

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DO EXERCÍCIO  
EM CICLOERGÔMETRO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS COM DIABETES TIPO 1**

**ANA PAULA TRUSSARDI FAYH**

**Orientador:  
ALVARO REISCHAK DE OLIVEIRA**

**Co-orientador:  
JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA**

**Porto Alegre, RS – Brasil.  
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DO EXERCÍCIO  
EM CICLOERGÔMETRO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS COM DIABETES TIPO 1**

**ANA PAULA TRUSSARDI FAYH**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, como requisito parcial para a obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO – ATIVIDADE FÍSICA E SAÚDE.

Orientador:  
**ALVARO REISCHAK DE OLIVEIRA**

Co-orientador:  
**JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA**

Porto Alegre, RS – Brasil.  
2005

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Paulo Henrique Fayh e  
Tania Trussardi Fayh,  
pelo amor incondicional, sacrifício,  
paciência, energia, fé, exemplo...  
Muito obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Neste momento muito especial, deixo registrada minha gratidão àqueles que, de alguma forma, me auxiliaram para que este trabalho fosse realizado.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Alvaro Reischak de Oliveira, por ter-me despertado o interesse pela pesquisa ainda no âmbito da graduação, interesses estes fortalecidos durante a especialização e consolidados durante o mestrado. Por todos os conselhos, que ultrapassaram o âmbito acadêmico.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, por ter me “amparado” durante estes anos com seus ensinamentos e exemplos profissionais. Por ter disponibilizado não apenas reagentes, mas também atenção e dicas para que este trabalho fosse concretizado.

Ao Prof. Dr. Rogério Friedman, por ter confiado neste trabalho e disponibilizado seu tempo para a execução do mesmo. Pela paciência despendida nos momentos angustiantes.

Ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, pelo acesso ao Setor de Métodos Não Invasivos do HCPA e empréstimo do pletismógrafo.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr, por ter disponibilizado seu laboratório para as análises de nitritos.

À Katiuce Borges Sapata, por todo auxílio, inicialmente como aluna de iniciação científica, e após como colega de profissão. Por ter me ensinado, de forma indireta, a orientar, agüentado o meu mau humor e ter-se tornado uma grande amiga.

Aos colegas do Grupo de Estudos em Fisiologia do Exercício (GEFEX), especialmente Jerri Luiz Ribeiro, pela orientação nos mais diversos momentos do estudo, bem como pela ajuda na análise estatística dos dados. Também ao Eduardo Freiburger e Maximiliano Isoppo Schaun, pelo auxílio nas coletas de dados.

Aos colegas do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (CEEEO), especialmente ao Márcio Martins Silveira, Evandro Gomes da Silva, Marcos Oliveira e Guilherme Behr, pelo socorro quando faltava um reagente ou quando a técnica não funcionava da maneira esperada.

Ao colega e amigo Alexandre Ramos Lazzarotto, pelas sugestões na elaboração deste projeto e auxílio na metodologia, bem como à farmacêutica Cristiana Lanz, pela manipulação das cápsulas.

Aos voluntários, que disponibilizaram seu tempo e atenção para que este estudo pudesse ser realizado.

Aos colegas do PPGCMH, especialmente aos amigos do Grupo de Pesquisa em Atividades Aquáticas e Terrestres, pela amizade, cervejadas, sinucas e risadas.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da UFRGS, do Laboratório de Pesquisa do exercício da UFRGS e do Laboratório de Patologia Clínica do HCPA, sempre prontos a ajudar.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao FIPE – HCPA, PROPESQ e FAPERGS pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais e familiares, pela paciência e estímulo dedicados nestes últimos anos.

## RESUMO

### EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DO EXERCÍCIO EM CICLOERGÔMETRO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS COM DIABETES DO TIPO 1

Autora: Ana Paula Trussardi Fayh

Orientador: Alvaro Reischak de Oliveira

Co-orientador: José Cláudio Fonseca Moreira

**Introdução e Objetivo:** O fluxo sanguíneo gera estresse de cisalhamento sobre a parede dos vasos induzindo a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina pela ação da eNOs, liberando o vasodilatador óxido nítrico. O exercício aumenta o fluxo sanguíneo e ativa a eNOs, promovendo vasodilatação. Um aumento no diâmetro do vaso diminuiria os níveis de estresse oxidativo pela diminuição do estresse de cisalhamento. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação de L-arginina sobre a função endotelial e estresse oxidativo em indivíduos com diabetes tipo 1. **Métodos:** Foram avaliados 10 indivíduos do sexo masculino com diabetes do tipo 1 e 20 indivíduos saudáveis para controle, que realizaram teste de cargas progressivas em cicloergômetro para a determinação da carga de exercício, que correspondia a 10% abaixo do 2<sup>o</sup> limiar ventilatório. Em uma nova data, os voluntários se exercitaram durante 45 minutos em cicloergômetro, onde foram avaliados parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo antes e depois do exercício. Os voluntários foram separados aleatoriamente em dois grupos: L-arginina e placebo. A suplementação de L-arginina foi realizada a partir da ingestão de 7g ao dia na forma de cápsulas; o grupo placebo recebeu amido. Após a suplementação, foi repetido o protocolo de exercício. A função endotelial foi avaliada através da avaliação do fluxo sanguíneo e concentração de nitritos plasmáticos; o estresse oxidativo foi avaliado pelas técnicas do TBARS, carbonil, TRAP e ácido úrico plasmáticos. Utilizou-se ANOVA Fatorial de duas vias e teste post hoc de Tukey para análise dos resultados, aceitou-se  $p < 0,05$  como significativo. **Resultados:** Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. Os indivíduos com diabetes do tipo 1 não apresentaram disfunção endotelial quando

comparados aos controle, entretanto tiveram parâmetros de estresse oxidativo elevados (TBARS de  $1,09 \pm 0,41$  e  $2,44 \pm 0,46$  nmolMDA.mg PTN<sup>-1</sup>,  $p=0,039$ ; carbonil de  $0,148 \pm 0,02$  e  $1,48 \pm 0,20$  fM.mg PTN<sup>-1</sup>,  $p=0,000$  e ácido úrico de  $44,55 \pm 2,06$  e  $28,10 \pm 1,57$  mg/dl,  $p=0,000$ , em controles e diabéticos, respectivamente). O exercício aumentou significativamente o fluxo sanguíneo nos controle e diabéticos ( de  $3,53 \pm 0,35$  para  $5,46 \pm 0,35$  ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> no controle,  $p=0,001$  e de  $2,66 \pm 0,33$  para  $3,77 \pm 0,36$  ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> nos indivíduos com diabetes,  $p= 0,000$ ), mas não alterou as concentrações plasmáticas de nitritos nem os parâmetros de estresse oxidativo. Os diabéticos que receberam suplementação com L-arginina tiveram seus valores de fluxo sanguíneo em repouso elevados significativamente (de  $3,05 \pm 0,63$  para  $4,74 \pm 0,86$  ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p=0,036$ ), efeito não encontrado no grupo controle que recebeu a suplementação. Entretanto, este grupo não apresentou aumento do fluxo sanguíneo após o exercício, conforme observado no momento antes da suplementação. **Conclusão:** O exercício físico em cicloergômetro aumenta o fluxo sanguíneo sem alterar os parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos controle e diabéticos tipo 1. A suplementação com L-arginina aumenta a vasodilatação dependente do endotélio em indivíduos com diabetes do tipo 1, e atenua o aumento do fluxo sanguíneo em resposta ao exercício nestes pacientes. Esta resposta demonstrou uma possível melhora na função endotelial na situação de repouso com a suplementação. Entretanto, restam questões obscuras sobre a resposta de fluxo ao exercício sob o efeito da L-arginina nesta população, sendo necessários estudos adicionais para o esclarecimento.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF THE SUPPLEMENTATION OF L-ARGININE AS WELL AS PHYSICAL EXERCISES IN CYCLE ERGOMETER OVER THE ENDOTHELIAL FUNCTION AND OXIDATIVE STRESS IN INDIVIDUALS WITH TYPE 1 DIABETES

Author: Ana Paula Trussardi Fayh

Adviser: Alvaro Reischak de Oliveira

Co-adviser: José Cláudio Fonseca Moreira

**Introduction and Objective:** Blood flow generates shear stress over the surface of the veins inducing the conversion of L-arginine amino acid into L-citruline through the action of the eNOs, releasing the vasodilator nitric oxide. The exercise increases blood flow and activates eNOs, promoting vasodilation. An increase in the diameter of the vein would decrease the levels of oxidative stress through shear stress decrease. The goal of this study was to verify the effects of L-arginine supplementation over the endothelial function and the oxidative stress in individuals with type 1 diabetes. **Methods:** Ten male individuals who suffered from type 1 diabetes and 20 healthy individuals were evaluated to control. Those have undergone a progressive load test in a cycle ergometer in order to set the load of exercise, which was 10% below the second ventilatory threshold. In another day, the volunteers exercised for 45 minutes in cycle ergometer, when parameters of endothelial function and oxidative stress before and after exercising were evaluated. The volunteers were divided aleatory into two groups: L-arginine and placebo. L-arginine supplementation was done with the ingestion of 7g a day as capsules; the placebo group received amido. After the supplementation, the exercise protocol was repeated. The endothelial function was evaluated through the evaluation of blood flow and plasmatic nitrites; the oxidative stress was evaluated through TBARS, carbonyl, TRAP and plasmatic uric acid techniques. Double-way factorial ANOVA and Tukey post hoc tests were used for analysing the results, in which  $p < 0,05$  was accepted as significant. **Results:** Data expressed in media  $\pm$  standard error. Individuals with type 1 diabetes have not shown endothelial dysfunction when compared to the control, however, they have had higher oxidative stress parameters

(TBARS  $1,09 \pm 0,41$  e  $2,44 \pm 0,46$  nmolMDA.mg PTN<sup>-1</sup>,  $p=0,039$ ; carbonyl  $0,148 \pm 0,02$  e  $1,48 \pm 0,20$  fM.mg PTN<sup>-1</sup>,  $p=0,000$  and uric acid  $44,55 \pm 2,06$  and  $28,10 \pm 1,57$  mg/dl,  $p=0,000$ , in control individuals and diabetics, respectively). The exercise has significantly increased blood flow in both control and diabetic individuals (from  $3,53 \pm 0,35$  to  $5,46 \pm 0,35$  ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> in control individuals,  $p=0,001$  and from  $2,66 \pm 0,33$  to  $3,77 \pm 0,36$  ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> in diabetics,  $p= 0,000$ ), but have not modified neither plasmatic concentration of nitrites nor oxidative stress levels. The diabetics who received L-arginine supplementation had their blood flow intensity increased while resting (from  $3,05 \pm 0,63$  to  $4,74 \pm 0,86$  ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p=0,036$ ), effect not observed in the control group that received supplementation. In spite of that, that group did not show an increase in blood flow after the exercise, as it had been observed in the moment before the supplementation.

**Conclusion:** Physical exercise in cycle ergometer increases blood flow without altering oxidative stress parameters in control individuals as well and in the ones with type 1 diabetes. The supplementation with L-arginine increases vasodilation depending on the endothelium in individuals with type 1 diabetes, and it relieves the increasing of the blood flow as a response to the exercise in those patients. This response has shown a possible improvement in endothelial function while resting with the supplementation. However, there are still some non-answered questions about the flow response to the exercise under the effect of L-arginine in this population, making some further studies necessary for elucidation.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Conteúdo de L-arginina por alimento.....	<b>43</b>
<b>Tabela 2</b>	Características dos grupos em relação à idade, tempo de doença, massa corporal, estatura, IMC, percentual de gordura, $VO_{2máx}$ e $FC_{máx}$ .....	<b>67</b>
<b>Tabela 3</b>	Resultados dos exames de glicemia em jejum, $A_{1c}$ , colesterol, colesterol HDL e triglicerídeos.....	<b>69</b>
<b>Tabela 4</b>	Avaliação do consumo alimentar em relação à calorias, carboidratos, proteínas e lipídeos.....	<b>71</b>
<b>Tabela 5</b>	Uréia na urina (mg/dl) nos grupos saudáveis e diabéticos, antes e após a suplementação.....	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estresse oxidativo e diabetes.....	<b>40</b>
<b>Figura 2</b>	Teste de cargas progressivas em cicloergômetro.....	<b>56</b>
<b>Figura 3</b>	Ventilação em relação ao consumo de oxigênio. Teste realizado em nosso laboratório.....	<b>57</b>
<b>Figura 4</b>	Equivalentes ventilatórios do oxigênio e do dióxido de carbono em relação ao consumo de oxigênio.....	<b>57</b>
<b>Figura 5</b>	Pletismografia de oclusão venosa.....	<b>59</b>
<b>Figura 6</b>	Curva de fluxo sanguíneo obtida pela técnica de pletismografia de oclusão venosa.....	<b>60</b>
<b>Figura 7</b>	Consumo máximo de oxigênio avaliado em teste de cargas progressivas em cicloergômetro. * $p < 0,05$ entre os grupos.....	<b>68</b>
<b>Figura 8</b>	Frequência cardíaca máxima avaliada em teste de cargas progressivas em cicloergômetro. * $p < 0,05$ entre os grupos.....	<b>68</b>
<b>Figura 9</b>	Glicemia em jejum de indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>70</b>
<b>Figura 10</b>	Valores de A1c nos indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>70</b>
<b>Figura 11</b>	Excreção de uréia na urina antes e após a suplementação nos grupos experimentais. * $p < 0,05$ .....	<b>72</b>
<b>Figura 12</b>	Fluxo sanguíneo de indivíduos controle e diabéticos....	<b>73</b>
<b>Figura 13</b>	Nitritos de indivíduos controle e diabéticos .....	<b>74</b>
<b>Figura 14</b>	TBARS em indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>75</b>
<b>Figura 15</b>	Carbonil em indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>75</b>
<b>Figura 16</b>	TRAP de indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>76</b>
<b>Figura 17</b>	Ácido úrico de indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>76</b>
<b>Figura 18</b>	Fluxo sanguíneo em repouso e depois do exercício em indivíduos controle e diabéticos. * $p < 0,05$ .....	<b>77</b>
<b>Figura 19</b>	Nitritos em repouso e depois do exercício em indivíduos controle e diabéticos.....	<b>78</b>
<b>Figura 20</b>	TBARS em repouso e depois do exercício em indivíduos controle e diabéticos.....	<b>79</b>
<b>Figura 21</b>	Carbonil em repouso e depois do exercício nos indivíduos controle e diabéticos.....	<b>79</b>
<b>Figura 22</b>	TRAP em repouso e depois do exercício nos indivíduos controle e diabéticos.....	<b>80</b>
<b>Figura 23</b>	Ácido úrico em repouso e depois do exercício, nos indivíduos controle e diabéticos.....	<b>80</b>
<b>Figura 24</b>	Fluxo sanguíneo antes e depois da suplementação nos grupos experimentais. * $p < 0,05$ .....	<b>81</b>

