., 2002; Chen e Bonhan 2010; Halliwill et al., 2013).

Os principais mecanismos centrais envolvidos na redução da pressão após o exercício físico envolvem ajustes do barorreflexo e inibição da atividade simpática no sistema nervoso central (Chen e Bonhan 2010; Halliwill et al., 2013). Os barorreceptores arteriais são estruturas sensíveis à mudanças na pressão arterial e ficam localizados no arco aórtico e seio carotídeo. Quando há algum estímulo de aumento ou queda de pressão arterial, os barorreceptores identificam esta alteração através de deformações mecânicas dos vasos sanguíneos e enviam esta informação para o Bulbo no sistema nervoso central, onde está localizado o núcleo do trato solitário (NTS), que processa informações como a pressão nos vasos, a frequência cardíaca, a atividade cardíaca, a composição química do sangue, entre outras. Uma vez recebidas e processadas as informações aferentes, estímulos eferentes excitatórios ou inibitórios são enviados pelo NTS para alteração na contratilidade cardíaca, resistência dos vasos, frequência cardíaca e controle do fluxo sanguíneo (Campos Junior et al., 2001; Brum et al., 2004).

Durante o exercício físico ocorre um estímulo excitatório eferente, da musculatura esquelética ativa para NTS, para o aumento volume sistólico, do débito cardíaco, e também para alteração na resistência periférica. Somados, esses fatores resultam na elevação de pressão arterial. Assim, há uma diminuição da sensibilidade barorreflexa e predominância do reflexo metabotrópico, que determinará o controle da pressão arterial durante o exercício físico (Campos Junior et al., 2001; Brum et al., 2004). Após o exercício físico há um efeito contrário, ou seja, diminuição da atividade simpática para o região

rostral ventrolateral do bulbo e a conexão com o NTS, retornando o papel dos barorreceptores. Isto ocorre pois após o exercício físico, interneurônios gabaérgicos apresentam uma resposta reduzida, exercendo menor atividade inibitória no NTS, reduzindo o ajuste barorreflexo e reduzindo a pressão arterial (Chen et al., 2002; Chen e Bonhan 2010).

Além do controle barorreflexo da pressão arterial após o exercício físico, outros mecanismo centrais também podem estar envolvidos na regulação da pressão arterial neste momento. Alguns autores propõem que o sistema serotoninérgico pode também contribuir para a redução da pressão arterial após o exercício físico, pois tanto a inibição dos receptores de vasopressina no sistema nervoso central, quanto a diminuição de serotonina cerebral, atenua a diminuição da pressão arterial após o exercício físico (Yao et al., 1982; Halliwill, 2013).

Alguns autores sugerem que alterações do controle simpático sobre os receptores alfa adrenérgico dos vasos sanguíneos também contribuem para esse fenômeno. Em modelos experimentais, utilizando animais como coelhos e ratos, esses estudos demonstraram que a responsividade vascular dos receptores alfa adrenérgicos está reduzida após o exercício físico, contribuindo para a redução da pressão arterial (Howard e DiCarlo, 1992; Patil et al., 1993; MacDonald, 2002). Em contrapartida, resultados de estudos em humanos mostraram que a atividade alfa adrenérgica permanece intacta após a realização de exercícios aeróbios, mesmo com aumento da condutância vascular, sugerindo outros fatores como responsáveis pela redução da PA após o exercício físico aeróbio (MacDonald, 2002, Halliwill et al., 2003, Halliwill, 2013).

Além destes mecanismos, fatores humorais exercem papéis importantes na alteração da pressão arterial após a realização do exercício aeróbio. Imediatamente após o trabalho da musculatura esquelética, o fluxo sanguíneo para esses tecidos permanece elevado, causando uma hiperemia local que pode durar por vários minutos (Bangsbo J, Hellsten, 1998; Halliwill, 2013). Essa hiperemia é dependente de fatores como a intensidade e a duração do exercício aeróbio e sua causa ainda não está bem clara na literatura. Alguns estudos sugerem que esta hiperemia está ligada à elevada demanda do transporte e consumo de oxigênio pela musculatura esquelética durante o exercício, que permanece aumentada mesmo após a interrupção deste. Mesmo assim, essa hiperemia excede a necessidade de fluxo sanguíneo de entrega de oxigênio para a musculatura esquelética após o exercício, mostrando que outros mecanismos estão atuando em conjunto para aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da resistência dos vasos após o

exercício, como a liberação de histamina e prostaglandinas (Bangsbo J, Hellsten, 1998; Halliwill, 2013).

Os principais mecanismos humorais que interferem no controle da pressão arterial após o exercício físico estão ligados à liberação de substâncias vasodilatadoras locais, principalmente derivados do endotélio, que podem diminuir a resistência periférica por várias horas após o exercício aeróbio (MacDonald, 2002; Halliwill, 2001, Halliwill, 2013). Algumas dessas substâncias, que diminuem a resistência periférica, são as proteínas derivadas da via das prostaglandinas pois durante o exercício aeróbio elas estimulam a hiperemia e a vasodilatação dos vasos na musculatura esquelética ativa (Wilson e Kapoor, 1993). Esse estímulo durante o exercício poderia prolongar-se para o período após o exercício e contribuir para a redução da PA (MacDonald 2002). Entretanto, Lokwood *et al.* (2005) mostraram que a inibição das enzimas cicloxigenases não alteraram a redução da pressão arterial de homens saudáveis após a realização de exercícios aeróbios, sugerindo que outros mecanismo estão envolvidos nesse fenômeno em humanos. Essas enzimas são responsáveis por catalisarem o ácido araquidônico e formar as prostaglandinas, incluindo a prostaciclina que é uma potente vasodilatadora.

Evidências recentes sugerem que a ativação dos receptores de histamina H₁ e H₂ são responsáveis pela vasodilatação duradoura após a realização do exercício físico aeróbio (Barrett-O'Keefe et al., 2013; Halliwill 2013). A histamina é um potente vasodilatador porém, os mecanismos causadores da estimulação dos receptores de histamina após a realização do exercício físico ainda permanecem indefinidos (Barrett-O'Keefe et al., 2013; Halliwill 2013). Durante o exercício físico aeróbio, o trabalho da musculatura esquelética produz calor, tensão muscular e vibrações, mecanismos estes que podem estimular a liberação de histamina pelos monócitos, mastócito e macrófagos. Uma vez liberada, a histamina irá se ligar aos receptores H₁ e H₂ promovendo vasodilatação e aumento do fluxo local (Barrett-O'Keefe et al., 2013).

O principal vasodilatador liberado pelo endotélio vascular é o NO e sua formação está ligada ao estímulo por substâncias agonistas como a acetilcolina, bradicinina, insulina, adenosina, dentre outras, e também pela força mecânica exercida pelo fluxo sanguíneo na parede dos vasos - chamada de *shear stress* ou força de cisalhamento (ZanESCO e Antunes, 2007, Francis et al., 2010). Esses mecanismos de formação, liberação e ação vasodilatadora do NO são descritos logo abaixo.

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular. Essa força de cisalhamento sob as células

endoteliais são estímulos poderosos para a geração de NO nos diferentes sistemas do organismo (Jungerten et al., 1997; Zanesco e Antunes, 2007, Francis et al., 2010).

Durante o exercício físico, a liberação de NO exerce um papel muito importante na vasodilatação e controle do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética (Goto et al., 2007; Zanesco e Antunes, 2007). Goto *et al.* (2007) demonstraram melhora na função endotelial e resposta vasodilatadora derivada do NO durante a realização de exercício moderado em jovens normotensos. Neste estudo, a administração de um inibidor da NO sintetase (N^G -monometil-L-arginina – L-NMMA) inibiu o aumento da vasodilatação quando comparado com indivíduos que não tiveram a infusão deste inibidor, demonstrando que o NO está diretamente ligado à vasodilatação e, conseqüentemente, à melhora da função endotelial durante o exercício físico. Apesar desse efeito vasodilatador derivado do NO, através do estímulo aumentado do *shear stress* durante o exercício, estar bem descrito na literatura, o papel do NO após a realização do exercício físico e sua contribuição para a diminuição da resistência periférica e queda de pressão ainda não está bem claro entre os autores.

Estudos que utilizaram ratos espontaneamente hipertensos mostraram que após a realização de exercícios físicos há aumento da fosforilação eNOS, com maior produção e ação do NO após o exercício, exercendo assim um papel importante na redução da PA (Lizardo et al., 2008, Lee et al., 2009). Além disso, Rao *et al.* (2002) demonstraram que após a realização de exercício aeróbios há diminuição da resposta contrátil mediada pelos receptores alfa adrenérgicos, mediada pelo NO, contribuindo para a redução da PA após a realização do exercício físico - contudo apenas em ratos, não sendo o efeito observado em ratas. Em contrapartida, os resultados em humanos não corroboram esses dados em modelos animais. Mesmo sendo demonstrado que o NO aumenta sua concentração após a realização do exercício físico aeróbio (Jungersten et al., 1997), Halliwill *et al.* (2000) mostraram que a PA, após a realização de exercício aeróbio, reduz mesmo quando infundido L-NMMA, um inibidor da eNOS, em jovens saudáveis, sugerindo que a queda da PA após o exercício não é dependente do aumento da produção de NO pelo endotélio.

Assim, apesar da ação vasodilatadora do NO mediado pelo exercício estar bem descrito na literatura, a contribuição do NO na redução da pressão arterial após uma sessão aguda de exercício aeróbio não está bem clara. Alguns estudos sugerem que o aumento da biodisponibilidade de NO através da suplementação de seu precursor, a L-arginina, poderia contribuir no aumento do fluxo sanguíneo e na diminuição da resistência periférica (Gokce, 2004; Lucotti et al., 2006; Börger, 2007; Puga et al., 2011), auxiliando

assim no controle da pressão arterial e trazendo efeitos positivos na redução da PA após o exercício físico aeróbio.

1.2 L-arginina e NO

O NO exerce importante papel na regulação funcional de diversos órgãos no organismo, dependendo do tipo de célula ou tecido, atuando como neurotransmissor em fibras não adrenérgicas e não colinérgicas, no aprendizado e na memória, na plasticidade sináptica e na neuroproteção (Palmer, Ferrigi e Moncada, 1987; Böhrer, 2007). No sistema cardiovascular, o NO produzido pela ação da enzima NOS, é responsável pela regulação e homeostase do tono vascular, inibição da agregação plaquetária e controle da estrutura vascular. Sendo assim, uma deficiência em sua produção e/ou sua menor biodisponibilidade está diretamente ligada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como aterosclerose, hipertensão arterial e diabetes mellitus (ZanESCO e Antunes, 2005; ZanESCO e Antunes, 2007). A síntese do NO é dependente de diversos cofatores e, principalmente, da disponibilidade do aminoácido L-arginina, que é seu substrato (Chin-Dusting et al., 2007). A L-arginina é um aminoácido semi-essencial que desempenha várias funções metabólicas no organismo de mamíferos, participando dos processos de transporte e excreção do nitrogênio, síntese de uréia, síntese de proteínas, e como substrato da síntese de creatina e NO (McConell e Kingwell, 2006).

As fontes de arginina livre são da dieta protéica, turn-over de proteínas corporais e síntese endógena, sendo que 40% da arginina consumida é metabolizada no intestino antes de atingir a circulação e aproximadamente 85% da arginina circulante é proveniente do turn-over protéico (Coman et al., 2008). Em uma dieta normal do mundo ocidental, aproximadamente 5g de L-arginina são consumidas diariamente pela população (Visek, 1986). Apesar de participar de vários processos fisiológicos, a L-arginina tem maior influência no sistema cardiovascular, através da produção do NO.

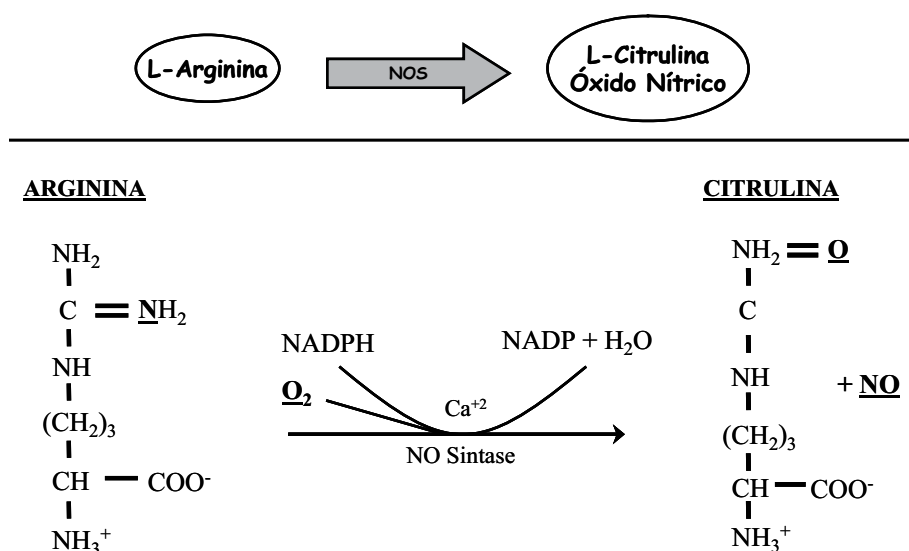
A L-arginina atua como substrato da produção de NO, através de uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintase (NOS). Existem três tipos diferentes de isoformas da NOS, que são nomeadas de acordo com o tipo celular e onde a enzima foi primeiramente isolada: óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS ou NOS I), óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS ou NOS III) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS ou NOS II), (Murad et al, 1994; Föstermann, 2010). A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente, produzindo NO em baixas dosagens, enquanto que a iNOS é induzida

por citocinas liberadas das células inflamatórias em estados patológicos (Börger, 2007; Föstermann, 2010).

As três isoformas da NOS possuem mecanismos enzimáticos similares que envolvem a transferência de elétrons para oxidação do nitrogênio guanidina, terminal da L-arginina. Todas essas enzimas requerem vários co-fatores para exercerem suas funções, incluindo a tetrahidrobiopterina (BH_4), a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (Palmer, Ferrigi e Moncada, 1987; Föstermann, 2010). Quando a eNOS é inibida em modelos experimentais, usando antagonistas da L-arginina, há uma redução drástica na formação de NO, levando ao quadro hipertensivo, aumento da adesão e agregação plaquetária e maior oxidação de moléculas de LDL-colesterol, mostrando que o NO possui papel fundamental tanto no sistema cardiovascular como endócrino-metabólico (Palmer, Ferrigi e Moncada, 1987; Börger, 2007; Föstermann, 2010).

Estímulos químicos e físicos ativam as eNOS para que ocorra a síntese e liberação de NO pelas células endoteliais. O *shear stress*, caracterizado pela força exercida pelo sangue na parede dos vasos, é o estímulo físico mais poderoso para ativar a produção de NO (Palmer, Ferrigi e Moncada, 1987; Francis et al., 2010). Os estímulos químicos são substâncias agonistas endógenas ou exógenas, que interagem com receptores específicos presentes nas células do endotélio e levam a formação de inosol trifosfato (IP3), liberando Ca^{2+} do retículo endoplasmático e formando o complexo cálcio-calmodulina, que irá ativar a NOS para gerar NO pelo endotélio (Murad et al., 1994; Zanesco e Antunes, 2007; Francis et al., 2010).

Uma vez formado, o NO liga-se à enzima guanilil ciclase, presente na camada média do vaso, que irá gerar a formação do segundo mensageiro GMPc, que ativará proteínas quinases. Dentre as proteínas ativadas está a proteína quinase G, que através de diferentes vias reduzirá a concentração de íons cálcio da musculatura lisa vascular. Entre as vias, a proteína cinase G (PKG) promove inibição da atividade da proteína fosfolambam sobre o retículo sarcoplasmático, aumentando assim o sequestro de íons cálcio; a PKG bloqueia também canais de cálcio tipo L da membrana celular da musculatura lisa vascular. Essa redução de íons cálcio intracelular promoverá relaxamento da musculatura lisa vascular e consequentemente resposta vasodilatadora (Murad et al., 1994; Zanesco e Antunes, 2007; Francis et al., 2010). Veja os esquemas 1 para maiores detalhes.



Esquema 1: Formação do óxido nítrico, a partir do metabolismo da arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase. Adaptado de Zanesco e Antunes (2007).

Além desse papel vasodilatador, a L-arginina pode agir como redutora de radicais livres, pelo aumento da biodisponibilidade de NO, exercendo papel importante em indivíduos hipertensos e com doenças cardiovasculares, onde têm-se observado maiores níveis de espécies reativas de oxigênio através de avaliação do status redox nesses pacientes (Hambrecht et al., 2000; Kawano et al., 2003). Evidências mostram também que a L-arginina participa na secreção dos hormônios de crescimento e insulina, eleva o metabolismo energético e diminui a concentração plasmática dos triglicerídeos (Steiner et al., 1984; Kawano et al., 2003).

1.3 Suplementação de L-arginina e doenças cardiometabólicas

Baseado na relação entre a L-arginina e a produção de NO, diversos estudos verificaram os efeitos da suplementação ou infusão exógena de L-arginina no sistema cardiovascular em indivíduos portadores de doenças crônico-degenerativas e saudáveis, visando principalmente melhora na função endotelial desses indivíduos (Gokce, 2004; Lucotti et al., 2006; Börger, 2007; Puga et al., 2011). Os resultados dos estudos existentes na literatura ainda não são unânimes nem conclusivos sobre os efeitos benéficos do uso da L-arginina para todas as populações. Os efeitos benéficos são mais encontrados em indivíduos com algum comprometimento no sistema cardiovascular e/ou algumas doenças endócrino-metabólicas crônicas, como a disfunção endotelial. Além disso, a diversidade

das populações estudadas, assim como a diferença entre as intervenções tanto nas dosagens e tempo de intervenção, quanto na qualidade do controle dos testes clínicos, comprometem conclusões mais precisas.

1.4 Papel do exercício físico e do óxido nítrico nas respostas antioxidantes e anti-inflamatórias

Algumas moléculas produzidas por fatores endógenos ou exógenos ao nosso organismo possuem elétrons despareado em sua última camada, sendo eletricamente instáveis e consideradas substâncias lesivas à outras estruturas, como células e tecidos saudáveis em nosso organismo. Essas substâncias são chamadas de espécies reativas ao oxigênio (EROs) ou ao nitrogênio (ERNs) (Ferreira e Matsubara, 1997; Finkel e Holbrook, 2000).

As EROs são formadas em nosso organismo através de vários processos fisiológicos e/ou patológicos. Nossas células de defesa, como macrófagos, monócitos, linfócitos T, neutrófilos e células NK, por exemplo, utilizam-se da produção de algumas EROs para destruir agentes invasores como vírus, bactérias e células com mutações genéticas ou lesadas (Lakshmi et al., 2009; Gomes, Silva e Oliveira, 2012). Em situações patológicas, agentes patogênicos ou até mesmo células e tecidos do nosso organismo começam a produzir EROs em excesso. Estas, em grande quantidade, podem causar lesões celulares e teciduais levando à morte ou disfunção dessas estruturas fisiológicas (Ferreira e Matsubara, 1997; Finkel e Holbrook, 2000). As principais fontes produtoras de EROs em nosso organismo são a xantina oxidase, ciclo-oxigenases, lipo-oxigenase, a respiração mitocondrial, o citocromo P450, a NADPH oxidase e a eNOS desacoplada - e a maioria dessas fontes estão aceleradas em pacientes com doenças cardiovasculares (Cai e Harrison, 2000; Lakshmi et al., 2009; Gomes, Silva e Oliveira, 2012).

Para combater essas lesões ou danos causados pelas EROs, nosso organismo possui sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, que combate esses agentes lesivos ao nosso organismo e também auxiliam na reparação celular ou tecidual. A defesa antioxidante não enzimática é proveniente principalmente da dieta e a defesa enzimática é realizada através de enzimas antioxidantes no nosso organismo, como a superóxido dismutases (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidases (GPx). O desequilíbrio entre a produção de EROs e atividade do sistema antioxidante, pendendo para a maior produção dessas moléculas, é chamado de estresse oxidativo, onde há

produção de EROs acima da capacidade do sistema antioxidante deter a produção e ação deletéria dessas moléculas, causando lesões nas células. A longo prazo esse estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de várias doenças crônicas, principalmente cardiovasculares (Cai e Harrison, 2000; Lakshmi et al., 2009; Gomes, Silva e Oliveira, 2012).

Como já demonstrado anteriormente, pacientes com doenças cardiovasculares e endócrino metabólicas possuem falha na produção de fatores relaxantes derivados do endotélio, principalmente do NO, apresentando disfunção endotelial e falha na função cardioprotetora dessas substâncias (Cai e Harrison, 2000; Föstermann, 2010). A redução da biodisponibilidade do NO pelo endotélio ocorre principalmente devido à interação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) com o NO, produzindo o peróxido nitrito ($ONOO^-$), que é uma ERO altamente lesiva em nosso organismo. A produção desta ERO reduz a atividade da eNOS em produzir o NO e aumentam mais ainda a produção de $O_2^{\cdot-}$ através da eNOS desacoplada, que nada mais é do que a desconformação da eNOS, que passa a produzir mais $O_2^{\cdot-}$ ao invés do NO (Cai e Harrison, 2000; Föstermann, 2010). Assim, a queda da biodisponibilidade do NO causada pelo aumento da produção de EROs e diminuição da atividade antioxidante é considerada a principal causa da disfunção no endotélio vascular e essa disfunção está associada ao desenvolvimento da hipertensão arterial, aterosclerose, doença arterial coronariana e vários outros eventos cardiovasculares (Cai e Harrison, 2000; Lakshmi et al., 2009; Föstermann, 2010; Gomes, Silva e Oliveira, 2012). Além disso, a diminuição da biodisponibilidade de NO em pacientes com disfunção endotelial pode estar relacionada à vários fatores, como aumento do ADMA (inibidor endógeno da eNOS), diminuição da expressão da eNOS, falta de cofatores para formação de NO pela eNOS e também pela diminuição da L-arginina, que é o substrato para a formação de NO (Cai e Harrison, 2000).

Alguns estudos em modelos animais mostraram que a suplementação e/ou infusão de L-arginina pode melhorar a função endotelial por diminuir os marcadores do estresse oxidativo e aumentar a biodisponibilidade do NO nos vasos (El-Missiry, Othman e Amer, 2004; Tsai et al., 2004). Porém, os resultados em humanos ainda são controversos. Um estudo realizado em homens adultos hipercolesterolêmicos mostrou que a infusão de L-arginina melhorou a função endotelial e os marcadores de estresse oxidativo (Kawano et al., 2002). Já Fayh *et al.* (2012) não encontraram diferença nos marcadores do estresse oxidativo após a suplementação de L-arginina em jovens diabéticos, mesmo com a melhora da função endotelial derivada do NO. A literatura carece de mais estudos em humanos que investiguem os efeitos da suplementação de L-arginina - que poderia

causar aumento da biodisponibilidade de NO nas respostas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo, principalmente em pacientes com disfunção endotelial.

O exercício físico exerce também papel importante no sistema antioxidante, auxiliando no combate ao estresse oxidativo (Fukai et al., 2000, Lucotti et al., 2006). Agudamente, o exercício físico aumenta o estresse oxidativo porque o aumento do consumo de oxigênio, o trabalho muscular, a liberação de hormônios como catecolaminas, o aumento da isquemia reperusão, a aceleração do metabolismo e da ação enzimática são alguns dos fatores que aceleram a produção de EROs e consequente estresse oxidativo pelo exercício físico (Gomes, Silva e Oliveira, 2012). Porém, apesar do exercício estimular o estresse oxidativo, ele também ativa mecanismos sinalizadores para o aumento de enzimas antioxidantes e melhora no sistema anti-inflamatório, além do aumento do *shear stress* e produção de NO pelo endotélio de forma aguda (Fukai et al., 2000; Finkel e Holbrook, 2000; Gomes, Silva e Oliveira, 2012). Segundo Finkel e Holbrook (2000), a estratégia mais eficiente para aumentar a quantidade endógena de substâncias antioxidantes pode ser a maior indução do próprio estresse oxidativo, que estimularia os mecanismos antioxidantes celulares aumentando a resistência às lesões induzidas pelo exercício físico ou por EROs, produzidas por outros mecanismos tanto fisiológicos como patológicos (Föstermann, 2010; Gomes, Silva e Oliveira, 2012).

Alguns trabalhos mostraram que a associação do exercício físico e a suplementação de L-arginina parece também ser eficaz e importante na regulação e diminuição de marcadores oxidantes e inflamatórios, bem como exercer ações antiaterogênicas e de proteção cardiovascular (Luccoti et al., 2006; Lucotti et al., 2009). Essa relação entre a produção de espécies reativas, que promovem efeitos deletérios, e a possível proteção antioxidante que o exercício e a suplementação de L-arginina podem proporcionar, ainda carece de estudos mais bem controlados. Nenhum estudo avaliou as respostas dessas intervenções conjuntas nas respostas agudas em populações com a função endotelial comprometida. Nós acreditamos que o aumento da produção de NO pelo exercício, aliado ao aumento do substrato para a formação do NO, a L-arginina, poderia também trazer melhoras no sistema antioxidante e reduzir a produção e/ou ação das EROs produzidas pelo exercício e também pelo estado inflamatório e patológico de pacientes com disfunção endotelial.

Além desse papel no sistema antioxidante do exercício físico, ele também pode atuar positivamente no sistema anti-inflamatório. O exercício físico promove respostas pró e anti-inflamatórias de forma diferente às classicamente observadas em estados

infecciosos e processos inflamatórios agudos e/ou crônicos (Steensberg et al., 2007; Pedersen e Febbraio, 2008). O estado inflamatório está associado ao aumento de marcadores como interleucinas (ILs) pró inflamatórias, fatores de necrose tumorais (TNFs), quimiocinas, proteína C reativa (PCR), proteínas de adesão, entre outros. Pacientes com doenças crônicas como a hipertensão, diabetes e obesidade, além de pessoas idosas e sedentárias, apresentam níveis elevados de marcadores pró inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL1- β), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e PCR e níveis reduzidos de marcadores anti-inflamatórios como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA) e o fator de transformação de crescimento (TGF- β) (Sprague e Khalil, 2009).

O papel do exercício como agente anti-inflamatório está associado à diminuição da liberação de agentes pró inflamatórios pelos adipócitos, reduzindo a gordura visceral e total, ao aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias pela musculatura esquelética (também chamadas de miocinas anti-inflamatórias) e à redução de receptores *Toll like* (TLRs) e sinalizadores, como o fator nuclear κ B (NF κ B), que ativam vias pró inflamatórias e de produção de EROs. Além do já mencionado aumento da produção de NO, que reduz a produção e ação das EROs e de marcadores pró inflamatórios (Pedersen e Febbraio, 2008; Sprague e Khalil, 2009; Gleeson et al., 2011).

A miocina mais discutida e relacionada às respostas anti-inflamatórias do exercício físico é a IL-6. Classicamente, os modelos de estudo do sistema imunológico mostram que a IL-6 é uma citocina pró inflamatória, participando da sinalização de processos de infecção e inflamação no nosso organismo. Além disso, a concentração plasmática de IL-6 parece estar aumentada em pacientes com doenças cardiovasculares (Pauletto e Rattazzi, 2006). Assim, o aumento desta interleucina durante o exercício era atribuído à lesão muscular e danos causados pelo exercício (Pedersen e Febbraio, 2008; Sprague e Khalil, 2009; Gleeson et al., 2011).

A literatura já mostra que a primeira e mais marcante citocina encontrada em níveis elevados no sangue durante o exercício é a IL-6. Porém, outras citocinas pró inflamatórias como o TNF- α e o IL1- β não aumentam seus níveis sanguíneo em resposta ao exercício físico, mostrando que o estímulo de liberação das citocinas durante o exercício é diferente do estímulo induzido por infecções (Pedersen e Febbraio, 2008). Alguns autores mostraram que a IL-6 liberada durante o exercício estimula o aumento da concentração de citocinas anti-inflamatorias como IL10 e IL-1RA e, além disso, inibe a liberação de TNF- α e IL1- β , mostrando um papel importante anti-inflamatório da IL-6 derivada da

musculatura esquelética durante o exercício físico (Pedersen e Febbraio, 2008; Pedersen, 2011). Além da contração da musculatura esquelética aumentar a liberação de IL-6, e essa miocina estimular a liberação e expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL10 e IL-1RA em resposta ao exercício, a IL-6 estimula também a liberação de cortisol, um potente hormônio anti-inflamatório, e de adrenalina, um hormônio que promove um *down regulation* na produção de TNF- α e IL-1 β pelas células do sistema imunológico (Gleeson et al., 2011). Assim, a IL-6 quando liberada pela musculatura esquelética durante o exercício, exerce um papel anti-inflamatório importante, diferentemente de seu papel no estado patológico e de infecções (Pedersen e Febbraio, 2008; Pedersen, 2011).

Um estudo interessante realizado por Steensberg *et al.* (2007) mostrou que a produção de NO induzida pelo exercício físico modula a expressão de RNAm da IL-6, aumentando a atividade e liberação desta citocina e mostrando que o NO está envolvido na liberação de IL-6 pela musculatura esquelética induzida pelo exercício físico e na melhora da atividade anti-inflamatória desta atividade. Assim, acreditamos que o aumento da biodisponibilidade do NO com a suplementação de L-arginina associada à liberação de NO e citocinas anti-inflamatórias pelo exercício físico poderia produzir respostas protetoras no sistema antioxidante e anti-inflamatório, o que poderia promover maior proteção ao sistema cardiovascular, principalmente para populações que apresentam comprometimento neste sistema como hipertensos e mulheres no período após a menopausa.

1.5 Menopausa e doenças cardiovasculares

O climatério compreende o período de transição fisiológica da fase reprodutiva para não reprodutiva na mulher. Dentro do período do climatério ocorre a falência total da função ovariana em produzir hormônios esteróides e ovulação, acarretando em amenorréia permanente, denominada menopausa. Após esse evento o período é chamado de pós-menopausa. Essa deficiência de produção de hormônios causa alterações no organismo como elevação do peso corporal, mudança nos depósitos de gordura, alterações do perfil lipídico e aparecimento de doenças metabólicas, bem como aumento na incidência de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (Hurd, 1998; Freitas, 2001; Reckelhoff, 2001).

A prevalência da hipertensão arterial eleva-se significativamente com a idade, chegando a 80% na população acima de 80 anos. Quando se compara esta prevalência

entre os gêneros pode-se observar que as mulheres, até a menopausa, apresentam menores índices de hipertensão arterial e doenças relacionadas ao coração do que o sexo masculino e após esse período as mulheres passam a ter uma prevalência igual à dos homens. Acredita-se que isso ocorra devido à falta de estrógeno, à alteração do perfil lipídico, ao ganho de peso e ao sedentarismo em mulheres pós-menopausadas com relação às mulheres pré-menopausadas (Reckelhoff, 2001; Coylewright et al., 2008). O estrogênio apresenta importante função no controle cardiovascular através da modulação da função endotelial (Wassertheil-Smoller et al., 2000) ao elevar a produção de NO através de receptores específicos no endotélio vascular (Cardoso Jr et al., 2007; Zanesco e Zaros, 2009) e de prostaciclina (PGI₂), que são importantes substâncias vasodilatadoras dependentes de endotélio. Além disso, parece que os estrógenos podem modular a síntese de endotelina, que é um potente vasoconstritor (Freitas et al., 2001). Por outro lado, a reposição hormonal em mulheres após a menopausa mostrou-se de baixa eficácia na redução dos valores de pressão arterial, como também na prevenção de eventos cardiovasculares. Sendo assim, métodos alternativos de prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares, principalmente da hipertensão arterial, é de fundamental importância para essa população.

Assim, os estudos clínicos não são conclusivos sobre o papel dos estrógenos sobre o sistema cardiovascular em mulheres após a menopausa e nos parece que outros fatores podem contribuir na regulação do sistema cardiovascular que difere entre os gêneros. De fato, trabalho recente mostra que mulheres após a menopausa (n=97.577) apresentam maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovascular quando comparadas aos homens de mesma idade (n=79.944). No entanto, as mulheres apresentam menor probabilidade de desenvolver as complicações das doenças cardiovasculares, como por exemplo, a doença arterial coronariana, sugerindo que outros fatores protejam as mulheres após a menopausa em relação aos homens (Daugherty et al., 2013). Portanto, seria interessante e de grande relevância verificar os efeitos agudos da suplementação de L-arginina realizada conjuntamente com o exercício físico aeróbio nas respostas pró e anti-inflamatórias e hemodinâmicas em mulheres hipertensas e normotensas após a menopausa e os possíveis mecanismos envolvidos nessas respostas.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO

Este trabalho tem por hipótese que a administração aguda do aminoácido L-arginina, molécula precursora para a síntese de óxido nítrico (NO), associada à uma sessão aguda de exercício físico aeróbio, promove melhor resposta hemodinâmica em mulheres normotensas e hipertensas após a menopausa, quando comparada ao exercício físico aeróbio ou administração de L-arginina isolados. Além disso, esse estudo procurou buscar a compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial em mulheres após a menopausa avaliando os mediadores cardio-inflamatórios e as respostas hemodinâmicas antes e após a intervenção.