<b>Figura 25</b>	Nitritos antes e depois da suplementação nos grupos experimentais.....	<b>82</b>
<b>Figura 26</b>	TBARS antes e depois da suplementação nos grupos experimentais.....	<b>83</b>
<b>Figura 27</b>	Carbonil antes e depois da suplementação nos grupos experimentais.....	<b>84</b>
<b>Figura 28</b>	TRAP antes e depois da suplementação nos indivíduos controle.....	<b>84</b>
<b>Figura 29</b>	TRAP antes e depois da suplementação nos indivíduos diabéticos.....	<b>85</b>
<b>Figura 30</b>	Ácido úrico antes e após a suplementação nos grupos experimentais.....	<b>85</b>
<b>Figura 31</b>	Fluxo sanguíneo dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados. * $p < 0,05$ .	<b>87</b>
<b>Figura 32</b>	Nitritos dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.....	<b>88</b>
<b>Figura 33</b>	TBARS dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.....	<b>88</b>
<b>Figura 34</b>	Carbonil dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.....	<b>89</b>
<b>Figura 35</b>	Ácido úrico dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.....	<b>89</b>

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b>	Riscos e benefícios do exercício para pacientes com diabetes mellitus do tipo 1.	<b>27</b>
<b>Quadro 2</b>	Normas gerais da ADA e do ACSM para a prática de exercícios aos portadores de diabetes tipo 1 (e outros usuários de insulina).	<b>28</b>
<b>Quadro 3</b>	Protocolos para análise sanguínea utilizados no HCPA	<b>61</b>

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ACSM -</b>	American College of Sports Medicine
<b>ADA -</b>	American Diabetes Association
<b>ATP -</b>	Adenosina trifosfato
<b>AU -</b>	Ácido úrico
<b>CAT -</b>	Catalase
<b>CHO -</b>	Carboidrato
<b>DAC -</b>	Doença arterial coronariana
<b>DCV -</b>	Doença cardiovascular
<b>DM -</b>	Diabetes mellitus
<b>ERN -</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ERO -</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FC -</b>	Frequência cardíaca
<b>GMPc -</b>	Guanilato monofosfato cíclico
<b>GPx -</b>	Glutathiona peroxidase
<b>HDL -</b>	Lipoproteína de alta intensidade
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -</b>	Peróxido de hidrogênio
<b>LA -</b>	Limiar aeróbio
<b>LAn -</b>	Limiar anaeróbio
<b>LAPEX -</b>	Laboratório de Pesquisa do Exercício
<b>LDL -</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LIP -</b>	Lípido
<b>LV -</b>	Limiar ventilatório
<b>LV1 -</b>	Primeiro limiar ventilatório
<b>LV2 -</b>	Segundo limiar ventilatório
<b>MDA -</b>	Malondialdeído
<b>NO -</b>	Óxido nítrico
<b>NOs -</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NO<sup>2-</sup> -</b>	Nitrato
<b>NO<sup>3-</sup> -</b>	Nitrito
<b>O<sub>2</sub> -</b>	Oxigênio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup> -</b>	Radical superóxido
<b>OH-</b>	Radical hidroxil
<b>PAD -</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAS -</b>	Pressão arterial sistólica
<b>PTN -</b>	Proteína
<b>SOD -</b>	Superóxido dismutase
<b>TBARS -</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>UFRGS -</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>VO<sub>2</sub> -</b>	Consumo de oxigênio
<b>VO<sub>2</sub>máx -</b>	Consumo máximo de oxigênio
<b>VCO<sub>2</sub> -</b>	Produção de dióxido de carbono
<b>XO -</b>	Xantina oxidase
<b>W -</b>	Watt

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
1.2 HIPÓTESES.....	20
1.3 DEFINIÇÃO OPERACIONAL DOS TERMOS.....	21
2 MARCO TEÓRICO.....	23
2.1 DIABETES.....	23
2.2 FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	29
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
2.4 L-ARGININA.....	42
3 METODOLOGIA.....	47
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....	47
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	47
3.3 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	48
3.4 INSTRUMENTOS DE MEDIDAS.....	49
3.5 PROCEDIMENTO DAS COLETAS DE DADOS.....	52
3.5.1 Antropometria.....	54
3.5.2 Protocolo para a determinação do $VO_{2máx}$ .....	54
3.5.3 Teste de cargas progressiva.....	55
3.5.4 Determinação dos limiares ventilatórios.....	56
3.5.5 Teste submáximo.....	58
3.5.6 Avaliação do fluxo sanguíneo.....	58
3.5.7 Coleta e análise do sangue e urina.....	60
3.5.7.1 Quantificação de nitritos plasmáticos.....	62
3.5.7.2 Quantificação de proteínas no plasma.....	62
3.5.7.3 Quantificação dos níveis de TBARS.....	63
3.5.7.4 Quantificação dos grupamentos carbonil.....	63
3.5.7.5 Determinação do potencial antioxidante não enzimático (TRAP).....	64
3.5.7.6 Ácido Úrico.....	64
3.6 SUPLEMENTAÇÃO.....	65
3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	65
4 RESULTADOS.....	67
4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E DIETÉTICAS.....	67
4.2 EFEITO DA DOENÇA SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	73
4.2.1 Função endotelial.....	73
4.2.2 Estresse oxidativo.....	74
4.3 EFEITO DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	77
4.3.1 Função endotelial.....	77
4.3.2 Estresse oxidativo.....	78
4.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	81

4.4.1 Função endotelial.....	81
4.4.2 Estresse oxidativo.....	83
4.5 EFEITO COMBINADO DA SUPLEMENTAÇÃO E DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	86
5 DISCUSSÃO.....	90
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E DIETÉTICAS.....	90
5.2 EFEITO DA DOENÇA SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	92
5.2.1 Efeito da doença sobre a função endotelial.....	92
5.2.2 Efeito da doença sobre o estresse oxidativo.....	95
5.3 EFEITO DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	98
5.3.1 Efeito do exercício sobre a função endotelial.....	98
5.3.2 Efeito do exercício sobre o estresse oxidativo.....	99
5.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	102
5.5 EFEITOS COMBINADOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L- ARGININA E DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	106
5.6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	109
6 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
ANEXOS.....	134

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo da disfunção endotelial e suas relações com o exercício tornou-se objeto de estudo deste projeto a partir de inúmeras evidências de que o exercício regular e uma dieta adequada diminui a progressão de doenças cardiovasculares.

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por secreção anormal de insulina, distúrbios no metabolismo dos carboidratos e lipídios, e é diagnosticada pela presença de hiperglicemia. Representa um grande problema de saúde pública, predispondo a aumento na mortalidade por doenças cardiovasculares e também aumento na morbimortalidade pelo desenvolvimento de nefropatia, neuropatia e retinopatia (CERIELLO et al, 1999).

A morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos está amplamente atribuída à complicações macrovasculares ateroscleróticas, bem como disfunções microvasculares. A importância do endotélio na manutenção da função vascular normal tem sido progressivamente reconhecida. A vasodilatação dependente do endotélio é fortemente dependente do óxido nítrico (NO), e torna-se diminuída em doenças vasculares. Este fato é frequentemente associado com fatores de risco vascular convencionais (MAIORANA et al, 2001).

A habilidade de manejar as estratégias para alterar a função vascular dependente do endotélio pode ser importante na intervenção ou até mesmo na prevenção de doenças cardiovasculares (COOKE & DZAU, 1997). A maioria dessas doenças é caracterizada por uma disfunção endotelial que, por exemplo, tem sido demonstrada como uma manifestação prévia da coronariopatia durante o desenvolvimento da aterogênese. Além da redução das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e terapias antioxidantes, a suplementação com L-arginina e o exercício representam estratégias anti-aterogênicas que podem restaurar a vasodilatação dependente do fluxo. A L-arginina, substrato fisiológico da síntese do NO, é

um aminoácido não essencial que melhora a vasodilatação dependente do NO e atua como agente anti-aterogênico reduzindo o estresse oxidativo (MAXWELL et al, 2002).

A óxido nítrico sintase (NOs) é a enzima responsável pela conversão bioquímica da L-arginina para L-citrulina, com conseqüente formação de óxido nítrico. Entre outras funções, o óxido nítrico promove o relaxamento da musculatura lisa vascular (SKYRME-JONES et al., 2000). Os efeitos bioquímicos do óxido nítrico são curtos: sua meia vida é de apenas 3-5s (PRELI et al, 2002). O NO é um radical livre que é rapidamente oxidado a nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ). A oxidação do óxido nítrico pode ocorrer com outros radicais livres, assim como o superóxido.

A produção celular endotelial de óxido nítrico desempenha um papel central na manutenção da vasculatura saudável. Os fatores de risco tradicionais de doença arterial coronariana (DAC), incluindo hipercolesterolemia, fumo, hipertensão e idade, podem facilitar o aparecimento de aterosclerose, em parte inibindo a produção endotelial de NO (SAKAMOTO et al, 1998).

Os efeitos benéficos da L-arginina são resultados do aumento da produção de NO, podendo representar ação terapêutica benéfica para condições associadas com disfunção endotelial. Existe um grande interesse em estudos a cerca dessa área, entretanto os resultados ainda são controversos. O treinamento em animais melhora a vasodilatação dependente do endotélio e a regulação da expressão da enzima NOs (KINGWELL, 1997). Adicionalmente, estudos recentes indicaram que o exercício pode melhorar a função endotelial em indivíduos normais e pacientes com insuficiência cardíaca crônica (GREEN, 2004; MARWICK, 2005). Embora a atividade física e o treinamento sejam bastante recomendados para que pacientes diabéticos modifiquem sua composição corporal, melhorem sua capacidade cardiorrespiratória e melhorem sua tolerância à glicose, poucos estudos têm-se preocupado em investigar seus efeitos na função vascular.

Os resultados de estudos publicados demonstraram que o aumento agudo na concentração de glicose sanguínea pode prejudicar a homeostase fisiológica em vários sistemas do organismo vivo (ASAYAMA et al, 1993, CERIELLO et al, 1999, UKPDS 33, 1998). A hiperglicemia crônica representa um importante fator patogênico das complicações microvasculares e macrovasculares em pacientes diabéticos. Os mecanismos

pelos quais a hiperglicemia exerceria esses efeitos continuam indefinidos, entretanto acredita-se que a produção de radicais livre esteja envolvida (De ANGELIS et al, 2000).

O papel da atividade física está bem estabelecido na prevenção e controle de diversas doenças, por exemplo hipertensão, dislipidemias, doenças coronarianas e alguns tipos de câncer (exemplo cólon). Por outro lado, sabe-se que a atividade física é uma reconhecida forma de estresse. A exposição crônica a esse estresse, chamada treinamento físico, promove uma série de adaptações fisiológicas em nível metabólico, neuromuscular, cardiovascular, respiratório, gastrointestinal e outros.

Restam questões não respondidas acerca das adaptações da atividade física em pacientes com disfunção endotelial. Ainda não se sabe ao certo se o estresse oxidativo induzido pelo exercício acarreta prejuízo à função de resistência e condução vascular em paciente com DM. São necessários estudos mais aprofundados para determinarmos se as adaptações promovidas pelo treinamento, isoladamente, poderiam melhorar estes fatores. Adicionalmente, a contribuição da suplementação dietética de certos nutrientes para a otimização dessas adaptações também não está bem estabelecida.

A partir das evidências sobre a relação das respostas endoteliais com o fluxo sanguíneo e disponibilidade do aminoácido L-arginina, a literatura demonstra uma carência de estudos que objetivem verificar se a suplementação oral de L-arginina diminui parâmetros de estresse oxidativo e melhora a função endotelial em indivíduos com diabetes do tipo 1, bem como comparem as respostas endoteliais e de fluxo sanguíneo e suas inter-relações com o exercício após a suplementação de L-arginina.

Antes da realização do atual estudo, foram realizados dois projetos preliminares para auxiliar na elaboração de nossas hipóteses. Todos os testes foram realizados com voluntários do sexo masculino, saudáveis, e que não necessariamente fizeram parte do estudo principal.

Inicialmente, foram realizados testes para verificar o efeito da suplementação de L-arginina sobre o fluxo sanguíneo. Foram avaliados seis indivíduos, que realizaram exercício de preensão palmar com dinamômetro Jamar a 30% da contração voluntária máxima (CVM) durante 6 minutos, sendo 5 segundos de período de contração e 5 segundos de relaxamento, conforme protocolo proposto por BROWN e colaboradores (2000). Foi avaliado o fluxo sanguíneo através da pletismografia de oclusão venosa nos momentos

antes e depois do exercício. Após este primeiro teste, os indivíduos receberam cápsulas de suplementação oral de L-arginina durante três dias, na dosagem de 7g/dia, e repetiram o protocolo de estudo. O exercício aumentou o fluxo sanguíneo nos voluntários, entretanto a suplementação de L-arginina não foi capaz de alterar os valores de fluxo em repouso e nem em resposta ao exercício (anexo 1).

Uma segunda avaliação foi realizada com oito voluntários, utilizando-se o mesmo protocolo de exercício e suplementação, entretanto agora com o objetivo de verificar se a suplementação oral de L-arginina altera índices de estresse oxidativo em repouso e frente ao exercício de prensão palmar em indivíduos saudáveis (SAPATA et al., 2003). Calculou-se dietas individuais que deveriam ser realizadas por três dias antes do primeiro teste até o final do protocolo. Os voluntários foram aleatoriamente alocados em dois grupos (arginina e placebo), e o estudo foi duplo-cego. O sangue foi coletado antes e depois de cada teste de exercício, e foram analisados lipoperoxidação, capacidade antioxidante total e ácido úrico plasmáticos. Verificou-se que o protocolo de exercício não foi capaz de alterar os parâmetros analisados, entretanto a suplementação de L-arginina alterou parâmetros de estresse oxidativo, aumentando lipoperoxidação e diminuindo capacidade antioxidante total em repouso.

A partir dos resultados obtidos através destes projetos, esta pesquisa foi realizada com os seguintes propósitos e hipóteses:

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Verificar o efeito da suplementação de L-arginina e do exercício em cicloergômetro sobre a função endotelial e parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos com diabetes tipo 1 e indivíduos não diabéticos (controle).

### **1.1.2 Objetivos específicos**

\*Quantificar os parâmetros de função endotelial através da técnica de pletismografia de oclusão venosa realizada na perna, e da medida sanguínea da concentração de nitritos plasmáticos.

\*Quantificar os parâmetros de estresse oxidativo através da medida sanguínea de lipoperoxidação, da oxidação de proteínas, da capacidade antioxidante total e do ácido úrico.

\*Observar o efeito do exercício físico sobre os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo.

\*Observar o efeito da suplementação de L-arginina sobre os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo.

\*Observar o efeito combinado da suplementação de L-arginina e do exercício sobre os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo.

\*Comparar os resultados dos grupos controle e diabético tipo 1 em relação aos parâmetros propostos acima.

## **1.2 HIPÓTESES**

H1 – Os indivíduos com diabetes tipo 1 apresentam função endotelial prejudicada quando comparado aos indivíduos controle.

H2 - Os indivíduos com diabetes tipo 1 apresentam parâmetros de estresse oxidativo aumentados quando comparado aos indivíduos controle.

H3 – O exercício aumenta o fluxo sanguíneo e concentração de nitritos plasmáticos de ambos os grupos.

H4 – O exercício aumenta o estresse oxidativo nos indivíduos com diabetes tipo 1, mas não no controle.

H5 – A suplementação de L-arginina é capaz de provocar modificações positivas sobre a função endotelial dos indivíduos com diabetes tipo 1, mas não do controle.

H6 – A suplementação de L-arginina é capaz de provocar modificações positivas sobre os parâmetros de estresse oxidativo dos indivíduos com diabetes tipo 1, mas não do controle.

H7 – A suplementação de L-arginina associada ao exercício físico é capaz de potencializar as modificações positivas sobre os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo nos indivíduos com diabetes tipo 1.

### **1.3 DEFINIÇÃO OPERACIONAL DOS TERMOS**

**Controle** - indivíduos do sexo masculino, não atletas, que não estavam engajados em um programa de atividades físicas, entretanto que praticassem exercícios físicos esporádicos, e que não apresentem doenças prévias.

**Diabéticos** – indivíduos do sexo masculino com diabetes do tipo 1, que não estavam engajados em um programa de atividades físicas, entretanto que praticassem exercícios físicos esporádicos, sem complicações vasculares decorrentes da doença.

**Exercício** – exercício físico em cicloergômetro em intensidade 10% abaixo do segundo limiar ventilatório.

**Suplementação de L-arginina** – suplementação por via oral de 7g de L-arginina ao dia, durante sete dias.

**Função endotelial** – corresponde às medidas de fluxo sanguíneo através da técnica de pletismografia de oclusão venosa e da concentração de nitritos em amostras de sangue coletadas dos grupos experimentais.

**Estresse oxidativo** – corresponde às determinações dos níveis de lipoperoxidação, de oxidação de proteínas, da capacidade antioxidante total e de ácido úrico realizadas em amostras de sangue coletadas dos grupos experimentais.

## **2 MARCO TEÓRICO**

A revisão de literatura está dividida em quatro partes: inicialmente abordou-se o diabetes mellitus, incluindo epidemiologia e características da doença. Em um segundo momento, abordou-se a questão da função endotelial, sendo seguida pelo estresse oxidativo. Enfim, analisou-se as questões referentes ao aminoácido L-arginina e suas atribuições. O exercício foi discutido em todos os momentos da revisão.

### **2.1 DIABETES**

Diabetes mellitus, também denominado simplesmente de diabetes, é um distúrbio do metabolismo dos carboidratos caracterizados por níveis elevados de açúcar no sangue (hiperglicemia) e pela presença de açúcar na urina (glicosúria). Ele ocorre quando existe uma produção inadequada de insulina pelo pâncreas ou uma utilização inadequada de insulina pelas células (LAAKSONEN, 2003). A maioria dos casos de diabetes é classificada em duas categorias:

1. Diabetes tipo 1: Essa forma de diabetes é resultado da destruição das células beta pancreáticas por um processo imunológico, ou seja, pela formação de anticorpos pelo próprio organismo contra as células beta pancreáticas, levando a deficiência de insulina. Em geral costuma acometer crianças e adultos jovens, mas pode ser desencadeado em qualquer faixa etária.

2. Diabetes tipo 2: Nesses pacientes, a insulina é produzida pelas células beta pancreáticas, porém, sua ação está dificultada, caracterizando um quadro de resistência insulínica. Isso ocasiona um aumento da produção de insulina para tentar manter a glicose em níveis normais. Quando isso não é mais possível, surge o diabetes. A instalação do quadro é mais lenta e os sintomas - sede, aumento da diurese, dores nas pernas, alterações visuais e outros - podem demorar vários anos até se apresentarem.

O diabetes é o maior problema de saúde mundial, predispondo a um aumento importante na mortalidade cardiovascular, bem como morbidade e mortalidade relacionadas ao desenvolvimento de nefropatia, neuropatia e retinopatia (GADSBY, 2002).

Outros tipos de diabetes são mais raros e incluem defeitos genéticos da função da célula beta (MODY 1, 2 e 3), defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas (pancreatite, tumores pancreáticos, hemocromatose), outras doenças endócrinas (Síndrome de Cushing, hipertireoidismo, acromegalia) e uso de certos medicamentos. O diabetes gestacional é diagnosticado durante a gestação e pode ser uma condição transitória ou não, necessitando a gestante ser acompanhada ao final da gravidez (GADSBY, 2002).

Do total de casos de diabetes, 85-90% são do tipo 2 ou não dependentes de insulina, 10% são do tipo 1 ou dependentes de insulina e 2% do tipo secundário ou associado a outras síndromes. O diabetes gestacional, uma condição transitória durante a gravidez ocorre em torno de 2 a 3% das gestações (DCCT, 1993). O diabetes tipo MODY ainda não possui estatísticas sobre sua prevalência.

Segundo dados do Ministério da Saúde, em um estudo realizado pelo Ministério da Saúde e o CNPq entre os anos de 1986 a 1989, envolvendo nove capitais brasileiras, a prevalência de diabetes no Brasil era de 7,6% da população entre 30 e 69 anos, sendo que Porto Alegre era a segunda capital com maior prevalência de diabetes entre esta população (8,9%), perdendo apenas para São Paulo (9,7%). Abaixo dos 30 anos, a prevalência de diabetes era de apenas 0,1% da população, e na população acima de 69 anos a prevalência subia para 20%. A partir de informações do Sistema de Informações em Hipertensão e Diabetes (HiperDia) do Ministério da Saúde, no período de janeiro de 1999 a abril de 2005, verificamos no Brasil um total de 185.333 pacientes com diabetes tipo 1 e 654.479 pacientes com diabetes tipo 2.

Como fatores que influenciam a prevalência do diabetes, podemos citar (GADSBY, 2002):

- idade: estudos epidemiológicos mostram que a prevalência do diabetes aumenta em pessoas com idade mais avançada.

- sexo: algumas evidências sugerem que o diabetes seja mais comum em mulheres do que em homens. No Brasil, segundo dados do HiperDia, 68,24% dos casos de diabetes tipo 1 e 69,01% dos casos de diabetes tipo 2 são pacientes do sexo feminino.

-país e região de residência: países com população mais idosa apresentam maior prevalência, bem como países pobres, que apresentam dificuldades no acesso à alimentação e esportes.

-poder sócio-econômico: fator associado diretamente à dieta pobre em alimentos ricos em fibras e consumo excessivo de alimentos industrializados e ricos em gorduras e açúcares, bem como hábitos de vida relacionados com a incidência do diabetes.

-estilo de vida: sedentarismo e obesidade propiciam o aparecimento do diabetes, sendo considerados fatores de risco independentes.

-hereditariedade parece ter um papel importante, tanto no diabetes tipo 1 quanto no tipo 2.

O diabetes tipo 1 apresenta, em geral, um início súbito durante a infância ou o início da vida adulta. Isto leva a uma deficiência quase total de insulina e, geralmente, são necessárias injeções diárias de insulina para controlar a doença. Abaixo dos 20 anos, encontra-se predominantemente diabetes do tipo 1, que requer tratamento insulínico a partir do diagnóstico ou até o primeiro ano. A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estima que 4,9 milhões de pessoas abaixo de 20 anos em 134 países tenham diabetes do tipo 1 (GADSBY, 2002).

Apesar de serem doenças distintas, os principais objetivos tratamento do diabetes tipo 1 e do tipo 2 são os mesmo e incluem: aliviar os sintomas, melhorar a qualidade de vida, prevenção de complicações agudas e crônicas, redução da mortalidade e tratamento das doenças associadas (DCCT, 1993; UK, 1998; LAAKSONEN, 2003). As principais formas de tratamento do diabetes são a administração de insulina, a dieta e o exercício (ACSM, 1995). Nem todos os pacientes necessitam de insulina, mas para aqueles que precisam, a dosagem é ajustada de modo a permitir um metabolismo normal dos carboidratos, das proteínas e das gorduras.

A terapia bem sucedida do diabetes tipo 1 depende de uma interação cuidadosamente gerenciada entre ingestão alimentar, exercício físico e administração de insulina (FRONTERA et al., 2001). O maior conhecimento sobre a regulação metabólica em resposta ao exercício agudo e ao treinamento físico, junto ao desenvolvimento de novas preparações de insulina e métodos de automonitorização da glicemia, tornam possíveis, atualmente, que pessoas com diabetes tipo 1 participem de uma ampla variedade de

esportes recreacionais e competitivos. Contudo, o papel adequado do exercício físico no tratamento do diabetes tipo 1 ainda é, de certo modo, controverso.

O exercício é componente da terapia básica do diabetes tipo 2, e bastante apropriado no manejo do diabetes tipo 1. O conseqüente aumento da aptidão física e os benefícios psicológicos do exercício promove a melhora da qualidade de vida tanto de indivíduos saudáveis quanto de pacientes com diabetes, e este efeito protetor deve-se em parte a melhora dos componentes da síndrome metabólica com conseqüente diminuição da massa corporal e acúmulo de gordura na região visceral, aumento do colesterol HDL, diminuição do colesterol LDL e triglicerídeos, diminuição da pressão arterial e melhora na sensibilidade à insulina (LAAKSONEN, 2003).

Durante o exercício, a necessidade de glicose para o músculo esquelético aumenta e a concentração de glicose plasmática diminui. Em indivíduos saudáveis, a concentração de glicose plasmática é mantida relativamente constante devido à produção de glicose a partir da degradação do glicogênio e pela gliconeogênese no fígado, em resposta à diminuição da concentração de insulina e aumento da concentração do glucagon que ocorre em resposta ao exercício (GARRETT & KIRKENDALL, 2000). Em pacientes diabéticos tratados com insulina, a concentração sérica de insulina não pode ser alterada fisiologicamente, portanto a liberação de glicose pelo fígado não pode ser ativada durante o exercício (YAMAKITA et al., 2002). Com isso, o exercício pode causar hipoglicemia em pacientes com diabetes, aspecto que deve ser cuidadosamente analisado ao se prescrever exercícios para esta população. A hipoglicemia pode ocorrer durante e após a atividade física., principalmente nos pacientes que utilizam fármacos para o controle da doença (HOPKINS, 2004). A hipoglicemia ocorre mais freqüentemente em diabéticos tipo 1, e a incidência pode ser 10 vezes maior quando comparada a de diabéticos do tipo 2. Para evitar a hipoglicemia induzida pelo exercício nestes pacientes, torna-se necessário ajustar a dose de insulina e ingestão de alimentos antes da atividade física (FRONTERA, 2001).

O quadro 1 apresenta riscos e benefícios do exercício para pacientes com diabetes tipo 1.

**Quadro 1** - Riscos e benefícios do exercício para pacientes com diabetes tipo 1.

<b>Exercício para pacientes com diabetes tipo 1</b>	
<b>Riscos</b>	<b>Benefícios</b>
Hipoglicemia (induzida pelo exercício e pós exercício de instalação tardia)	Reduz glicemia durante e após exercício
Hiperglicemia após exercício muito extenuante	Melhora a sensibilidade à insulina e diminui a necessidade de insulina exógena
Hiperglicemia e cetose em pacientes insulino-deficientes	Melhora do perfil lipídico
Precipitação ou exacerbação de doença cardiovascular	Aumento do gasto de energia
Piora das complicações a longo prazo do diabetes	Condicionamento físico e cardiovascular

Adaptado de FRONTERA et al., 2001.