Esse estudo possui grande relevância na área de saúde e de Fisiologia Cardiovascular, uma vez que evidências mostram que as mulheres vivem cerca de oito anos mais que os homens. Além disso, a incidência de hipertensão arterial aumenta em mulheres após a menopausa quando comparadas às mulheres na pré-menopausa. Portanto, medidas preventivas e/ou de controle das doenças cardiovasculares são de grande relevância na área de saúde pública, tanto no que se refere à melhora na qualidade de vida quanto nos gastos com medicamentos e sistema de atendimento à saúde dessa população. Estudos com administração de suplementos dietéticos relacionados ao vasodilatador óxido nítrico têm merecido grande atenção na área de Fisiologia cardiovascular em diferentes estados patológicos. Adicionalmente, os efeitos benéficos do exercício físico sobre o sistema cardiovascular tem sido exaustivamente documentados. No entanto, nenhum trabalho avaliou a interação entre a administração de L-arginina associado ao exercício físico em mulheres no climatério em formato *crossover*.

3. OBJETIVOS:

O presente trabalho será dividido em três estudos que será apresentado de forma separada de acordo com os objetivos listados abaixo:

3.1 Objetivo estudo 1: Comparação dos níveis basais dos marcadores cardiolinfamatórios entre normotensas e hipertensas

- Comparar os níveis plasmáticos/séricos basais dos marcadores cardiolinfamatórios entre as mulheres normotensas e hipertensas após a menopausa.

3.2 Objetivos estudo 2: Efeitos da interação exercício físico/L-arginina em mulheres normotensas

- Verificar os efeitos agudos da suplementação de L-arginina nas respostas da pressão arterial após uma sessão de exercício físico aeróbio em mulheres normotensas após a menopausa.
- Verificar se os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas da pressão arterial após o exercício físico/L-arginina estão relacionados à via NO/GMPc e/ou insulina.
- Verificar se os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas da pressão arterial após o exercício físico/L-arginina estão relacionados ao estado redox (medidos pelo níveis de MDA e atividade das enzimas anti-oxidantes);
- Verificar se os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas da pressão arterial após o exercício físico/L-arginina estão relacionados aos marcadores pró e anti-inflamatórios.

3.3 Objetivo estudo 3: Efeitos da interação exercício físico/L-arginina em mulheres hipertensas

- Verificar os efeitos agudos da suplementação de L-arginina nas respostas da pressão arterial após uma sessão de exercício físico aeróbio em mulheres hipertensas após a menopausa.
- Verificar se os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas da pressão arterial após o exercício físico aeróbio estão relacionados à via NO/GMPc e insulina.
- Verificar se os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas da pressão arterial após o exercício físico aeróbio estão relacionados ao estado redox (medidos pelo níveis de MDA e atividade das enzimas anti-oxidantes);

- Verificar se os possíveis mecanismos envolvidos nas respostas da pressão arterial após o exercício físico/L-arginina estão relacionados aos marcadores pró e anti-inflamatórios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

Os métodos descritos abaixo são comum aos três estudos deste trabalho.

4.1 Participantes:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos no Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro, protocolo nº 6817 de 28/10/2009. Após atenderem os critérios de inclusão do estudo, as participantes foram informadas de todos os procedimentos envolvidos no projeto de pesquisa e após terem suas dúvidas esclarecidas, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para iniciar o estudo. Este estudo foi constituído de 33 mulheres acima de 50 anos, sendo 16 normotensas e 17 com o diagnóstico de hipertensão arterial com valores de pressão arterial sistólica entre 140 e 159 mmHg e pressão arterial diastólica superior entre 90 e 99 mmHg (o diagnóstico foi feito pelo próprio médico da voluntária ou pelo clínico geral do Departamento de Educação/UNESP/Rio Claro). Os critérios de inclusão foram:

- Estar na fase pós-menopausa (pela medida de FSH/LH e auto-relato de ausência de menstruação por 12 meses)
- Ter idade igual ou superior a 50 anos;
- Não possuírem diabetes mellitus tipo 2;
- Não apresentarem problemas físicos ou complicações cardiovasculares que impeça a realização de exercícios físicos;
- Não apresentarem histórico de acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio;
- Não fumante;
- Apresentar hipertensão estágio 1, segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Hipertensão (para o grupo de hipertensas – estudo 3).
- Não apresentarem patologias renais.
- Não serem caracterizadas como obesas pelo índice de massa corporal (IMC > 30).
- Não fazerem uso de terapia de reposição hormonal.

4.2 Procedimentos:

Todas as voluntárias responderam um questionário anamnese e foram submetidas à uma avaliação antropométrica antes das sessões experimentais.

O estudo consistiu de aproximadamente 12 visitas ao Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física da Unesp - Rio Claro, após atenderem os critérios de inclusão e assinarem o TCLE. Inicialmente foi realizada uma familiarização ao ergômetro utilizado, seguido de 3 a 5 sessões para avaliação da aptidão aeróbia, e posteriormente quatro sessões experimentais agudas para testar os efeitos da suplementação de L-arginina aliada ou não ao exercício físico nas variáveis analisadas, separadas por no mínimo 72h entre si.

No período de 24 horas prévias às sessões experimentais, todas as voluntárias foram instruídas a não ingerirem bebidas alcoólicas, café, chá e não realizarem atividades físicas intensas. Durante o período de testes do estudo não foi padronizado ou controlado a dieta das voluntárias, porém, elas foram instruídas à manterem suas dietas regulares durante todo o período de intervenção.

4.3 Avaliação da aptidão aeróbia – Teste de máxima fase estável de lactato sanguíneo (MFEL):

Anteriormente às sessões experimentais agudas e após a familiarização na esteira ergométrica, as voluntárias realizaram um teste incremental submáximo em esteira ergométrica com velocidade fixa de 5,5 km/h, inclinação inicial de 4% e incrementos de 1% de inclinação a cada 3 minutos até a voluntária atingir frequência cardíaca referente a 85% da máxima prevista, e/ou uma percepção subjetiva de esforço (PSE) acima de 17 na escala de Borg (1982). Entre cada estágio de 3 minutos foram realizadas coletas de amostra 25µL de sangue no lóbulo da orelha através de capilares heparinizados, que foram depositadas em tubos contendo 400µL de ácido tricloroacético (TCA), armazenadas a 4°C, para análise da concentração de lactato sanguíneo através do método ELISA conforme descrito por Engels e Jones (1978).

Após análise da concentração de lactato sanguíneo, o limiar de lactato (LL) foi identificado plotando a cinética do lactato em cada estágio, com as respectivas intensidades de exercício (% de inclinação) no teste incremental, analisando o ponto de inflexão da curva do lactato sanguíneo (Wasserman e MacIlory, 1964). Em seguida, baseado na intensidade do LL, as voluntárias realizaram em dias separados testes de 30 minutos com intensidade constante até a identificação da intensidade correspondente à

máxima fase estável de lactato sanguíneo (MFEL) de acordo com Beneke e Von Duvillard (1996).

Durante os testes de 30 minutos com intensidade constante houve coleta de sangue do lóbulo da orelha no repouso, e 10º e 30º minutos durante o exercício. Após assepsia do local com álcool, foi realizada punção do lóbulo da orelha, utilizando luvas de procedimento e lanceta descartável. A primeira gota de sangue foi desprezada, evitando contaminação da amostra com suor, e em seguida foram coletados 25µl de sangue, por meio de capilares de vidro descartáveis heparinizados e previamente calibrados. As amostras de sangue coletadas sofreram os mesmos procedimentos supracitados para armazenagem e posterior análise. A intensidade correspondente a MFEL foi considerada aquela com valor de variação da lactatemia $\leq 1,0$ mM entre o 10º e 30º minutos do teste.

4.4 Sessões experimentais:

Após a avaliação da aptidão aeróbia e determinação da intensidade de exercício correspondente a MFEL, todas as voluntárias foram submetidas a quatro sessões agudas experimentais com duração de aproximadamente 3,5 horas, e realizadas com intervalo de no mínimo 72 horas e máximo de uma semana entre elas. Durante essas quatro sessões experimentais, as voluntárias foram instruídas a não alterarem suas dietas e atividades físicas habituais, sendo controladas por um recordatório de atividades físicas e nutricionais.

As voluntárias foram instruídas a comparecerem no laboratório no período da manhã após jejum habitual, devidamente trajadas para realização de exercícios físicos.

As quatro sessões experimentais foram realizadas de maneira randomizada, no formato *crossover*, consistindo em:

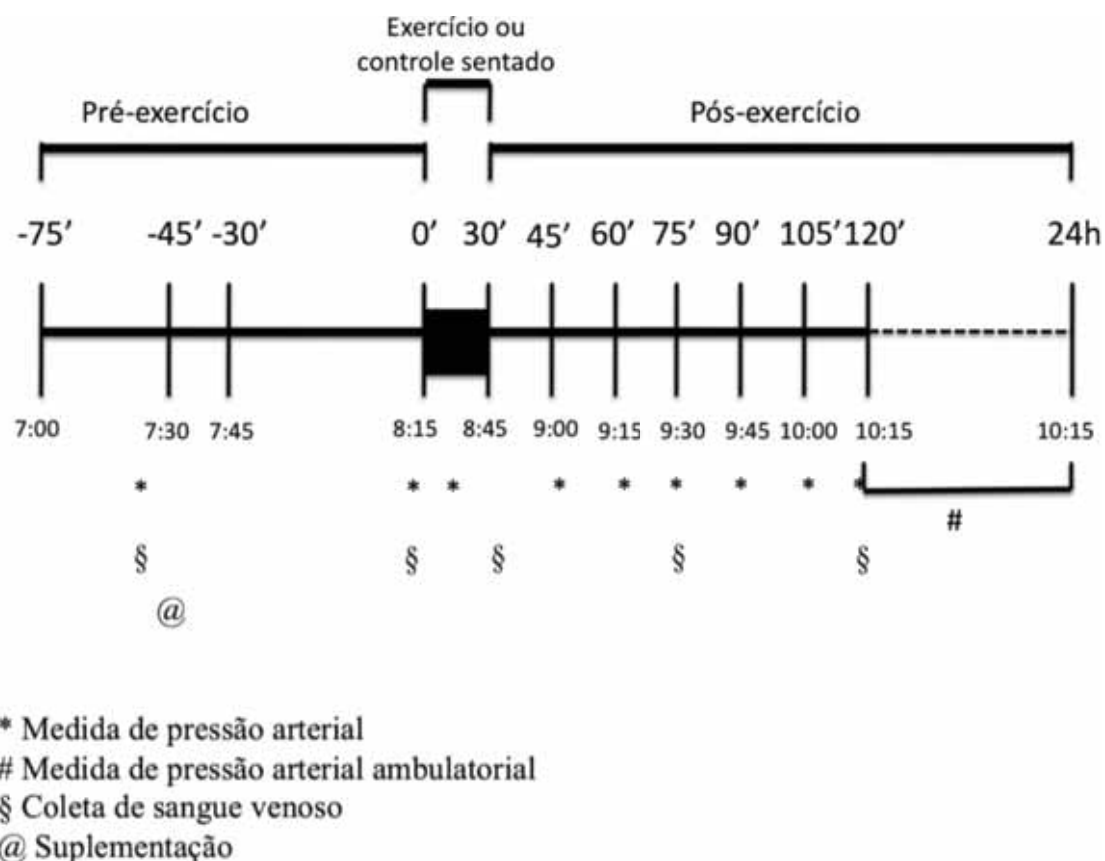
- (A-E) - Sessão com suplementação de L-arginina e realização de exercício físico;
- (ARG) - Sessão com suplementação de L-arginina sem a realização de exercício físico;
- (EXE) - Sessão com suplementação de placebo e realização de exercício físico;
- (CON) – Sessão controle sem a suplementação de L-arginina e sem exercício físico.

Assim que as voluntárias chegaram ao laboratório, foram encaminhadas para um ambiente calmo, sem movimentos e silencioso para minimizar os efeitos estressores do ambiente e não interferirem nas medidas pressóricas. Logo em seguida foram realizadas 3 medidas de pressão arterial após 20 minutos de repouso na posição sentada, seguida

da primeira coleta de sangue. Logo após a coleta, as voluntárias receberam a suplementação de L-arginina, placebo ou nada, dependendo da sessão experimental a ser realizada. A suplementação foi realizada durante um período de 15 min. Após 45 min desta intervenção, as voluntárias foram submetidas a uma sessão aguda de exercício aeróbio a 100% da intensidade da MFEL em esteira ergométrica nas sessões A-E e EXE. Nas sessões CON e ARG, as voluntárias permaneceram em repouso na posição sentada durante esse período.

Assim que terminaram esse período, foi aferida a pressão arterial e realizadas as coleta de sangue venoso por um período de 90 min dentro do laboratório. Em seguida, aparelhos ambulatoriais de medição de pressão arterial (MAPA) foram instalados nas voluntárias e retirados 24 horas após a sessão do exercício. Veja abaixo o desenho experimental.

Design do protocolo experimental



Esquema 2: Design do protocolo experimental

4.5 Suplementação de L-arginina e placebo:

Durante as sessões ARG, A-E as voluntárias receberam doses idênticas do aminoácido L-arginina e placebo na sessão EXE. Os suplementos foram ingeridos na forma de cápsulas de maneira duplo-cega. A quantidade de L-arginina era de 9g, divididas em 18 cápsulas de 0,5g cada. Essa quantidade foi escolhida devido aos resultados de estudos prévios (Tangphao et al., 1999; Evans et al., 2004; Shao e Hathcok, 2008) que relataram essa quantidade estaria dentro de uma faixa de segurança nesta suplementação. Além disso, acima desta concentração não há um maior aumento da concentração sérica da L-arginina e estão acompanhadas de efeitos colaterais como náuseas, diarreias e dores estomacais (Shao e Hathcok, 2008). A suplementação foi feita 45 minutos antes do início do exercício, pois estudos farmacocinéticos demonstram que após a suplementação de doses de L-arginina, o pico dos níveis plasmáticos acontece por volta de 45 a 60 minutos, podendo ficar elevado por até 8 horas após essa suplementação (Tangphao et al., 1999; Evans et al., 2004). O grupo placebo (EXE) recebeu a mesma quantidade de cápsulas sem a L-arginina. Essas cápsulas estavam vazias para evitar a interferência de outras substâncias, como carboidratos nos resultados

4.6 Exercício aeróbio:

O exercício físico das sessões experimentais consistiu em 30 minutos de exercício aeróbio na esteira ergométrica com velocidade fixa de 5,5 km/h, com a sobrecarga imposta através da inclinação da esteira (%), na intensidade da MFEL previamente determinada para cada voluntária. Esta intensidade e duração foram escolhidas pois 30 minutos de exercício aeróbio já são suficientes para proporcionarem alterações significativas na pressão arterial após sua realização (Anunciação e Polito, 2010). Além disso esta intensidade pode ser caracterizada entre os limites de moderada e intensa, onde as voluntárias provavelmente não suportariam permanecer um período mais prolongado de tempo sem entrarem em exaustão (Faude et al., 2009; Beneke et al., 2011).

4.7 Mensuração da pressão arterial e frequência cardíaca:

Durante todo o período que as voluntárias permaneceram no laboratório, nas quatro sessões agudas experimentais, a pressão arterial foi monitorada através do monitor

automático Microlife® modelo BP 3BT0A, e a frequência cardíaca foi monitorada através do monitor de frequência cardíaca POLAR® modelo RS800. Em cada momento de medida da pressão arterial eram realizadas 3 medidas de pressão e consideradas a média para análise. Caso alguma medida estivesse acima do intervalo de confiança de 95% das medidas, ela era descartada sendo considerada a média das duas outras medidas. As medidas de pressão arterial ambulatorial (MAPA) durante as 24 horas após as sessões agudas foram realizadas pelo aparelho Dyna Mapa⁺ - Cardius. Os valores muito acima ou abaixo das medidas foram descartados pelo próprio software do aparelho, retirando os valores *outliers*.

O Prof Dr Gilberto de Nucci, colaborador do projeto e médico, foi responsável pela avaliação dos resultados do MAPA de todas as voluntárias, bem como a supervisão da suplementação da L-arginina.

4.8 Coleta de sangue venoso:

Durante cada uma das quatro sessões agudas, 5 amostras de sangue foram coletadas, sendo uma em repouso logo após a voluntária chegar ao laboratório, e as outras imediatamente antes e após o período da realização do exercício, e 45 e 90 minutos após o término do período de exercício. Todas essas coletas foram realizadas por um profissional de enfermagem habilitado e experiente. Após assepsia local, 12 mL de sangue foram obtidos em cada coleta, totalizando 60 mL de sangue coletados em cada sessão experimental, através da punção da veia antecúbital ou radial, utilizando-se de seringa e agulhas descartáveis. As amostras de sangue foram depositadas em tubos de ensaio, contendo EDTA e tubos secos com gel separador para coleta de soro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos para separação de alíquotas de plasma e soro, e armazenadas a -80° C para posterior análises bioquímicas.

4.9 Análises bioquímicas:

A partir das amostras de soro e/ou plasma devidamente armazenadas, as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física através de kits comerciais pelos próprios pesquisadores, que possuem amplas experiências em determinação dessas substâncias por esses protocolos.

- Perfil lipídico: Amostras de soro foram utilizadas para a determinação dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, HDL Colesterol (HDL-C) pelo método colorimétrico pela Lipid Research CLinic (Atlanta, USA), utilizando-se de kit específico para ELISA (LABORLAB, Guarulhos, SP). O LDL Colesterol (LDL -C) também foi mensurado através de kit específico para ELISA (BT 3000 plus, Wiener Lab®, Rosario, Argentina). Os valores de VLDL foi calculado através da equação de Friedwald sugerida pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, dividindo a concentração de triglicerídeos por 5.
- Superóxido Dismutase (SOD): Para determinação da atividade da SOD plasmática foi utilizado o kit comercial Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. Esse kit utiliza o sal tetrazolium para detecção dos radicais superóxido gerado pela xantina oxidase e hypoxantina. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação do radical superóxido. O kit permite a medida da atividade séricas dos três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn, e FeSOD). A leitura foi realizada a 450 nm absorvância, e os resultados são expressos em U/mL.
- Catalase (CAT): Para determinação da atividade da CAT plasmática foi utilizado o kit comercial Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. O Kit utiliza da função peroxidática da catalase para determinação da atividade da enzima. O método é baseado na reação da enzima com metanol na presença de uma concentração ótima de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O Formaldeído produzido é medido colorimetricamente com 4-amino-3hydrazino-5-mercapto-1,2,4triazole (Purpald) como o cromógeno. O Purpald forma especificamente hererociclo biociclina com aldeídos que na oxidação muda a coloração para cor roxa. O Kit é usado para medir a atividade da catalase plasmática em nmol/min/mL a 540 nm de absorvância.
- Ácido tiobarbitúrico (TBARS): A medição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método bem estabelecido para detecção e monitoramento da peroxidação lipídica e foi medido utilizando o kit comercialmente colorimétrico Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA. O malondialdeído (MDA) é um dos produtos derivados da oxidação dos ácidos graxos insaturados e utilizado como método para avaliação da peroxidação lipídica. O malondialdeído (MDA) em altas temperaturas e em condições ácidas se liga ao ácido tiobarbitúrico (TBA) formando produtos desta reação (MDA-TBA) e foram medidos a 532 nm, os resultados são expressos em μM .

- Nitrito/nitrato (NO_x^-): Para determinação da produção endógena de NO, foi realizada a quantificação dos ânions nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), produtos terminais da oxidação do NO. As amostras foram ultra filtradas por meio de micro filtros (Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA). Após o processo de filtragem as concentrações de NO_x^- foram determinadas utilizando kit comercial colorimétrico Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. Este método primeiramente irá converter o nitrato em nitrito utilizando nitrato redutase e após a adição dos reagentes Griess o nitrito será convertido em um azo-composto roxo. A leitura em 540 nm permite a determinação da concentração total de NO_x^- e os resultados são expressos em μM .
- Guanosina Monofosfato cíclica (GMPc): Para determinação da concentração sérica de GMPc foi utilizado o kit comercial R&D system - Minneapolis, MN. Esse kit é baseado na ligação competitiva do GMPc presente no plasma com uma quantidade fixa de GMPc marcado com peroxidase *horseradish* (HRP) nos sítios de anticorpos policlonal de coelhos. Durante a incubação, o anticorpo policlonal se liga ao anticorpo na placa. Após a lavagem da placa e retirada do excesso de conjugado e amostra não ligadas ao anticorpo, a solução de substrato é adicionada para determinar a atividade da enzima ligada. A coloração é desenvolvida e interrompida para leitura a 450nm. A intensidade da coloração é inversamente proporcional à concentração de GMPc nas amostras. O GMPc é expresso em pmol/mL.
- Lactato: A concentração sanguínea de lactato foi analisada através do método colorimétrico conforme descrito por Engels e Jones (1978). Basicamente as amostras de 25 μL de sangue eram depositadas em tubos contendo 400 μL de ácido tricloroacético (TCA) e levemente agitadas para homogeneizar a amostra. Após a homogeneização da amostra, elas eram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm e 50 μL de sobrenadante era adicionado a 250 μL de reativo e encubado por 60 min, para posterior leitura a 340nm. Os valores de Lactato estão expressos em mM. A preparação do reativo era realizada com 25 mL de estoque de Glicina/EDTA (20,2 g de glicina + 2,05 de EDTA + qsp de água destilada para 500 mL) adicionada a 2,25 mL de Hidrato de Hidrazina a 24% e ajustado para o pH a 9,54. Posteriormente era adicionado 50 mg de Beta-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Sigma aldrich) e 75 μL de Lactato desidrogenase (sigma aldrich).
- Interleucina-6 (IL-6): A concentração plasmática de IL-6 foram determinada pelo método ELISA utilizando kit comercial (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA).

As amostras e padrões eram adicionadas placas contendo anticorpo específico monoclonal para IL-6 humano e incubada. Posteriormente a placa era lavada restando apenas as ligações da IL-6 na placa, e adicionada uma solução amarela de anticorpo policlonal para IL-6 humano, que era ligada a essa IL-6 da placa. Após incubação uma solução azulada de HRP conjugado era adicionada e novamente incubada e lavada. Após esse processo o substrato TMB era adicionado gerando uma coloração azulada, com posterior adição da solução que interrompe a reação resultando numa coloração amarelada. Assim a placa era lida com absorvância de 450nm. A quantidade de sinal era diretamente proporcional ao nível de IL-6 humano na amostra.

- Interleucina-10 (IL-10): A concentração plasmática de IL-10 foi determinada pelo método ELISA utilizando kit comercial (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA). O kit usa anticorpo monoclonal para IL-10 humano para ligar-se ao IL-10 das amostras e padrões. Após um período de incubação o excesso de amostra não ligado à placa é eliminado e lavado e posteriormente um anticorpo monoclonal para IL10 é adicionado. O anticorpo liga-se à IL-10 na placa e após nova lavagem um conjugado de SHP é adicionado, o qual liga-se ao anticorpo biotinilado humano. O excesso de conjugado é eliminado e o substrato é adicionado. Após incubação a reação enzimática é interrompida e lida com absorvância de 450nm. A medida da densidade óptica é diretamente proporcional à concentração da IL-10 humana nas amostras.
- Fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$): A concentração plasmática de $\text{TNF}\alpha$ foi determinada pelo método ELISA utilizando kit comercial R&D system - Mineapolis, MN. Um anticorpo monoclonal específico ao $\text{TNF}\alpha$ estava presente na placa. As amostras eram adicionada e o $\text{TNF}\alpha$ era ligado a esse anticorpo. Após incubação o excesso é removido e um anticorpo específico para o $\text{TNF}\alpha$ é adicionado. Novamente o excesso de substâncias não ligadas é removido e lavado. Posteriormente a solução substrato é adicionada e uma coloração aparece proporcionalmente à quantidade de $\text{TNF}\alpha$ na amostra. Assim a reação é interrompida e a absorvância lida a 450nm.
- Interleucina-1 beta (IL-1 β): A concentração plasmática de IL1 β foi determinada pelo método ELISA utilizando kit comercial R&D system - Mineapolis, MN. A placa continha anticorpo monoclonal específico para IL-1 β . As amostras eram pipetadas na placa e a IL-1 β era imobilizada pelo anticorpo. Após lavagem de substâncias

não ligadas, foi adicionado o anticorpo policlonal e encubada. Novamente era lavada a placa e uma solução substrato é adicionada e encubada. Após esse período uma solução amplificadora é adicionada na placa e uma coloração de acordo com a concentração de IL-1 β surge. O desenvolvimento dessa coloração é interrompido e essa coloração é lida com absorbância de 490nm.

- Dimetilarginina assimétrica (ADMA): A concentração sérica de ADMA foi determinada pelo método ELIZA através do kit comercial Immunodiagnostik – Germany. A preparação da amostra inclui a adição de reagente para ligação com ADMA. Posteriormente as amostras eram tratadas com antisoro policlonal de ADMA e encubada em placas com marcador derivativo de ADMA. Durante o período de incubação o ADMA das amostras competem com os marcadores imobilizados no fundo da placa para se ligar com anticorpo policlonal. O ADMA das amostras tomam os lugares das ligações dos marcadores. A concentração da ligação com os marcadores com anticorpo é inversamente proporcional à concentração de ADMA nas amostras. Durante a segunda incubação, o anticorpo conjugado peroxidase é adicionado à placa para detectar os anticorpos anti-ADMA. Após a lavagem dos componentes sem ligação, o substrato tetratilbenzidina (TMB) é adicionado para a peroxidase. Finalmente a reação enzimática é interrompida pela adição de solução ácida. A mudança de coloração do azul para o amarelo e a absorbância é medida a 450nm. A intensidade da coloração amarela é inversamente proporcional à concentração de ADMA, isso significa que a maior a concentração de ADMA nas amostras reduzem as concentrações de anticorpos ligados ao marcador e diminui o sinal fotômetro. A concentração de ADMA está expressa em $\mu\text{mol/L}$.
- Insulina: A dosagem de insulina foi realizada pelo método ELISA tipo *sandwich immunoassay* pelo kit comercial Alpco Diagnostics – Salem, NH, USA). A placa é composta por anticorpo monoclonal específico para insulina. As amostras eram pipetadas na placa com anticorpo de detecção (anti corpo monoclonal marcado com enzima peroxidase *horseardish*. Então a placa era incubada no agitador orbital a 700-900 rpm, e depois lavadas com buffer de lavagem e esvaziadas. O substrato TMB era adicionado e uma segunda incubagem era realizada no mesmo agitador. Após esse período de incubação a solução de interrupção da reação era adicionada e realizada a leitura da placa a 450nm com referencia de 650nm. A intensidade da coloração era diretamente proporcional à concentração de insulina plasmática. Os valores de insulina estão representados em $\mu\text{IU/mL}$.

- Hormônio folículo estimulante (FSH): A dosagem de FSH foi realizada pelo método ELISA imunométrico Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. Cada placa contém estreptavidina. As amostras, os anticorpos e o anticorpo marcado HRP são incubados conjuntamente. O anticorpo irá se ligar em ambas as estreptavidinas na placa e no FSH da amostra, e o anticorpo de detecção irá se ligar a outro antígeno na molécula de FSH. Todo o complexo é imobilizado na placa pela interação entre o anticorpo e a estreptavidina. Depois da eliminação e lavagem do excesso do restante do anticorpo e do material não ligado ao complexo, a concentração de FSH é determinada pela medida da atividade enzimática da HRP adicionando o substrato tetrametilbenzidina (TMB). Depois do tempo determinado a reação é interrompida com um ácido formando um produto de cor amarelada que pode ser medido a 450nm. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à quantidade de ligações do anticorpo HRP e FSH, que está relacionado a quantidade proporcional de FSH na amostra. As amostras estão expressas em mIU/mL.
- Hormônio luteinizante (LH): A dosagem de LH foi realizada pelo método ELISA imunométrico do tipo sandwich Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. Cada placa contém estreptavidina. As amostras, os anticorpos e o anticorpo marcado HRP são incubados conjuntamente. O anticorpo irá se ligar em ambas as estreptavidinas na placa e no LH da amostra, e o anticorpo de detecção irá se ligar a outro antígeno na molécula de LH. Todo o complexo é imobilizado na placa pela interação entre o anticorpo e a estreptavidina. Depois da eliminação e lavagem do excesso do restante do anticorpo e do material não ligado ao complexo, a concentração de LH é determinada pela medida da atividade enzimática da HRP adicionando o substrato tetrametilbenzidina (TMB). Depois do tempo determinado a reação é interrompida com um ácido formando um produto de cor amarelada que pode ser medido a 450nm. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à quantidade de ligações do anticorpo HRP e LH, que está relacionado a quantidade proporcional de LH na amostra. As amostras estão expressas em mIU/mL.

4.10 Tratamento estatístico:

Os resultados descritivos estão apresentados em média \pm desvio padrão, e os demais resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. Antes das análises estatísticas foi aplicado um teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se havia uma distribuição normal dos resultados. A área abaixo da curva (AUC) foi calculada pelo método trapezoidal (cálculo da integral) para avaliar o comportamento das variáveis em razão do tempo através do software GraphPad Prisma versão 4.

Quando comparado as características antropométricas, cardiovasculares de repouso e bioquímicas de jejum e basal, entre o grupo de mulheres normotensas e hipertensas, foi utilizado o teste *t* Student para amostras independentes.

Quando analisado as variáveis em relação ao tempo durante as quatro sessões, a análise de variância ANOVA *two way* para medidas repetidas (Sessões x Tempo) foi utilizada, e caso houvesse diferença entre as variáveis foi aplicada o *post hoc* de Newman-Keuls.

Para comparação das AUC entre as sessões experimentais, foi aplicado a análise de variância ANOVA *two way* para medidas repetidas (Suplementação x Exercício) e caso houvesse uma diferença entre as variáveis foi aplicada o *post hoc* de Newman-Keuls.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software de estatística Statistica versão 7.0 e GraphPad Prisma versão 4.

5. RESULTADOS ESTUDO 1: COMPARAÇÃO ENTRE MULHERES NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

A partir da divulgação em mídia falada e escrita, e de cadastros realizados pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Atividade Física da Unesp, foi formado um banco de dados do qual foram pré selecionadas 250 mulheres que, aparentemente, atendiam aos critérios de inclusão. Destas, noventa e sete voluntárias atendiam os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo, assinaram o TCLE e responderam os questionários anamnese, além de realizarem as avaliações antropométricas. Trinta e uma voluntárias foram excluídas após assinarem o TCLE e durante os testes para avaliação aeróbia. Do total de sessenta e seis voluntárias que completaram os testes de avaliação da aptidão aeróbia, sete mulheres desistiram de participar do estudo realizando apenas a primeira sessão experimental, e trinta e três voluntárias (16 normotensas e 17 hipertensas) completaram todas as sessões experimentais agudas (Veja abaixo quadro esquemático de recrutamento e seleção).



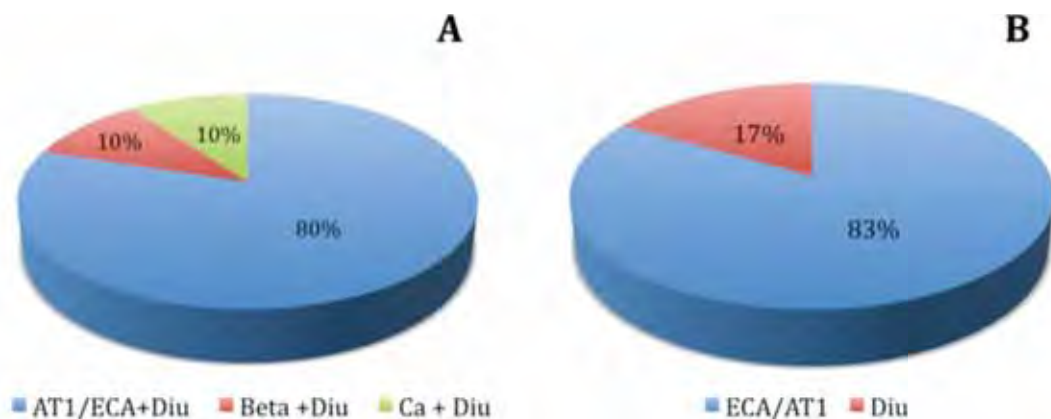
Esquema 3: Processo de recrutamento e participação no estudo

5.1 Características das voluntárias nas condições de jejum e repouso:

A tabela 1 mostra os medicamentos utilizados pelas voluntárias de ambos os grupos. Das 16 voluntárias normotensas que terminaram as sessões agudas, duas (13%) faziam uso de drogas para redução dos níveis de colesterol, duas (13%) faziam uso de medicamento para tratamento de hipotireoidismo, três (19%) faziam uso de ansiolíticos, e uma (6%) fazia uso de medicamento para osteoporose. No grupo de voluntárias hipertensas (n=17) onze (59%) mulheres faziam uso de politerapia e seis (41%) faziam uso de monoterapia, sendo que sete (41%) faziam uso de drogas para redução dos níveis de colesterol, 10 (59%) faziam uso de diuréticos, 13 (77%) faziam uso de bloqueadores do receptor AT1 de angiotensina II, ou de inibidores da enzima conversora da angiotensina, duas (12%) faziam uso de beta bloqueadores e uma (6%) faziam uso de inibidor do canal de Ca^{+2} . Durante todo o período de estudo não houve alteração ou retirada de nenhum medicamento em ambos os grupos.