A *American Diabetes Association* (ADA) publicou recentemente recomendações clínicas para o exercício aos portadores do diabetes tipo 1 (ADA, 2005). Essas normas, adotadas também pelo *American College of Sports Medicine* (ACSM), se concentram no controle metabólico antes do exercício, no monitoramento da glicose sanguínea antes e depois do exercício e na dieta. Preparar o indivíduo com diabetes para um programa de exercício seguro e agradável é tão importante quanto o próprio exercício. O indivíduo jovem sob controle metabólico adequado pode seguramente participar da maioria das atividades físicas. Entretanto, existem várias considerações que são particularmente importantes e específicas para o indivíduo com diabetes. O quadro 2 aponta os cuidados gerais recomendados pela ADA (2005) e ACSM (2000) para a prática segura de exercício em indivíduos com diabetes tipo 1.

**Quadro 2** – Normas gerais da ADA e do ACSM para a prática de exercícios aos portadores de diabetes tipo 1 (e outros usuários de insulina).

<b>Controle metabólico antes do exercício</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evitar o exercício se o nível de glicose estiver superior a 250mg/dl e a cetose estiver presente, e tomar cuidado se o nível de glicose for superior a 300 mg/dl na ausência de cetose.</li> <li>▪ Ingerir mais carboidrato se o nível de glicose for inferior a 100 mg/dl.</li> </ul>
<b>Monitoração da glicose sanguínea antes e depois do exercício</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Identificar quando as mudanças na insulina ou na alimentação serão necessárias.</li> <li>▪ Conhecer sua resposta glicêmica às diferentes condições de exercício.</li> </ul>
<b>Dieta</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Consumir carboidrato de acordo com o necessário para evitar a hipoglicemia.</li> <li>▪ Os alimentos baseados em carboidratos devem estar em alcance durante e depois do exercício.</li> </ul>

Adaptado de ADA, 2005.

O treinamento físico em pacientes com diabetes melhora significativamente a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, independente da redução do peso corporal (HORTON, 1988). O efeito do exercício físico sobre a sensibilidade à insulina tem sido demonstrado de 12 a 48 horas após a sessão de exercício, porém volta aos níveis pré-atividade em três a cinco dias após a última sessão de exercício físico (ERIKSSON, 1997), o que reforça a necessidade de praticar atividade física com frequência e regularidade. Devido ao fato de que o diabetes está associado a um aumento do risco de doenças cardiovasculares, o benefício da atividade física na melhora dos fatores de risco conhecidos para a aterosclerose é fortemente validado (ADA, 2003). Entretanto, o exercício eleva o consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) e é reconhecidamente uma forma de estresse fisiológico (ASTRAND & RODHAL, 2003), fato que pode representar risco para o paciente com diabetes.

Devido ao fato que as espécies reativas de oxigênio (ERO) normalmente serem produzidas pelo metabolismo, o exercício pode provocar aumento de sua produção. Além disso, durante o exercício exaustivo, ocorre a degradação de adenosina trifosfato (ATP), indicada pela liberação de xantina e hipoxantina do músculo esquelético. A enzima xantina oxidase (XO) presente no músculo esquelético pode gerar radicais superóxido na presença de hipoxantina e oxigênio. Então, quando os produtos da degradação do ATP se acumulam, a XO pode gerar radicais livres (HEUNKS et al., 1999). Lembrando que a possibilidade de ocorrer lesão oxidativa nos tecidos durante o exercício vai depender de um preciso equilíbrio entre a geração de radicais livres e a eficácia dos mecanismos antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), e que os indivíduos com diabetes possuem aumento basal da geração de radicais livres (VILLA-CABALLERO et al., 2000; SYDOW & MUNZEL, 2003), o exercício pode ser interpretado tanto como agente protetor de doenças cardiovasculares quanto agente agressor aos tecidos pela produção de radicais livres. Para isso, torna-se importante conhecermos as respostas agudas do exercício nesta população.

## **2.2 FUNÇÃO ENDOTELIAL**

Durante muitos anos sendo considerado uma simples membrana semi-permeável, o endotélio ganhou, nos últimos 20 anos, o título de complexo órgão que controla a homeostase vascular pela integração dos sinais entre a parede vascular e o lúmen do vaso. Hoje, é amplamente aceito que o endotélio possui um importante papel na manutenção do tônus vascular, reduzindo a atividade plaquetária e adesão leucocitária, e limitando as reações inflamatórias vasculares (PRATICO, 2005).

Devido à localização anatômica destas células entre o sangue circulante e os tecidos, possuem a capacidade de percepção das alterações nas forças hemodinâmicas e mediadores produzidos localmente ou circulantes e de responder a estas alterações pela produção de um número de fatores biologicamente ativos (WAJCHENBERG, 2002). Os fatores derivados do endotélio podem modificar profundamente a função das células

musculares lisas vasculares. Estes fatores incluem NO e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), ambos vasodilatadores e potentes inibidores da função plaquetária, e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Por outro lado, as células endoteliais podem também produzir vasoconstritores e promotores do crescimento tais como angiotensina II, endotelina-1, tromboxano A<sub>2</sub> e prostaglandina A<sub>2</sub> (LAROIA *et al.*, 2003). O dano endotelial pode resultar em um desequilíbrio entre os fatores de relaxamento e de contração, entre os mediadores anti e pró-coagulantes ou entre os fatores inibidores e promotores do crescimento. A disfunção endotelial é não somente um pré-requisito da aterosclerose, mas também serve como um potente preditor para eventos cardíacos (FLEMING & BUSSE, 1999). Os mecanismos causadores deste dano endotelial ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto, um denominador comum para todas estas condições é o aumento do estresse oxidativo, que tem sido postulado como uma causa importante da disfunção endotelial (RAITAKARI & CELERMAJER, 2000).

Furchgott e Zawadzki publicaram em 1980 que o relaxamento da aorta de coelhos em resposta à acetilcolina era inteiramente dependente da presença de uma camada de células endoteliais intactas e forneceram evidências da liberação de um fator humoral lábil que causava esse relaxamento. Mais tarde, essa substância foi chamada de EDRF (fator de relaxamento derivado do endotélio). Furchgott e Zawadzki, bem como Ignarro e colaboradores, em investigações independentes, demonstraram que o óxido nítrico (NO) e o EDRF tinham propriedades semelhantes e, no mesmo ano, verificou-se que a liberação do NO pelas células endoteliais era responsável pela atividade biológica do EDRF (KHAN *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987).

No sistema cardiovascular de mamíferos saudáveis, as células endoteliais representam a maior fonte de NO, um gás altamente lipofílico e de meia vida curta, que é rapidamente convertido a produtos biologicamente inativos, nitritos e nitratos. O NO é o mediador endógeno responsável pela vasodilatação dependente do endotélio e é derivado do metabolismo da L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase derivada do endotélio (eNOS) (MONCADA, 1988). A eNOS é cálcio dependente, quando um agonista com capacidade de estimular a secreção endotelial de óxido nítrico ativa o respectivo receptor, causa um aumento na concentração citosólica de cálcio. Pequenas variações na concentração de cálcio em torno dos valores fisiológicos influenciam

profundamente a produção endotelial de óxido nítrico (LÓPEZ-JARAMILLO et al, 1990). Após a sua secreção, o NO provoca a ativação da proteína guanilato-ciclase solúvel que, quando ativada promove a conversão do guanilato trifosfato (GTP) em guanilato monofosfato cíclico (GMPc), que funciona como um segundo mensageiro. Nas células musculares lisas, o GMPc ativa um sistema enzimático que é responsável pela defosforilação das cadeias leves de miosina e relaxamento das fibras musculares. Há também uma secreção intraluminal de óxido nítrico dirigida às plaquetas e, nesse caso, o GMPc provoca uma diminuição da concentração citosólica de cálcio provocando a inibição da adesividade e agregação plaquetárias (RADOMSKI et al, 1987), participando de um sistema fisiológico regulador do tônus vascular local e atividade plaquetária.

A partir das evidências que a liberação do NO e a sua biodisponibilidade pode ser importante na avaliação clínica da disfunção endotelial resultante de condições patológicas, muitos estudos têm focado sua atenção nesta propriedade do endotélio. Para isso, a maioria deles tem utilizado a capacidade do endotélio normal de liberar o fator de relaxamento NO em resposta ao estímulo farmacológico e/ou mecânico (LAROIA et al., 2003). Além do NO, as espécies reativas do oxigênio (ERO) também estão envolvidas no desenvolvimento da disfunção endotelial. As células endoteliais e as células da musculatura lisa dos vasos sanguíneos são reconhecidas como potentes fontes de ERO (DARLEY-USMAR et al., 1997).

A função endotelial é comumente medida pela resposta vasodilatadora a estímulos mecânicos ou farmacológicos. O aumento do fluxo sanguíneo estimula o endotélio mecanicamente. In vitro, a função endotelial é comumente medida pela tensão de anéis vasculares em resposta à variações da concentração de acetilcolina. Clinicamente, a regulação vascular tem sido medida na coronária e circulação periférica utilizando mudanças no diâmetro do vaso como índice da função de condutância vascular (LAROIA et al., 2003). As três técnicas mais comuns são:

-Angiografia: mede as mudanças no diâmetro da artéria coronária ou fluxo sanguíneo em resposta à infusões intracoronárias pela variação de concentrações de acetilcolina ou outra substância;

-Ultrassom: mede as mudanças no diâmetro da artéria braquial pela indução de hiperemia com a oclusão por manguito de pressão sanguínea;

-Pletismografia de oclusão venosa: medida do fluxo sanguíneo intra-arterial pela indução de hiperemia com a oclusão por manguito de pressão sanguínea ou infusão de medicamentos.

Neste estudo, foi utilizada a técnica de pletismografia de oclusão venosa para a avaliação da função endotelial. De forma conceitual, a pletismografia quantifica as variações do volume em um determinado segmento (ALAM et al., 2005). Esta técnica é não invasiva, altamente reproduzível e acurada, e representa uma ferramenta eficaz para o estudo do fluxo sanguíneo e compreensão do sistema cardiovascular em humanos (JOYNER et al., 2001).

As variações no diâmetro dos vasos ocorrem em resposta às variações de fluxo. O aumento no fluxo provocará um aumento na secreção de NO causando um aumento no calibre do vaso. Ao contrário, se o fluxo diminuir, o vaso contrai-se. O aumento no fluxo produz um estresse de cisalhamento, relacionado com o atrito entre a camada estacionária associada com a parede do vaso e as camadas de sangue em movimento. Este estresse de cisalhamento constitui-se no estímulo fisiológico mais importante para a liberação de NO pela camada endotelial (SCHINI-KERTH, 1999). A deformação celular, em resposta a este estresse, depende de propriedades elásticas e estruturais das células endoteliais.

O DM é uma doença altamente associada com o desenvolvimento precoce de aterosclerose, gerando a macroangiopatia diabética (MAEJIMA et al., 2001). Além disso, o desenvolvimento de complicações microvasculares associadas ao diabetes aumenta cerca de três vezes os riscos cardiovasculares quando comparamos a indivíduos controles sem diabetes (JENSEN et al., 1989 apud MAEJIMA et al., 2001). Embora o mecanismo preciso do desenvolvimento das complicações vasculares decorrentes do diabetes ainda não estejam bem esclarecidas, a disfunção endotelial tem sido amplamente relacionada ao desenvolvimento destes eventos. Especialmente o NO tem um importante papel no desenvolvimento destas complicações, não somente pelo seu papel na regulação do fluxo sanguíneo, mas por seus papéis anti-ateroscleróticos (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; WATTS & PLAYFOLD, 1998).

O prejuízo na função vasodilatadora endotelial tem sido descrita tanto em indivíduos com diabetes do tipo 1 (PIEPER et al., 1996; SKYRME-JONES, 2000) quanto do tipo 2 (MAEJIMA et al., 2001; OUVIÑA et al., 2001;). As altas concentrações de

glicose estão associadas com a disfunção endotelial em estudos *in vivo* e *in vitro* (SYDOW & MUNZEL, 2003), assim como a resistência à insulina (YKI-JARVINEN, 2003) e anormalidades no perfil lipídico (LAAKSO et al., 1993). Nestes pacientes, podemos ter um aumento da concentração plasmática do NO e de seus produtos finais associados com o aparecimento de doenças vasculares (MAEJIMA et al., 2001; OUVIÑA et al., 2001). Portanto, apesar de apresentar efeitos vasodilatadores, o NO também possui ação deletéria em indivíduos com disfunção endotelial devido ao seu caráter de radical livre de nitrogênio.

Embora alguns estudos tenham demonstrado um prejuízo da função endotelial em diabéticos tipo 1 sem complicações vasculares (POSTON & TAYLOR, 1995; SMITS et al., 1993, SKYRME-JONES et al., 2000), estes resultados são contestados por outros autores que não observam o mesmo efeito (ALLEN et al., 2001; ENDERLE et al., 1998; LAMBERT et al., 1996; LEKAKIS et al.; 1997). Para melhor entendermos este mecanismo de regulação vascular, bem como a ação do NO sobre o endotélio, são necessários mais estudos avaliando a função vascular em indivíduos diabéticos do tipo 1 com e sem complicações vasculares estabelecidas.

O exercício regular pode exercer efeitos benéficos na reatividade vascular, e estas mudanças seriam devidas ao aumento de fluxo induzido pelo exercício (ALAM et al., 2005). O fluxo pode aumentar a vasodilatação dependente do endotélio pelo incremento da expressão da eNOS e pelo aumento da liberação de NO e prostaciclina (SESSA et al., 1992). O treinamento tem assumido um papel essencial no tratamento de doenças cardiovasculares, pois além de aumentar o fluxo, estimulando a liberação de substâncias vasodilatadoras também aumenta a produção extracelular de antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), que previne a degradação prematura do NO (LAROIA et al., 2003).

Alguns estudos, como o de BROWN e colaboradores (2000), demonstram que a vasodilatação induzida pelo exercício está relacionada com os níveis plasmáticos de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), que são os produtos finais da oxidação do NO. Node e colaboradores (1997) e Jungersten e colaboradores (1997) também observaram aumentos nos níveis plasmáticos de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  após um teste máximo e após 2 horas de exercício submáximo em cicloergômetro. Entretanto, Poveda e colaboradores (1997) não encontraram alterações após um exercício máximo em esteira, bem como St. Croix e

colaboradores (1999) após 3 min de exercício a 30, 60 e 90% do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2\text{máx}}$ ) em cicloergômetro. Apesar da causa dos resultados discrepantes entre os estudos não estar clara, as diferenças na duração e na intensidade dos protocolos utilizados podem ter contribuído, assim como a diferença de idade dos grupos testados.

Adicionalmente, em um estudo clínico prospectivo conduzido por HAMBRECHT e colaboradores (2000), 19 pacientes com doença arterial coronariana estável não oclusiva foram randomizados em grupos treinamento e controle. Eles demonstraram que, após quatro semanas, o grupo que realizou treinamento físico apresentou melhora importante na função endotelial, verificada pelo paradoxo vasoconstritor à acetilcolina.

Recentemente, estudos têm se preocupado em avaliar os efeitos do exercício sobre a função vascular em indivíduos com diabetes. Para avaliar a resposta aguda do exercício em diabéticos, alguns autores utilizaram-se do dinamômetro de preensão palmar (*handgrip*) para verificar as alterações de fluxo sanguíneo e concentração de  $NO_2^-$  e  $NO_3^-$  (ALLEN et al., 2001). Os efeitos do treinamento aeróbico sobre a função vascular de diabéticos do tipo 2 foram relatados nos estudos de MAIORANA e colaboradores (2001) e YOKOYAMA e colaboradores (2004), onde os dois autores encontraram modificações benéficas na função vascular após o período de treinamento. Interessante ressaltar que no estudo de YOKOYAMA e colaboradores (2004), os efeitos benéficos foram observados em um período de apenas três semanas de caminhadas orientadas e exercício em cicloergômetro. Entretanto, ainda são os escassos os estudos na literatura que se preocuparam em avaliar a resposta vascular após exercício agudo em diabéticos do tipo 1.

Os estudos encontrados em diabéticos tipo 1, que utilizaram protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo, preocuparam-se em avaliar os efeitos do exercício sobre a glicemia e estresse oxidativo, mas não sobre a função vascular (DEROUCHE & BOUTAYEB, 2002; STENSTRÖM et al., 2003). Portanto, torna-se importante conhecermos o efeito do exercício agudo sobre a função vascular de indivíduos com diabetes tipo 1, com e sem complicações vasculares, submetidos a diferentes protocolos de exercício. Com isso, poderemos planejar programas de treinamento para esta população, tendo em vista suas adaptações e respostas esperadas, oferecendo maior segurança aos pacientes.

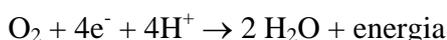
### 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

No meio celular, o oxigênio molecular é difundido até as mitocôndrias, onde tem o papel fundamental de receber os elétrons extraídos dos substratos, por meio de diferentes reações enzimáticas. Estas reações de oxidação e redução ocorrem simultaneamente nas células, e estão acopladas de tal maneira que possibilitam uma transferência eficiente e controlada de parte da energia armazenada nas ligações químicas dos substratos para o ATP, que quando hidrolisado transfere energia para que ocorram as diversas funções celulares (OLIVEIRA et al., 2004).

No processo respiratório tem-se sempre, seja em maior ou menor escala, a formação de espécies intermediárias de oxigênio, com potencial citotóxico, chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO). Com isso, o metabolismo dos seres aeróbios depara-se com um paradoxo vital: a imprescindibilidade do oxigênio (O<sub>2</sub>) para a manutenção da vida e, por outro lado, seu potencial de toxicidade, diante de vias oxidativas defectíveis no processo respiratório (SIGNORINI & SIGNORINI, 1996).

Na cadeia de transporte de elétrons, grande parte do oxigênio é reduzido à água, em uma reação tetravalente estável, catalisada pela enzima citocromo-oxidase, condicionando a reação a ocorrer em uma única etapa, sem a formação de intermediários, conforme a reação abaixo ilustrada.

#### **Reação 1 – redução tetravalente do oxigênio**



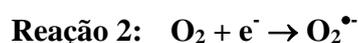
Entretanto, uma pequena parte (2-5%) deste oxigênio pode sofrer redução univalente seqüencial, formando ERO, como por exemplo os ânions superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) (ALESSIO, 1993). Nem todas as ERO são radicais livres, mas nem por isso elas deixam de ser muito reativas ou precursoras de outras espécies de radicais.

Um radical livre é definido como um átomo, grupo de átomos ou molécula, com um ou mais elétrons desemparelhados, e capaz de existência independente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Estas moléculas são bastante instáveis (reativas), de meia-vida

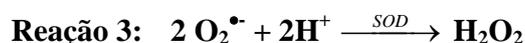
curta, características que as tornam potentes oxidantes. Entretanto, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações onde há necessidade de ativação do sistema imunológico, na detoxificação de drogas e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o NO, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (MONCADA, 2001).

Em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez. A conversão univalente do oxigênio à água processa-se da seguinte maneira:

(a) A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera a formação do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (reação 2).



(b) O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio, forma  $H_2O_2$ , através do processo chamado dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a  $10^4$  vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (reação 3).

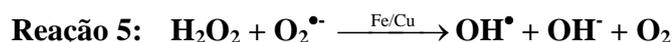


(c) Quando o  $H_2O_2$  recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucléicos (JENKINS, 1988).

O radical hidroxil pode ser formado quando o  $H_2O_2$  reage com íons ferro ou cobre (reação 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton.



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre  $H_2O_2$  e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil (reação 5), a chamada Reação de Haber-Weiss.



Os radicais superóxido e hidroxil têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido.

Outra espécie reativa de interesse é o oxigênio singleto, que é uma forma de oxigênio spin-alterada. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados ERO em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas, e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com quem eles interagem (LAURINDO E LUZ, 1996).

Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o NO, um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (reação 6).



Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO), quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Além disso, o EO pode gerar danos à proteínas e ao DNA provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Quando existe um desequilíbrio entre a taxa de produção de ERO e a taxa de remoção destes pela defesa antioxidante, caracteriza-se um desbalanço redox temporário (OLIVEIRA et al., 2004). Por outro lado, se este desbalanço for mais intenso e duradouro caracteriza-se um estresse oxidativo crônico. O desbalanço redox, agudo ou crônico, pode ser devido a uma maior produção de EROs aliado ou não a uma diminuição na capacidade de defesa antioxidante (BOVERIS, 1998).

Para proporcionar proteção contra a ação deletéria das ERO e demais radicais livres, os meios intra e extracelular possuem sistema de defesa antioxidante. Por definição, um antioxidante é qualquer substância presente em baixa concentração dentro da célula, comparado com outros elementos oxidáveis, capaz de retardar ou inibir a oxidação destes elementos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de garantir a manutenção do estado redox celular. O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

A catalase desempenha um importante papel na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovendo a sua catálise até água.



A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG), removendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e formando água (reação 8).



Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa.

Já o sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano, como bilirrubina, ceruloplasmina, estrogênio, melatonina, ácido úrico, e outros ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (URSO & CLARKSON, 2003).

Em organismos aeróbios saudáveis, a produção de ERO e espécies reativas ao nitrogênio (ERN) é neutralizada pelo nosso sistema de defesas antioxidantes. Este balanço não é perfeito, entretanto, visto que danos mediados por ERO e ERN ocorrem continuamente, e as moléculas lesadas precisam ser reparadas (ex: DNA) ou repostas (ex: algumas proteínas oxidadas). O estresse oxidativo pode resultar da diminuição da nossa capacidade antioxidante ou da produção aumentada de ERO-ERN.

Para avaliar o estresse oxidativo em humanos, muitos pesquisadores têm utilizado marcadores sanguíneos e urinários. Estes marcadores incluem produtos de peroxidação lipídica, *status* antioxidante, produtos da oxidação de proteínas e DNA, e enzimas antioxidantes (URSO & CLARKSON, 2003). As medidas de peroxidação lipídica incluem o pentano expirado, malondialdeído (MDA), hidroperóxidos lipídicos, isoprostanos e dienos conjugados. Muitos estudos vêm utilizando o MDA como medida de estresse oxidativo induzido pelo exercício. Quando os radicais livres são gerados eles atacam os ácidos graxos polinsaturados da membrana celular, induzindo uma reação química em cascata denominada peroxidação lipídica. Como os ácidos graxos ficam desorganizados, gases hidrocarbonados (etano e pentano) e aldeídos são formados. O pentano pode ser

medido pela exalação através da técnica de cromatografia gasosa, entretanto existem poucos estudos que se utilizaram desta técnica como marcador de estresse oxidativo pela dificuldade da técnica. Já os produtos de oxidação de proteínas são mensurados através da detecção de produtos de carbonilação e grupos tióis, e refletem a produção destas moléculas no processo da doença (TELCI et al., 2000).

O diabetes é reconhecido como um estado metabólico onde há um aumento na produção de radicais livres (VILLA-CABALLERO et al., 2000; NOYMAN et al., 2002; SEGHROUCHNI et al., 2002; SYDOW & MÜNZEL, 2003). Os mecanismos que contribuem para a formação de radicais livres no diabetes incluem não somente o aumento da glicação e auto-oxidação não enzimática da glicose, mas também o estresse metabólico resultante das mudanças do metabolismo energético, níveis de mediadores inflamatórios e status de defesa antioxidante (ANWAR & MEKY, 2003).

Muitas vias metabólicas associadas com a hiperglicemia, tais como a auto-oxidação da glicose, a glicação de proteínas e a ativação da via do polirol aumentam a produção de radicais livres e iniciam o papel central da disfunção endotelial (DE MATTIA et al., 2003). Os níveis elevados de glicose causam estresse oxidativo nas células e os radicais livres derivados de oxigênio prejudicam a vasodilatação dependente do endotélio no diabetes (NOYMAN et al., 2002). Adicionalmente, os mecanismos de defesa contra os radicais livres estão diminuídos no diabetes, em particular as enzimas GPx, SOD e CAT (Figura1). Um mecanismo potencial que pode levar à disfunção endotelial no diabético é a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs: *advanced glycation end products*), que podem causar uma diminuição da disponibilidade de NO, pela diminuição de sua formação ou inatividade pelo ânion superóxido (HASEGAWA et al., 2002). Quando as proteínas plasmáticas e da membrana celular estão expostas a concentrações elevadas de glicose por períodos prolongados elas sofrem glicação não-enzimática podendo se depositar na camada sub-endotelial e induzir disfunção endotelial. O acúmulo de AGE nos tecidos poderia contribuir para o aparecimento das complicações do diabetes, como retinopatia, neuropatia e nefropatia (NICOLOFF et al., 2002).



**Figura 1** – Estresse oxidativo e diabetes. Fonte:WAJCHENBERG (2002).

Têm-se postulado que o estresse oxidativo está relacionado com diversos mecanismos da patogênese das complicações vasculares no diabetes. Ainda, os fatores de risco associados como dislipidemia, hipertensão e fumo não explicam a prevalência aumentada das doenças vasculares do diabetes (RAHIMI et al., 2005). Portanto, o estado diabético é, por si só, um fator de risco independente para aterosclerose precoce. Um mecanismo potencial que poderia mediar a aterosclerose precoce no diabetes é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo inicia um papel crucial na aterogênese, causando a oxidação de LDL, que resulta em acúmulo de colesterol e formação de células espumosas (*foam cells*) (SYDOW & MÜNZEL, 2003).

O aumento do estresse oxidativo tem sido mostrado tanto em diabéticos dependente de insulina quanto nos não dependentes de insulina, mesmo em pacientes sem complicações (ATALAY et al., 2001; KASSAB et al., 2003; SYDOW & MÜNZEL, 2003; TELCI et al., 2000). Apesar de vários estudos mostrarem a associação entre diabetes e estresse oxidativo, ainda não é possível estabelecer uma relação de causa-efeito. Adicionalmente, não está bem esclarecido se todos os pacientes com diabetes apresentam

aumento de estresse oxidativo ou somente aqueles que apresentam complicações. Além disso, seria importante que outros estudos fossem realizados para esclarecer se o estresse oxidativo responde à melhora no controle glicêmico.

O exercício está associado com um aumento significativo do consumo de oxigênio pela musculatura esquelética (ASTRAND & RODHAL, 2003). Durante o exercício, quando o consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) é elevado 10-15 vezes mais do que no repouso, é muito provável que os radicais livres sejam produzidos em uma intensidade muito maior comparada com o repouso (ALESSIO et al, 1993).

Durante o exercício de alta intensidade, a geração de ERO pode ser ocasionada pelo influxo de neutrófilos e macrófagos para dentro da musculatura e ativação de citocinas secundárias pelo dano muscular (SACHECK & BLUMBERG, 2001). O exercício estimula a redistribuição do fluxo sanguíneo, provocando hipóxia e reoxigenação em alguns tecidos, que pode aumentar a produção de radicais em alguns tecidos, como o superóxido pela xantina oxidase no músculo. Adicionalmente, condições hipóxicas também são relacionadas com aumento da atividade da NOs, levando à formação de radicais NO. Estes radicais podem exercer um efeito pró-oxidante por eles próprios ou se combinar com o superóxido para formar o peroxinitrito, um oxidante mais potente, conforme demonstrado anteriormente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Estudos prospectivos sugerem que o exercício físico regular possui um efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares e mortalidade. O treinamento pode fortalecer as defesas antioxidantes e reduzir o estresse oxidativo induzido pelo exercício (JOHNSON, 2002). Alguns autores têm demonstrado o efeito protetor do treinamento sobre o estresse oxidativo induzido pelo exercício em humanos (JENKINS, 1988; ALESSIO, 1993; KINGWELL, 2000; SCHNEIDER, 2002). Entretanto, os benefícios relativos ou riscos do exercício agudo ou treinamento em relação ao estresse oxidativo em grupos com suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo, assim como os pacientes diabéticos, ainda não estão bem esclarecidos.