Tabela 1: Relação dos tipos de medicamentos utilizados pelas voluntárias de ambos os grupos de mulheres normotensas e hipertensas.

Tipo de medicamentos	Nº voluntárias	%
<i>Normotensas n=16</i>		
Estatina	2	13
Tireoidianos	2	13
Ansiolíticos	3	19
Osteoporose	1	6
Nenhum medicamento	9	56
<i>Hipertensas n=17</i>		
Estatina	7	41
Diuréticos	10	59
Inibidores da ECA	4	24
Bloqueadores do receptor AT1	9	53
Inibidores dos canais de Ca^{+2}	1	6
Beta Bloqueadores	2	12
Politerapia para hipertensão	10	59
Monoterapia para hipertensão	7	41



Esquema 4: Percentual de voluntárias hipertensas que faziam uso de politerapia (A) e monoterapia (B). Diu – diuréticos; AT1 - bloqueadores do receptor AT1 de angiotensina II; ECA - inibidores da enzima conversora da angiotensina; Beta - beta bloqueadores; Ca - inibidor do canal de Ca^{+2} .

A Tabela 2 apresenta as características antropométricas, cardiovasculares, e bioquímicas de todas as voluntárias normotensas e hipertensas. Não houve diferença significativa na idade, no tempo após a menopausa, na massa corporal, na estatura, no IMC, na circunferência da cintura e quadril, e na razão cintura-quadril entre os grupos de mulheres normotensas e hipertensas. Em relação aos valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de repouso, também não observamos diferenças entre os grupos de mulheres normotensas e hipertensas. É importante ressaltar que todas as voluntárias hipertensas faziam uso de medicação anti-hipertensiva, e em nenhum momento do estudo a medicação foi suspensa ou alterada. Essa medida foi adotada devido aos aspectos éticos do estudo, para não causar riscos a saúde durante as intervenções e manter a validade ecológica do estudo, reproduzindo a situação real das voluntárias que eram medicadas durante o seu dia a dia.

Os resultados do perfil lipídico e glicemia de jejum também não foram diferentes entre os grupos de mulheres normotensas e hipertensas, com exceção da trigliceridemia e VLDL que foi maior no grupo de mulheres hipertensas. Neste grupo, sete mulheres (41%) apresentaram hipercolesterolemia e uma (6%) apresentou hipertrigliceridemia de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia. No grupo de mulheres normotensas quatro (25%) apresentaram hipercolesterolemia e duas (13%) apresentaram hipertrigliceridemia.

As concentrações dos hormônios folículo estimulante (FSH) do hormônio luteinizante (LH) não foram diferentes entre os grupos, sendo que em ambos os grupos, as concentrações do FSH e LH demonstram que as voluntárias estavam no período após a menopausa.

Tabela 2: Características antropométricas, cardiovasculares e de perfil lipídico das voluntárias normotensas e hipertensas na condição basal de jejum.

	Normotensas <i>N</i> =16	Hipertensas <i>N</i> =17
Idade (anos)	57 ± 6	58 ± 6
Tempo após menopausa (anos)	8 ± 6	11 ± 8
Massa Corporal (kg)	68,4 ± 9,5	68,1 ± 10,9
Estatutura (m)	1,60 ± 0,06	1,56 ± 0,06
IMC (kg/m²)	27 ± 3	28 ± 4
C-C (cm)	86 ± 10	89 ± 11
C-Q (cm)	104 ± 9	106 ± 10
RCQ	0,82 ± 0,06	0,84 ± 0,05
PAS repouso (mmHg)	115 ± 11	116 ± 12
PAD repouso (mmHg)	73 ± 8	71 ± 7
FC repouso (bpm)	75 ± 10	68 ± 8
Colesterol total (mg/dL)	190,8 ± 29,8	203,4 ± 28,2
HDL-C (mg/dL)	51,4 ± 13,8	49,6 ± 6,4
LDL-C (mg/dL)	122,8 ± 17,5	126,0 ± 30,8
Triglicerídeos (mg/dL)	97,9 ± 49,4	138,4 ± 59,2*
Glicemia (mg/dL)	87,0 ± 10,7	89,4 ± 7,3
VLDL (mg/dL)	19,6 ± 9,9	27,7 ± 11,8*
FSH (mIU/mL)	42,8 ± 21,4	63,1 ± 34,2
LH (mIU/mL)	26,7 ± 13,7	31,9 ± 15,1

Valores apresentados em média ± desvio padrão. IMC – Índice de massa corporal; C-C – Circunferência da cintura; C-Q – Circunferência de quadril; RCQ – Razão cintura-quadril; PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; FC – frequência cardíaca; HDL-C – Lipoproteína de alta densidade; LDL-C – Lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C – Lipoproteína de muito baixa densidade; FSH – Hormônio Folículo Estimulante; LH – Hormônio Luteinizante. **p* < 0,05 em relação ao outro grupo.

A tabela 3 apresenta os resultados de jejum dos biomarcadores cardio-inflamatórios. Nenhuma diferença foi encontrada em relação às concentrações de Nitrito/Nitrato (NOx^-), Dimetilarginina assimétrica (ADMA), no marcador inflamatório IL1- β , nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e Catalase, e no marcador de peroxidação lipídica MDA entre os grupos de mulheres normotensas ($n=16$) e hipertensas ($n=17$). De maneira interessante, a concentração plasmática da citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou menor concentração, enquanto que a citocina pró inflamatória IL-6 maior concentração em jejum nas mulheres hipertensas quando comparadas às mulheres normotensas (aproximadamente 110% menor e 25% maior respectivamente). Não conseguimos detectar dentro da sensibilidade do método ELISA com os kits da R&D Systems os níveis plasmáticos de TNF- α de jejum ou repouso.

Tabela 3: Concentrações plasmáticas dos marcadores cardiovasculares e inflamatórios das voluntárias normotensas e hipertensas na condição de jejum.

	Normotensas $N=16$	Hipertensas $N=17$
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	$0,46 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,07$
NOx^- (μM)	$10,3 \pm 6,2$	$13,7 \pm 7,9$
IL-6 (pg/mL)	$22,5 \pm 3,2$	$27,8 \pm 6,4^*$
IL-10 (pg/mL)	$4,4 \pm 2,7$	$2,1 \pm 1,0^*$
TNF- α (pg/mL)	NC	NC
IL1- β (pg/mL)	$0,051 \pm 0,062$	$0,081 \pm 0,074$
MDA (μM)	$3,6 \pm 0,9$	$3,9 \pm 1,0$
SOD (U/mL)	$21,4 \pm 8,9$	$21,5 \pm 13,9$
Catalase (nmol/min/mL)	$33,7 \pm 23,0$	$41,4 \pm 15,2$

Valores apresentados em média \pm desvio padrão. ADMA – Dimetilarginina assimétrica; NOx^- – Nitrito/Nitrato; IL-6 – Interleucina 6; IL-10 – Interleucina 10; TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa; IL1- β – Interleucina 1 beta; MDA – Malondialdeído; SOD – Superóxido dismutase; NC – Não contábil. * $p<0,05$. O número de voluntárias que obtivemos leitura para dosagem de IL1- β foram de 7 e 9 respectivamente para grupo NT e HT.

A tabela 4 mostra os valores das citocinas pró e anti-inflamatórias IL-6, IL-10 e IL1- β na condição de repouso previamente às sessões experimentais. Os valores de repouso foram calculados na condição pós prandial de desjejum, após 20 minutos de repouso e antes de iniciarem as sessões experimentais agudas, no mesmo horário do dia. O valor de cada voluntária foi calculado pela média entre os valores de repouso nos

quatro dias. Da mesma forma que nas análises de jejum, os valores de TNF- α não foram detectáveis durante as sessões, pelo método utilizado. As concentrações plasmáticas de IL-10 estavam aproximadamente 60% menores, e as concentrações plasmáticas de IL-1- β estavam aproximadamente 110% maiores no grupo de mulheres hipertensas em relação às mulheres normotensas.

Tabela 4: Concentrações plasmáticas dos marcadores e inflamatórios das voluntárias normotensas e hipertensas na condição basal pré teste.

	Normotensas N=16	Hipertensas N=17
IL-6 (pg/mL)	29,4 \pm 2,1	34,2 \pm 9,6
IL-10 (pg/mL)	5,3 \pm 0,8	1,9 \pm 0,2*
IL1- β (pg/mL)	0,072 \pm 0,013	0,157 \pm 0,033*
TNF- α (pg/mL)	NC	NC

Valores apresentados em média \pm desvio padrão. * $p \geq 0,05$ em relação ao grupo de mulheres normotensas

5.2 Avaliação da intensidade de exercício aeróbio

Os resultados da avaliação da intensidade de exercício correspondente à MFEL estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre as intensidades e as concentrações de lactato sanguíneo correspondente à máxima fase estável de lactato sanguíneo entre os grupos normotensas e hipertensas. Além disso, a frequência cardíaca (FC) e a percepção subjetiva de esforço (PSE) correspondentes a essas intensidades não foram diferentes entre si.

Tabela 5: Medida da intensidade, da concentração de lactato sanguíneo ([bLac]), da frequência cardíaca (FC) e da percepção subjetiva de esforço (PSE) correspondentes à máxima fase estável de lactato (MFEL) para as voluntárias normotensas (NT) e hipertensas (HT).

	Intensidade (% de inclinação)	[bLac] (mM)	FC (bpm)	PSE
NT (n=16)	6 \pm 2	3,0 \pm 1,0	157 \pm 9	13 \pm 2
HT (n=17)	5 \pm 2	2,7 \pm 1,1	140 \pm 18	14 \pm 1

Obs: No grupo de mulheres hipertensas há duas voluntárias que fazem uso de medicamentos beta bloqueadores.

6. DISCUSSÃO ESTUDO 1

6.1 *Máxima fase estável de lactato sanguíneo (MFEL)*

De acordo com vários autores, a intensidade correspondente à MFEL deve ser o parâmetro utilizado para prescrição de exercícios físicos, e a intensidade de exercício correspondente a MFEL é mais importante que a [bLac] por si só (Faude et al, 2009; Beneke et al, 2011).

Nosso estudo é um dos primeiros a avaliar a intensidade correspondente à MFEL em mulheres de meia idade após a menopausa utilizando um protocolo de exercício adaptado de acordo com a população estudada. A MFEL geralmente ocorre com uma concentração média de 4 mM, essa concentração foi obtida em indivíduos atletas jovens, adultos ou idosos saudáveis e populações especiais como cardiopatas e diabéticos (TegTbur et al., 2001; Simões et al., 2010a; Simões et al., 2010b; Beneke et al., 2011). Apesar da MFEL ter sido menor do que 4mM em nosso estudo (cerca de 3 mM), alguns autores reportam que tanto a MFEL quando a intensidade correspondente a MFEL reduzem com o envelhecimento, principalmente em mulheres (Matternn et al., 2003; Korhonen et al., 2005). Um possível mecanismo seria que a população estudada possui menor quantidade de massa muscular. De fato, alguns fatores podem influenciar as concentrações de lactato, como o tipo de exercício utilizado, bem como a densidade da massa muscular envolvida no exercício físico (Beneke et al., 2003; Faude et al., 2009; Beneke et al., 2011).

Além disso, a PSE e a FC correspondentes à MFEL, corroboram os resultados já descritos na literatura, mesmo utilizando ergômetros diferentes, e em populações distintas, possibilitando mais uma ferramenta para controle e prescrição de exercícios de acordo com as respostas metabólicas, cardiovasculares e de percepção de esforço correspondente à MFEL.

Assim a determinação destes parâmetros, proporciona uma melhor identificação de intensidades de exercícios para mulheres após a menopausa, podendo ter melhor controle na prescrição de exercícios físicos com eficiência e segurança, conforme descrito na literatura e já aplicados em indivíduos jovens, adultos e idosos saudáveis (TegTbur et al., 2001; Simões et al., 2010^a; Simões et al., 2010b; Beneke et al., 2011).

6.2 Avaliação da Níveis plasmáticos dos marcadores cardioprotetores em jejum e repouso:

O ADMA é um inibidor endógeno de todas as isoformas da NO sintases, cujo mecanismo de ação é competir com a L-arginina pelo sítio ativo da enzima NOS, comprometendo assim a síntese de NO. A molécula de ADMA é sintetizada a partir da metilação de resíduos de arginina pela ação de enzimas denominadas transferases. O ADMA considerado similar ao inibidor L-NMMA (Vallance et al., 2004). No sistema cardiovascular, o ADMA tem sido considerado um marcador de risco cardiovascular, e mesmo em pessoas que não apresentam doenças cardiovasculares, sua elevação tem sido associada com maiores riscos de apresentar eventos cardiovasculares futuros (Achan et al., 2003; Böger et al., 2009; Visser et al., 2010).

Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de ADMA foram similares entre as voluntárias normotensas ($0,46 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$) e hipertensas ($0,50 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$). Em consonância com nossos resultados, estudos prévios observaram valores de ADMA similares aos encontrados em nosso estudo. Estudo recente mostrou que jovens com IMC abaixo de $24,9 \text{ kg/m}^2$ (homens e mulheres) apresentavam níveis plasmáticos de ADMA em torno de $0,45 \mu\text{mol/L}$ que não foi diferente daqueles encontrados em mulheres obesas no climatério (48 anos de idade), cerca de $0,50 \mu\text{mol/L}$, determinado pelo método ELISA (Siervo e Bluck, 2012). Outro trabalho comparou valores de ADMA entre homens saudáveis e hipertensos em condições basais (idade de 58 anos), e verificaram que os valores não diferiam entre os grupos, cerca de $0,45 \mu\text{mol/L}$, porém determinado pelo método HPLC (Ito et al., 2001). De maneira similar, estudos recentes mostraram que os níveis plasmáticos de ADMA, determinado pelo método ELISA, em mulheres e homens obesos com idade média de 54 anos apresentavam valores em torno de $0,46 \mu\text{mol/L}$ (Kelly et al., 2012), que foram semelhantes àqueles encontrados em homens/mulheres com sobrepeso, cerca de $0,48 \mu\text{mol/L}$, determinado pelo método HPLC (Kielstein et al., 2011). Por outro lado, esse mesmo laboratório avaliando homens e mulheres com idade média de $73,8 \pm 2,7$ anos verificaram valores basais de ADMA plasmáticos, determinado pelo método HPLC, de $4 \mu\text{mol/L}$, enquanto que homens jovens (27 anos) apresentavam valores de $1 \mu\text{mol/L}$ (Bode-Böger et al., 2003). Já Holden et al. (2003) encontraram valores de $0,72 \mu\text{mol/L}$ em mulheres na pós-menopausa e esses valores não foram diferentes daqueles encontrados em mulheres jovens saudáveis ($0,83 \mu\text{mol/L}$). De maneira similar, Kocak et al. (2011), através do método ELISA, observaram que as mulheres com peso normal apresentavam valores de ADMA em torno de $0,82 \pm 0,33$

$\mu\text{mol/L}$ no período após a menopausa. Cabe ressaltar que os valores de ADMA plasmáticos parecem variar muito, conforme a população estudada independente da técnica usada (ELISA ou HPLC). Assim, podemos visualizar num breve levantamento bibliográfico na literatura que os valores de ADMA plasmáticos podem variar de 0,45 a 4,0 $\mu\text{mol/L}$, dependendo da população analisada e histórico médico prévio.

Com relação à hipertensão arterial e níveis plasmáticos de ADMA, três trabalhos encontraram níveis aumentados do inibidor endógeno de NO, em homens hipertensos de meia idade e com sobrepeso (Surdacki et al., 1999), e em homens (maioria) e mulheres hipertensos (Perticone et al., 2005; Tsioufis et al., 2010). Esses trabalhos encontraram associação positiva entre maiores níveis de ADMA e menor concentração de nitrito/nitrato, bem como maiores valores de pressão arterial sistólica e diastólica e maiores concentrações plasmáticas de ADMA. Diferentemente dos resultados obtidos nesses estudos, os valores obtidos em nosso estudo foram similares entre voluntárias normotensas e hipertensas. As razões para essa discrepância podem ser devidas; a) nesses estudos os voluntários não faziam uso de medicação hipertensiva previamente ou as medicações foram suspensas durante o estudo (período de wash out); b) a maioria dos voluntários estudados eram do sexo masculino, o que poderia ter alguma relação com diferenças entre gênero. No entanto, deve-se ter em mente estudos com mulheres hipertensas sem medicação seria interessante para efeitos comparativos.

Com relação às concentrações de nitrito/nitrato, de maneira similar também não observamos qualquer alteração em seus valores nas condições basais. De fato, trabalhos prévios de nosso laboratório mostram que as concentrações de nitrito/nitrato não são diferentes entre os voluntárias (Sponton et al., 2010; Esposti et al., 2011)

Quando analisado os níveis séricos basais dos marcadores pró e anti-inflamatórios de jejum, nossos resultados mostraram que as concentrações plasmáticas de jejum na IL-6 foi 25% maior no grupo de voluntárias hipertensas. Além disso, as concentrações de interleucina 10 foi aproximadamente 110% maiores nas voluntárias normotensas em relação às voluntárias hipertensas. A IL-6 pode apresentar papéis antagônicos em nosso organismo. Alguns trabalhos mostram a IL-6 como importante citocinas pró-inflamatórias (Bhagat e Balance, 1997; Ziccardi et al., 2002) enquanto que outros mostram que a IL-6 possui com ação anti-inflamatória, principalmente quando liberada pela musculatura esquelética em situação de exercício físico, pois ela tem papel importante na recuperação e regeneração muscular após exercício, no estímulo da liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-1RA, e também de hormônios como cortisol e adrenalina

que tem efeitos anti-inflamatórios e inibitórios na liberação de citocinas pró inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Pedersen, 2011).

Em condições patológicas, essa citocina pode ser liberada também pelo tecido adiposo, podendo influenciar a função endotelial, e induzir a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, favorecendo o processo de aterosclerose (Bhagat e Balance, 1997; Ziccardi et al., 2011). Além disso, elevados níveis de IL-6 plasmática são considerados como preditores de risco de futuros eventos cardiovasculares em mulheres após a menopausa (Ridker et al., 2000).

Com relação à IL-10, sabe-se que é uma importante citocina anti-inflamatória, secretada por monócitos/macrófagos e linfócitos, e age principalmente como antagonista da IL-6 e TNF- α (Esposito et al., 2006). Evidências mostram que a IL-10 pode oferecer uma proteção contra a disfunção no endotélio causado pelo diabetes e excessiva produção de espécies reativas. Além disso, baixos níveis séricos de IL-10 podem refletir instabilidade plaquetária podendo favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ligadas à disfunção endotelial (Gunnnett et al., 2002; Esposito et al., 2006). Assim, elevados níveis basais de IL-6, conjuntamente com baixos níveis de IL-10 podem representar um estado inflamatório que poderá favorecer o desenvolvimento de síndrome metabólica e disfunção endotelial (Gunnnett et al., 2002; Esposito et al., 2006; Ziccardi et al., 2002). Os níveis circulantes da citocina anti-inflamatória IL-10 são preditores independente das respostas vasodilatadora mediada pela endotélio em pacientes com doenças cardiovasculares, pois essa citocina induz a redução da produção de EROs e da sinalização de liberação de agentes pró inflamatórios mediados pelo NF κ B (Fichtlscherer, et al., 2004).

Nosso estudo mostra que existe um desequilíbrio, entre as concentrações plasmáticas basais de IL-10 e IL-6 em voluntárias hipertensas no climatério comparadas às mulheres normotensas. As razões para essa alteração ainda não são claras. Trabalhos avaliando marcadores inflamatórios, função endotelial e climatério mostram resultados conflitantes. Kim *et al.* (2012) encontraram concentrações 2 vezes maiores de IL-6 em mulheres após a menopausa em comparação com mulheres na pré-menopausa. Além disso, esses autores mostraram que as concentrações dessa citocina aumentam com o envelhecimento, indicando o agravamento do processo inflamatório e desenvolvimento de disfunção endotelial ao longo dos anos. Conceição *et al.* (2012) encontraram níveis séricos de IL-6, três vezes e meia maiores, que mulheres jovens, porém não encontraram diferença nas concentrações de IL-10 entre mulheres após a menopausa. Por outro lado, Yasui *et al.* (2008) não encontraram diferenças nas concentrações de IL-6 ou IL-10 entre

os grupos de mulheres nas fases pré e pós-menopausa. Em contrapartida, Vural *et al.* (2006) encontraram maiores níveis de IL-10 em mulheres após a menopausa em comparação com mulheres pré-menopausa. Além disso, esses elevados níveis de IL-10 foi reduzido após o tratamento com reposição hormonal. Segundo os autores o aumento das citocinas anti-inflamatórias nessas mulheres após a menopausa é um mecanismo compensatório devido ao aumento das concentrações de processos inflamatórios causado pelo estresse oxidativo e o aumento de TNF- α .

Em relação à hipertensão alguns estudos sugerem que as concentrações de citocinas pró inflamatórias poderiam estar elevadas, enquanto as citocinas anti-inflamatórias poderiam estar reduzidas em indivíduos hipertensos (Ridker *et al.*, 2000; Gunnnett *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2006; Ziccardi *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Stumpf *et al.* (2005) que mostraram concentrações duas vezes maiores de IL-6 em pacientes hipertensos, porém sem diferença nos níveis de IL-10. No entanto, esses trabalhos avaliaram população diferente da nossa, homens e mulheres jovens. Nosso trabalho mostrou que mulheres hipertensas após a menopausa apresentam um desequilíbrio nas concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10. Nossa hipótese é que apesar destas mulheres apresentaram controle pressórico pelos medicamentos anti-hipertensivos (em sua maioria envolvendo o sistema renina-angiotensina), esse desequilíbrio parece representar uma das bases etiológicas da hipertensão arterial nessa população, o que levaria ao comprometimento do sistema cardiovascular e mais especificamente à função endotelial. De fato, evidências mostram que compostos que reduzem os níveis de mediadores pró inflamatórios melhoram a resposta pressórica de ratos espontaneamente hipertensos (Zarzuelo *et al.*, 2011).

Nosso estudo também mostrou que a concentração de IL-1- β no repouso (Tabela 4) nas voluntárias hipertensas estavam 110% maiores que no grupo de mulheres normotensas. A citocina IL-1- β é um marcador importante do processo inflamatório, pois medeia vários mecanismos nesse processo, incluindo a liberação de substâncias pró inflamatórias. Além disso, elevados níveis plasmáticos dessa citocina estão relacionados ao desenvolvimento de patologias ligada ao desenvolvimento da aterosclerose, resistência à insulina e disfunção endotelial (Gunnnett *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2006; Vanhala, Kautiainen e Kumpusaio, 2008). Mais especificamente, o estudo de Vanhala, Kautiainen e Kumpusaio (2008) acompanhou 396 homens e mulheres aparentemente saudáveis de meia idade por 6 anos e meio, e verificaram que as concentrações de IL-1- β foi altamente correlacionada com a incidência de hipertensão nesses pacientes ao longo dos anos. Neste estudo os autores mostraram que independente da idade ou sexo, o

processo inflamatório mediado por altos níveis de IL-1- β são preditores do desenvolvimento de hipertensão arterial. Além disso, o estudo de Nemati *et al.* (2011) mostraram que a secreção de IL-1- β pelos leucócitos polimorfonuclear periféricos sanguíneos são 8 vezes maiores por células de pacientes hipertensos em comparação com pacientes normotensos. Nesse estudo os autores também mostraram que drogas anti-hipertensivas como Losartana, Alondipina e Captopril (mesmo medicamento utilizado pela maioria das voluntárias de nosso estudo) reduzem a secreção dessa citocina nas mulheres hipertensas, auxiliando no processo anti-inflamatório.

7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

As mulheres hipertensas após a menopausa apresentam:

- Maiores níveis plasmáticos das citocinas pró inflamatórias IL-6 de jejum e IL1- β de repouso pré teste;
- Menores níveis da citocina anti-inflamatória IL-10;
- Nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de ADMA.

8. CONCLUSÃO ESTUDO 1

O desequilíbrio entres as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias poderia ser uma das bases etiológicas de maior incidência de hipertensão arterial em mulheres após a menopausa.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO 1

Esse estudo teve como principais limitações o número amostral da população que foi pequeno, e a falta de registro de respostas relaxantes mediadas pelo fluxo, ou seja, resposta funcional da função vascular que seria interessante obter.

10. RESULTADOS ESTUDO 2 – AVALIAÇÃO DAS VOLUNTÁRIAS NORMOTENSAS

10.1 *Medidas da Pressão Arterial para as voluntárias normotensas (NT): método convencional*

As características antropométricas, cardiovasculares, perfil lipídico e marcadores cardioinflamatórios estão demonstradas no estudo 1.

Os resultados da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) durante o período em que as voluntárias normotensas permaneceram no laboratório, nas quatro sessões experimentais agudas (n=16), estão apresentados nas figuras 1 e 2. Fizemos as comparações entre as quatro sessões, e posteriormente a evolução dos valores no tempo em cada sessão em relação ao repouso e pré-exercício.

No repouso, os valores de PAS não foram diferentes entre as quatro sessões experimentais, porém na sessão A-E o valor de PAS foi maior que na sessão CON no momento pré exercício, sem diferença entre as outras sessões. As voluntárias na sessão A-E apresentaram valores de PAS menores nos momentos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Na sessão EXE, a PAS teve o mesmo comportamento, com exceção do minuto 60, quando comparados à sessão CON. Já em comparação com a sessão ARG, a PAS foi menor nos minutos 15, 60, 75 e 90 após o exercício na sessão A-E e nos minutos 15 e 75 após o exercício na sessão EXE (Figura 1A).

Quando comparado a PAS no período após o tempo de execução do exercício, houve uma redução desses valores nos minutos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 em relação tanto ao repouso quando ao momento pré exercício na sessão A-E, e nos mesmos pontos na sessão EXE porém apenas em relação ao pré exercício. Já os valores de PAS na sessão CON foram maiores em relação ao repouso nos minutos 75 e 90 após o tempo destinado para execução do exercício (figura 1A).

Os valores de PAD estão apresentados na figura 1B. Na sessão A-E, o valor de PAD de repouso foi maior que na sessão ARG, porém não houve diferença entre as quatro sessões nos valores pré exercício. A PAD de repouso foi menor que os valores pré exercício, e todos os momentos (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos) após o tempo destinado para execução do exercício na sessão ARG. Na sessão EXE, a PAD foi maior nos momentos pré exercício e 15, 60 e 75 minutos após o exercício em relação ao repouso e na sessão CON, apenas no minuto 75, a PAD foi maior que no repouso. Não houve diferença nos valores de PAD na sessão A-E em relação ao repouso, porém houve redução significativa nos minutos 45, 60, 75 e 90 em relação à PAD no momento pré exercício apenas nessa sessão.

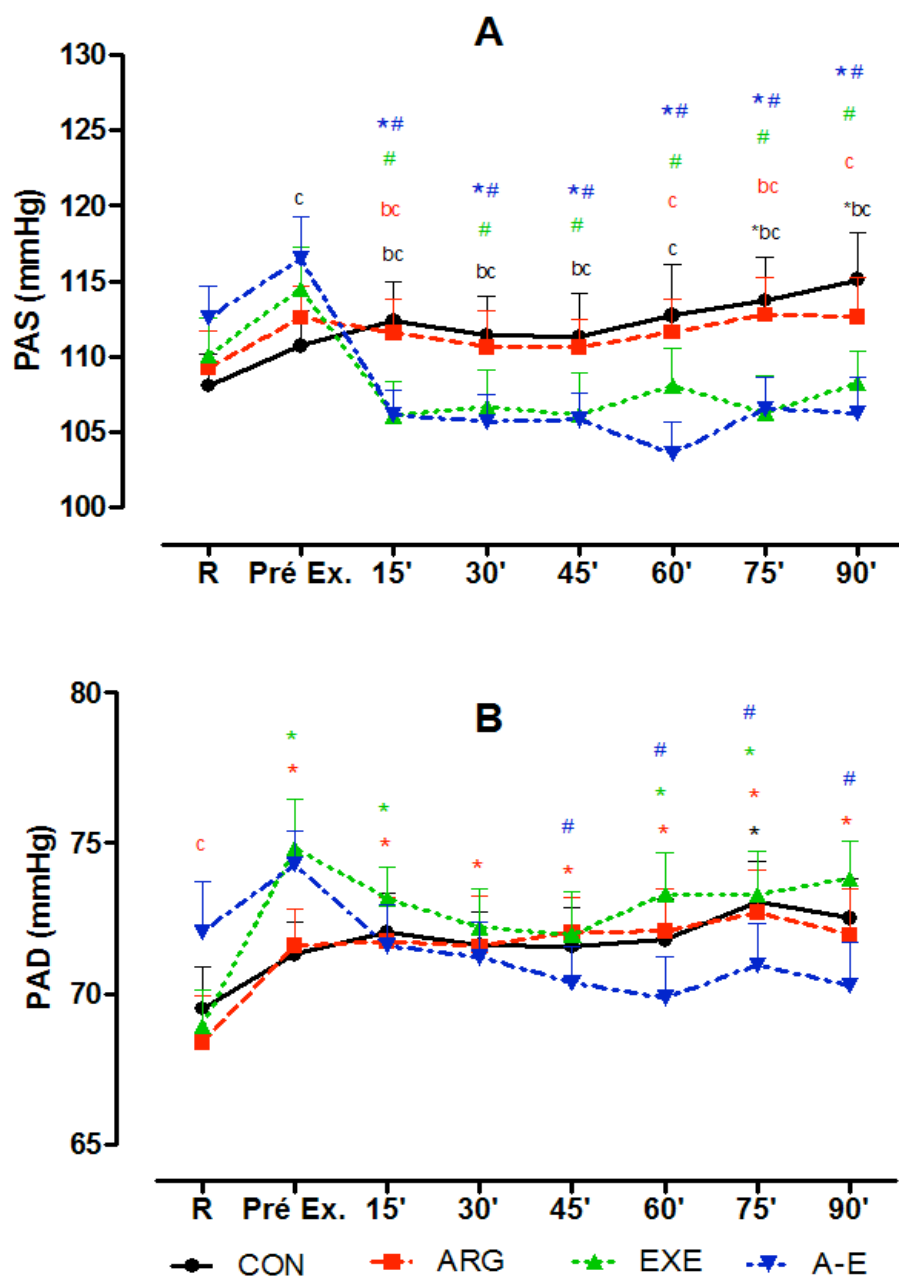


Figura 1: Pressão arterial sistólica (A) e Pressão arterial diastólica (B) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias normotensas (n=16) nos momentos: Repouso (R), pré exercício (Pré Ex.) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após exercício. * $p \leq 0,05$ em relação ao R; # $p \leq 0,05$ em relação ao Pré Ex.; ^a $p \leq 0,05$ em relação à sessão ARG, ^b $p \leq 0,05$ em relação à sessão EXE; ^c $p \leq 0,05$ em relação à sessão A-E. Os valores estão representados média \pm EPM.

A figura 2 apresenta os valores da variação da PAS e da PAD e suas respectivas áreas abaixo da curva em relação ao tempo. A ANOVA two way não demonstrou interação entre a suplementação de L-arginina e a realização do exercício nos valores da AUC tanto da PAS quanto da PAD, porém nos dias em que eram realizados exercícios físicos, ambas pressões sistólica e diastólica apresentavam uma AUC menor que nos dias em que não eram realizados os exercícios, tanto na PAS quanto na PAD.