Laaksonen e colaboradores (1996) e Atalay e colaboradores (1997) encontraram altos níveis de lipoperoxidação e diminuição nas enzimas antioxidantes no repouso e após o exercício agudo em homens jovens com diabetes tipo 1, quando comparados a indivíduos saudáveis. Johnstone e colaboradores (1993) mostraram que o exercício poderia prejudicar

a reposta vascular de diabéticos com disfunção endotelial. Adicionalmente, Laaksonen e colaboradores (1996) também demonstraram uma forte correlação inversa entre os níveis basais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o  $VO_{2\text{máx}}$  em diabéticos tipo 1 do sexo masculino ( $r = -0,82$ ;  $p = 0,006$ ), demonstrando que quanto maior a capacidade aeróbica do diabético, menores os índices de lipoperoxidação, podendo o treinamento ter fortalecido as defesas antioxidantes e diminuído este parâmetro de estresse oxidativo.

De acordo com os dados acima, foi postulado que o exercício pode aumentar dos níveis de estresse oxidativo nos pacientes com diabetes, tanto nos que utilizam insulina como naqueles que não utilizam. Entretanto, um programa de treinamento poderia melhorar a ação das enzimas antioxidantes e atenuar o desbalanço oxidativo observado durante o exercício (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). As diferenças de estresse oxidativo induzidas pelo exercício entre os indivíduos e com diabetes também poderiam variar de acordo com a severidade da doença (LAAKSONEN, 1996). Para responder a estas questões, estudos adicionais devem ser conduzidos com o objetivo de verificar as respostas oxidativas ao exercício nestes pacientes.

## **2.4 L-ARGININA**

O aminoácido L-arginina tem sido foco de inúmeros estudos nas últimas décadas por estar envolvido em diversas funções bioquímicas e fisiológicas, como a síntese e secreção de hormônios, ciclo da uréia e detoxificação da amônia e formação do óxido nítrico (BRODY, 1999). A L-arginina é classificada como um aminoácido semi-essencial, devido ao fato de poder ser sintetizado pelo organismo a partir do glutamato em humanos adultos saudáveis, mas no caso de doenças ou traumas deve ser suplementado a partir da dieta (WIESINGER, 2001). Uma vez sintetizada, a L-arginina é catabolizada em diferentes produtos nos diversos tecidos.

A L-arginina dietética pode ser promissora na prevenção de doenças cardiovasculares (DCV). Ela é precursora do NO, e por isso seu consumo está diretamente relacionado com o aumento de NO em ratos (WU et al., 1999). O NO possui propriedades como a vasodilatação, efeitos antioxidante e efeitos antiplaquetários, que possuem

implicações sobre DCV. Alguns estudos na literatura demonstram que a suplementação de L-arginina poderia diminuir a formação de fatores de coagulação (tramboxano e fibrina), diminuir a viscosidade sangüínea e estresse oxidativo (PRELI et al., 2002). Adicionalmente, a suplementação de L-arginina pode reverter a disfunção endotelial associada à hipercolesterolemia, fumo e hipertensão (KAWANO et al., 2002). Adicionalmente, alguns efeitos da suplementação de L-arginina, como os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, são independentes da produção de NO (WELLS et al., 2005).

O consumo habitual dietético de L-arginina na dieta Americana é 5,4g (PRELI et al., 2002). Estudos de suplementação de L-arginina em humanos tem aumentado a ingestão oral 2 a 5 vezes este número (CLARKSON et al., 1996; GIUGLIANO et al., 1997; WOLF et al., 1997; BEDNARZ et al., 2000; ABDELHAMED et al., 2003). O objetivo geral destes estudos tem sido avaliar o impacto de suplementação oral de L-arginina sobre marcadores sangüíneos e medidas funcionais da vasculatura saudável, uma vez que a administração de L-arginina poderia melhorar os sintomas clínicos de doenças cardiovasculares, como doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

A tabela 1 tem por finalidade ilustrar a quantidade do aminoácido L-arginina em alguns alimentos que habitualmente ingerimos.

Tabela 1 - Conteúdo de L-arginina por alimento

Alimento	Porção média servida (g)	Quantidade de L-arginina por porção média servida (mg)	Concentração média do alimento (mg/g alimento)
Filé mignon	110,10	2140	19,4
Camarão	66,5	1060	15,9
Peixe branco	182,55	2150	11,8
Amendoim	68,93	2140	31,3
Peito de frango	92,42	1610	17,4
Semente de abóbora	66,21	3220	48,6

Adaptado de WELLS et al., 2005.

A L-arginina também pode ser convertida a L-ornitina pela enzima arginase, desempenhando um papel importante no ciclo da uréia, sendo precursor de poliaminas e uréia (BRODY, 1999). A L-arginina também serve como precursora para creatina, que

inicia um papel essencial no metabolismo energético do músculo, sistema nervoso e tecidual, e o catabolismo deste aminoácido também atua na síntese de proteínas e agmatina, podendo aumentar a secreção do hormônio de crescimento e influenciar na função imune (TAPIERO et al., 2002). Em humanos adultos, apenas o intestino tem capacidade de sintetizar L-citrulina (a partir da glutamina e da prolina), e o maior local para a biossíntese endógena de L-arginina a partir da L-citrulina ocorre no rim. No caso de uma produção endógena insuficiente de L-arginina para a promoção do crescimento ou reparo de tecidos, a dieta representa a maior fonte deste aminoácido (TAPIERO et al., 2002).

A L-arginina é o substrato para a formação do NO nas células eucarióticas. Os cofatores necessários para que esta reação aconteça são a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), oxigênio (O<sub>2</sub>) e cálcio/calmodulina.

É descrito na literatura que o papel do NO sobre a regulação do tônus vascular pelo endotélio está prejudicado durante a hipercolesterolemia, e que a depleção de L-arginina poderia contribuir para esta disfunção. Em estudo publicado por Wolf e colaboradores (1997), foram avaliados 14 voluntários normocolesterolêmicos e 23 voluntários hipercolesterolêmicos que realizaram suplementação de 8,4g de L-arginina ou placebo por dia, com o objetivo de verificar se a suplementação normaliza a função plaquetária em hipercolesterolêmicos. Após duas semanas de tratamento, a reatividade plaquetária foi reduzida nos hipercolesterolêmicos, fato que não se observou nos voluntários normocolesterolêmicos. O efeito observado perdurou por mais duas semanas, fazendo os autores concluir que a suplementação de L-arginina restaurou a atividade do óxido nítrico endógeno e inibiu a agregação plaquetária. Creager e colaboradores (1990) também demonstraram que a infusão venosa de L-arginina melhorou a resistência do fluxo sanguíneo do antebraço em resposta à acetilcolina em pacientes hipercolesterolêmicos.

A suplementação dietética de L-arginina pode representar uma melhora clínica em pacientes com angina, devido às propriedades anti-inflamatórias deste aminoácido (BLUM et al., 1999.) Em um estudo, Bednarz e colaboradores (2000) avaliaram os efeitos da suplementação oral de L-arginina sobre a dispersão do intervalo QT do eletrocardiograma induzida pelo exercício e tolerância ao exercício em indivíduos com angina estável. Vinte e cinco pacientes foram alocados randomicamente em dois grupos e realizaram dois testes de

exercício em esteira rolante, em momentos separados. Um grupo recebeu 6g ao dia de L-arginina durante 3 dias, e o outro grupo recebeu placebo durante o mesmo tempo e na mesma quantidade. O desenho de estudo foi duplo-cego com *cross over*, ou seja, o mesmo indivíduo suplementação com os dois tipos de suplementação, separados por um período de tempo. A suplementação de L-arginina não provocou alterações na duração do intervalo QT induzido pelo exercício, entretanto melhorou significativamente a tolerância ao exercício destes pacientes.

Maxwell e colaboradores (2002) compararam o efeito da L-arginina e exercício físico em pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Quarenta pacientes com insuficiência cardíaca severa foram randomizados em quatro diferentes grupos: L-arginina (8g/dia), treinamento diário apenas de membros superiores, L-arginina adicionada ao treinamento, ou sem tratamento (controle). O diâmetro interno da artéria radial foi mensurado durante infusões de acetilcolina e nitroglicerina. Após quatro semanas, a suplementação dietética de L-arginina e o exercício físico regular melhoraram a vasodilatação dependente do endotélio, mas a L-arginina adicionada ao exercício físico produziu efeitos benéficos adicionais sobre a vasodilatação dependente do endotélio. Este resultado demonstrou um efeito potencializado quando o treinamento foi realizado junto com a suplementação de L-arginina.

Também se encontram na literatura estudos nos quais os resultados encontrados não são promissores. Abdelhamed e colaboradores (2003) estudaram o efeito da suplementação de 6,6g de L-arginina sob a forma de barras de cereais, durante duas semanas, sobre a função endotelial e agregação plaquetária em indivíduos hipercolesterolêmicos. A suplementação não alterou o diâmetro da artéria braquial e também não alterou a agregação plaquetária nesta população. Oomen e colaboradores (2000) investigaram se a ingestão dietética de L-arginina estaria associada com a redução de riscos de DAC em 806 homens idosos. Os resultados deste estudo não confirmaram a hipótese de que a ingestão de L-arginina diminuiria os riscos de mortalidade por DAC.

Em um estudo duplo-cego realizado por Clarkson e colaboradores (1996), 27 indivíduos hipercolesterolêmicos foram alocados aleatoriamente em dois grupos, e avaliados antes e depois de quatro semanas de suplementação oral de L-arginina ou placebo. A dose adotada neste estudo foi de 7g, divididos em três horários do dia. Os níveis

plasmáticos de L-arginina e vasodilatação dependente do endotélio aumentaram no grupo que recebeu o aminoácido. Entretanto, não houve modificações na vasodilatação independente do endotélio ou nos níveis lipídicos entre os grupos. O mesmo desenho de estudo foi utilizado posteriormente por Adams e colaboradores (1998) em homens com DAC, obtendo resultados semelhantes.

A maioria dos estudos relata que a suplementação de L-arginina não aponta efeitos adversos quando realizada em dosagens entre 3g e 20g (WOLF et al., 1997; ADELHAMED et al., 2003; CLARKSON et al., 1996; PRELI et al., 2002). Entretanto, de acordo com CHAITOW (1989), possíveis efeitos colaterais deste aminoácido incluem sonolência e sintomas gastrointestinais, se ministrado em doses equivalentes ou superiores a 8g por dia. Dosagens acima de 35g por dia podem incluir aumento na replicação viral (herpes).

Conforme a breve revisão de literatura apresentada, estudos vêm sendo desenvolvidos em pacientes com DAC, tentando elucidar o papel da L-arginina sobre a resposta vascular. Entretanto, estudos de suplementação de L-arginina em pacientes com diabetes ainda são escassos. Uma vez conhecido que o diabetes é uma doença que ocasiona o comprometimento vascular a partir do aumento do estresse oxidativo provocado principalmente pela hiperglicemia, postulou-se que a suplementação de L-arginina poderia beneficiar esta população.

Foi realizada em abril de 2003 uma busca por trabalhos envolvendo suplementação de L-arginina e diabetes no banco de dados MEDLINE no período de 1993 até o atual. Naquela época, foram encontradas 12 referências originais de estudos que verificaram os efeitos da suplementação de L-arginina em modelo de diabetes, sendo 8 estudos em modelo animal e 4 estudos em modelo humano. Cabe ressaltar que os trabalhos divergiam nos enfoques avaliados, sendo o perfil lipídico e controle da pressão arterial os objetivos mais citados. Ao final deste trabalho, em setembro de 2005, uma busca idêntica foi realizada nesta base de dados, apontando que 6 trabalhos adicionais foram realizados neste período, sendo todos em modelo animal. Com isso, visualizamos uma carência de informações acerca dos efeitos da suplementação de L-arginina nesta população, bem como os efeitos adicionais do exercício e a associação de controles de função endotelial e estresse oxidativo nas respostas vasculares.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA**

Esta pesquisa se caracteriza por ensaio clínico controlado, duplo-cego e randomizado, onde os voluntários são incluídos em um grupo e, então, alocados aleatoriamente para um dos seguintes grupos: (1) o grupo da intervenção, o qual irá receber o tratamento experimental, ou (2) o grupo-controle, consistindo de placebo (JEKEL et al., 1999).

#### **3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

A população se constituiu de homens saudáveis e diabéticos tipo 1. A amostra desta pesquisa foi composta por vinte indivíduos não diabéticos para controle e dez indivíduos com diabetes tipo 1, com idade entre 18 e 30 anos, não fumantes, não atletas, fisicamente ativos e que não utilizavam suplementos vitamínicos ou minerais. Os participantes diabéticos foram abordados no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e convidados a participar do estudo através de exposição do projeto, enquanto que os voluntários controles foram informados do estudo a partir de divulgação nos espaços físicos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os participantes assinaram Termo de Consentimento Informado (anexo 2) em duas vias, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG – HCPA – Proj. 04-009, anexo 3).

Todos os participantes diabéticos não utilizavam outros medicamentos senão a insulina exógena e foram devidamente investigados para verificar se atendiam aos critérios de inclusão deste estudo, que incluem ausência de retinopatia diabética e neuropatia periférica. Adotou-se os seguintes critérios para excluir estas complicações:

- Neuropatia periférica: ausência de sintomas e estesiometria normal;
- Retinopatia: exame de fundo de olho normal;
- Vasculopatia: palpação dos pulsos pedioso e tibial posterior e exclusão dos sintomas de claudicação;

-Nefropatia: Exame de albuminúria normal;

-Cardiopatia isquêmica: Ausência de sintomas, eletrocardiograma normal e não utilizar medicamentos.