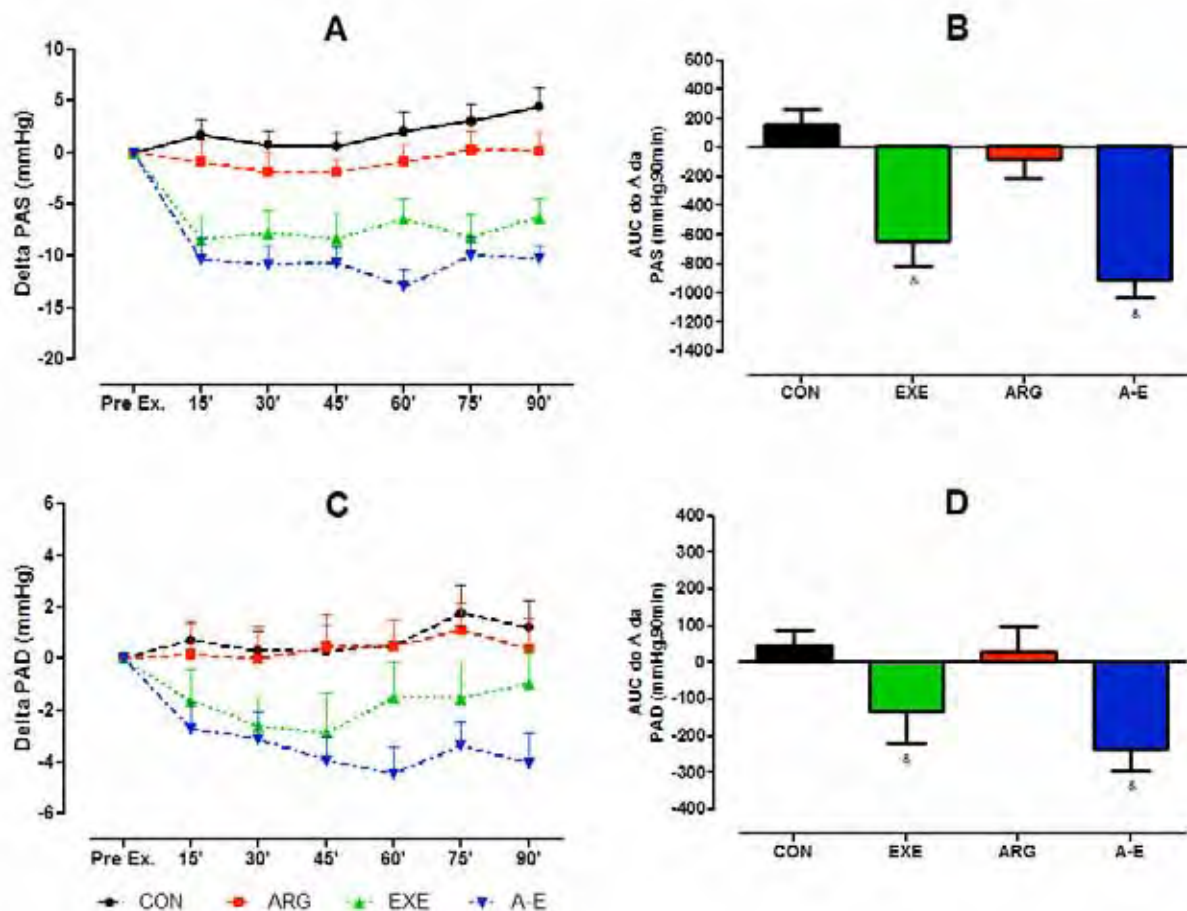


Figura 2: Delta da pressão arterial sistólica (A) e sua respectiva área abaixo da curva (B) e delta da pressão arterial diastólica (C) e sua respectiva área abaixo da curva durante (D) as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias normotensas (n=16) nos momentos: Pré exercício (Pré Ex.) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após exercício. & p≤ 0,05 em relação às sessões sem a realização de exercício (CON e ARG). Os valores estão representam média ± EPM.

10.2 Monitorização ambulatorial da Pressão arterial – MAPA:

Os resultados da monitorização ambulatorial da pressão arterial sistólica e diastólica ao longo das 24 horas estão apresentados em valores médios ponto a ponto de 2 em 2 horas (Figuras 3), além da área abaixo da curva da variação da PAS e PAD em relação ao repouso (Figuras 4), e dos valores médios durante o período total de 24 horas, período de vigília e período de sono (Figuras 5). Para cálculo dos valores médios da PAS e PAD do período total de 24 horas foram feitas as médias de todas as medidas de pressões realizadas pelo aparelho MAPA durante o período de 24 horas sem os valores de *outliers* e os valores com erro de medida, realizados pelo próprio software do aparelho. O período de vigília foi considerado como o período onde as voluntárias estavam acordadas, e o de sono, onde as voluntárias estavam dormindo, ambos relatados por um recordatório de atividades pelas próprias voluntárias.

A análise de variância (ANOVA two way) dos valores tanto de PAS quanto de PAD durante as 24 horas (ponto a ponto) após as sessões experimentais, não apresentaram diferença entre as sessões experimentais. No entanto, quando comparado com o repouso, todas as sessões apresentaram menores valores de PAS nos momentos entre 23:00 e 07:00, e menores valores de PAD entre 23:00 e 05:00, coincidindo com o período de sono das voluntárias (Figura 3).

A ANOVA two way também não mostrou interação (suplementação x exercício) nas AUC da variação da PAS e PAD nessas voluntárias normotensas, porém a AUC da PAS foi menor nas sessões onde eram realizados exercícios físicos em comparação com as sessões que não realizavam, sem diferença nas AUC da PAD para essas voluntárias (Figura 4).

A figura 5 mostra os valores médios de pressão arterial sistólica e diastólica nos períodos total de 24 horas, vigília e sono. Não houve diferença significativa em nenhum desses períodos tanto para a PAS quanto para a PAD nessas voluntárias normotensas.

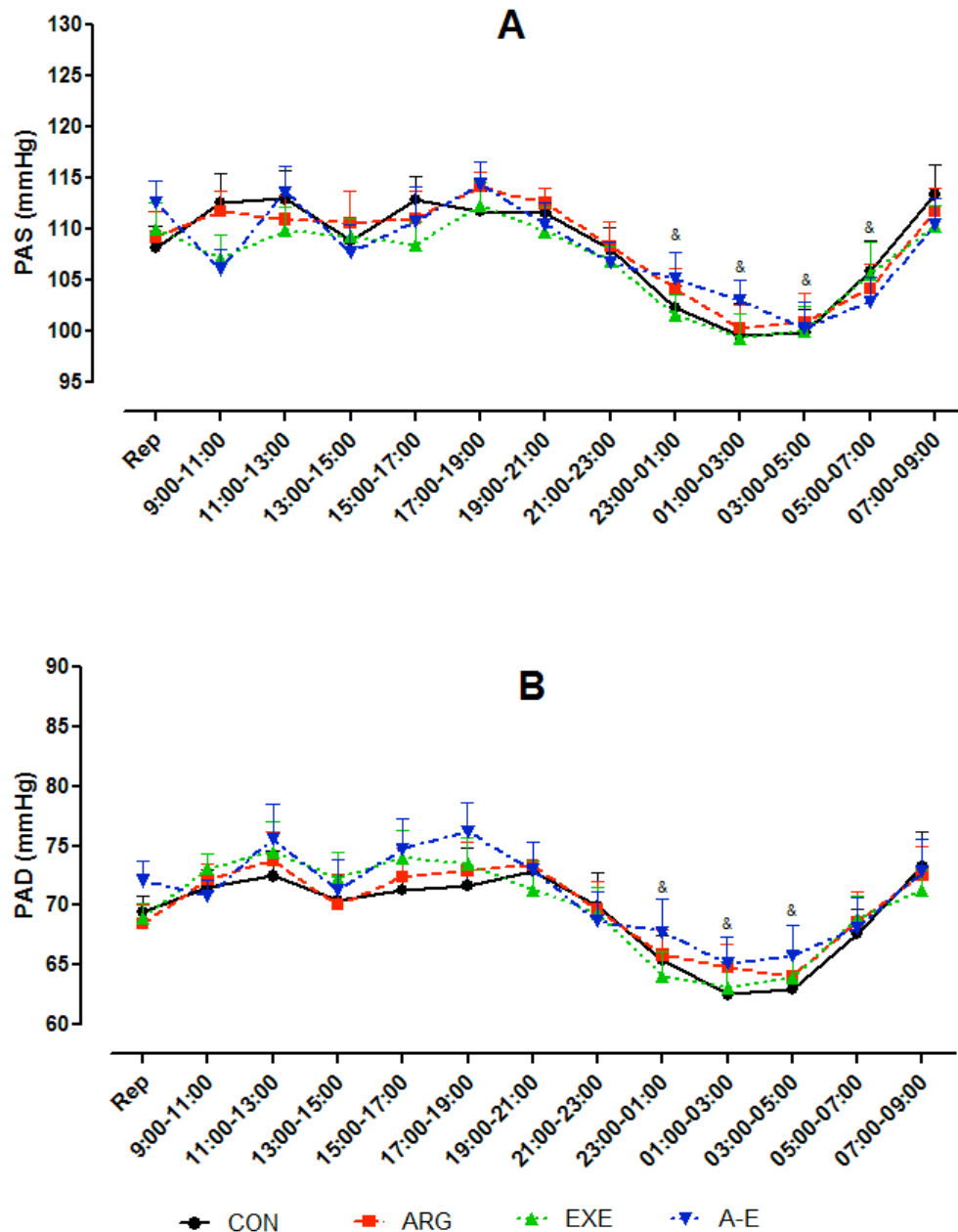


Figura 3: Pressão arterial sistólica (acima), pressão arterial diastólica (abaixo) no período de 24 horas após as quatro sessões experimentais: Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias normotensas (n=16). & p≤ 0,05 em relação ao repouso para todas as sessões (CON, ARG, EXE, A-E). Os valores representam média do delta ± EPM.

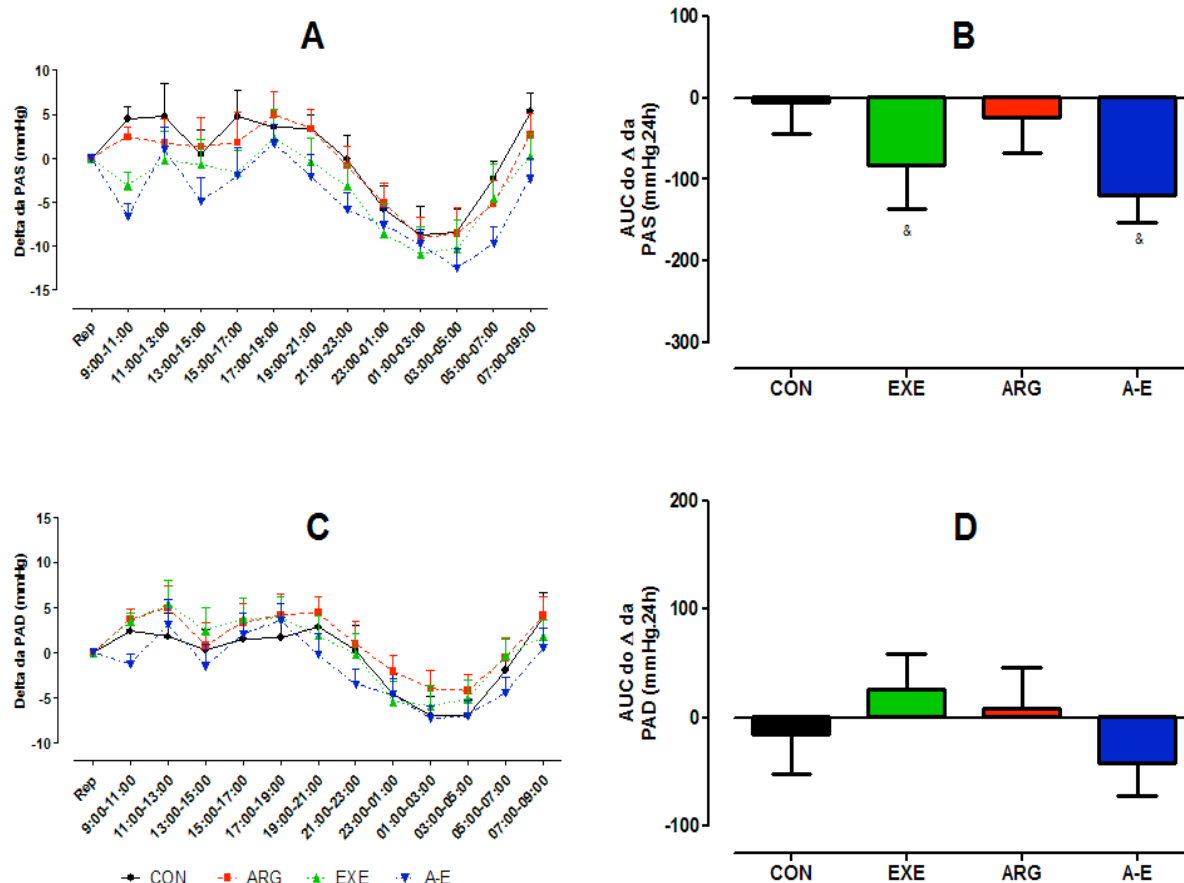


Figura 4: Delta da pressão arterial sistólica (A) e sua respectiva área abaixo da curva (B), delta da pressão arterial diastólica (C) e sua respectiva área abaixo da curva (D) no período de 24 horas após as quatro sessões experimentais: Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias normotensas ($n=16$). $\&$ $p \leq 0,05$ em relação às sessões sem a realização de exercício (CON e ARG). Os valores representam média \pm EPM.

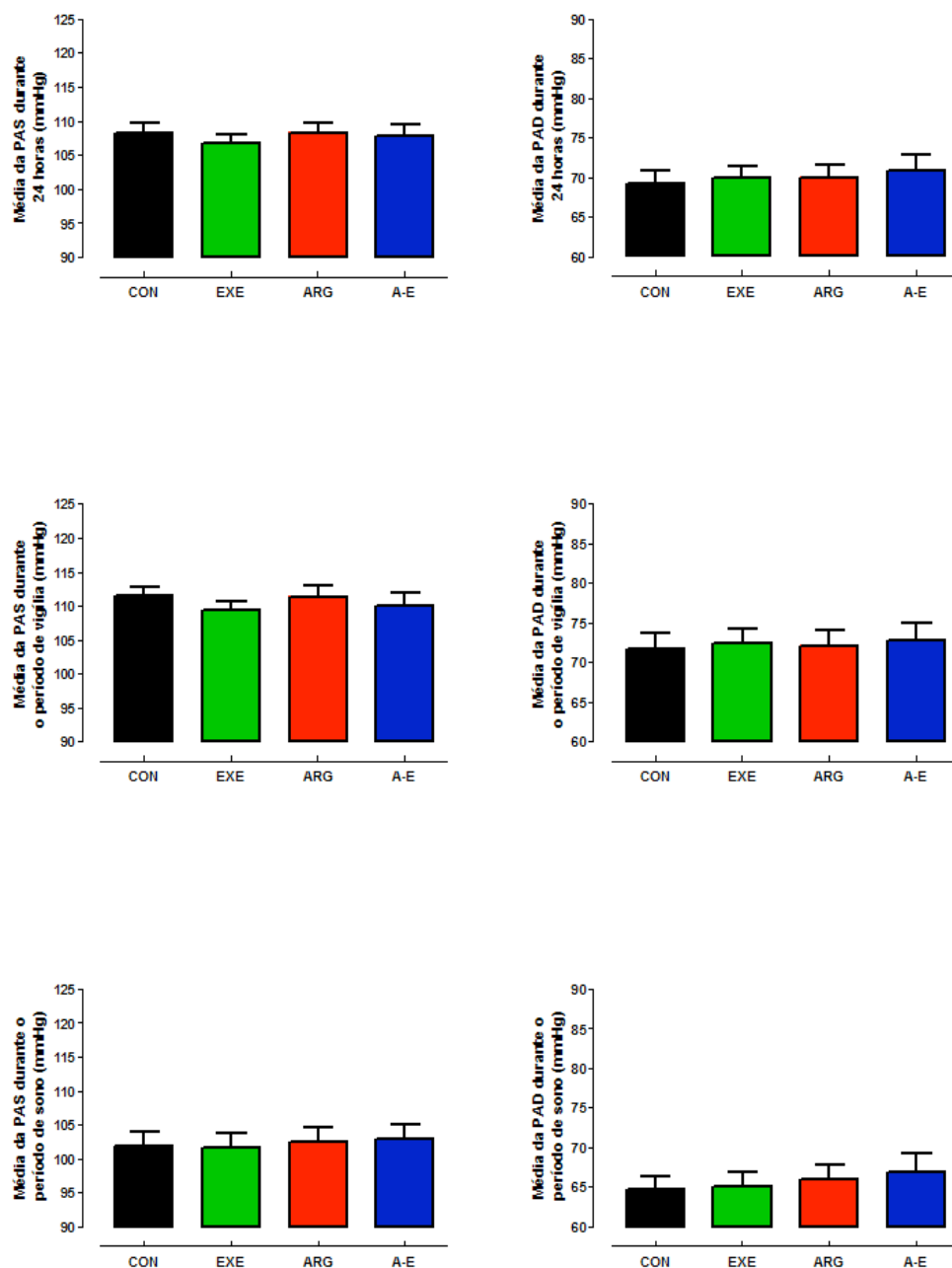


Figura 5: Pressão arterial Sistólica (PAS – coluna da esquerda) e pressão arterial Diastólica (PAD coluna da direita) durante o período total de 24 horas (acima) período de vigília (meio) e período de sono (abaixo) para o grupo de mulheres normotensas (n=16), durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E). Os valores representam média \pm EPM.

10.3 Análises bioquímicas – Nitrito/Nitrato (NOx^-) e Guanosina Monofosfato cíclica (GMPc):

A tabela 6 apresenta as concentrações plasmáticas de Nitrito/Nitrato (NOx^-) durante as quatro sessões experimentais nos períodos de repouso (Rep), imediatamente, 45 min e 90 min após o período de realização do exercício físico. Nenhuma diferença foi encontrada nas mulheres normotensas em todos os pontos. Além disso, a AUC da variação do NOx^- ao longo do tempo não foi diferente entre as sessões experimentais.

Tabela 6: Concentração plasmática de NOx^- (Nitrito/Nitrato) no repouso, imediatamente, (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-90') após a realização do exercício para o grupo de mulheres normotensas (n = 16) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

	NOx^- (μM)			
	Repouso	PE-0'	PE-45'	PE-90'
Normotensas (n = 16)				
CON	7,6 \pm 1,3	7,1 \pm 0,7	6,7 \pm 0,9	5,7 \pm 0,5
ARG	7,8 \pm 0,6	7,7 \pm 0,9	6,5 \pm 0,6	6,1 \pm 0,5
EXE	9,0 \pm 1,1	8,4 \pm 1,0	8,1 \pm 1,0	7,5 \pm 0,8
A-E	8,6 \pm 1,6	8,7 \pm 1,5	8,0 \pm 1,4	8,5 \pm 1,2

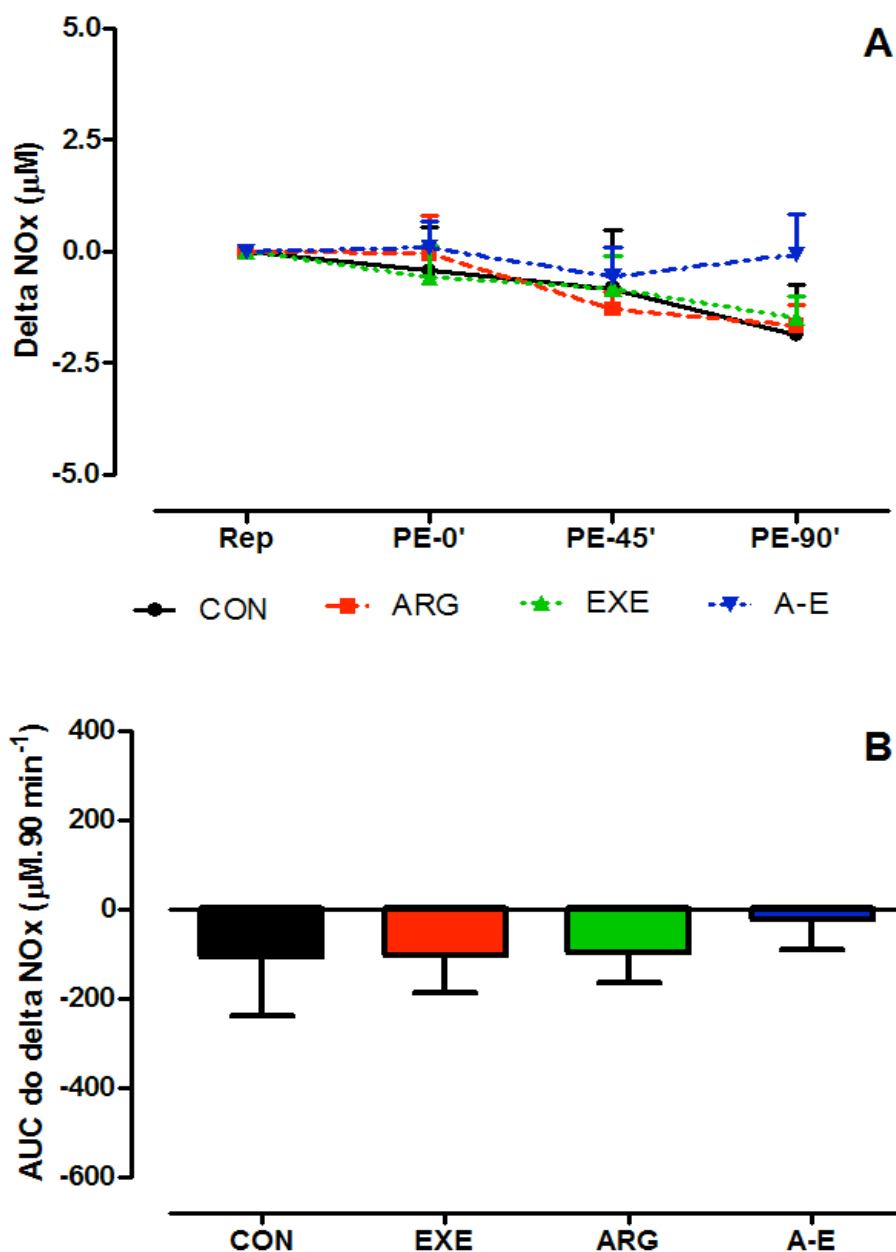


Figura 6: Variação da concentração plasmática de NOx⁻ (Nitrito/Nitrato) no repouso (Rep), imediatamente (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-90') após a o tempo para a realização do exercício (A) para o grupo de mulheres normotensas (n=16) e respectivas área abaixo da curva (AUC) das concentrações de NOx⁻ ao longo do tempo (B) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

A tabela 7 e a figura 7 apresentam os resultados das concentrações plasmáticas de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) durante as quatro sessões experimentais nos períodos de repouso (Rep), imediatamente e 45 min após o período de realização do exercício físico. Nenhuma diferença também foi encontrada nas concentrações entre as

quatro sessões tanto no grupo de mulheres normotensas, assim como não houve diferença entre as AUC da variação do GMPc ao longo do tempo nas quatro sessões experimentais (Figura 7B).

Tabela 7: Concentração plasmática de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) no repouso, imediatamente, (PE-0') e 45 minutos (PE-45') após a realização do exercício para o grupo de mulheres normotensas (n = 16) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

	GMPc (pmol/mL)		
	Repouso	PE-0'	PE-45'
Normotensas (n = 16)			
CON	104,0 ± 11,3	102,2 ± 13,0	100,7 ± 9,4
ARG	110,8 ± 10,2	100,5 ± 9,7	100,7 ± 9,9
EXE	105,0 ± 9,7	111,4 ± 10,0	110,0 ± 18,5
A-E	111,1 ± 15,4	119,0 ± 10,7	127,3 ± 21,1

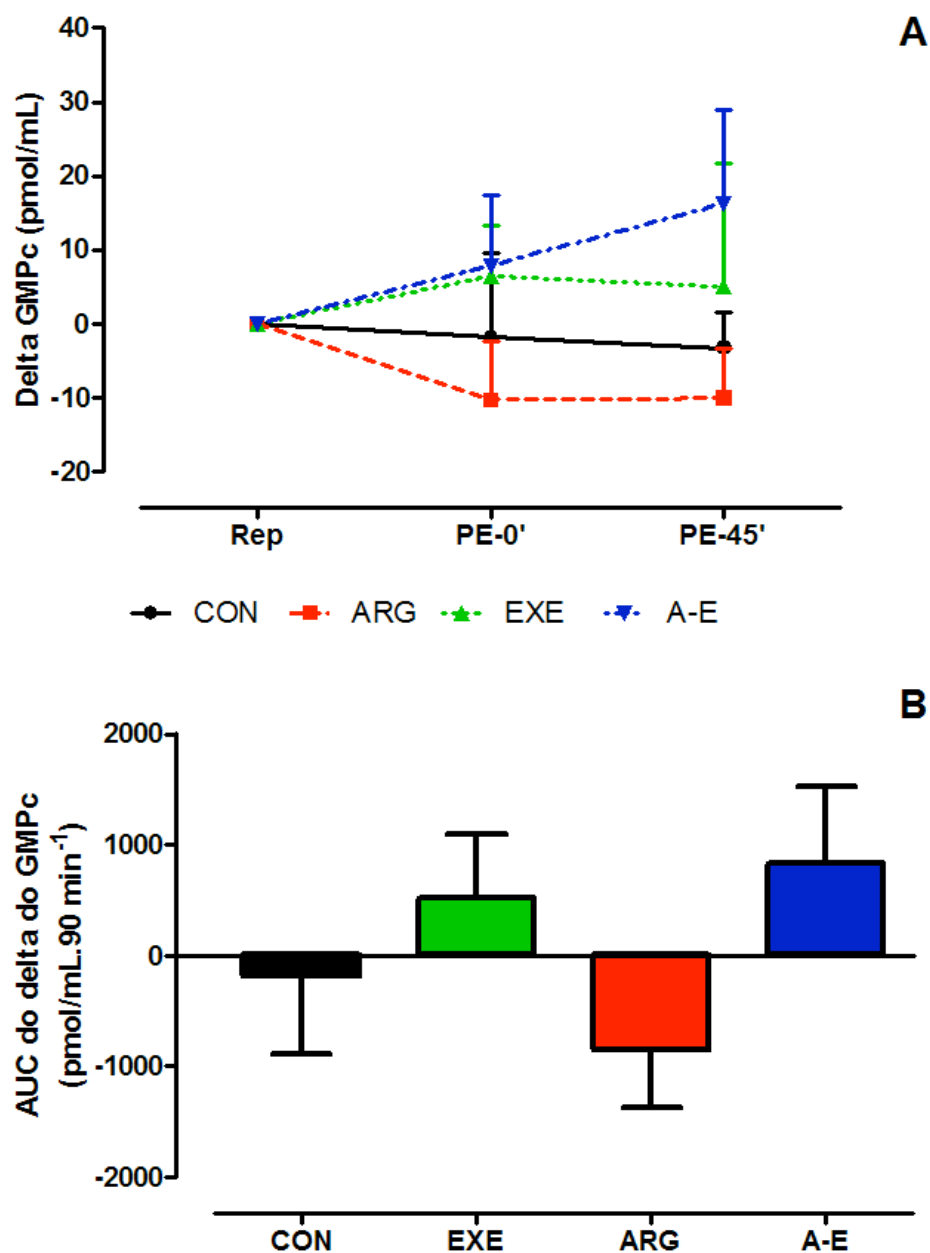


Figura 7: Variação da concentração plasmática de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPC) no repouso (Rep), imediatamente, (PE-0') e 45 minutos (PE-45') após a realização do exercício (A) para o grupo de mulheres normotensas e respectivas área abaixo da curva (AUC) das concentrações de GMPC ao longo do tempo (B) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

10.4 Análises dos marcadores pró e anti-inflamatórias:

As tabelas 8 apresenta os resultados dos marcadores pró e anti-inflamatórios nos períodos de repouso e 45 minutos após o período de realização do exercício físico durante as quatro sessões experimentais no grupo de mulheres normotensas. Nenhuma alteração significativa foi encontrada nas variações (Δ) da interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) entre o repouso e o período após o exercício físico, entre as quatro sessões experimentais. Já os valores plasmático de interleucina-1 beta (IL-1 β) e do fator tumoral de necrose (TNF- α), não foram detectáveis em todos os pontos, pois a maioria das amostras apresentaram leitura abaixo da sensibilidade do Kit comercial utilizado para análise (kit R&D systems).

Tabela 8: Níveis dos marcadores pró e anti-inflamatórios nos períodos de repouso (REP) e 45 minutos após o período de realização do exercício físico (PE) e suas variações (Δ) durante as quatro sessões experimentais agudas em voluntárias normotensas (n=16).

	IL-6 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)		
	Rep	PE-45'	Δ	Rep	PE-45'	Δ
Normotensas (n=16)						
CON	28,4 \pm 2,7	28,2 \pm 2,4	0,16 \pm 1,45	3,3 \pm 0,5	3,0 \pm 0,4	-0,62 \pm 0,34
ARG	29,3 \pm 1,9	28,8 \pm 2,3	0,49 \pm 1,31	4,4 \pm 0,7	4,4 \pm 0,8	0,20 \pm 0,92
EXE	30,2 \pm 2,8	30,0 \pm 2,7	0,18 \pm 0,59	5,5 \pm 0,9	4,9 \pm 0,6	-0,59 \pm 0,93
A-E	31,7 \pm 9,9	34,0 \pm 10,5	2,27 \pm 1,38	3,5 \pm 0,5	3,8 \pm 0,8	0,30 \pm 0,57

10.5 Análises das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (MDA):

Verificamos também em nosso estudo, a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase bem como a concentração de Malodialdeído (MDA), que reflete a peroxidação lipídica, no período de repouso e após 45 minutos, nas quatro sessões experimentais (Tabela 9). Podemos observar que nenhuma alteração ocorreu na atividade da SOD e da catalase entre as quatro sessões experimentais. Além disso, a suplementação de L-arginina associado ao exercício físico também não afetou a peroxidação lipídica, medida pelo MDA em mulheres normotensas.

Tabela 9: Concentrações plasmáticas da enzima Superoxido Dismutase (SOD), da atividade da Catalase e da concentração plasmática de Malondialdeído (MDA) nos períodos de repouso (REP) e 45 minutos após o período de realização do exercício físico (PE) e suas variações (Δ) durante as quatro sessões experimentais agudas em voluntárias normotensas (n=16).

Superóxido dismutase - SOD (U/mL)			
	Rep	PE – 45'	Δ
CON	3,5 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	-0,84 \pm 0,14
ARG	3,3 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	-0,66 \pm 0,20
EXE	3,3 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	-0,57 \pm 0,2
A-E	3,3 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	-0,65 \pm 0,14
Atividade Catalase (nmol/min/mL)			
	Rep	PE – 45'	Δ
CON	38,5 \pm 9,4	41,7 \pm 6,2	12,6 \pm 4,9
ARG	37,1 \pm 5,9	35,9 \pm 4,1	-1,3 \pm 5,8
EXE	40,3 \pm 5,0	36,6 \pm 4,3	-3,6 \pm 6,7
A-E	40,4 \pm 5,1	32,7 \pm 3,0	-7,7 \pm 5,8
Malondialdeído - MDA (μM)			
	Rep	PE – 45'	Δ
CON	4,3 \pm 0,4	3,9 \pm 0,3	-0,44 \pm 0,41
ARG	4,1 \pm 0,3	4,3 \pm 0,3	0,17 \pm 0,36
EXE	5,3 \pm 0,7	4,1 \pm 0,3	-1,22 \pm 0,70
A-E	4,2 \pm 0,3	3,9 \pm 0,3	-0,27 \pm 0,34

11. DISCUSSÃO ESTUDO 2

O estudo 2 teve como principal objetivo analisar as respostas cardiovasculares após exercício aeróbio de 30 minutos realizado na intensidade da MFEL, aliado à suplementação aguda de 9 gramas de L-arginina, em mulheres normotensas no período após a menopausa, e os possíveis mecanismos envolvidos nessas respostas através da avaliação da concentração plasmática de nitrito/nitrato, GMP cíclico, insulina, citocinas pró e anti-inflamatórias: IL-6, IL-10, IL-1 β , atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase e concentração plasmática de malondialdeído (MDA). Os principais resultados encontrados neste estudo foram que o exercício físico promove redução da PAS após sua execução independente da suplementação de L-arginina em voluntárias normotensas durante um período de 90 minutos após a intervenção. Além disso, somente quando associada a suplementação aguda de L-arginina ao exercício físico aeróbio há redução da PAD. Esses efeitos benéficos não foi acompanhado por qualquer alteração nas concentrações de nitrito/nitrato, GMPc, insulina, IL-6 e IL-10 em mulheres normotensas. Nenhuma alteração foi vista também no estado redox, avaliados pelas enzimas antioxidantes (SOD e catalase) e pela peroxidação lipídica através da concentração de MDA.

11.1 Respostas hemodinâmicas à suplementação aguda de L-arginina e ao exercício físico em mulheres normotensas

A suplementação aguda de 9 gramas de L-arginina não alterou as respostas da PAS e PAD durante 24 horas após sua ingestão em nossas voluntárias. Poucos estudos mostraram essas alterações agudas e nosso estudo, em nosso conhecimento, é o primeiro a mostrar as respostas agudas da pressão arterial após a suplementação de L-arginina em mulheres normotensas de meia idade após a menopausa. Alguns autores mostraram resultados semelhantes ao encontrado em nosso estudo. Kawano *et al.* (2002) mostraram que a infusão de 30 gramas de L-arginina por uma hora não altera a pressão arterial média de homens hipercolesterolêmicos de meia idade. Porém nesse estudo os autores mediram a PA apenas uma única vez, e não acompanharam as respostas da PA por um período prolongado como nosso estudo. Porém, apesar de não mostrarem alterações na PA, os autores mostraram efeitos benéficos hemodinâmicos com a suplementação de L-arginina, pois essa intervenção melhorou agudamente a dilatação

dependente do endotélio e aumentou a dilatação mediada pelo fluxo sanguíneo nesses pacientes.

Os resultados do estudo de Sttergren *et al.* (2009) com pacientes diabéticos idosos corroboram também nossos resultados, pois neste estudo os autores também não encontraram alterações da PA 15 e 60 minutos após protocolo de isquemia e reperfusão associado à infusão de 20 mg/min de arginina + 500mg/min de BH₄ por 15 minutos. Neste estudo, os autores também encontraram melhora na função endotelial após o protocolo de isquemia reperfusão, mesmo sem alteração da PA como no estudo supra citado. Nosso estudo não mediu o fluxo sanguíneo ou a dilatação derivada do endotélio durante as sessões experimentais, porém, vários estudos já mostraram que a suplementação aguda de L-arginina de diferentes dosagens e em diferentes populações podem melhorar a dilatação derivada do endotélio e o fluxo sanguíneo (Kawano *et al.*, 2002; Lekakis *et al.*, 2002; Borucki *et al.*, 2009; Sttergren *et al.*, 2009; Álvares *et al.*, 2012), mas nem sempre essa melhora no fluxo sanguíneo é acompanhada de alterações na PA, mostrando que outros mecanismos reguladores da PA no repouso como barorreceptores, atividade simpática, e sistema renina angiotensina estão contra regulando a redução da resistência periférica, causada pela dilatação derivada da maior biodisponibilidade do NO no endotélio vascular, consequente da suplementação aguda de L-arginina.

A falta de resultados benéficos com a suplementação de L-arginina em mulheres após a menopausa normotensas também foi mostrada pelo estudo de Blum *et al.* (2000). Neste estudo a suplementação crônica por um mês, da mesma dosagem de L-arginina utilizada em nosso estudo (9 gramas), em mulheres após a menopausa, não proporcionou melhora na dilatação derivada do endotélio, nem alterações nos níveis plasmáticos de NOx⁻, mesmo com a elevação da concentração plasmática de L-arginina em 80% em relação ao dia placebo, sugerindo que essa suplementação não aumenta a produção de NO derivada do endotélio, e não traz melhoras para essas mulheres após a menopausa, porém, neste estudo os autores não mediram as respostas da PA durante a intervenção.

Apenas um estudo verificou os efeitos agudos da suplementação de L-arginina nas respostas da pressão arterial após o exercício físico. Neste estudo os autores não encontraram alterações na PA após exercício máximo em cicloergômetro em homens com idade média de 57 anos com insuficiência cardíaca (Doutreleau *et al.*, 2005). No entanto, neste estudo os autores mediram a PA somente imediatamente após o exercício, e não acompanharam o comportamento da PA após a intervenção como em nosso estudo. Outro estudo também não encontrou alterações na PA após a suplementação de

L-arginina, porém o exercício utilizado nestes estudos foi o exercício resistido (Greer e Jones, 2011).

A redução da PAS após o exercício aeróbio em indivíduos normotensos já está bem descrito na literatura (Forjaz et al., 2000; MacDonald, 2002; Anunciação e Polito, 2010; Chen e Bonhan 2010). Vários mecanismos podem estar envolvido na redução da PA após a realização de exercícios aeróbios, seja centrais como a atividade barorreflexa (Chen e Bonhan 2010) e redução da atividade simpática (Howard e DiCarlo, 1992; Patil et al., 1993; MacDonald, 2002), ou mecanismos humorais, principalmente derivado a liberação de substâncias vasodilatadoras como a histamina (Barrett-O'Keefe et al., 2013) ou derivadas do endotélio como o NO (Rao et al., 2002; Lizardo et al., 2008, Lee et al., 2009) e prostaciclina (Wilson e Kapoor, 1993; MacDonald 2002). Outro mecanismo que poderia contribuir para a redução da pressão arterial após o exercício físico é o próprio estímulo de hiperemia na musculatura esquelética causado pelo exercício físico (Bangsbo J, Hellsten, 1998; Halliwill, 2013), porém os mecanismos envolvidos nesse fenômeno em humanos ainda não são certos (Halliwill, 2013).

Apesar de trabalhos anteriores em nosso laboratório mostrarem que um dos mecanismos pelos quais o exercício físico exerce efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, tanto em modelos animais (Zanesco e Antunes, 2007; Claudino et al., 2011), como em seres humanos (Zaros et al., 2009; Sponton et al., 2010), é através da via NO/GMPc, no presente estudo não detectamos qualquer alteração nessa via, medidos pelas concentrações plasmáticas de NOx^- e GMPc em mulheres normotensas no climatério. Uma das razões poderia ser devido ao fato de ser apenas uma sessão aguda de exercício físico com intensidade moderada e duração de 30 minutos, assim as possíveis alterações não seriam detectadas tão precocemente. No entanto, vários estudos em humanos não encontraram alterações plasmáticas nos níveis de NOx^- após a suplementação aguda e crônica de L-arginina, mesmo com vários efeitos benéficos na dilatação derivada do endotélio, melhora no fluxo sanguíneo e na resistência periférica (Theilmeier et al., 1997; Baylis et al., 1998, Evans et al., 2004; Forbes e Bell 2011; Álvares et al., 2012). Forbes *et al.* (2011) mostraram que a suplementação aguda de 6 ou 11 gramas de L-arginina não foi capaz de elevar os níveis plasmáticos de NOx^- em jovens saudáveis, mesmo com a elevação da concentração sanguínea de L-arginina em 178% e 204% respectivamente. Doutreleau *et al.* (2005) também não encontraram alterações nos valores plasmáticos de NOx^- após a suplementação aguda de 6 gramas de L-arginina seguida de exercício físico aeróbio máximo em pacientes com insuficiência cardíaca, mesmo com a elevação de mais de 100% da concentração plasmática desse aminoácido.

Tsai *et al.* (2009) mediram os níveis plasmáticos de NOx⁻ durante duas horas após a suplementação de aproximadamente 7,5 gramas de L-arginina e o exercício aeróbio de 60 minutos no cicloergometro, e não encontraram alterações nos níveis desse metabólito do NO em jovens saudáveis. Resultados similares foram mostrados por Álvares *et al.* (2012), que também não encontraram alterações nas concentrações plasmáticas de NOx⁻ no período de até 120 minutos após a suplementação aguda de 6 gramas de L-arginina associada a exercícios resistidos em jovens saudáveis, mesmo com aumento da concentração plasmática de L-arginina e aumento no fluxo sanguíneo na musculatura esquelética. Assim como Tang *et al.* (2011), que não encontraram alterações nos níveis plasmáticos nem de nitrito nem de nitrato após a suplementação de 10 gramas de L-arginina em jovens saudáveis mesmo com aumento de 4 vezes dos níveis sanguíneos de L-arginina, após sessão aguda de exercícios resistidos. Em conjunto, os dados mostram que a suplementação de L-arginina e o exercício físico aeróbio associados ou não, podem promover redução da PAS sem alterações nos marcadores plasmáticos NOx⁻ e GMPc em mulheres normotensas após a menopausa. Enquanto que, a PAD foi reduzida quando ocorreu a associação Exercício físico/L-arginina, mas também não foi detectado qualquer alteração na via NO/GMPc.

O aumento da biodisponibilidade do NO através da suplementação de L-arginina é dependente do quanto desse aminoácido é absorvido e chega a corrente sanguínea e quanto é excretado pelo organismo. Em nosso estudo nós não medimos a concentração plasmática de L-arginina após sua suplementação, porém vários estudos mostraram que a suplementação oral desse aminoácido aumenta sua concentração no sangue, atingindo o pico em aproximadamente 60 minutos, podendo perdurar por várias horas após essa ingestão (Tangphao *et al.*, 1999; Forbes *et al.*, 2011; Closs *et al.*, 2012). Tangphao *et al.* (1999) encontraram um pico de $50 \pm 13 \mu\text{g/mL}$ ou mais de 100% acima dos valores basais de L-arginina em aproximadamente 60 minutos após a suplementação oral de 10 gramas desse aminoácido em homens e mulheres saudáveis entre 20 e 50 anos. Além disso, esses autores não encontraram alterações significantes na excreção renal de arginina após sua administração oral. Resultados similares do tempo necessário para atingir o pico da concentração de arginina no sangue, foram encontrados mesmo com diferentes dosagens. Forbes *et al.* (2011) encontraram em jovens saudáveis que mesmo com a suplementação de baixa ou alta dosagens de arginina (0,075g e 0,15g de arginina por kg de massa corporal ou aproximadamente 6 e 12 gramas respectivamente), as curvas farmacocinéticas apresentaram o mesmo padrão independente da dosagem, atingindo o pico entre 60 e 90 minutos após a suplementação, permanecendo elevadas por até 180

minutos, e significativamente maior que no dia com a suplementação de placebo. Já Tang *et al.* (2011) suplementaram 10 gramas de arginina em jovens saudáveis, e encontraram aumento de 150% dos níveis sanguíneos de arginina 60 minutos após essa ingestão, permanecendo elevados até 180 minutos. Nesse estudo, os autores mostraram que havia uma elevação de mais de 100%, com apenas 30 minutos após a suplementação dessa dose de arginina. Borucki *et al.* (2009) também encontraram o pico de arginina plasmática em 60 minutos mesmo após a ingestão de apenas 2,5 gramas de arginina juntamente com uma refeição rica em gorduras em jovens saudáveis.

Resultados similares na farmacocinética da arginina após sua ingestão também foram encontrados em populações de idosos e com algum tipo de doença cardiovascular. Segundo os resultados de Hambrecht *et al.* (2000), mesmo com baixas dosagens de três e dois gramas de arginina, há uma elevação de 50 a 80% de arginina plasmática acima dos valores basais, na primeira hora após a ingestão em pacientes com insuficiência cardíaca, e essa elevação é independente do horário do dia, ou da suplementação crônica (8 g/dia por 4 semanas) prévia. Já Closs *et al.* (2012) recentemente mostraram que a mesma dosagem de suplementação de arginina utilizada em nosso estudo (9 gramas), porém em adultos jovens com angina (37 anos de idade), elevou a concentração de arginina plasmática por 180 minutos, atingindo o valor máximo com 60 minutos, porém com valores elevados já nos 30 minutos e permanecendo com níveis similares até 90 minutos após a ingestão. Esses resultados mostram que a suplementação de 9 gramas de L-arginina utilizada em nosso estudo foi suficiente para aumentar em mais de 100% os níveis sanguíneos desse aminoácido após 60 minutos e perdurar por até 180 minutos elevados após sua ingestão.

Nosso estudo também investigou uma possível via alternativa que poderia promover o aumento do estímulo vasodilatador e conseqüente redução da resistência periférica e PA através da liberação de insulina pelo pâncreas. A Insulina é um hormônio produzido e secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e desempenha papel muito importante na manutenção da homeostase celular de glicose, na sinalização anabólica e no crescimento e diferenciação celular. Ela regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumento na síntese de proteínas e diminuição na sua degradação (Wilson e Foster, 1992, Cavalheira *et al.*, 2002). A secreção de insulina ocorre principalmente em resposta ao aumento dos níveis

circulantes não só de glicose mas também de aminoácidos pós-prandial. Além de desempenhar esses importantes papéis endócrino-metabólico, a insulina pode também atuar como substância vasodilatadora, participando na regulação do fluxo sanguíneo da musculatura esquelética. A insulina possui ação vasodilatadora tanto agindo diretamente nos vasos, quanto estimulando a produção de NO pelo endotélio vascular (Steinberg et al., 1994; Kohlhaas et al., 2011).

O estímulo vasodilatador da insulina per se resulta em cerca de 20% de resposta relaxante, ou seja, sua ação agonista nos vasos é pequena, principalmente em concentrações fisiológicas normais de jejum. No entanto, sua ação é aumentada em situações pós prandial, quando a sua concentração e a de glicose estão elevadas (Ueda et al., 1998). Esse efeito vasodilatador pode contribuir com uma parcela na redistribuição do fluxo sanguíneo e aumento da captação de glicose na musculatura esquelética. Por outro lado, essa ação apresenta-se comprometida em indivíduos que possuem resistência a insulina ou algum comprometimento no endotélio (Steinberg et al., 1994; Ueda et al., 1998; Kohlhaas et al., 2011).

A relação entre as concentrações de insulina e efeitos da via L-arginina/NO parecem potencializar as respostas vasodilatadoras derivadas do endotélio. Dallinger et al., (2003) verificaram que os efeitos vasodilatadores da infusão de L-arginina são aumentados na presença de insulina endógena em homens saudáveis jovens. Resultados similares foram encontrados avaliando homens e mulheres idosas, onde foi demonstrado que a infusão de L-arginina estimulou o aumento do fluxo sanguíneo derivado da ação da insulina (Meneilly et al., 2001). Além disso, a Insulina estimula o transporte de L-arginina, aumentando o suprimento desse aminoácido, via mecanismo dependente da PI3k-Akt, o qual contribui para o estímulo da síntese de NO. O estímulo da síntese de NO pela insulina é resultado da ativação da via PI3K na Akt e subsequente fosforização e ativação da eNOS na posição Ser1177 e Ser615 (Kohlhaas et al., 2011).

O estudo de Giugliano *et al.* (1997a) mostrou que a infusão de 1 g/min por 30 minutos de L-arginina em jovens saudáveis aumentou o fluxo sanguíneo da perna em aproximadamente 40%, e reduziu em 11 e 8 mmHg a PAS e PAD respectivamente nos primeiros 30 minutos após a infusão desse aminoácido. Esses efeitos hemodinâmicos foram revertidos quando infundido a mesma quantidade de L-arginina com adição de octreotide, um bloqueador da secreção de insulina e glucagon pelo pâncreas, mostrando que a insulina teve um papel importante nessas respostas. Esse mesmo grupo mostrou também que a infusão de L-arginina 1 g/min por 30 minutos reverte a disfunção endotelial,

mediada pela falha na produção de NO, causada pela hiperglicemia, revertendo a elevação na PAS e PAD e aumentando o fluxo sanguíneo local. (Giugliano et al., 1997b).

Em contrapartida aos efeitos vasodilatadores da insulina, esse hormônio pode também aumentar a atividade do nervo simpática muscular, elevando a liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso central na musculatura esquelética (Hausberg et al., 1995). Esse estímulo poderia levar a uma redução de fluxo sanguíneo e aumento da pressão arterial, porém esse aumento da atividade simpática nem sempre resulta no aumento da pressão arterial (Hausberg et al., 1995; Forjaz et al., 1999). De fato alguns estudos mostraram que a infusão de insulina eleva a atividade do nervo simpático muscular, mas não altera o fluxo sanguíneo, pois possivelmente essa elevação simpática contrapõe os efeitos vasodilatadores da insulina mencionados acima.

Em nosso estudo, nós verificamos que tanto o exercício físico quanto a suplementação com L-arginina não modificaram as concentrações de insulina plasmática nas voluntárias normotensas (Figura 8). Os valores de insulinemia de repouso foi maior que os pontos imediatamente (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-(90')) após a realização do exercício. Cabe salientar que um dos critérios de inclusão em nosso estudo era não ser diabética, para evitar fatores de confusão na proposta do trabalho que foi verificar os efeitos da suplementação e exercício físico somente em voluntárias após a menopausa. Além disso, os valores insulinêmicos estavam elevados no período de repouso (Rep) porque as voluntárias estavam no período pós-prandial do jejum ao chegarem ao laboratório para realizarem todas as sessões experimentais.

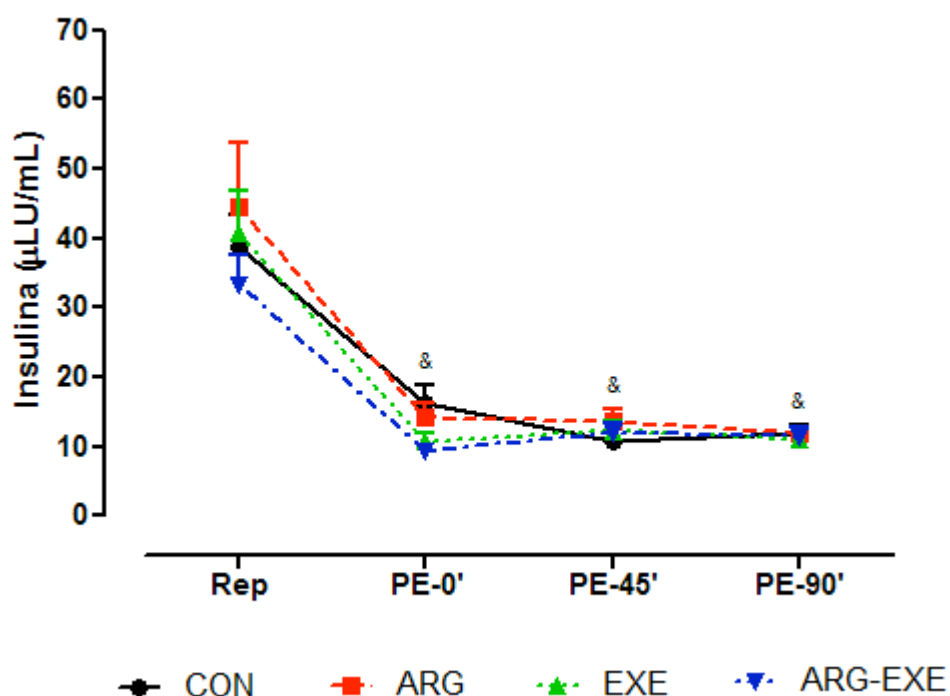


Figura 8: Valores plasmáticos insulina no repouso (Rep), imediatamente, (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-90') após a realização do exercício para o grupo de mulheres normotensas (n=16) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E). & p<0,05 em relação ao repouso em todas as sessões.

Assim esses resultados mostram que agudamente a suplementação de arginina e o exercício físico aeróbico não foram capazes de alterar as concentrações plasmáticas desse hormônio significativamente, apesar da L-arginina ser considerada um secretagogo de insulina em protocolos experimentais (Natali et al., 1990; Thams e Capito, 1999). Além disso, o estado pós prandial das voluntárias pode ter mascarado os possíveis estímulos da suplementação de L-arginina na insulinemia. As refeições realizadas pelas voluntárias no jejum eram ricas em carboidratos, e o carboidrato é um estimulador da liberação de insulina muito mais potente que os aminoácidos, elevando as concentrações de insulina plasmática a valores muito maiores do que a suplementação desse aminoácido poderia elevar. Assim nós acreditamos que em nosso estudo tanto a vasodilatação mediada pela insulina, quanto o possível aumento da atividade do nervo simpático muscular, podem não ter contribuído significativamente para as diferenças nas respostas da pressão arterial encontradas entre as sessões experimentais.

11.2 Análise dos marcadores pró e anti-inflamatórios nas voluntárias normotensas:

Nosso estudo investigou não somente a relação entre os sistemas pró e anti-inflamatórios com o exercício físico, mas também se o aumento da biodisponibilidade de NO através da suplementação aguda de L-arginina atuaria também nesse sistema, pois o NO desempenha importante papel na modulação da resposta inflamatória reduzindo algumas citocinas como a IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ (Steensberg et al., 2007; Pedersen e Febbraio, 2008; Mussi et al., 2008).

Nenhuma alteração nas concentrações das citocinas anti-inflamatórias IL-6 e IL-10 foram encontradas entre as 4 sessões experimentais agudas nas mulheres pós menopausadas normotensas. Já as citocinas pró inflamatórias $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 β não apresentaram leitura de absorbância com os kit de ELISA utilizados, demonstrando que as concentrações estavam muito abaixo das concentrações apresentadas na curva padrão encontrada no kit.

Alguns estudos demonstraram que a suplementação de L-arginina exerce efeito protetor na função endotelial, principalmente melhorando a dilatação dependente do endotélio, mas também na inibição da agregação plaquetária, de moléculas de adesão no endotélio e da concentração de células mediadores do processo inflamatório como leucócitos (Adams et al., 1997; Wolf et al., 1997; Lerman et al., 1998; Blum et al., 2000; Martina et al., 2008). Porém, nosso estudo é um dos poucos a mostrar os efeitos agudos da suplementação de L-arginina aliada ao exercício aeróbio nas concentrações plasmáticas de citocinas pró e anti-inflamatórias, em mulheres após a menopausa.

Colagrande *et al.* (2006) apresentaram resultados diferentes ao encontrado em nosso estudo, pois esses autores mostraram que a adição de 7,5 gramas de L-arginina em uma solução de cardioplegia reduziu a concentração plasmática de IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ em pacientes que foram submetidos a cirurgia arterial coronariana, comparado com os pacientes que receberam a solução de cardioplegia sem adição de L-arginina. Porém, nesse estudo os autores mediram os níveis plasmáticos em tempo diferente ao dosado em nosso estudo (15 minutos após a infusão) e utilizaram uma população de cardiopatas com estágio avançado de comprometimento no sistema cardiovascular, e possivelmente com níveis de inflamação elevados.

Já a suplementação crônica de L-arginina por 6 meses, em pacientes idosos cardiopatas, reduziu as concentrações plasmáticas de IL-6 em 50% e em 20% de MCP-1 (um marcador importante no processo de disfunção endotelial), porém sem alterações nos

níveis de $\text{TNF}\alpha$ (Lucotti et al 2009). No entanto, outro estudo mostrou que a suplementação crônica de L-arginina, pelo mesmo período, apesar de reduzir as concentrações das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em aproximadamente 10%, não alterou as concentrações de IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ em comparação com a suplementação de placebo em pacientes hipertensos e diabéticos (Martina et al., 2008).

Nosso estudo mostrou que a associação da suplementação de L-arginina e o desempenho de exercício físico aeróbio, não provocaram alterações nas concentrações de IL-6 e IL-10 nessas mulheres pós menopausadas. A produção de NO induzida pelo exercício físico pode modular a expressão de RNAm da IL-6, aumentando a atividade e liberação desta citocina, mostrando que o NO está envolvido na liberação de IL-6 pela musculatura esquelética induzida pelo exercício físico, estimulando o aumento da concentração de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, e inibindo a liberação de citocinas pró inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1- β (Steensberg et al., 2007; Pedersen e Febbraio, 2008). Isso deve-se principalmente pela redução de receptores da via da inflamação *Toll like* (TLRs) e da sinalização do processo inflamatório mediada pelo NF κ B, e produção de EROs (Pedersen e Febbraio, 2008; Sprague e Khalil, 2009; Gleeson et al., 2011).

A IL-6 pode aumentar em até 100 vezes seus níveis plasmáticos após o exercício físico aeróbio, porém isso é dependente da intensidade e duração desse exercício. Esse aumento pode ser exponencial durante o exercício, podendo atingir seu pico no momento final ou alguns minutos após seu interrompimento. Além disso, logo após atingir seu pico, próximo ao final do exercício, a concentração de IL-6 pode reduzir drasticamente, a níveis pré exercício (Pedersen e Febbraio, 2008; Sprague e Khalil, 2009; Gleeson et al., 2011). Esse comportamento da IL-6 poderia explicar a ausência de alteração nos níveis plasmáticos de IL-6 em nosso estudo, pois todas as variáveis estudadas foram medidas com 45 minutos após o final do exercício. No entanto, em nosso estudo piloto também não foram encontradas alterações plasmáticas de IL-6 em 5 voluntárias nos momentos imediatamente, 45 e 90 minutos após a realização do exercício físico. Além disso, as concentrações plasmáticas da citocina anti-inflamatória IL-10 também não foram alteradas pois sua resposta ao exercício físico parece estar ligada às respostas da IL-6 (Pedersen e Febbraio, 2008; Gleeson et al., 2011).

O estímulo da liberação da IL-6 pela musculatura esquelética durante o exercício é muito dependente da intensidade e duração do exercício, sendo que exercício de duração longa, principalmente acima de uma hora, e de maiores intensidade, promovem maiores liberações de IL-6 e conseqüentemente maior estímulo de liberação de IL-10 durante e após o exercício (Pedersen e Febbraio, 2008; Gleeson et al., 2011). Esse fator pode

também ter contribuído para a ausência de alteração das concentrações dessas citocinas em nosso estudo, pois as voluntárias realizaram 30 minutos de exercícios em intensidade moderada.

Conceição *et al.* (2012), assim como em nosso estudo, não encontraram alterações nas concentrações plasmáticas de IL-10 e IL-6 após exercícios excêntricos de flexção de cotovelo em mulheres após a menopausa, que foram medidas imediatamente após, e 24, 48 e 72 horas após o exercício. De maneira similar, outro estudo também não encontrou alterações nas concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 em mulheres normotensas, porém jovens, após exercício físico aeróbio em cicloergometro, mesmo encontrando aumento do MCP-1 (quimiocina pró inflamatória) e melhora na função dos neutrófilos (García *et al.*, 2011). Recentemente Izzicupo *et al.* (2012) mostraram que a prática regular de atividade física também não promove alterações nas concentrações plasmáticas de citocinas pró e anti-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-10 em mulheres após a menopausa hipertensas e normotensas. Neste estudo os autores não avaliaram as concentrações de IL-6 nessas voluntárias.

11.3 Análise das enzimas antioxidantes – Superóxido Dismutase (SOD), Catalase e Malondialdeído (MDA) nas voluntárias normotensas:

O nosso organismo está constantemente produzindo espécies reativas ao oxigênio (EROs) através de fontes endógenas e exógenas, as quais participam de vários processos fisiológicos de sinalização e regulação da função celular. Por outro lado, um eficiente sistema enzimático e não enzimático antioxidante existe em nosso organismos desempenhando a função de manutenção do equilíbrio redox, reduzindo as EROS formada produtos neutros. Em situações patológicas, acredita-se que excessiva quantidades de EROs são produzidas e estes por sua vez promovem efeitos deletérios sobre as células levando ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas como as doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas (Cohen e Tong, 2010; Föstermann, 2010). Assim, um desbalanço entre o sistema oxidante e antioxidante podem contribuir para o agravamento de lesões e disfunções celulares ocasionando danos importantes em nosso organismo. No sistema cardiovascular, excessiva produção de EROs ou ineficiência da defesa antioxidante podem causar disfunções no endotélio que podem levar ao desenvolvimento do processo de aterosclerose bem como hipertensão arterial (Föstermann, 2010). Além disso, evidências mostram que uma associação entre a maior incidência de hipertensão arterial em mulheres após a menopausa, e a redução das

defesas antioxidantes e/ou aumento do estresse oxidativo, pelo desbalanço entre a razão estrógeno/andrógeno (Simkin-Silverman et al., 2003; Yang e Reckelhoff, 2011; Sánchez-Rodriguez et al., 2012).

Nosso estudo avaliou a atividade plasmática da Superóxido dismutase (SOD) e da catalase frente as quatro sessões experimentais agudas. As enzimas SOD e catalase participam diretamente do processo de controle antioxidante impedindo a formação e ação deletéria das EROs. A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do anion superoxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a catalase participa na ação de decomposição e redução do H_2O_2 a H_2O mais O_2 (Ferreira e Matsubara, 1997; Finkel e Holbrook, 2000). Nossos resultados mostraram que a atividade das enzimas SOD e catalase não estavam alteradas, e que a suplementação aguda de L-arginina, ou a realização do exercício físico aeróbio, também não afetaram a atividade dessas enzimas. Com relação a peroxidação lipídica, de maneira similar às enzimas antioxidantes, não verificamos qualquer alteração nos níveis plasmáticos de MDA após as intervenções, mostrando que essas intervenções não alteraram esse marcador da peroxidação lipídica.

Em modelo animal alguns estudos mostram que a suplementação ou infusão de L-arginina reduz a atividade da xantina oxidase em produzir EROs, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e reduz o marcador da peroxidação lipídica, melhorando o estresse oxidativo induzido tanto por mecanismo patológicos, quanto pela aceleração da via respiratória induzida pelo exercício físico (El-Missiry, Othman e Amer, 2004; Huang, Tsai e Lin, 2008).

Já os resultados agudos da suplementação de L-arginina aliada ou não ao exercício físico em humanos ainda carece de mais estudos. Kawano *et al.* (2002) mostraram que a infusão venosa de 30 gramas de L-arginina durante uma hora melhorou a função endotelial derivada do NO, e essa substância melhorou o sistema antioxidante, pois reduziu o marcador da peroxidação lipídica em 30%, medida pela concentração de TBARS, em homens adultos hipercolesterolêmicos. É importante ressaltar que neste estudo o grupo controle composto de homens saudáveis apresentava valores de TBARS, 30% menores em repouso do que o grupo de homens hipercolesterolêmicos, pois nesse último grupo, os pacientes já possuíam algum comprometimento na função endotelial causada pela patologia. Por isso, a L-arginina somente produziu efeito nos indivíduos com níveis elevados desse marcador da peroxidação lipídica. Esse efeito protetor da L-arginina/NO na função endotelial também foi mostrado por Lin *et al.* (2008). Nesse estudo a ingestão de uma refeição hiperlipídica aumentou a liberação de da enzima glutathione peroxidase (enzima que desempenha papel similar a da catalase no sistema anti

oxidante), porém quando houve adição de 15 gramas de L-arginina nessa refeição, há redução na liberação desta enzima antioxidante mostrando um efeito protetor dessa suplementação contra o desenvolvimento de aterosclerose e na função endotelial.

Os efeitos da associação entre L-arginina e exercício físico e equilíbrio redox são encontrados mais em estudos com protocolos crônicos. Recentemente, um estudo avaliando jovens com diabetes tipo 1 demonstrou que a suplementação de 7 gramas de L-arginina por 7 dias não alterava as concentrações de MDA após a realização de exercício aeróbio, tanto em indivíduos com diabetes quanto em indivíduos saudáveis (grupo controle) (Fayhs et al., 2012). Por outro lado, um estudo avaliando homens cardiopatas (entre 40 e 70 anos) demonstrou que a suplementação crônica de 3 gramas de L-arginina aumentava a atividade da SOD e reduzia a atividade da xantina oxidase (uma enzima produtora de EROs) e de MDA (Tripathi e Misra, 2009; Tripathi, Chandra, Misra 2010). De maneira similar, a suplementação de 6 e 12 gramas de L-arginina por 4 semanas em homens e mulheres de meia idade com doença arterial periférica aterosclerótica, aumentou os níveis de NO em mais de 2 vezes e o status antioxidante total (medido pelo incubamento das células sanguíneas e formação de radicais livres) em aproximadamente 50% (Jablecka et al 2004). Por outro lado, Sureta et al. (2009) não encontraram alterações nas concentrações de MDA após a realização aguda de exercícios aeróbios em jovens saudáveis e com a suplementação de L-citrulina (aminoácido que pode ser convertido em L-arginina), mesmo com o aumento das concentrações plasmáticas de L-arginina e de nitrito nas células dos neutrófilos desses indivíduos, mostrando uma possível proteção do aumento da biodisponibilidade do NO contra a peroxidação lipídica. Esse estudo, no entanto, possui uma limitação importante pois não houve um grupo controle para comparação dessas respostas. Já Marchesi et al., (2001) mostraram que a suplementação oral de 6 gramas de L-arginina durante 10 dias em homens jovens, não produziu alterações significantes nas concentrações de glutathione peroxidase, após a ingestão de uma refeição hiperlipídica, mesmo com melhora no fluxo sanguíneo, mostrando que essa suplementação não produziu efeitos benéficos no sistema antioxidante para essa população. Outro estudo interessante mostrou que a suplementação diária de 8,3 gramas de L-arginina por 21 dias aumentou as concentrações plasmática de SOD mediada pelo treinamento com exercícios físicos (Lucotti et al., 2006) em pacientes diabéticos obesos.

Apesar desses estudos citados acima demonstrarem alguns efeitos benéficos da suplementação de L-arginina na melhora do sistema antioxidante e combate à produção de EROs, nosso estudo é um dos primeiros a demonstrar os efeitos agudo da

suplementação de L-arginina aliada ou não ao exercício físico em mulheres pós-menopausadas normotensas.

12. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

A tabela abaixo apresenta o resumo dos principais resultados encontrados no estudo em relação à sessão aguda controle (CON).