O nível de aptidão física considerado para a inclusão neste estudo foi baseado no ACSM (2000), que considera indivíduos ativos aqueles que acumulam no mínimo 120 minutos de atividade física semanal e  $VO_{2máx}$  acima de  $29 \text{ ml/kg.min}^{-1}$ .

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando-se auxílio do software EpiInfo versão 6.0, onde foi informado as seguintes características: confiança de 95%, poder de 80% e, aceitando que 75% dos voluntários expostos ao tratamento vão responder a ele, chegou-se a um tamanho amostral de 20 voluntários por grupo, posteriormente divididos em 10 voluntários com tratamento (L-arginina) e 10 voluntários sem tratamento (placebo). Durante o período de um ano, convidamos os pacientes com diabetes tipo 1 do ambulatório do HCPA a participarem do estudo, entretanto não se conseguiu atingir a meta proposta pelo cálculo estatístico. Com isso, foram avaliados aqueles que aceitaram participar por voluntariedade do estudo, e que atendessem aos requisitos dos critérios de inclusão, sendo que 10 indivíduos diabéticos finalizaram o protocolo de estudo.

### **3.3 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS**

As variáveis deste estudo foram assim definidas:

Variáveis independentes:

- Exercício
- Suplementação de L-arginina

Variáveis dependentes:

- Fluxo sanguíneo
- Nitritos
- TBARS
- Carbonil
- TRAP

### -Ácido úrico

Variáveis para caracterização da amostra:

- $VO_{2máx}$

- $FC_{máx}$

-Antropometria: medidas de massa corporal, estatura, IMC e percentual de gordura;

-Perfil glicêmico: medidas de hemoglobina glicada ( $A_{1c}$ ) e glicemia em jejum;

-Perfil lipídico: medidas de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos;

-Uréia: medida de uréia na urina.

### 3.4 INSTRUMENTOS DE MEDIDA

Foram utilizados os equipamentos dos laboratórios de fisiologia e bioquímica do LAPEX da UFRGS, do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Laboratório de Bioquímica da UFRGS e do Laboratório de Análises Bioquímicas do HCPA.

#### Ficha de dados individual

Para controle dos dados utilizou-se uma ficha de anamnese incluindo: nome do sujeito, data de nascimento, telefone, e-mail, história do voluntário (em relação à doenças, uso de medicamentos e/ou suplementos alimentares e tabagismo), dados antropométricos como massa corporal, estatura e medidas de dobras cutâneas (tríceps, subescapular, abdominal, coxa, suprailíaca, peitoral e axilar), bem como recordatório alimentar de três dias e de atividades físicas.

#### Esfigmomanômetro

Para verificação da pressão arterial, utilizou-se esfigmomanômetro aneróide e estetoscópio modelo Premium, da marca Glucomed (Brasil), com resolução de 1 mmHg.

#### Balança

Para determinação da massa corporal foi utilizada uma balança eletrônica, modelo PS - 180 da marca URANO, RS/Brasil, com carga máxima de 180 Kg e resolução de 100g.

#### Estadiômetro

Para medir a estatura foi utilizado um estadiômetro constituído por escala métrica, na qual desliza um cursor que mede a estatura do indivíduo na posição de pé. A escala é fixa a uma base apoiada no solo, com resolução de 1mm.

#### Compasso de dobras cutâneas

Para medição das dobras cutâneas, foi utilizado o compasso de Lange com resolução de 1mm.

#### Fita métrica

Para auxiliar na localização das medidas de dobras cutâneas bem como medir as perimetrias corporais, foi utilizado uma fita métrica de 2m de comprimento, marca Lufkin, com resolução de 1mm.

#### Software de nutrição

Foi utilizado o software Programa de Apoio a Nutrição do Centro de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina (CIS-EPM) da Universidade Federal de São Paulo, versão 2.5. As tabelas de alimentos utilizadas no programa são do departamento de agricultura dos EUA. Além disso, foram incluídos dados da tabela de composição química dos alimentos de Guilherme Franco (1997), da tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras do IBGE (1994), e adição de alguns alimentos regionais.

#### Cardiotacômetro

Durante os testes de laboratório os sujeitos tiveram sua frequência cardíaca monitorada através de um cardiotacômetro de marca POLAR, modelo S610 (Finlândia).

#### Ergospirometro

Foi utilizado um analisador de gases modelo CPX/D da marca Medical Graphics Corporation (EUA).

#### Ergômetro

Os testes foram realizados em cicloergômetro de marca Cybex, modelo The Byke (EUA) e em cicloergômetro da marca Monark (Suécia).

#### Pletismógrafo

Os testes foram realizados por pletismógrafo Hokanson TL 400(USA).

### Centrífuga Refrigerada

Uma centrífuga de mesa refrigerada modelo PK 120-R, marca ALC International SRL (Itália), foi utilizada para separar o plasma e glóbulos vermelhos.

### Glicosímetro

Para fazer a leitura da glicemia antes e após o exercício, utilizou-se o glicosímetro Accu Chek Active, marca Roche (Alemanha).

### Contador Beta

O contador LKB Wallac Rack Beta Liquid Scintillation Counter – 1209; LKB producer AB (Suécia), foi utilizado para as medidas de capacidade antioxidante total.

### Espectrofotômetro

O espectrofotômetro UV-Visible Spectrophotometer – Cary 1E (Austrália), foi utilizado para todas as medidas oxidativas, determinação do ácido úrico e concentração de proteína.

### Leitora de ELISA

Uma leitora de ELISA da marca Backmark Bio Rad (EUA) foi utilizada para a mensuração dos nitritos plasmáticos.

### Reagentes utilizados para análises bioquímicas

Reativo de Folin Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:1;

Reativo C, composto por 50mL do reagente A e 1mL do reagente B onde os reagentes A e B são, respectivamente:

Reagente A -  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;

Reagente B -  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre) 1% adicionado a  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartarato de sódio e potássio) 2% em partes iguais (0,5mL de cada).

Tampão glicina 0,1 pH= 8,6;

3,75 g de glicina para 500 ml tampão (ajustar o pH em 300 ml);

ABAP 10 mM (peso molecular = 271 g): 0,135 g em 50 ml de tampão glicina.

Luminol (peso molecular = 199,1 g)

Solução de estoque 50 mM – 17,7 mg Luminol + 2 ml NaOH 0,1 N,

Solução de uso 4 mM – 80  $\mu\text{l}$  solução de estoque + 920  $\mu\text{l}$  tampão glicina.

Ácido tricloroacético TCA 10%

Tampão TBA a 0,67% em água destilada

TMP 2 nmol/ml

NaOH 3%

HCl

DNPH (2 M)

TCA 20%

Etanol e etilacetato

Reagente de Griess – Naftilenodiamina (0,1%) diluído em água destilada e sulfanilamida (2%), misturados em quantidades idênticas.

Solução saturada de  $VCl_3$  – 400 mg de  $VCl_3$  foi diluído em HCl 1M (50 ml)

$NaNO_3$

### **3.5 PROCEDIMENTOS DAS COLETAS DE DADOS**

Em um primeiro momento, os participantes compareceram ao LAPEX da Escola de Educação Física da UFRGS (ESEF-UFRGS) para o esclarecimento do protocolo do estudo. Neste momento, verificou-se a pressão arterial com auxílio de esfigmomanômetro, bem como se realizou o exame de extremidades e verificação dos pulsos. Após, preencheram uma ficha de anamnese incluindo história da doença e hábitos de vida (anexo 4), questionário PAR-Q de prontidão para atividade física (anexo 5) como critério de inclusão no estudo, recordatório alimentar de 3 dias (anexo 6) e inquérito de atividade física (anexo 7). Durante o estudo, foi solicitado aos participantes que não modificassem sua alimentação atividades físicas habituais, entretanto foi solicitado que observassem alguns cuidados em relação à sua alimentação nas 48h anteriores aos testes (anexo 8).

Após esta entrevista preliminar, os voluntários realizaram avaliação da composição corporal e teste de cargas máximas progressivas em cicloergômetro para a determinação do  $VO_{2máx}$  e dos limiares ventilatórios (LV). A partir desses resultados foi calculada a intensidade para a realização dos testes submáximos, em dias diferentes e sempre no turno da manhã, conforme descrito posteriormente. Neste dia, também, era marcado com os voluntários uma data para a coleta de sangue (5 mL) para a realização dos

exames bioquímicos de perfil lipídico e glicêmico (jejum de 12 horas) e de urina para análise de uréia, visando a caracterização da amostra.

Na manhã do primeiro teste submáximo, o voluntário comparecia ao HCPA previamente alimentado a no mínimo 60 minutos e no máximo 90 minutos. Os voluntários repousavam em decúbito dorsal por 20 minutos, e em seguida procedia-se a primeira coleta de sangue (15mL) para medidas basais dos parâmetros bioquímicos oxidativos e antioxidantes, e a avaliação do fluxo sanguíneo da perna. O exercício em cicloergômetro durou 45 minutos em intensidade 10% abaixo do 2<sup>o</sup> limiar ventilatório. Imediatamente após o término do exercício, foi novamente coletado sangue (15mL) para medidas pós-exercício de parâmetros bioquímicos oxidativos e antioxidantes, bem como avaliação do fluxo sanguíneo da perna. Neste mesmo dia, foi entregue aos participantes cápsulas de suplementação, que consistiram em L-arginina (grupo tratamento) ou amido (placebo, grupo controle). O delineamento adotado neste estudo foi duplo cego e randomizado, sendo realizado um sorteio pelo farmacêutico responsável pela manipulação das cápsulas, que não estava diretamente envolvido com o estudo, para definir o conteúdo das cápsulas que cada participante receberia. Nem os participantes nem os pesquisadores envolvidos diretamente no estudo conheciam o conteúdo das cápsulas. Os participantes foram devidamente orientados sobre como administrar as cápsulas. Após o período de suplementação, os participantes retornavam ao HCPA para repetir o protocolo de exercício submáximo, com coletas de urina, sangue e avaliação do fluxo sanguíneo nos momentos pré e pós-exercício.

As principais preocupações na realização de exercício agudo em indivíduos com diabetes tipo 1 são a hiperglicemia quando há pouca insulina presente e a hipoglicemia. Para controlarmos estes fatores de risco, foi realizado teste de glicemia capilar com auxílio de um glicosímetro antes do exercício e adotado os seguintes procedimentos: se a glicemia estivesse menor ou igual a 100 mg/dl, eram oferecidos carboidratos; se ela estivesse acima de 250mg/dl, o exercício era postergado até que se encontrasse abaixo deste nível. Também foi monitorada a glicemia dos voluntários com diabetes a cada 15 minutos do exercício e após 30 minutos do seu término, bem como controlada a frequência cardíaca dos voluntários em todos os momentos durante sua permanência no HCPA. Quando foi verificado hipoglicemia induzida pelo exercício durante os testes nos voluntários

diabéticos, o exercício foi imediatamente interrompido e oferecido aos voluntários bebidas carboidratadas a 6% e/ou glicose a 10%.

Os protocolos de antropometria, exercícios, coleta de sangue, avaliação do fluxo e suplementação estão detalhados a seguir.

### **3.5.1 Antropometria**

Antes de iniciar os testes de  $VO_{2máx}$ , foi realizada a coleta de dados antropométricos: massa corporal, estatura, dobras cutâneas, perímetros e diâmetros ósseos.

As medidas de dobras cutâneas fornecem informações significativas em relação à gordura corporal e sua distribuição (McARDLE et al., 2001). O lado direito do corpo foi padronizado para a averiguação das dobras do tríceps, subescapular, peitoral, bíceps, crista ilíaca, abdominal e coxa 1/3 anterior. Todas as avaliações foram realizadas por um mesmo examinador, que avaliou três vezes a mesma dobra, e a média dos valores foi utilizada para os cálculos do percentual de gordura, proposto por Jackson et al., 1978. A perimetria foi realizada com fita métrica adequada nos seguintes locais: braço, antebraço, punho, tórax mesoesternal, abdômen, cintura, quadril, coxa e panturrilha. Os diâmetros ósseos obtidos foram biestilóide, úmero e fêmur, com paquímetro desenvolvido para esta finalidade.

### **3.5.2 Protocolo para determinação do $VO_{2máx}$**

A determinação do  $VO_{2máx}$  foi realizada através do ergoespirômetro da marca Medical Graphics Corporation, modelo CPX-D (USA), que foi ligado uma hora antes do teste para aquecimento e estabilização das células analisadoras dos gases. Concluída esta etapa, procedeu-se a calibração do equipamento, procedimento adotado em todas as manhãs antes do início dos testes. Antes do início da calibração foram informadas as condições ambientais ao equipamento: temperatura ambiente, pressão atmosférica e umidade relativa do ar. Então, iniciou-se a calibração do volume no pneumotacógrafo

eletronicamente pelo sistema de calibração do volume zero. Em seguida foi feita a calibração do volume com cinco injeções e ejeções de ar em diferentes velocidades através do pneumotacógrafo, com uma seringa de três litros.

A calibração do analisador de gases consistiu no ajuste das concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de acordo com as concentrações dos cilindros de referência (21% O<sub>2</sub> e nitrogênio para balanço) e de calibração (12% O<sub>2</sub>, 5,09% CO<sub>2</sub>, e nitrogênio para balanço), da empresa *Air Products* (Brasil). Por último, foi feita a medida da *phase delay*, ou seja, a diferença de tempo entre a detecção do fluxo pelo pneumotacógrafo, praticamente instantânea, e as medidas das concentrações dos gases pelo analisador.

Durante os testes, foram registrados os seguintes parâmetros: VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, VE, pressão de O<sub>2</sub> no final da expiração (P<sub>ET</sub>O<sub>2</sub>), pressão de CO<sub>2</sub> no final da expiração (P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub>), razão de troca respiratória (RER), frequência cardíaca (FC), tempo e velocidade.