Tabela 10: resumo dos principais resultados do estudo 2

	Normotensas		
	ARG	EXE	A-E
PAS 90 min	↔	↓	↓
PAD 90 min	↔	↔	↓
AUC PAS 90 min	↔	↓	↓
AUC PAD 90 min	↔	↓	↓
PAS MAPA	↔	↔	↔
PAD MAPA	↔	↔	↔
AUC PAS MAPA	↔	↓	↓
AUC PAD MAPA	↔	↔	↔
Média MAPA PAS 24h	↔	↔	↔
Média MAPA PAD 24h	↔	↔	↔
Média MAPA PAS Vigília	↔	↔	↔
Média MAPA PAD Vigília	↔	↔	↔
Média MAPA PAS Sono	↔	↔	↔
Média MAPA PAD Sono	↔	↔	↔
NOx ⁻	↔	↔	↔
GMPc	↔	↔	↔
Insulina	↔	↔	↔
SOD	↔	↔	↔
Catalase	↔	↔	↔
MDA	↔	↔	↔
IL-6	↔	↔	↔
IL-10	↔	↔	↔
TNF- α	-	-	-
IL-1 β	-	-	-

↔ Sem alteração

↓ Redução

↓↓ Grande redução

- Valores não encontrados

13. CONCLUSÃO ESTUDO 2:

Mulheres normotensas após a menopausa submetidas a exercício agudo e administração de L-arginina apresentam redução de PAD que não está acompanhada a qualquer alteração da via NO/GMPc, níveis plasmáticos de citocinas pró e anti-inflamatórias bem como alteração do balanço redox .

14. LIMITAÇÕES DO ESTUDO 2

Nosso estudo não mediu a concentração plasmática de L-arginina nem o fluxo sanguíneo ou dilatação derivada do endotélio durante as sessões agudas.

15. RESULTADOS ESTUDO 3 – AVALIAÇÃO DAS VOLUNTÁRIAS HIPERTENSAS

15.1 *Medidas da Pressão Arterial para as voluntárias hipertensas (HT): método convencional*

As características antropométricas, cardiovasculares, perfil lipídico e marcadores cardioinflamatórios estão demonstradas no estudo 1.

Os resultados da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) durante o período em que as voluntárias hipertensas permaneceram no laboratório nas quatro sessões experimentais agudas (n=17) estão apresentados na figura 9 e 10. Fizemos as comparações entre as quatro sessões, e posteriormente a evolução dos valores no tempo em cada sessão em relação ao repouso e pré-exercício.

Os valores de PAS tanto no repouso quanto no momento pré exercício não foram diferentes entre as quatro sessões experimentais. Já nos momentos após o tempo destinado para execução do exercício tanto nas sessões CON quando ARG foram maiores que nas sessões EXE e A-E em todos os pontos (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos). Apenas no minuto 60 a sessão CON também foi maior que na sessão ARG.

Na sessão CON os valores de PAS foram maiores em todos os pontos (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos) após o tempo destinado para execução do exercício em relação ao repouso, porém não foram diferentes do momento pré exercício com exceção do minuto 75. Já na sessão ARG tanto o pré exercício quanto os minutos 75 e 90 foram maiores em relação ao repouso, sem nenhuma diferença dos pontos em relação ao pré exercício.

Os valores de PAS em ambas as sessões EXE e A-E foram maiores no pré exercício em relação ao repouso, e foram menores que os valores tanto de repouso quanto de pré exercício em todos os pontos (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos) com exceção dos minutos 75 e 90 na sessão A-E que não foram diferentes que a PAS no repouso.

Os valores de PAD tanto no repouso quanto no pré exercício também não foram diferentes entre as quatro sessões. Apenas nos minutos 30, 45 e 60 na sessão A-E, a PAD foi menor que na sessão CON, sem diferença entre as outras sessões nos outros momentos.

Na sessão CON tanto no momento pré exercício quanto nos momentos após o tempo destinado para execução do exercício, a PAD foi maior que a de repouso, e nos minutos 75 e 90, também maiores que a PAD pré exercício. Na sessão ARG todos os momentos apresentaram valores de PAD também maiores em relação ao repouso, com

exceção do minuto 45. Já na sessão EXE a PAD do pré exercício e do minuto 90 após o exercício foram maiores que o repouso, sem diferença em relação ao pré exercício. E na sessão A-E os minutos 30 e 45 após o exercício foram menores que o pré exercício, sem diferença com o valor pré exercício.

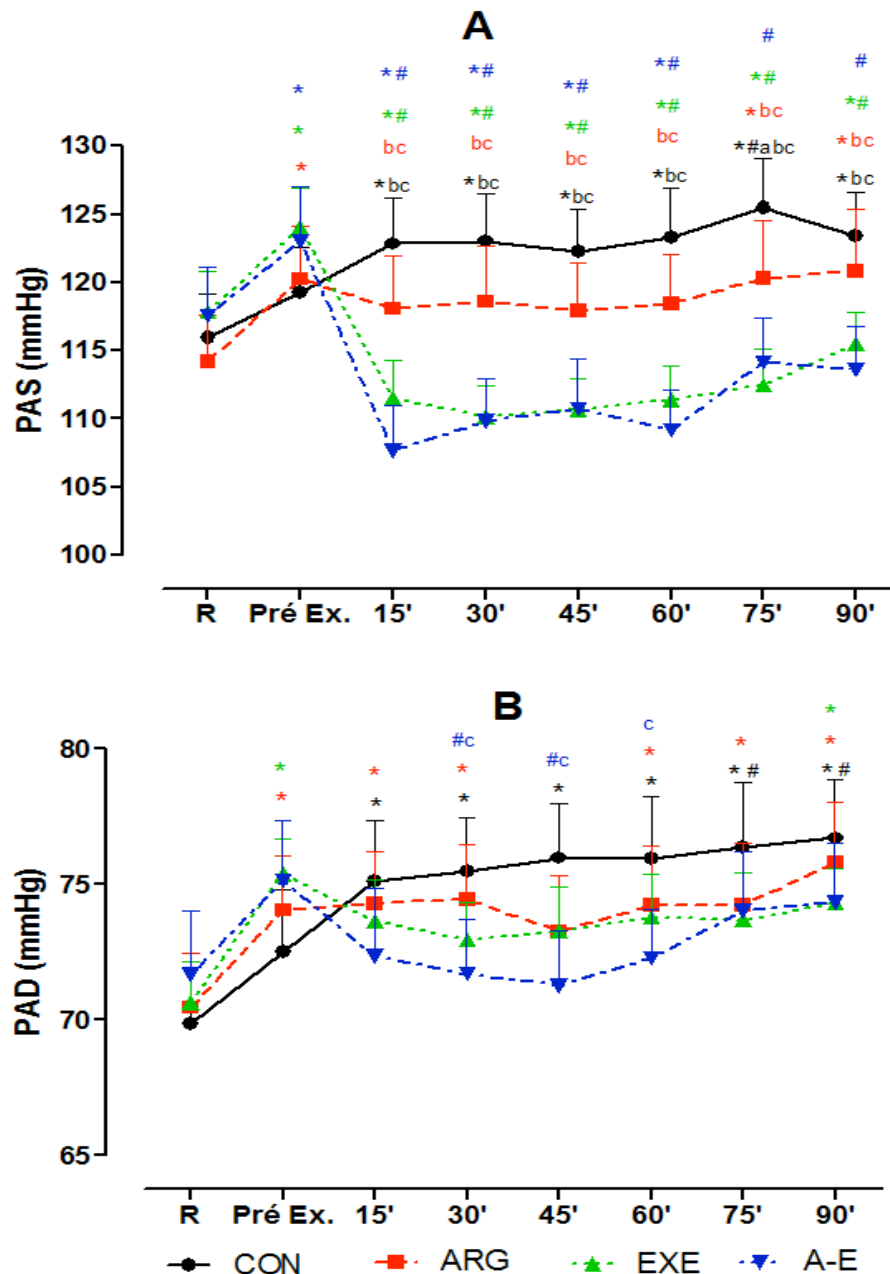


Figura 9: Pressão arterial sistólica (A) e Pressão arterial diastólica (B) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias hipertensas (n=17) nos momentos: Repouso (R), pré exercício (Pré Ex.) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após exercício. * $p \leq 0,05$ em relação ao R; # $p \leq 0,05$ em relação ao Pré Ex.; ^a $p \leq 0,05$ em relação à sessão ARG, ^b $p \leq 0,05$ em relação à sessão EXE; ^c $p \leq 0,05$ em relação à sessão A-E. Os valores estão representam média \pm EPM.

A ANOVA two way mostrou interação entre a suplementação de L-arginina e o exercício físico nas AUC da variação tanto da PAS quanto da PAD nas voluntárias hipertensas (Figura 10). Em ambas as pressões sistólica e diastólica, a AUC das sessões ARG, EXE e A-E foram menores em relação à sessão CON, e além disso a AUC das sessões EXE e A-E foram menores que na sessão ARG.

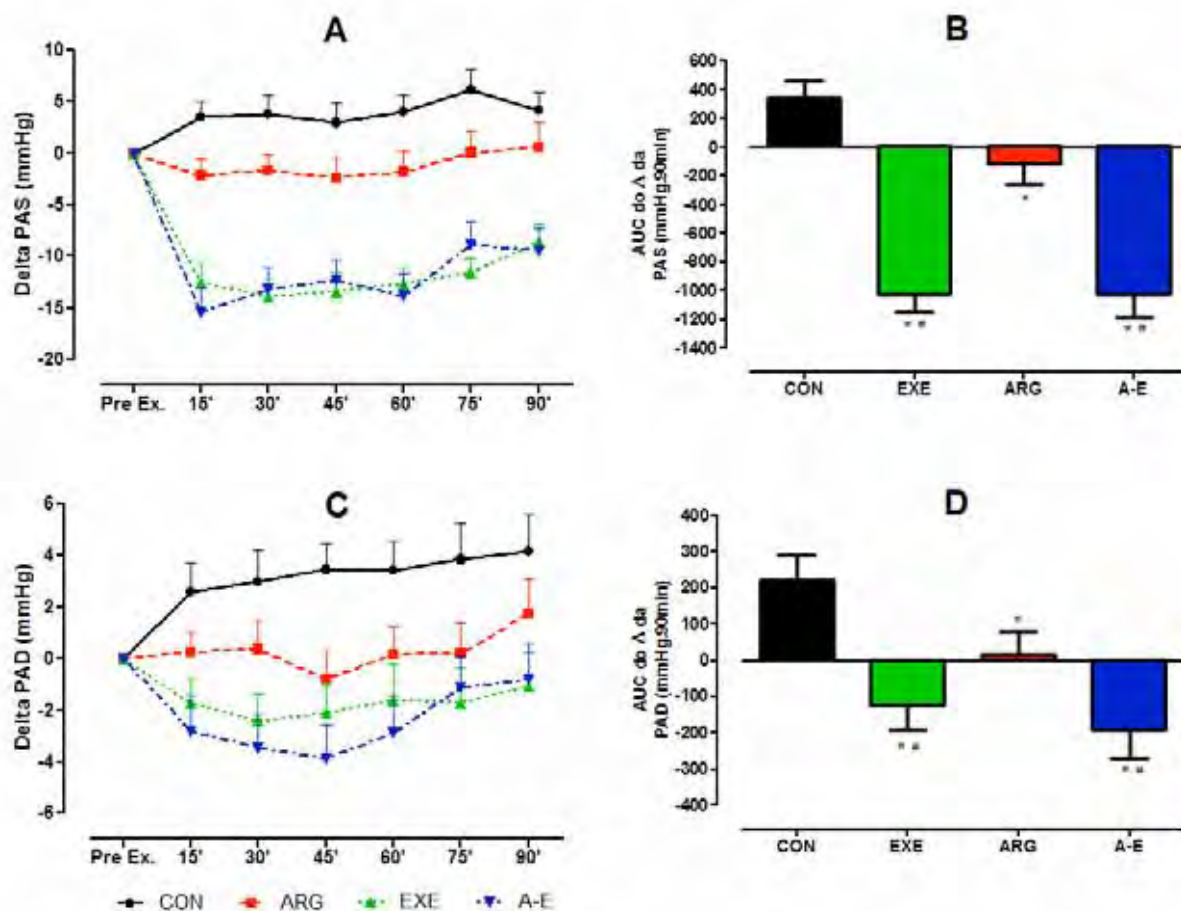


Figura 10: Delta da pressão arterial sistólica (A) e sua respectiva área abaixo da curva (B) e delta da pressão arterial diastólica (C) e sua respectiva área abaixo da curva durante (D) as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias hipertensas (n=17) nos momentos: Pré exercício (Pré Ex.) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após exercício. * $p \leq 0,05$ em relação à sessão CON; # $p \leq 0,05$ em relação à sessão ARG. Os valores estão representados média \pm EPM.

15.2 Monitorização ambulatorial da Pressão arterial – MAPA:

Os resultados da monitorização ambulatorial da pressão arterial sistólica e diastólica ao longo das 24 horas estão apresentados em valores médios ponto a ponto de 2 em 2 horas (Figura 11), além da área abaixo da curva da variação da PAS e PAD em relação ao repouso (Figura 12), e dos valores médios durante o período total de 24 horas, período de vigília e período de sono (Figura 13). Para cálculo dos valores médios da PAS e PAD do período total de 24 horas foram feitas as médias de todas as medidas de pressões realizadas pelo aparelho MAPA durante o período de 24 horas, sem os valores de *outliers* e os valores com erro de medida, realizados pelo próprio software do aparelho. O período de vigília foi considerado como o período onde as voluntárias estavam acordadas, e o de sono, onde as voluntárias estavam dormindo, ambos relatados pelas próprias voluntárias através de um recordatório de atividades.

A ANOVA two-way mostrou interação entre as sessões e os momentos de medida da PAS. Na sessão CON, a PAS foi maior entre os momentos de 09:00 a 11:00 e de 11:00 a 13:00 em relação à sessão A-E e no momento de 09:00 a 11:00 em relação à sessão EXE. Na sessão EXE, a PAS foi menor no período entre 23:00 a 05:00 em relação ao repouso, e entre 03:00 e 05:00 na sessão A-E em relação ao repouso. Nas outras sessões CON e ARG não houve redução significativa da PAS em relação ao repouso (Figura 11A).

Quando analisado os valores de PAD das voluntárias hipertensas, a análise estatística não demonstrou interação entre as sessões e os momentos de medida da pressão. No entanto, em todas as sessões, a PAD foi significativamente maior nos momentos de 11:00 a 13:00, de 15:00 a 21:00 e 07:00 a 09:00 em relação ao repouso, e menores apenas entre 01:00 e 05:00 também em relação ao repouso em todas as sessões (Figura 11B).

A ANOVA two way também não mostrou interação (suplementação x exercício) nas AUC da variação da PAS e PAD nas voluntárias hipertensas, porém a AUC da PAS foi menor nas sessões onde eram realizados exercícios físicos em comparação com as sessões que não realizavam-no, sem diferença nas AUC da PAD (figura 12).

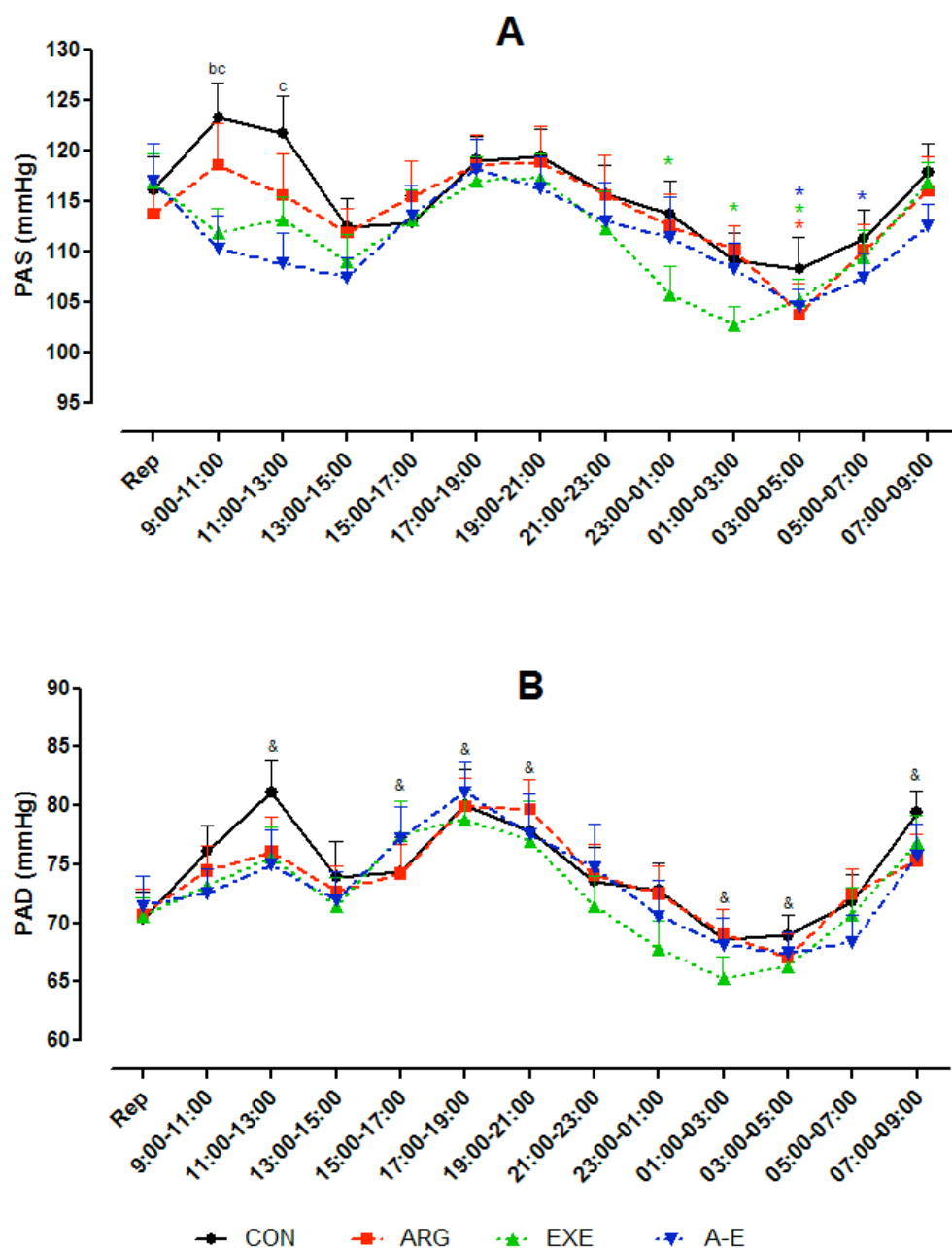


Figura 11: Pressão arterial sistólica (acima), pressão arterial diastólica (abaixo) no período de 24 horas após as quatro sessões experimentais: Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias hipertensas (n=17). * $p \leq 0,05$ em relação ao repouso em cada sessão; ^b $p \leq 0,05$ em relação à sessão EXE; ^c $p \leq 0,05$ em relação à sessão A-E; & $p \leq 0,05$ em relação ao repouso para todas as sessões (CON, ARG, EXE, A-E). Os valores representam média do delta \pm EPM.

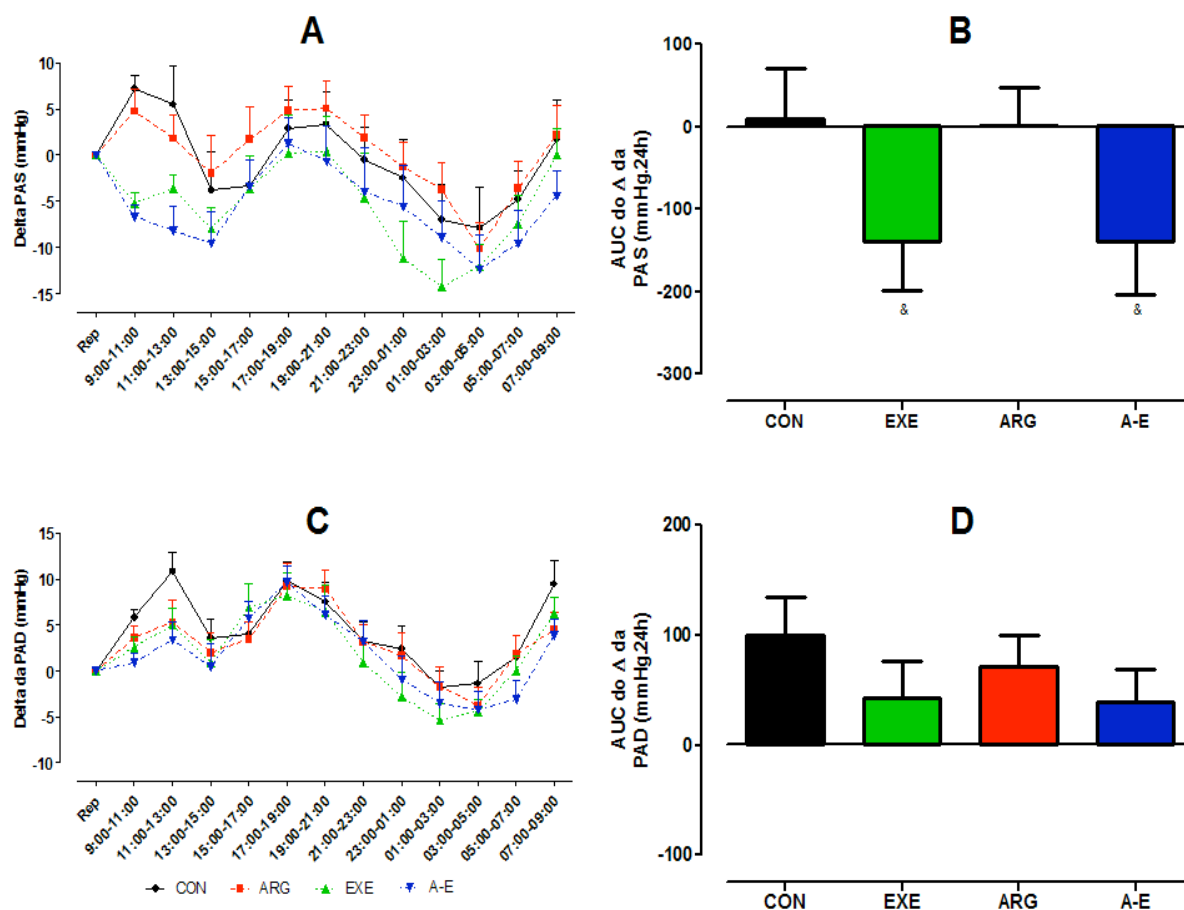


Figura 12: Delta da pressão arterial sistólica (A) e sua respectiva área abaixo da curva (B), delta da pressão arterial diastólica (C) e sua respectiva área abaixo da curva (D) no período de 24 horas após as quatro sessões experimentais: Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina e exercício (A-E) para as voluntárias hipertensas (n=17). & p≤ 0,05 em relação às sessões sem a realização de exercício (CON e ARG). Os valores representam média ± EPM.

A figura 13 mostra os valores médios de pressão arterial sistólica e diastólica nos períodos total de 24 horas, vigília e sono. Apesar da ANOVA two way não identificar interação entre a suplementação de L-arginina e o exercício físico entre as sessões, tanto no período total de 24 horas, quanto no período de vigília, as médias da PAS foram menores nos dias em que eram realizados exercícios físicos em comparação com os dias em que não eram realizados esses exercícios, sem diferença no período de sono. Por outro lado, a média da PAD somente foi diferente nos dias em que eram realizados exercícios físicos no período de sono, sem diferença nos outros períodos analisados (Figura 13).

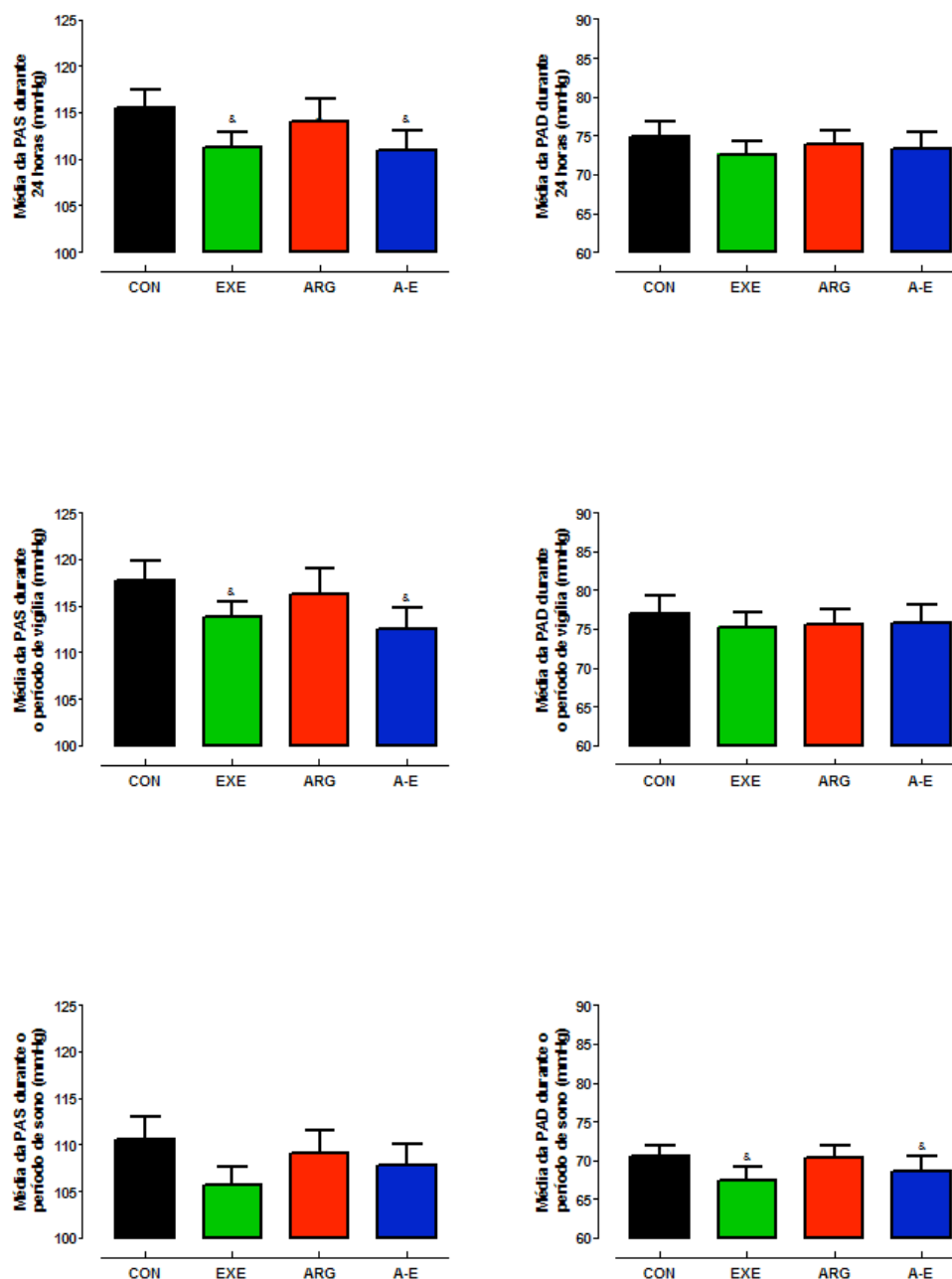


Figura 13: Pressão arterial Sistólica (PAS – coluna da esquerda) e pressão arterial Diastólica (PAD coluna da direita) durante o período total de 24 horas (acima) período de vigília (meio) e período de sono (abaixo) para o grupo de mulheres hipertensas (n=17), durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E). Os valores representam média \pm EPM. & $p \leq 0,05$ em relação às sessões sem a realização de exercício (CON e ARG).

15.3 Análises bioquímicas – Nitrito/Nitrato (NOx⁻) e Guanosina Monofosfato cíclica (GMPc):

A tabela 11 apresenta as concentrações plasmáticas de Nitrito/Nitrato (NOx⁻) durante as quatro sessões experimentais nos períodos de repouso, imediatamente, 45 min e 90 min após o período de realização do exercício físico. Apesar da ANOVA *two way* não demonstrar interação as concentrações de NOx⁻ entre as sessões ao longo do tempo, a AUC da variação plasmática do NOx⁻ ao longo do tempo (Figura 14) foi maior nos dias em que eram realizado exercícios físicos (EXE e A-E) em relação aos dias em que não eram realizados esses exercícios (CON e ARG), mostrando que o exercício físico promoveu elevação nas concentrações de NOx⁻ sem o efeito da suplementação de L-arginina.

Tabela 11: Concentração plasmática de NOx⁻ (Nitrito/Nitrato) no repouso, imediatamente, (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-90') após a realização do exercício para o grupo de mulheres hipertensas (n=17) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

NOx ⁻ (μM)				
	Repouso	PE-0'	PE-45'	PE-90'
Hipertensas (n = 17)				
CON	15,0 ± 2,5	12,7 ± 2,1	11,4 ± 2,0	12,5 ± 2,4
ARG	10,6 ± 2,3	7,9 ± 1,7	9,5 ± 1,9	9,1 ± 1,8
EXE	9,2 ± 1,0	10,9 ± 1,6	9,7 ± 0,9	9,4 ± 1,1
A-E	10,8 ± 1,4	11,9 ± 2,6	11,9 ± 2,4	10,9 ± 2,4

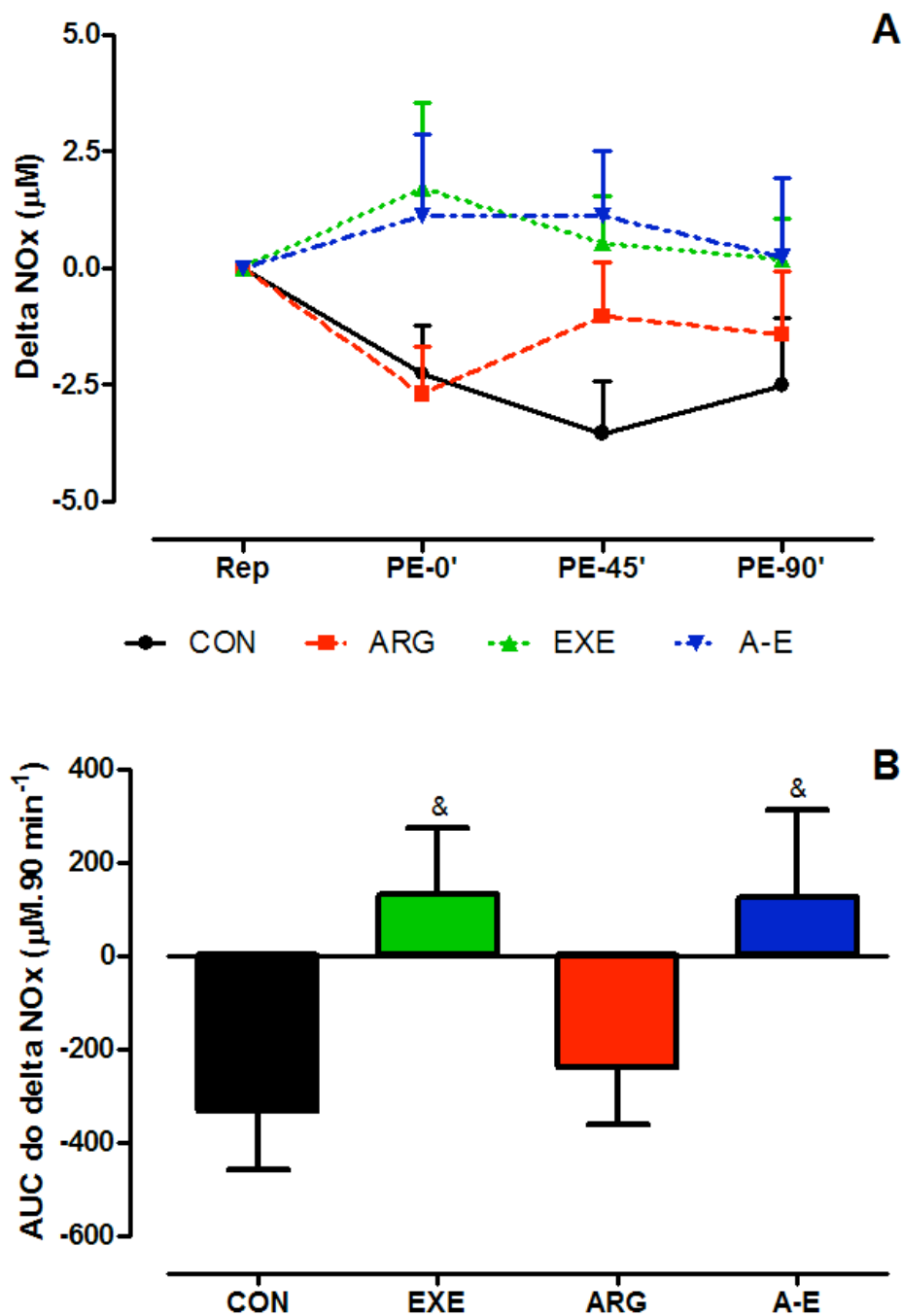


Figura 14: Variação da concentração plasmática de NOx^- (Nitrito/Nitrato) no repouso (Rep), imediatamente (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-90') após a o tempo para a realização do exercício (A) para o grupo de mulheres hipertensas ($n=17$) e respectivas área abaixo da curva (AUC) das concentrações de NOx^- ao longo do tempo (B) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E). [&] $p \leq 0,05$ em relação às sessões sem a realização de exercício (CON e ARG).

A tabela 12 e a figura 15 apresentam os resultados das concentrações plasmáticas de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) durante as quatro sessões experimentais nos períodos de repouso (Rep), imediatamente e 45 min após o período de realização do exercício físico. Nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações de GMPc entre as quatro sessões, porém a ANOVA *two way* mostrou que a AUC da variação do GMPc ao longo do tempo nas sessões ARG, EXE e A-E foram maiores que na sessão CON (Figura 15B), mostrando que tanto o exercício quanto a suplementação de L-arginina elevaram as concentrações de GMPc, porém a associação entre essas intervenções não apresentou efeitos aditivos.

Tabela 12: Concentração plasmática de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) no repouso, imediatamente, (PE-0') e 45 minutos (PE-45') após a realização do exercício para o grupo de mulheres hipertensas (n=17) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

GMPc (pmol/mL)			
	Repouso	PE-0'	PE-45'
Hipertensas (n = 17)			
CON	102,3 ± 11,9	90,4 ± 11,4	75,6 ± 11,0
ARG	118,6 ± 11,8	122,8 ± 15,3	153,3 ± 12,3
EXE	112,9 ± 10,1	128,1 ± 9,8	93,4 ± 12,3
A-E	126,7 ± 12,6	136,7 ± 10,8	131,4 ± 12,2

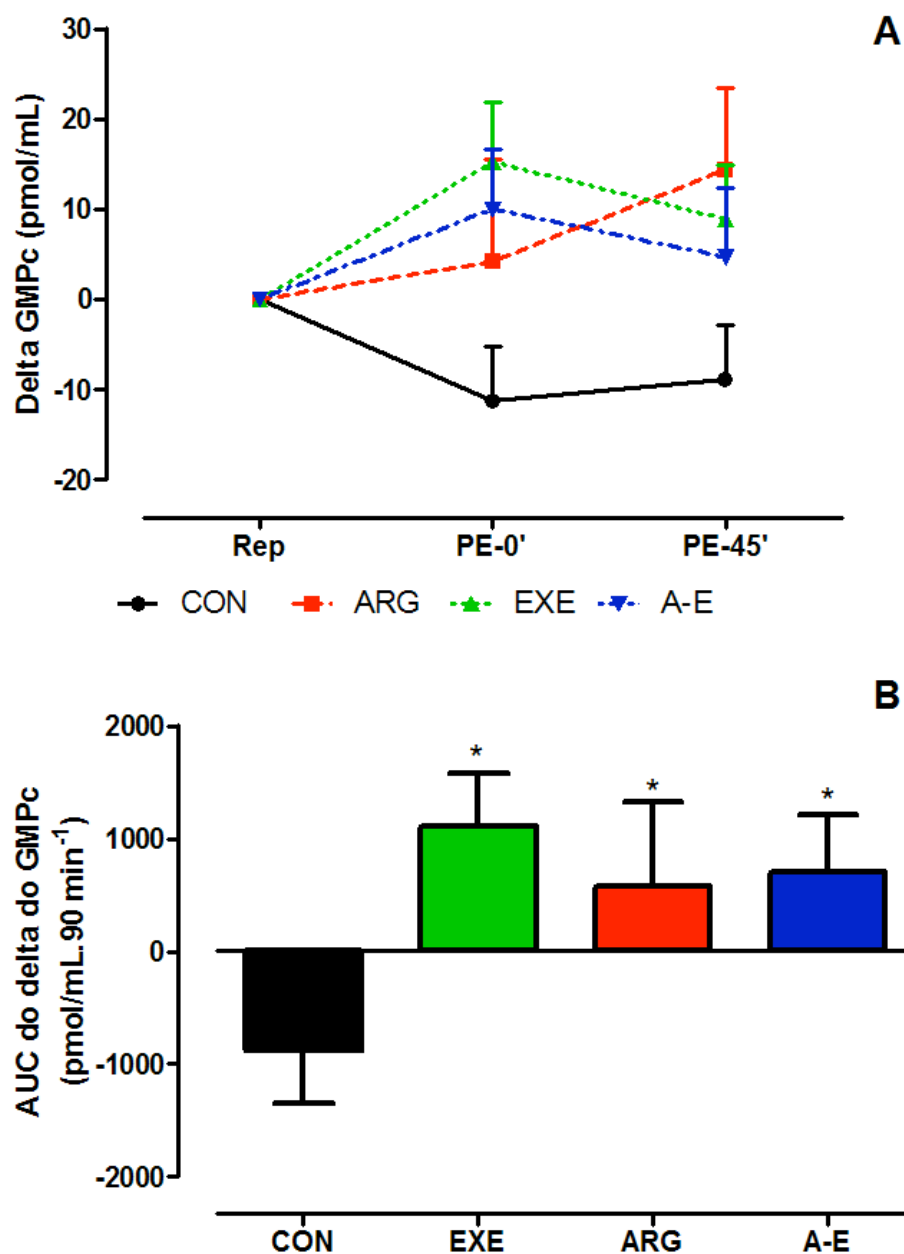


Figura 15: Variação da concentração plasmática de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) no repouso (Baseline), imediatamente, (PE-0') e 45 minutos (PE-45') após a realização do exercício (A) para o grupo de mulheres hipertensas e respectivas área abaixo da curva (AUC) das concentrações de GMPc ao longo do tempo (B) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E).

15.4 Análises dos marcadores pró e anti-inflamatórias:

A tabela 13 apresenta os resultados dos marcadores pró e anti-inflamatórios nos períodos de repouso e 45 minutos após o período de realização do exercício físico durante as quatro sessões experimentais no grupo de mulheres hipertensas (n=17). Nenhuma alteração significativa foi encontrada nas variações (Δ) da interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) entre o repouso e o período após o exercício físico. Já os valores plasmático de interleucina-1 beta (IL-1 β) e do fator tumoral de necrose (TNF- α), não foram detectáveis em todos os pontos, pois a maioria das amostras apresentaram leitura abaixo da sensibilidade do Kit comercial utilizado para análise (kit R&D systems).

Tabela 13: Níveis dos marcadores pró e anti-inflamatórios nos períodos de repouso (REP) e 45 minutos após o período de realização do exercício físico (PE) e suas variações (Δ) durante as quatro sessões experimentais agudas em voluntárias e hipertensas (n=17).

	IL-6 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)		
	Rep	PE-45'	Δ	Rep	PE-45'	Δ
Hipertensas (n=17)						
CON	31,8 \pm 8,7	32,8 \pm 9,2	1,06 \pm 1,71	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4	0,17 \pm 0,26
ARG	36,2 \pm 10,6	35,4 \pm 9,8	-0,81 \pm 2,08	2,0 \pm 0,2	2,4 \pm 0,5	0,33 \pm 0,34
EXE	37,0 \pm 9,7	33,6 \pm 10,5	-3,37 \pm 1,83	2,0 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	-0,39 \pm 0,20
A-E	31,7 \pm 9,9	34,0 \pm 10,5	2,27 \pm 1,38	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,4	0,46 \pm 0,26

15.5 Análises das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (MDA):

As concentrações séricas da enzima Superóxido Dismutase (SOD), a atividade da enzima antioxidante Catalase e a concentração de Malodialdeído (MDA), que reflete a peroxidação lipídica, não foram diferente no repouso e após 45 minutos do período do exercício físico nas quatro sessões experimentais (tabela 14).

Tabela 14: Concentrações plasmáticas da enzima Superóxido Dismutase (SOD), da atividade da Catalase e da concentração plasmática de Malondialdeído (MDA) nos períodos de repouso (REP) e 45 minutos após o período de realização do exercício físico (PE) e suas variações (Δ) durante as quatro sessões experimentais agudas em voluntárias hipertensas (n=17).

Superóxido dismutase - SOD (U/mL)			
	Rep	PE-45'	Δ
CON	2,5 \pm 0,2	1,9 \pm 0,2	-0,61 \pm 0,13
ARG	2,4 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	-0,49 \pm 0,09
EXE	2,3 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	-0,49 \pm 0,18
A-E	2,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	-0,87 \pm 0,18
Atividade Catalase (nmol/min/mL)			
	Rep	PE-45'	Δ
CON	41,1 \pm 6,3	45,1 \pm 6,6	1,0 \pm 3,3
ARG	32,3 \pm 3,4	50,0 \pm 7,8	17,7 \pm 5,9
EXE	35,4 \pm 4,2	44,3 \pm 6,1	8,9 \pm 7,1
A-E	43,1 \pm 4,8	35,3 \pm 5,0	-7,9 \pm 6,8
Malondialdeído - MDA (μM)			
	Rep	PE-45'	Δ
CON	4,0 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3	0,75 \pm 0,54
ARG	4,0 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4	0,39 \pm 0,70
EXE	4,3 \pm 0,4	4,0 \pm 0,3	-0,26 \pm 0,25
A-E	4,0 \pm 0,6	4,2 \pm 0,6	0,21 \pm 0,42

16. DISCUSSÃO ESTUDO 3

O estudo 3 teve como principal objetivo analisar as respostas cardiovasculares após exercício aeróbio de 30 minutos realizado na intensidade da MFEL, aliado à suplementação de 9 gramas de L-arginina, em mulheres hipertensas no período após a menopausa, e os possíveis mecanismos envolvidos nessas respostas através da avaliação da concentração plasmática de nitrito/nitrato, GMP cíclico, insulina, além das respostas dos marcadores pró- e anti-inflamatórios: IL-6, IL-10 e IL-1 β e atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase e concentração plasmática de malonaldeído (MDA) frente a essa intervenção. Os principais resultados encontrados neste estudo foram que a associação dessa suplementação com o exercício físico aeróbio promove redução na PAD nos primeiros 90 minutos após o exercício, e prolonga a redução da PAS causada pelo exercício por até 4 horas após sua performance. Além disso, a suplementação aguda de L-arginina por si só promove regulação tanto da PAS quanto da PAD nessas mulheres hipertensas, mantendo os valores pressóricos menores que no dia controle, sem a intervenção. Esses efeitos positivos da suplementação de L-arginina foram associados à maior ativação da via NO/GMPc como mostrado no aumento das concentrações plasmáticas desses dois biomarcadores. Já em relação aos marcadores inflamatórios e do balanço redox, nem a associação da suplementação de L-arginina ao exercício aeróbio, nem as intervenções isoladas promovem alterações nos marcadores pró e anti-inflamatórios IL-6 e IL-10, na atividade da SOD e catalase e concentração de MDA em mulheres hipertensas após a menopausa.

16.1 *Respostas hemodinâmicas à suplementação aguda de L-arginina e ao exercício físico em mulheres hipertensas*

A suplementação aguda de 9 gramas de L-arginina alterou as respostas da PAS e PAD nas mulheres hipertensas após sua ingestão em relação ao dia controle sem essa intervenção, como mostrado nas figuras 9 e 10. Essa suplementação nas mulheres hipertensas auxiliou a regulação da PAS e PAD limitando o aumento natural da PA ao longo do dia, principalmente no período da manhã, como mostrado na sessão CON e já demonstrado de acordo com o ciclo circadiano na literatura em seres humanos (Guo e Stein, 2003). Os efeitos benéficos da suplementação de L-arginina é melhor evidenciado em populações com algum comprometimento na função endotelial ou no sistema cardiovascular como na população deste estudo (Sato et al., 2000; Gokce, 2004; Lucotti

et al., 2006; Börger, 2007; Puga et al., 2011). Procuramos em nosso estudo focar apenas em mulheres após a menopausa e hipertensas, evitando patologias associadas como obesidade e diabetes melitus, uma vez que os resultados mostram-se contraditórios na literatura. O estudo de Lekakis *et al.* (2002) não detectou alterações na pressão arterial após a suplementação de 6 gramas de L-arginina em pacientes hipertensos (homens e mulheres), de idade similar ao nosso estudo. Nesse estudo, os autores mediram a PA apenas uma única vez, e não acompanharam as respostas da PA por um período prolongado como em nosso estudo. Neri et al., (2010) avaliaram os efeitos da suplementação de 4 gramas de L-arginina na pressão arterial durante 24 horas, em mulheres grávidas com diagnósticos de hipertensão crônica, no início e durante a 28ª e 30ª semana de gestação. Nenhuma diferença foi encontrada entre o grupo com L-arginina e placebo nos valores de pressão arterial nos períodos total de 24 horas, vigília e sono e nas alterações da pressão ao longo da gestação. No entanto, os autores relataram que no grupo que ingeriu L-arginina apresentou menor necessidade de prescrição de medicamentos anti-hipertensivos e menores complicações associadas ao parto tanto para a gestante quanto para o recém-nascido.

Sato *et al.* (2000) também não encontraram alterações na PA após a infusão de L-arginina em homens e mulheres com idade média de 62 ± 4 anos. Nesse estudo, a infusão de 500 mg/kg de L-arginina por 30 minutos não alterou a PA dos pacientes hipertensos, porém aqueles que apresentavam hipertensão arterial maligna (homens e mulheres com idade de 63 ± 3 anos), essa mesma infusão reduziu a PA média em aproximadamente 8 mmHg bem como promoveu aumento nas concentrações de GMPc em aproximadamente 42%, sugerindo que a via arginina/NO/GMPc é acelerada com a infusão de L-arginina e produz efeitos benéficos na função endotelial, e consequentemente no controle da PA, mas somente nos pacientes com hipertensão maligna, os quais possuem a maior comprometimento da função endotelial.

Efeitos benéficos do aumento exógeno da concentração de L-arginina também foi encontrado pelo estudo de Higashi *et al.* (1999). Neste estudo os autores encontraram redução na PA média ao longo de 60 minutos após a infusão de 500 mg de L-arginina durante 30 minutos em pacientes hipertensos (homens e mulheres de meia idade) com função renal normal. Essa redução também foi encontrada com mesma magnitude em pacientes normotensos e hipertensos com insuficiência renal, com aumentos similares também na concentração urinária de NO_x^- , nos três grupos estudados. Um dado interessante encontrado nesse estudo foi que o tono vascular renal e a resistência glomerular apresentaram melhoras marcantes em indivíduos hipertensos em comparação

com normotensos, e também mais significativas nos hipertensos com insuficiência renal em comparação com os pacientes com a função renal normal.

Recentemente, um estudo mostrou que em mulheres hipertensas após a menopausa, o aumento do substrato para a formação do NO melhora as respostas hemodinâmicas, porém este estudo foi conduzido com a suplementação crônica e não aguda. Neste estudo, as voluntárias tiveram a suplementação com melancia, contendo 6g de L-citrulina/L-arginina, por 6 semanas. A melancia é um alimento rico em L-citrulina, e esse aminoácido é metabolizado em nosso organismo formando L-arginina, fornecendo substrato para a eNOS formar NO. Essa suplementação reduziu a rigidez arterial e a PAS aórtica nas mulheres hipertensas após a menopausa (Figuroa et al., 2012). Nosso estudo mostra que a suplementação de L-arginina reduziu a PAS e PAD, possivelmente devido à diminuição da resistência periférica, causado pelo aumento da biodisponibilidade do NO. Pacientes hipertensos podem apresentar maior comprometimento na função endotelial causada principalmente pela redução da produção de NO pelo endotélio vascular e consequente prejuízo na dilatação derivada do NO (Palmer, Ferrigi e Moncada, 1987; Zanesco e Antunes, 2007; Börger, 2007; Föstermann, 2010). Os valores da concentração plasmática de GMPc ao longo do tempo após a suplementação de L-arginina encontrados em nosso estudo suportam essa hipótese, pois os valores da AUC da variação do GMPc ao longo do tempo foi maior em comparação com a sessão controle, sugerindo que a via L-arginina/NO/GMPc pode ter contribuído para a redução da PA em mulheres hipertensas. O aumento da concentração de GMPc está relacionado com os efeitos benéficos da suplementação aguda de L-arginina em pacientes com a função endotelial comprometida (Sato et al., 2000). Além disso, esse aumento na concentração plasmática de GMPc após a suplementação de L-arginina também foi demonstrado em estudos com suplementação crônica.

Piatti *et al.* (2001) submeteu homens e mulheres diabéticas com faixa etária similar ao nosso estudo (média de 55 anos) a um mês de suplementação de 9g L-arginina ou placebo e mostraram que no mês onde foi suplementado arginina houve aumento no fluxo sanguíneo no antebraço em 35% e da concentração de GMPc em aproximadamente 65%. Outro trabalho mostrou que a suplementação de L-arginina (8,3g diárias) aliada à uma dieta hipocalórica e exercício físico por 21 dias aumenta em 50% as concentrações basais de GMPc bem como em mais de três vezes as concentrações de NOx⁻ em indivíduos obesos e com resistência à insulina (Lucotti et al., 2006).

O aumento da biodisponibilidade do NO através da suplementação de L-arginina é dependente da farmacocinética desse aminoácido. Em nosso estudo, nós não medimos a

concentração plasmática de L-arginina após sua suplementação, porém vários estudos mostram que a suplementação oral desse aminoácido aumenta sua concentração no sangue, atingindo o pico em aproximadamente 60 minutos, podendo perdurar por várias horas após essa ingestão (Tangphao et al., 1999; Forbes et al., 2011; Closs et al., 2012), como já discutido no estudo 2.

Após a realização do exercício físico, houve redução da PAS, mas a sua associação com a suplementação de L-arginina não proporcionou maiores alterações nas respostas da PAS em mulheres hipertensas. No entanto, a PAS ficou reduzida por duas horas após o exercício físico, e foi prolongada por até quatro horas quando houve a intervenção conjunta da L-arginina/exercício aeróbico. Além disso, essa intervenção conjunta trouxe efeitos benéficos também nos valores de PAD pois reduziu seus valores significativamente em relação ao repouso, e em relação ao dia da sessão controle como mostrado na figura 9.

O exercício físico, através do *shear stress*, aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil e a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular. Essa força de cisalhamento sob as células endoteliais são estímulos poderosos para a geração de NO através da eNOS no sistema vascular (Palmer, Ferrigi e Moncada, 1987; Jungerten et al., 1997; Zanesco e Antunes, 2007, Francis et al., 2010). Uma vez formado, o NO liga-se à enzima guanilil ciclase presente na camada média do vaso, que irá gerar a formação do segundo mensageiro GMPc, que irá ativar proteínas quinases, entre elas, a proteína quinase G, que por sua vez através de diferentes vias reduzirá a concentração de íons cálcio da musculatura lisa vascular. Entre as vias, a PKG promove inibição da atividade da proteína fosfolambam sobre o retículo sarcoplasmático, aumentando assim o sequestro de íons cálcio; a PKG bloqueia também canais de cálcio tipo L da membrana celular da musculatura lisa vascular. Essa redução de íons cálcio intracelular promoverá relaxamento da musculatura lisa vascular e consequentemente resposta vasodilatadora (Murad et al., 1994; Francis et al., 2010).

O aumento das concentrações plasmáticas de NOx^- e GMPc (Figura 14B e 15B) após as sessões que realizaram exercícios aeróbicos (EXE e A-E) em mulheres hipertensas, sugere maior ativação da via L-arginina/NO/GMPc, e essa maior ativação estaria contribuindo para maior vasodilatação e redução da resistência periférica, reduzindo, por sua vez, a PAD bem como prolongando a redução da PAS em mulheres hipertensas após a menopausa. Interessantemente, apesar da suplementação de L-arginina e o exercício físico isolados aumentarem as concentrações de GMPc e de NOx^- , sendo mais potente pelo exercício físico, a intervenção conjunta da suplementação aguda

de L-arginina com o exercício aeróbio não proporcionaram efeitos aditivos nesses biomarcadores, mesmo proporcionando efeitos redutores na PAS e reduzir ainda mais a PAD.

Nosso estudo também investigou uma possível via alternativa que poderia promover o aumento do estímulo vasodilatador e conseqüentemente redução da resistência periférica e PA através da liberação de insulina pelo pâncreas. Em nosso estudo, nós verificamos que tanto o exercício físico quanto a suplementação com L-arginina não modificaram as concentrações de insulina plasmática nas voluntárias hipertensas (Figura 16). Os valores de insulinemia de repouso foi maior que os pontos imediatamente (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-(90')) após a realização do exercício. Cabe salientar que um dos critérios de inclusão em nosso estudo era não ser diabética, para evitar fatores de confusão na proposta do trabalho que foi verificar os efeitos da suplementação e exercício físico somente em voluntárias hipertensas após a menopausa. Além disso, os valores insulinêmicos estavam elevados no período de repouso (Rep) porque as voluntárias estavam no período pós-prandial do desjejum ao chegarem ao laboratório para realizarem todas as sessões experimentais.

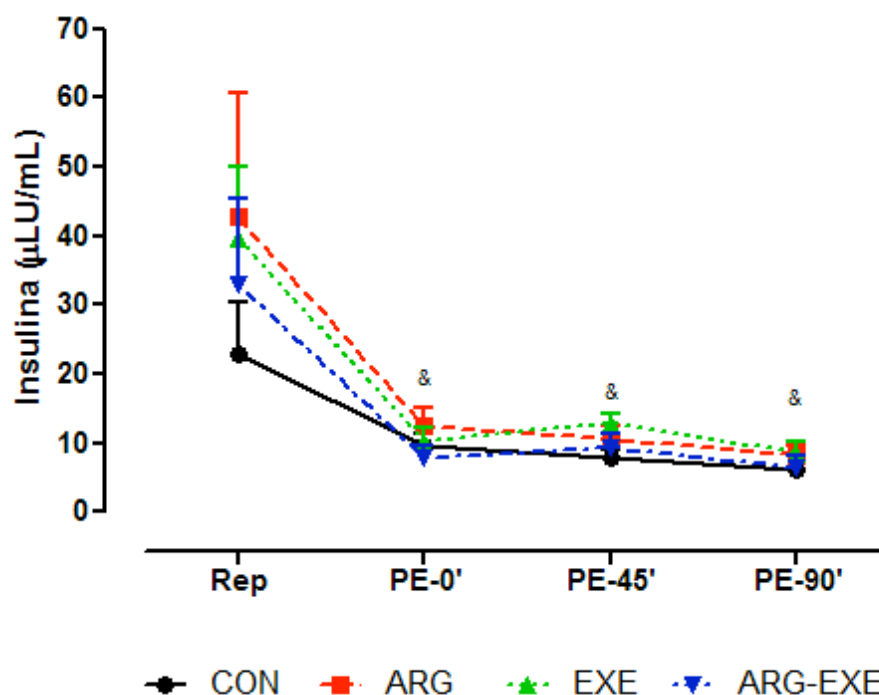


Figura 16: Valores plasmáticos insulina no repouso (Rep), imediatamente, (PE-0'), 45 minutos (PE-45') e 90 minutos (PE-90') após a realização do exercício para o grupo de mulheres hipertensas (n=17) durante as sessões agudas Controle (CON), Arginina (ARG), Exercício (EXE) e Arginina + Exercício (A-E). & p<0,05 em relação ao repouso em todas as sessões.

Assim esses resultados mostram que agudamente a suplementação de arginina e o exercício físico aeróbico não foram capazes de alterar as concentrações plasmáticas desse hormônio significativamente, apesar da L-arginina ser considerada um secretagogo de insulina em protocolos experimentais (Natali et al., 1990; Thams e Capito, 1999).

16.2 Análise dos marcadores pró e anti-inflamatórios:

Nosso estudo investigou não somente a relação entre os sistemas pró e anti-inflamatórios com o exercício físico, mas também se o aumento da biodisponibilidade de NO através da suplementação aguda de L-arginina, atuaria também nesse sistema, pois o NO desempenha importante papel na modulação da resposta pró e anti-inflamatória reduzindo algumas citocinas como a IL-6, IL10, IL-1 β e TNF α (Steensberg et al., 2007; Pedersen e Febbraio, 2008; Mussi et al., 2008).

De maneira similar aos resultados encontrados em mulheres normotensas, nenhuma alteração nas concentrações das citocinas anti-inflamatórias IL-6 e IL-10 foram encontradas entre as 4 sessões experimentais agudas nas mulheres hipertensas.

Resultados similares foram encontrados por Arsenault *et al.* (2009), onde o treinamento de exercícios aeróbios moderados por seis meses em 267 mulheres após a menopausa com idade similar ao nosso estudo, não alterou as concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios como a IL-6, TNF- α , PCR e adiponectina (Arsenault *et al.*, 2009).

16.3 Análise das enzimas antioxidantes – Superóxido Dismutase (SOD), Catalase e Malondialdeído (MDA):

Nosso estudo avaliou a atividade plasmática da Superóxido dismutase (SOD) e da catalase nas mulheres após a menopausa hipertensas frente as quatro sessões experimentais agudas. Nosso resultados mostram que a atividade das enzimas SOD e catalase não estavam alteradas nessas voluntárias e que a suplementação aguda de L-arginina ou a realização do exercício físico aeróbio também não afetou a atividade dessas enzimas. Com relação a peroxidação lipídica, de maneira similar às enzimas antioxidantes, não verificamos qualquer alteração nos níveis plasmáticos de MDA após as intervenções, mostrando que essas intervenções não alteraram esse marcador. Esses dados mostram que o sistema antioxidante não está alterado nessa população, diferentemente dos trabalhos prévios que atribuem a esse sistema a possível gênese da hipertensão arterial em mulheres hipertensas após a menopausa (Yang e Reckelhoff, 2011; Sánchez-Rodriguez *et al.*, 2012).

Uma das possíveis hipóteses para explicar a gênese das doenças cardiovascular como a hipertensão arterial, é a menor biodisponibilidade dos fatores relaxantes derivados do endotélio, principalmente do NO, levando à disfunção endotelial (Cai e Harrison, 2000; Föstermann, 2010). A redução da biodisponibilidade do NO ocorre principalmente devido a sua interação com o ânion superóxido (O_2^-), produzindo o peróxido nitrito ($ONOO^-$), que é uma ERO altamente lesiva em nosso organismo. Assim, a menor biodisponibilidade do NO causada pelo aumento da produção de EROs e diminuição da atividade antioxidante é considerada a principal causa da disfunção endotelial, e essa disfunção está associada ao desenvolvimento da hipertensão arterial, aterosclerose, doença arterial coronariana e vários outros eventos cardiovasculares (Cai e Harrison, 2000; Lakshmi *et al.*, 2009; Föstermann, 2010; Gomes, Silva e Oliveira, 2012). Além disso, o processo de desenvolvimento da hipertensão está relacionado ao aumento da atividade da NADPH oxidase, que é uma enzima multifuncional presente nas membranas celulares, e que

produzem EROs como o O_2^- em vários tecidos como na parede dos vasos, ocasionando lesões de células e tecidos no organismo (Föstermann, 2010). Alguns autores também mostram que a atividade do sistema antioxidante está reduzido em pacientes hipertensos (Lakshmi et al., 2009). Esses dados em conjunto demonstram que pacientes hipertensos apresentam um desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante, favorecendo maior produção de EROs, menor biodisponibilidade de NO, e conseqüentemente disfunção endotelial, elevando a pressão arterial, agravando o risco de eventos cardiovasculares.

Tanto o exercício físico aeróbio quanto a suplementação aguda de L-arginina poderiam aumentar a biodisponibilidade do NO no sistema fisiológico, combatendo a produção de EROs e melhorando o sistema antioxidante, pois esse exercício aumenta a atividade da eNOS, e a suplementação desse aminoácido aumentaria a concentração plasmática do substrato para a formação do NO (Fukai et al., 2000; Finkel e Holbrook, 2000; Gomes, Silva e Oliveira, 2012). Porém nossos resultados não suportam essa hipótese nas mulheres após a menopausa hipertensas, pois a associação da suplementação aguda de L-arginina e o exercício aeróbio não alteraram as respostas das atividades das enzimas antioxidantes, nem a peroxidação lipídica. O exercício físico é uma estratégia muito importante para aumentar a quantidade endógena de enzimas antioxidantes, pois ele estimularia os mecanismos antioxidantes celulares e aumentaria a resistência às lesões induzidas pelo próprio exercício físico. No entanto, essas respostas benéficas são encontrada principalmente através da pratica regular de exercícios físicos, como resposta crônica. (Finkel e Holbrook, 2000).

Em modelo animal alguns estudos mostram que a suplementação ou infusão de L-arginina reduz a atividade da xantina oxidase em produzir EROs, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e reduz o marcador da peroxidação lipídica, melhorando o estresse oxidativo induzido tanto por mecanismo patológicos, quanto pela aceleração da via respiratória induzida pelo exercício (El-Missiry, Othman e Amer, 2004; Tsai et al., 2002; Huang, Tsai e Lin, 2008). Porém os estudos relacionando a suplementação de L-arginina aliada ou não ao exercício em humanos ainda são escassos.

17. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

A tabela abaixo apresenta o resumo dos principais resultados encontrados no estudo em relação à sessão aguda controle (CON).

Tabela 15: resumo dos principais resultados do estudo 3

	Hipertensas		
	ARG	EXE	A-E
PAS 90 min	↓	↓↓	↓↓
PAD 90 min	↔	↔	↓
AUC PAS 90 min	↓	↓↓	↓↓
AUC PAD 90 min	↓	↓↓	↓↓
PAS MAPA	↔	↓2h	↓4h
PAD MAPA	↔	↔	↔
AUC PAS MAPA	↔	↓	↓
AUC PAD MAPA	↔	↔	↔
Média MAPA PAS 24h	↔	↓	↓
Média MAPA PAD 24h	↔	↔	↔
Média MAPA PAS Vigília	↔	↓	↓
Média MAPA PAD Vigília	↔	↔	↔
Média MAPA PAS Sono	↔	↔	↔
Média MAPA PAD Sono	↔	↓	↓
NOx ⁻	↔	↑	↑
GMPc	↑	↑	↑
Insulina	↔	↔	↔
SOD	↔	↔	↔
Catalase	↔	↔	↔
MDA	↔	↔	↔
IL-6	↔	↔	↔
IL-10	↔	↔	↔
TNF- α	-	-	-
IL-1 β	-	-	-

↔ Sem alteração

↓ Redução

↓↓ Grande redução

- Valores não encontrados

18. CONCLUSÃO ESTUDO 3

A suplementação de L-arginina associada ao exercício aeróbio é capaz de prolongar a redução da pressão arterial sistólica após a realização desse exercício, e somente essa intervenção conjunta é capaz de reduzir a pressão arterial diastólica em mulheres hipertensas após a menopausa. Além disso, nessa população a suplementação aguda de L-arginina isolada é capaz de impedir o aumento natural tanto da pressão sistólica quanto diastólica ao longo do tempo. Esses efeitos benéficos estão associados ao aumento dos biomarcadores da via NO/GMPc, sem alteração do balanço redox e dos mediadores pró e anti-inflamatórios nessa população.

19. LIMITAÇÕES DO ESTUDO 3

Nosso estudo não mediu a concentração plasmática de L-arginina nem o fluxo sanguíneo ou dilatação derivada do endotélio durante as sessões agudas.

20. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric Dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* v.23, pp.1455-1459, 2003.
- Adams MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer D. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in Young men with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* v.129, pp.261-269, 1997.
- Álvares TS, Conte Jr CA, Paschoalin VMF, Silva JT, Meirelles CM, Bhambhani YN, Gomes PSC. Acute L-arginin supplementation increases muscle blood volume but not strength performance. *Appl Physiol Nutri Metab.* v.37, pp.115-126, 2012.
- Anunciação PG, Polito MD. A review on post-exercise hypotension in hypertensive individuals. *Arq Bras Cardiol.* v. 96, n.5, 2010.
- Arsenault BJ, Côté M, Cartier A, Lemieux I, Després JP, Ross R, Earnest CP, Blair SN, Church TS. Effect of exercise training on cardiometabolic risk markers among sedentary, but metabolically healthy overweight or obese post-menopausal women with elevated blood pressure. *Atherosclerosis.* v.207, n.2, pp. 530-3, 2009.
- Bangsbo J, Hellsten Y. Muscle blood flow and oxygen uptake in recovery from exercise. *Acta Physiol Scand* v.162, pp.305–312, 1998.
- Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine—what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* v.7, pp.59–62, 1998.
- Barrett-O’Keefe Z, Kaplon RE, Halliwill JR. Sustained postexercise vasodilatation and histamine receptor activation following small muscle-mass exercise in humans. *Exp Physiol.* v.98, n.1, pp.268-77, 2013.
- Beevers G, Lip G, O’Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ.* v.322, pp.912-916, 2001.
- Beneke R, Leithäuser RM, Ochentel O. Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. *Int J Sports Physiol Perform.* v.6, n.1, pp.8-24, 2011
- Beneke R, Von Duvillard SP. Determination of maximal lactate steady state response in selected sports events. *Med Sci Sport Exerc.* v.28, pp.21-46, 1996.
- Beneke, R. Maximal lactate steady state concentration (MLSS): experimental and modeling approaches. *Eur J. Appl Physiol.* v.88, p.361-369, 2003.

- Bennet T, Wilcox RG, MacDonald IA. Post-exercise reduction of blood pressure in hypertensive men is not due to acute impairment of baroreflex function. *Clin Sci (Colsh)*. v.67, pp.97-103, 1984.
- Bhagat K, Balance P. Inflammatory cytokines impair endotheliumdependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*. v.96, pp.3042–3047, 1997.
- Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, Schenke WH, Kirby M, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon III RO. Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmonopausal women. *J Am Coll Card*. v. 35, n.2, pp.271-6, 2000.
- Bode-Böger SM, Muke J, Surdacki A, Brabant G, Böger RH Frölich JC. Oral Larginine improves endothelial function in heathy individuals older than 70 years. *Vasc Med*. v.8, pp.77-81, 2003.
- Borg G A V. Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine and science in sports and exercise*, v.14, p.377-381, 1982.
- Börger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality-An aupdate on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacological Research*. v.60, pp. 481-487, 2009.
- Börger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr*. v.137, n.6, suppl. 2, pp. 1650S-165S, 2007.
- Borucki K, Aronica S, Starke I, Luley C, Westphal S. Addition of 2.5 g L-arginine in a fatty meal prevents the lipemia-induced endothelial dysfunction in healthy volunteers. *Atherosclerosis*. v.205, n.1, pp.251-4, 2009.
- Bowen W. Changes in heart-rate, blood-pressure, and duration of systole resulting from bicycling. *Am J Physiol* v.11, pp.59–77, 1904.
- Brown SP, Clemons JM, He Q, Liu S. Effects of resitance exercise and cycling on recovery blood pressure. *J Sports Sci*. v.12, pp.463-468, 1994.
- Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci, T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís São Paulo*, v. 18, pp. 21-31, 2004.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidtant stress. *Cir Res*. v.87, pp.840-844, 2000.
- Campos Junior R, Colombari E, Cravo S, Lopes O U. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. *Rev Bras Hipertens* v.8, pp.41-54, 2001.
- Cardoso Jr, CG, Forjaz CLM, Oneda B, Moriyama CK, Tinucci T, Fonseca AM. Climatério, Hipertensão arterial e qualidade de vida. *Hipertensão*, v. 10, p. 144-151, 2007.

- Casonatto J, Tinucci T, Dourado AC, Polito M. Cardiovascular and autonomic responses after exercise sessions with different intensities and durations. *Clinics* v.66, n.3, pp.453-458, 2011.
- Cavalleira J.B.C.; Zecchin H.G.; Saad M.J.A. Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 46 (4), p. 419-425, 2002.
- Colagrande L, Formica F, Porta F, Martino A, Sangalli F, Avalli L, Paolini G. Reduced cytokines release and myocardial damage in coronary artery bypass patients due to L-arginine cardioplegia supplementation. *Ann Thorac Surg*. v.81, n.4, pp.1256-61, 2006.
- Chen CY, Bonham AC. Post exercise hypotension: Central Mechanisms. *Exerc Sport Sci Rev*. v.38, n.3, pp. 122-127, 2010.
- Chen CY, Munch PA, Quail AW& Bonham AC. Postexercise hypotension in conscious SHR is attenuated by blockade of substance P receptors in NTS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* v.283, pp.H1856–H1862, 2002.
- Chin-Dusting JPF, Willems L, Kaye DM. L-arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacology and Therapeutics*. v.116, pp.428-436, 2007.
- Chiong RJ. Controlling hypertension from a public health perspective. *Int J Cardiol* v.127, pp.151-156, 2008.
- Ciolac EG, Guimaraes GV, D'Avila VM, Bortolotto LA, Doria EL, Bocchi EA. Acute effects of continuous and interval aerobic exercise on 24-h ambulatory blood pressure in long-term treated hypertensive patients. *Int J Cardiol*. v.133, n. 3, pp. 381-7, 2009.
- Claudino MA, Delbin MA, Franco-Penteado CF, Priviero FB, De Nucci G, Antunes E, Zanesco A. Exercise training ameliorates the impairment of endothelial and nitric corpus cavernosum responses in diabetic rats. *Life Sci*. v.88, n.5-6 pp.272-7, 2011.
- Closs EI, Ostad MA, Simon A, Warnholtz A, Jabs A, Habermeier A, Daiber A, Förstermann U, Münzel T. Impairment of the extrusion transporter for asymmetric dimethyl-L-arginine: a novel mechanism underlying vasospastic angina. *Biochem Biophys Res Commun*. v.423, n.2, pp.218-23, 2012.
- Cohen RA, Tong XY. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol* v. 55, n. 4, pp. 308-3-16, 2010.
- Coman D, Yapfite-Lee J, Boneh A. New indications and controversies in arginine therapy. *Clinical Nutrition*. v.27, pp.489-496, 2008.
- Conceição MS, Libardi CA, Nogueira FRD, Bonganha V, Gáspari AF, Mikahil TC, Cavaglieri CR, Madruga VA. Effects of eccentric exercise on systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and prostaglandin (E2): comparison between young and postmenopausal women. *Eur J Appl Physiol*. v.112, n.9, pp.3205-13, 2012.

- Coylewright M, Reckelhoff JF, Ouyang P. Menopause and hypertension: an age-old debate. *Hypertension*, v.51, n.4, p.952-959, 2008.
- Dallinger S, Sieder A, Strametz J, Bayerle-Eder M, Wolzt Michael Schmetterer L. Vasodilator effects of L-arginine are stereospecific and augmented by insulin in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 284, pp. E1106-E1111, 2003.
- Daugherty SL, Masoudi FA, Zeng C, Ho PM, Margolis KL, O'Connor PJ, Go AS, Magid DJ. Sex differences in cardiovascular outcomes in patients with incident hypertension. *J Hypertens*. v.31, n. 2, pp.271-7, 2013.
- Doutreleau S, Mettauer B, Piquard F, Schaefer A, Londerfer E, Richard R, Geny B. Chronic but not acute oral L-arginine supplementation delays the ventilatory threshold during exercise in heart failure patients. *Can J Appl Physiol*. v.30, n. 4, pp. 419-32, 2005.
- Eicher JD, Maresh CM, Tsongalis GJ, Thompson PD, Pescatello LS. The additive blood pressure lowering effects of exercise intensity on post-exercise hypotension. *Am Heart J*. v.160, n.3, pp.513-20, 2010.
- El-Missiry MA, Othman AI, Amer MA. L-Arginine ameliorates oxidative stress in alloxan-induced experimental diabetes mellitus. *J Appl Toxicol*. v.24, n.2, pp.93-7, 2004.
- Engels R.C, Jones J.B. – Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Anal. Biochem*. v.88, pp. 475-84, 1978.
- Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Mediterranean diet, endothelial function and vascular inflammatory markers. *Public Health Nutrition*. v.9, n.8A, pp.1073–1076, 2006)
- Esposti RD, Sponton CH, Malagrino PA, Carvalho FC, Peres E, Puga GM, Novais IP, Albuquerque DM, Rodovalho C, Bacci M, Zanesco A. Influence of eNOS gene polymorphism on cardiometabolic parameters in response to physical training in postmenopausal women. *Braz J Med Biol Res*. v.44, n.9, pp.855-63, 2011.
- Evans RW, Fernstrom JD, Thompson J, Morris Jr SM, Kuller LH. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 15, pp.534–539, 2004.
- Faude O, Kindermann W, Meyer T, Lactate threshold Concepts: How valid are they? *Sports Med*. v.39, n.6, pp. 469-490, 2009.
- Fayhs APT, Krause M, Krause-Rodrigues J, Ribeiro JL, Ribeiro JP, Friedman R, Moreira JCF, Reischak-Oliveira A. Effects of L-arginine supplementation on blood flow, oxidative stress status and exercise responses in Young adults with uncomplicated type 1 diabetes. *Eur J Nutr*. PRELO 2012.

- Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defence system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Brás* v. 43, n.4, pp.61-8, 1997.
- Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. v.44, n.1, pp.44-9, 2004.
- Figueroa A, Wong A, Hooshmand S, Sanchez-Gonzalez MA. Effects of watermelon supplementation on arterial stiffness and wave reflection amplitude in postmenopausal women. *Menopause*. v.20, n.5, pp.000-000, 2012.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. v.408, n.6809, pp.239-47, 2000.
- Fitzgerald W. Labile hypertension and jogging: new diagnostic tool or spurious discovery? *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* v.282, pp.542Y4, 1981.
- Forbes SC, Bell G. The acute effects of a low and high dose of oral L-arginine supplementation in Young active males at rest. *Appl Physiol Nutri Metab*. v.36, pp. 405-411, 2011.
- Forjaz CL, Ramires PR, Tinucci T, Ortega KC, Salomão HE, Ignês EC, Wajchenberg BL, Negrão CE, Mion D Jr. Postexercise responses of muscle sympathetic nerve activity and blood flow to hyperinsulinemia in humans. *J Appl Physiol*. v.87, n.2, pp. 824-9, 1999.
- Forjaz CLM, Tinucci T, Ortega KC, Santaella DF, Mion Jr D, Negrão CE. Factors affecting post-exercise hypotension in normotensive and hypertensive humans. *Blood pressure monitoring* v.5, pp. 255-262, 2000.
- Föstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Eur J Physiol*. v.459, p. 923-939, 2010.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD. cGMP-Dependent Protein Kinase and cGMP Phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological Reviews* v.62, n.3, pp.525-63, 2010.
- Freitas F. Rotinas em Ginecologia. 4ª edição. Porto alegre: Artmed Editora, 2001.
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Chen Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. v.105, pp.1631-1639, 2000.
- García JJ, Bote E, Hinchado MD, Ortega E. A single session of intense exercise improves the inflammatory response in healthy sedentary women. *J Physiol Biochem*. v.67, n.1, pp.87-94, 2011.
- Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed

- by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation*. v.95, n.7, pp.1783-90, 1997.
- Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, Coppola L, Cozzolino D, D'Onofrio F. The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest*. v.99, n.3, pp.433-8, 1997.
 - Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. v.11, n.9, pp.607-15, 2011.
 - Gokce N. L-arginine and hypertension. *J Nutr*. v.134, n. 10 suppl., pp. 2741S-2897S, 2004.
 - Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev*. v.2012, pp.756132, 2012.
 - Goto C, Nishioka K, Umemura T, et al. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens* v.20, pp.825-830, 2007.
 - Greer BK, Jones BT. Acute arginine supplementation fails to improve muscle endurance or affect blood pressure responses to resistance training. *J Strength Cond Res*. v.25, n.7, pp.1789-94, 2011
 - Gunnett CA, Heistad DD, Faraci FM. Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: role of superoxide. *Diabetes* v.51, pp. 1931–7, 2002.
 - Guo YF, Stein PK. Circadian rhythm in the cardiovascular system: chronocardiology. *Am Heart J*. v.145, n.5 pp.779-86, 2003.
 - Halliwill JR. Mechanisms and clinical implications of post-exercise hypotension in humans. *Exerc Sport Sci Rev* v.29, pp.65–70, 2001.
 - Halliwill J, Buck TM, Lacewell AN, Romero SA. Post-exercise hypotension and sustained post-exercise vasodilation: what happens after we exercise? *Exp Physiol*. v.98, n.1, pp.7-18, 2013.
 - Halliwill JR, Dinenna FA, Dietz NM. α -Adrenergic vascular responsiveness during postexercise hypotension in humans. *J Physiol* v.550, pp.279–286, 2003.
 - Halliwill JR, Minson CT, Joyner MJ. Effect of systemic nitric oxide synthase inhibition on postexercise hypotension in humans. *J Appl Physiol*. v.89, 5, pp. 1830-6, 2000.
 - Hambrecht R, Hilbrich L, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Schoene N, Schuler G. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: Additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *J Am Coll Cardiol*. v.35, n.3, pp. 706-13, 2000.

- Harrison DG . Endothelial function and oxidant stress. Clin Cardiol. v.20, n.11, suppl 2, pp. II-11-7, 1997.
- Hausberg M, Mark AL, Hoffman RP, Sinkey CA, and Anderson EA. Dissociation of sympathoexcitatory and vasodilation actions of modestly elevated plasma insulin levels. J Hypertens 13: 1015–1021, 1995.
- Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Matsuura H, Kambe M, Kajiyama G. Effect of L-arginine infusion on systemic and renal hemodynamics in hypertensive patients. Am J Hypertens. v.12, n.1 Pt 1, pp.8-15, 1999.
- Hill L . Arterial pressure in man while sleeping, resting, working and bathing. J Physiol v.22, pp.xxvi–xxx, 1898.
- Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley GSJ. Estrogen stimulates Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of Asymmetric Dimethylarginine. Circulation. v.108, pp.1575-1580, 2003.
- Howard, MG, DiCarlo SE. Reduced vascular responsiveness after a single bout of dynamic exercise in the conscious rabbit. J Appl Physiol v.73 pp. 2662–2667, 1992.
- Huang CC, Tsai SC, Lin WT. Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. Exp Gerontol. v.43, n.6, pp.571-7, 2008.
- Hurd WW. Menopausa. In Berek, J. S.; ADASHI, E.; HILLARD, P. A. Tratado de Ginecologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- Ito A, Egashira K, Takahiro N, Muramatsu K, Takashita A. Renin-Angiotensin System is involved in mechanism of increased Serum Asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. Jpn Circ J. v.65, pp. 775-778 2001.
- Izzicupo P, D'Amico MA, Bascelli A, Di Fonso A, D'Angelo E, Di Blasio A, Bucci I, Napolitano G, Gallina S, Di Baldassarre A. Walking training affects dehydroepiandrosterone sulfate and inflammation independent of changes in spontaneous physical activity. Menopause. v.20, n.4, pp.000-000, 2012.
- Jablecka A, Checinski P, Krauss H, Micker M, Ast J. the influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. Med Sci Monit. v.10, n.1, pp. CR29-32, 2004.
- Jones H, George K, Edwards B, Atkinson G. Is the magnitude of acute post-exercise hypotension mediated by exercise intensity or total work done? Eur J Appl Physiol. v.102, pp.33-40, 2007.

- Jungersten L, Ambring A, Wall B, and Wennmalm, Å. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol* v.82 pp.760–764, 1997.
- Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Kugiyama K, Yasue H, Ogawa H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: possible role of oxidative stress. *Atherosclerosis*. v.161, n.2, pp.375-80, 2002.
- Kawano T, Nomura M, Nisikado A, Nakaya Y, Ito S. Supplementation of L-arginine improves hypertension and lipid metabolism but not insulin resistance in diabetic rats. *Life Sci*. v.73, pp.3017-3026, 2003.
- Kelly AS, Gonzalez-Campoy M, Rudser KD, Katz H, Metzigg AM, Thalin M, Bank AJ. Carvediol-lisinopril combination therapy and endothelial function in obese individuals with hypertension. *J Clin Hypertens*. v.14, n.2, pp.85-91, 2012.
- Kielstein JT, Veldink H, Lobenhoffer JM, Haller H, Perthel R, Lovric S, Lichtinghagen R, Kliem V, Bode-Böger SM. Unilateral nephrectomy causes an abrupt increase in inflammatory mediators and a simultaneous decrease in plasma ADMA: a study in living kidney donors. *Am J Physiol Renal Physiol*. v.301, pp.F1042-F1046, 2011.
- Kim OY, Chae JS, Paik JK, Seo HS, Jang Y, Cavaillon JM, Lee JH. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age (Dordr)*. v.34, n.2, pp.415-25, 2012.
- Kocak H, Oner-Lyidogan Y, Gurdol F, Oner P, Esin D. Serum Asymmetric Dimethylarginine and nitric oxide levels in obese postmenopausal women. *J Clin Lab Anal*. v.25, pp.174-178, 2011.
- Kohlhaas CF, Morrow VA, Jhakra N, Patil V, Connell JMC, Petrie JR, Salt I. Insulin rapidly stimulates L-arginine transport in human aortic endothelial cells via Akt. *Biochem Biophys Research Communications*. v.412, pp.747-751, 2011.
- Korhonen MT, Suominen H, Mero A. Age and sex differences in blood lactate response to sprint running in elite master athletes. *Can J Appl Physiol*. v.30, n.6, pp.647-665, 2005.
- Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys*. v.46, n.6, pp.421-40, 2009.
- Lee SK, Kim CS, Kim HS, Cho EJ, Joo HK, Lee JY, Lee EJ, Park JB, Jeon BH. Endothelial nitric oxide synthase activation contributes to post-exercise hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*. v.382, n.4, pp.711-4, 2009.
- Lekakis JP, Papathanassiou S, Papaioannou TG, Papamichael CM, Zakopoulos N, Kotsis V, Dagher AG, Stamatelopoulos K, Protegerou A, Stamatelopoulos F. Oral L-arginine

- improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol.* v.86, pp.317-323, 2002.
- Lerman A, Burnett JC, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR. Long term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation.* v.97, pp. 2123-2128, 1998.
 - Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Pedro R, Collins R. Propective SC. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one milion adults in 61 prospective studies. *Lancet.* v.360, n.9349, pp. 1903-13, 2002.
 - Lin CC, Tsai WC, Chen JY, Li TH, Lin LJ, Chen JH. Supplements of l-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress. *Int J Cardiol.* n.127, pp. 337-341, 2008.
 - Lizardo JH, Silveira EA, Vassallo DV, Oliveira EM. Post-resistance exercise hypotension in spontaneously hypertensive rats is mediated by nitric oxide. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v.35, n.7, pp.782-7, 2008.
 - Lockwood JM, PricherMP, Wilkins BW, Holowatz LA, Halliwill JR. Postexercise hypotension is not explained by a prostaglandin-dependent peripheral vasodilation. *J Appl Physiol* v.98 pp. 447– 453, 2005.
 - Lucotti P, Monti L, Setola E, La Canna G, Castiglioni A, Rossodivita A, et al. Oral L-arginina supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. *Metab Clin Exp.* v.58 pp. 1270-6, 2009.
 - Lucotti P, Setola E, Monti LD, Galluccio E, Costa S, Sandoli EP, et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v.291, pp. e906-12, 2006.
 - MacDonald J, MacDougall J, Interisano S, et al. Hypotension following mild bouts of resistance exercise and submaximal dynamic exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* v.79, p.148-154, 1999.
 - MacDonald J. Potential causes, mechanisms, and implications of post exercise hypotension. *J Hum Hypertens.* v.16, pp.225-236, 2002.
 - MacDonald JR, MAdougall JD, Hogben CD. Post exercise hypotention is sustained during mild exercise and simulated activities of daily living. *J Hum Hypertens.* v.15, pp.567-572, 2001.

- Marchesi S, Siepi LD, Roscini AR, Vaudo G, Sinzinger H. Oral L-arginine administration attenuates postprandial endothelial dysfunction in Young healthy males. *J Clin Pharmac Therapeutics*. v.26, pp.343-349, 2001.
- Martina V, Masha A, Gigliardi VR, Brocato L, Manzato E, Berchio A, Masserenti P, Settanni F, Casa LD, Bergamini S, Ianone A. Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. v.31, pp.940-944, 2008.
- Mattern CO, Gutilla MJ, Bright DL, Kirby TE, Hinchcliff KW, Devor ST. Maximal lactate steady state declines during aging process. *J Appl Physiol*. v.95, pp.2576-2582, 2003.
- McConell GK, Kingwell BA. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? *Exerc Sport Sci Rev*. v.34, pp.36-41, 2006.
- Meneilly GS, Battistini B, Floras JS. Contrasting effects of L-arginine on Insulin-Mediated Blood Flow and Glucose disposal in the elderly. *Metabolism*. v.50, n.2, pp. 194-199, 2001.
- Murad F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res*. v.49, pp.239-48, 1994.
- Mussi RK, Camargo EA, Ferreira T, De Moraes C, Delbin MA, Toro IF, Brancher S, Landucci EC, Zanesco A, Antunes E. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. *Eur Respir J*. v. 31, n.3, pp.645-9, 2008.
- Natali A, Buzzigoli G, Taddei S, Santoso D, Cerri M, Pedrineli R, Ferrannini E. Haemodynamics and metabolism in human forearm: effects of insulin. *Diabetes*. v.39, pp.490 –500, 1990.
- Nemati F, Rahbar-Roshandel N, Hosseini F, Mahmoudian M, Shafiei M. Anti-inflammatory effects of anti-hypertensive agents: influence on interleukin-1 β secretion by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes from patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. v.33, n.2, pp.66-76, 2011.
- Neri I, Monari F, Sgarbi L, Berardi A, Masellis G, Facchinetti F. L-arginine supplementation in women with chronic hypertension: impact on blood pressure and maternal and neonatal complication. *J Matern Fetal Neonatal Med*. v.23, n.12, pp.1456-60, 2010.
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. v.21, n.4, pp. 850-3, 2006.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v.327, n.6122, pp.524-6, 1987.
- Patil RD, DiCarlo SE, Collins HL. Acute exercise enhances nitric oxide modulation of vascular response to phenylephrine. *Am J Physiol* v.265, pp.H1184–H1188, 1993.

- Pedersen B K, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle derived interleukin-6. *Physiol Rev.* v.88, pp.1379-1406, 2008.
- Pedersen BK. Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. *Brain, Behavior and immunity.* v.25, n.5, pp. 811-6, 2011.
- Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Mass R, Börger RH, Tripepi G, Sesti G, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* v.46, n.3, pp.518-23, 2005.
- Pescatello LS, Fargo AE, Leach Jr CN, Scherzer HH. Short-term effect of dynamic exercise on arterial blood pressure. *Circulation.* v.83, pp.1557-1561, 1991.
- Pescatello LS, Guidry MA, Blanchard BE, Kerr A, Taylor AL, Johnson AN, Maresh CM, Rodriguez N, Thompson PD. Exercise intensity alters post exercise hypotension. *Journal of Hypertension.* v.22, n.10, 2004.
- Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, Magni F, Setola E, Marchesi F, Galli-Kienle M, Pozza G, Alberti KGMM. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* v.24, pp.875– 880, 2001.
- Puga GM, Novais IP, Zanesco A. Efeitos terapêuticos da suplementação de L-arginina nas doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas. *Arq Med.* v.25, n. 3, pp. 107-114, 2011.
- Rao SP, Collins HL, DiCarlo SE. Postexercise alpha-adrenergic receptor hyporesponsiveness in hypertensive rats is due to nitric oxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v.282, n.4, pp.R960-8, 2002.
- Reckelhoff JF. Gender difference in the regulation of blood pressure. *Hypertension.* v.37, pp.1199-1208, 2001.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* v.342, n.12, pp.836-43, 2000.
- Sánchez-Rodríguez MA, Zacarias-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Muñoz E, Mendonza-Núñez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause.* v.12, n.3, pp.361-7, 2012.
- Sato K, Kinoshita M, Kojima M, Miyagawa K, Takase H, Suzuki S, Dohi Y. Failure of L-arginine to induce hypotension in patients with a history of accelerated-malignant hypertension. *J Hum Hypertens.* v.14, n.8, pp.485-8, 2000.
- Shao A, Hathcock JN. Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regul toxicol pharmacol.* v.50, n.3, pp.376-99, 2008.

- Siervo M, Bluck LJC. In vivo nitric oxide synthesis, insulin sensitivity, and asymmetric dimethylarginine in obese subjects without and with metabolic syndrome. *Metabolism* v.61, n.5, pp.680-8 2012.
- Simkin-Silverman LR, Wing RR, Boraz MA, Kuller LH. Lifestyle intervention can prevent weight gain during menopause: results from a 5-year randomized clinical trial. *Ann Behav Med.*, v. 26, n. 3, p. 212-20, 2003.
- Simões HG, Hiyane WC, Benford RE, Madrid B, Prada FA, Moreira SR, de Oliveira RJ, Nakamura FY, Campbell CS. Lactate threshold prediction by blood glucose and rating of perceived exertion in people with type 2 diabetes. *Percept Mot Skills*. v.111, n.2, pp. 365-78, 2010.
- Simões HG, Moreira SR, Monfatti RJ, Campbell CS, Methods to identify the anaerobic threshold for type-2 diabetic and non-diabetic subjects. *Arq Bras Cardiol*. v.94, n.1, pp.71-8, 2010.
- Singh M, Mensah GA, Bakris G. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin*. v.28, pp.545-559, 2010.
- Skovgaard N, Gouliaev A, Aalling M, Simonsen U. The role of endogenous H₂S in cardiovascular physiology. *Curr Pharm Biotechnol* v.12, n.9, pp. 1385-93, 2011.
- Sponton CH, Rezende TM, Mallagrino PA, Franco-penteado CF, Bezerra MA, Zanesco A. Women with TT genotype for eNOS are more responsive in lowering blood pressure in response to exercise. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. v.17, n.6, pp.676-81, 2010.
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. v.78, n.6, pp.539-52, 2009.
- Steensberg A, Keller C, Hilling T, Frøsig C, Wojtaszewski JFP, Pedersen BK, Pilegaard H, Sander M. Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. *FASEB J*. v.21, pp. 2683-2694, 2007.
- Steinberg HO, Brechtel G, Johnson Ann, Fineberg N, Baron Alain. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilatation is nitric oxide dependent: A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest*. v. 94, pp. 1172-1179, 1994.
- Steiner G, Haynes FJ, Yoshino G, Vranic M. Hyperinsulinemia and in vivo very-low-density lipoprotein-triglyceride kinetics. *Am. J. Physiol*. v.246, pp.E187 – E192, 1984.
- Sttergren M, Böhm F, Malmström RE, Channon KM, Pernow J. L-arginine and tetrahydrobiopterin protects against ischemia/reperfusion-induced endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Atherosclerosis* v.204, pp.73-78, 2009.

- Stumpf C, Johnb S, Jukica J, Yilmaza A, Raaza D, Schmiederb RE, Daniela WG, Garlichs CD. Enhanced levels of platelet P-selectin and circulating cytokines in young patients with mild arterial hypertension. *Journal of Hypertension*. v.23, pp.995–1000, 2005.
- Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiakowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. v.33, n.4, pp.652-8, 1999.
- Sureda A, Cordova A, Ferrer MD, Tauler P, Pérez G, Tur JA, Pons A. Effects of L-citrulline oral supplementation on polymorphonuclear neutrophils oxidative burst and nitric production after exercise. *Free Radical Research*. v. 43, n.9, pp.00828-835, 2009.
- Tang JE, Lysecki PJ, Manolagos JJ, MacDonald MJ, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Bolus arginine supplementation affects neither muscle blood flow nor muscle protein synthesis in young men at rest or after resistance exercise. *J Nutr*. v.141, n.2, pp.195-200, 2011.
- Tangphao O, Grossman M, Chalon S, Hoffman BB, Terrence F. Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteer. *BR J Clin Pharmacol*. v.47, pp. 261-6, 1999.
- Tegtbur U, Machold H, Meyer H, Storp D, Busse M W. Bestimmung des bereichs intensiver dauerleistungsfähigkeit bei patienten mit koronarer herzkrankheit. *Z. Kardiologie*. v.90, pp.637-645, 2001.
- Thams P, Capito K. L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide. *Eur J Endocrinol*. v.140, n.1, PP.87-93, 1999.
- Theilmeier G, Chan JR, Zalpour C, Anderson B, Wang BY, Wolf A, Tsao PS, Cooke JP. Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary L-arginine. *Arter Thromb Vasc Biol*. v.17, pp.3557–64,1997.
- Tripathi P, Chandra M, Misra MK. Protective role of L-arginine against free-radical mediated oxidative damage in patients with unstable angina. *Ind J Clin Biochem*. v.25, n.3, pp.302-306, 2010.
- Tripathi P, Misra MK. Therapeutic role of L-arginine on free radical scavenging system in ischemic heart diseases. *Ind J Biochem Biophys*. v. 46, pp.498-502, 2009.
- Tsai HJ, Shang HF, Yeh CL, Yeh SL. Effects of arginine supplementation on antioxidant enzyme activity and macrophage response in burned mice. *Burns*. v.28, n.3, pp.258-63, 2002.

- Tsai PH, Tang TK, Juang CL, Chen KWC, Chi CA, Hsu MC. Effects of arginine supplementation on post-exercise metabolic responses. *Chin J Physiol.* v. 52, n.3, pp. 136-142, 2009.
- Tsioufis C, Dimitriadis k, Andrikou E, Thomopoulos C, Tsiachris D, Stefanadi E, Mihos C, Miliou A, Papademetriou V, Stefanadis C. ADMA, C-reactive protein, and albuminuria in untreated essential hypertension: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis.* v.55, n.6, pp. 1050-9, 2010.
- Ueda S, Petrie JR, Cleland SJ, Elliott HL, Connell MC. The vasodilating effects of insulin is dependent on local glucose uptake: a double blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 83, pp. 2126-2131, 1998.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* v.339, n.8793, pp.572-5, 2004.
- Vanhala M, Kautiainen H, Kumpusalo E. Proinflammation and hypertension: A population-Based Study. *Mediators of Inflammation.* v.2008, pp. 1-7, 2008
- Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets: a reevaluation. *J Nutri.* v.116, n.36-46, 1986.
- Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MAR, Richir M, Davids M, Wisselink W, Mol BAJM, Leeuwen PAM. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. *European journal of Heart Failure.* v.12, pp.1274-1281, 2010.
- Vural P, Canbaz M, Akgul C. Effects of menopause and postmenopausal tibolone treatment on plasma TNFalpha, IL-4, IL-10, IL-12 cytokine pattern and some bone turnover markers. *Pharmacol Res.* v.53, n.4, pp.367-71, 2006.
- Wallace JP, Bogle PG, King BA, Krasnoff JB, Jastremski CA. A Comparison of 24-h Average Blood Pressures and Blood Pressure Load Following Exercise. *Am J Hypertens.* v.10, n.7, pp. 728-34, 1997.
- Wasserman K, McIlroy M B. Detecting the threshold of metabolism in cardiac patients during exercise. *American journal of cardiology,* v.14, p.844-852, 1964.
- Wassertheil-Smoller S, Anderson G, Psaty BM, Black HR, Manson J, Wong N. Hypertension and its treatment in postmenopausal women: baseline data from the Women's Health Initiative, *Hypertension,* v.36, n.5, p.780-789, 2000.
- Wilson JR, Kapoor SC. Contribution of prostaglandins to exercise-induced vasodilation in humans. *Am J Physiol* v.265, pp. H171–H175, 1993.
- Wilson JD, Foster DW, William's textbook of endocrinology. New York: Saunders Company, 1992.

- Wolf A, Zalpour C, Theilmeyer G, Wang BY, Adrian MA, Barbara Anderson RN, Tsao PS, Cooke JP. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol.* v. 29, pp. 479-85, 1997.
- Yang XP, Reckelhoff JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* v.20, n.2, pp. 133-8, 2011.
- Yao T, Andersson S, Thoren P. Long-lasting cardiovascular depressor response following sciatic stimulation in spontaneously hypertensive rats. Evidence for the involvement of central endorphin and serotonin systems. *Brain Res.* v.244, pp.295Y303, 1982.
- Yasui T, Uemura H, Yamada M, Matsuzaki T, Tsuchiya N, Noguchi M, Yuzurihara M, Kase Y, Irahara M. Associations of interleukin-6 with interleukin-1beta, interleukin-8 and macrophage inflammatory protein-1beta in midlife women. *Cytokine.* v.41, n.3, pp.302-6, 2008.
- Zanesco A, Antunes E. Células endoteliais. In: Hernandez F. Carvalho; Carla B. Collares-Buzato. (Eds). *Células.* São Paulo: Manole, 2005.
- Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: Pharmacological approaches. *Pharmacol Ther.* v.114, pp.307-17, 2007.
- Zanesco A, Zaros P. Exercício físico e menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v.31, n.5, pp.254-61, 2009.
- Zaros, PR, Romero C, Moraes C, Zanesco A. Effect of 6-months of physical exercise on the nitrate/nitrite levels in hypertensive postmenopausal women. *BMC Womens Health,* v. 9, pp. 17-25, 2009.
- Zarzuelo MJ, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, Nieto A, Romero M, Quintela AM, López-Sepúlveda R, Gómez-Guzmán M, Bailón E, Rodríguez-Gómez I, Zarzuelo A, Gálvez J, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor- β activation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* v.58, n.4, pp.733-43, 2011.
- Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* v.105, n.7, pp.804-9, 2002.

APOIO FINANCEIRO

Apoio financeiro: este projeto conta com o auxílio pesquisa da FAPESP, processo número 2009/17751-3 e bolsa FAPESP processo 2011/11457-6.