Os indivíduos que nunca haviam realizado um teste ergoespirométrico em cicloergômetro foram submetidos a um teste de adaptação aos equipamentos antes de iniciar o estudo.

### **3.5.3 Teste de cargas progressivas**

Antes da realização do teste, os indivíduos foram instruídos a realizarem um breve alongamento. Após o alongamento, procedeu-se a colocação do monitor de frequência cardíaca, assim como a máscara de coleta de gases acoplada ao ergoespirômetro, e acomodou-se os indivíduos sentados por aproximadamente 3 minutos antes do início do teste.

O teste de carga máxima progressiva foi realizado em cicloergômetro com frenagem eletromagnética da marca Cybex, modelo The Byke (USA) conforme o protocolo proposto por LUCÍA e colaboradores (2000). A figura abaixo ilustra o momento do teste de um dos voluntários do estudo.



Figura 2 – Teste de cargas máximas em cicloergômetro realizado no nosso laboratório.

O protocolo constitui-se de uma carga de exercício inicial de 25 W (Watt), com incrementos adicionais de  $25 \text{ W} \cdot \text{min}^{-1}$  até a exaustão, e recuperação de 5 minutos a 25 W. A cadência de pedalada foi mantida constante entre 60 e 90 rpm, ou seja, a rotação em que o voluntário se sinta mais confortável. O exercício foi interrompido quando: 1) voluntariamente solicitado, ou 2) a cadência não era mantida acima de 60 rpm.

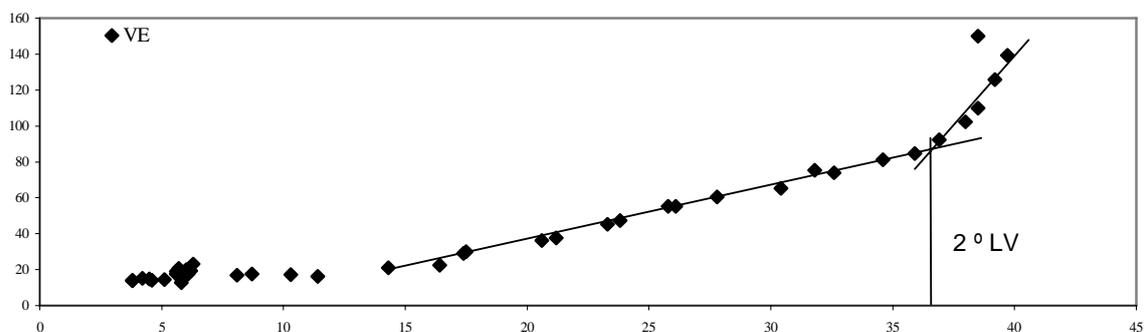
Durante todo o teste foi realizada a ergoespirometria computadorizada, de onde foram obtidos o consumo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ), a produção de  $\text{CO}_2$  ( $\text{VCO}_2$ ) e a ventilação (VE). A partir dos resultados foram determinados os limiares ventilatórios (LV), conforme procedimento a seguir.

#### **3.5.4 Determinação dos limiares ventilatórios**

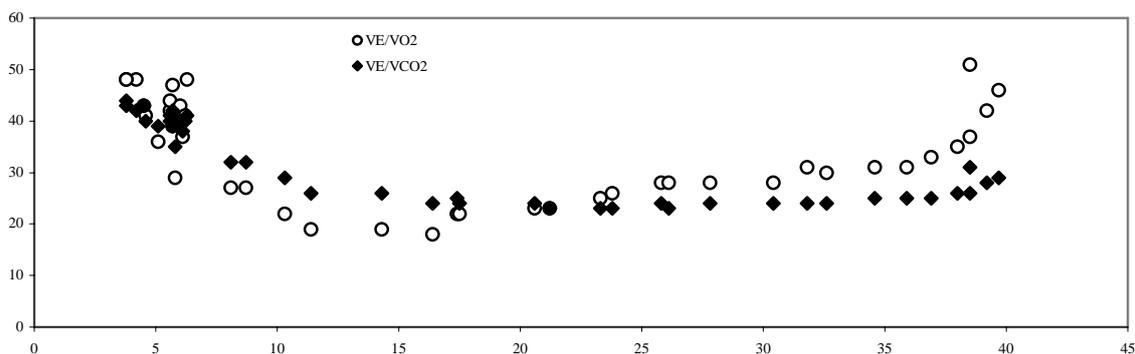
Esta técnica de estimativa foi escolhida em função de (a) não ser invasiva; (b) evitar a necessidade de presença dos indivíduos mais de uma vez no laboratório para realizar outro protocolo máximo incluindo a medida de lactato sanguíneo.

O primeiro limiar ventilatório ou limiar aeróbio (LA), foi determinado através da análise computadorizada da equação de regressão entre  $\text{VO}_2$  e  $\text{VCO}_2$ , conhecido como método de inclinação V (*V-slope*). O segundo limiar ventilatório ou limiar anaeróbio (LAn), foi determinado usando o critério de aumento no equivalente ventilatório do oxigênio e do gás carbônico ( $\text{VE} \cdot \text{VO}_2^{-1}$  e  $\text{VE} \cdot \text{VCO}_2^{-1}$ ), com uma redução concomitante na  $\text{P}_{\text{ETCO}_2}$ .

Tanto o LA (quando necessário) e o LAn foram determinados por dois observadores independentes por inspeção visual nos gráficos impressos conforme as figuras 3 e 4, os quais foram plotados em intervalos de 5 segundos em função do  $\text{VO}_2$ . Quando a escolha do limiar diferir por mais de 15 segundos entre os investigadores, um terceiro investigador independente foi consultado.



**Figura 3** – Ventilação em relação ao consumo de oxigênio. Teste realizado em nosso laboratório.



**Figura 4** – Equivalentes ventilatórios do oxigênio e do dióxido de carbono em relação ao consumo de oxigênio. Teste realizado em nosso laboratório.

### 3.5.5 Teste submáximo

Os indivíduos exercitaram-se em cicloergômetro em intensidade ajustada para manter a FC estável correspondente ao valor de  $VO_2$  10% abaixo de seu LV2, denominado daqui por diante como teste submáximo e baseado no protocolo de Ribeiro e colaboradores (1986). Após a identificação do  $VO_2$  correspondente ao momento do LV2, foi reduzido 10% deste valor e verificado em qual FC o voluntário estava neste momento do teste. Para controle do exercício, foi calculada uma zona de segurança 5% acima e abaixo deste valor de FC, no qual era aceito a variação da FC dos voluntários durante o exercício.

Após repouso prévio, os indivíduos se exercitavam por 3 minutos em uma intensidade aproximada de 33% correspondente àquela do  $VO_2$  almejado correspondente ao teste submáximo (ou seja, 33% do valor correspondente a 10% abaixo do seu LV2). Esta intensidade foi aumentada para 66% e 100% do valor almejado no 3º e 6º minuto, respectivamente. Os sujeitos foram encorajados a continuar o exercício por 45 minutos. A carga foi ajustada, quando necessário, durante o teste para manter a FC referente ao teste.

### 3.5.6 Avaliação do fluxo sanguíneo

A avaliação do fluxo sanguíneo foi realizada através da técnica de pletismografia de oclusão venosa, que avalia as alterações no volume corporal com um *strain gauge* de mercúrio conectado a um pletismógrafo (Hokanson TL-400, USA), a partir do protocolo de Copeland e colaboradores (1996). Um manguito foi colocado no tornozelo esquerdo e insuflado até uma pressão superior a pressão arterial sistólica para isolar o fluxo para o pé. Um segundo manguito colocado na coxa esquerda foi insuflado até 60 mmHg para bloquear o efluxo venoso sem interromper o influxo arterial. Pequenas alterações na circunferência da perna causam alterações no comprimento do *strain gauge*, que resultam em alterações na voltagem das extremidades deste último. O *strain gauge* está conectado ao pletismógrafo, que registra as alterações do seu comprimento, que se relaciona com as variações de fluxo sanguíneo. Três determinações foram feitas antes de cada exercício submáximo para determinar a linha de base, sendo 10 segundos de oclusão venosa seguidas de dez segundos sem oclusão, e três determinações imediatamente após o final de cada

teste. A calibração do petismógrafo adotada durante as coletas foi de 0,5%. A figura 5 ilustra o momento da pletismografia de oclusão venosa de um voluntário do estudo, com os manguitos devidamente colocados na altura da coxa e tornozelo, e o *strain gauge* de mercúrio na maior circunferência da perna.



Figura 5 – Pletismografia de oclusão venosa realizada no HCPA.

No momento em que ocluimos o retorno venoso pela insuflação do manguito da coxa, há um represamento de sangue no segmento distal ao manguito, levando ao aumento do volume da perna. Esse progressivo aumento é registrado no canal do pletismógrafo com uma linha ascendente. Quando se solta a pressão do manguito, o sangue que estava represado é rapidamente escoado, voltando a perna a ter o volume inicial. Esse processo é feito sucessivamente, originando as curvas de fluxo.

Para o cálculo das curvas de fluxo, utilizou-se a técnica manual, realizando-se a seguinte seqüência: traçou-se uma linha que tangenciava os três primeiros picos sistólicos; marcou-se um ponto nesta linha e, a partir dele, traçou-se uma outra reta no sentido horizontal (acompanhando o quadriculado do papel). Mediu-se, a partir do ponto de intercessão das retas, uma distância equivalente ao período de dez segundos na linha horizontal, e marcou-se este ponto. A seguir, mediu-se a distância entre as duas linhas, que representa o aumento de volume nesse intervalo de tempo. Para calcular o aumento do volume que ocorreria se a oclusão permanecesse durante 60 segundos, multiplicamos o valor por seis. A seguir, divide-se o valor pela calibração prévia do pletismógrafo. O

procedimento do cálculo é repetido para cada curva que se deseja analisar. A figura 6 representa um exemplo de curvas de fluxo sanguíneo obtida pela técnica de pletismografia de oclusão venosa.

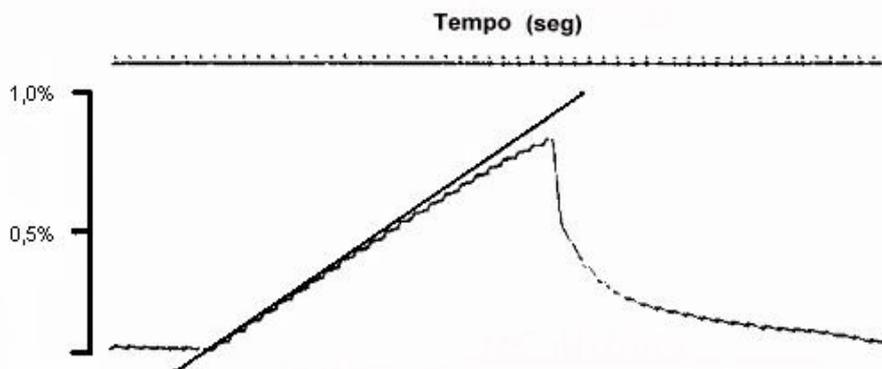


Figura 6 - Curva de fluxo obtida pela técnica de pletismografia de oclusão venosa.

A temperatura da sala foi mantida entre 20 e 24 °C, e os indivíduos foram instruídos a não consumir cafeína ou outro modulador conhecido da função vascular 24 h antes dos testes.

### 3.5.7 Coleta e análise do sangue e urina:

Duas coletas de sangue (15ml) foram realizadas em veia da região antecubital, por profissional capacitado para este fim, nos momentos:

- 1- Antes de cada teste submáximo, com o indivíduo em repouso por 20 minutos.
- 2- Imediatamente após a realização de cada teste submáximo.

O sangue foi retirado com seringa e agulhas descartáveis e colocadas em tubos com solução heparina a 6%, que foi centrifugado a 4000 rotações por minuto (rpm), à 4 °C. O plasma foi aliquoteado em microtubos e armazenado à -75° C, até o momento de sua análise no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Departamento de Bioquímica, ICBS,

UFRGS, Laboratório de Fisiologia Celular (ICBS, UFRGS) ou no Laboratório de Patologia Clínica (HCPA).

A coleta de urina ocorreu na residência do voluntário em recipiente específico para armazenamento da mesma até ser entregue ao pesquisador. O voluntário foi orientado a coletar a urina no período da manhã do dia correspondente ao teste, em jejum, e entregar na mesma data o recipiente ao pesquisador.

Glicemia em jejum, Hemoglobina Glicada, Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicerídeos e Uréia na urina:

As análises de colesterol total, colesterol HDL, glicose, hemoglobina glicada, triglicerídeos e uréia foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA, conforme o protocolo especificado abaixo:

Quadro 3 – Protocolos para análise sanguínea utilizados no HCPA.

<b>Teste/Analito</b>	<b>Método</b>	<b>Equipamento</b>
COL - Colesterol Total	Enzimático Colorimétrico	Ádvia Bayer <sup>®</sup> Mega Bayer <sup>®</sup>
HDL - Colesterol HDL	Direto Inibição Seletiva	Ádvia Bayer <sup>®</sup> Mega Bayer <sup>®</sup>
GLI – Glicose	Enzimático UV Hexoquinase	Ádvia Bayer <sup>®</sup> Mega Bayer <sup>®</sup>
A <sub>1C</sub> -Glicohemoglobina/HbA <sub>1C</sub> Hemoglobina Glicada	Imunoensaio	Cobas Mira Plus <sup>®</sup>
TRI - Triglicerídios	Enzimático Colorimétrico	Ádvia Bayer <sup>®</sup> Mega Bayer <sup>®</sup>
U - Uréia	Enzimático UV	Ádvia Bayer <sup>®</sup> Mega Bayer <sup>®</sup>

As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - Departamento de Bioquímica e no Laboratório de Fisiologia Celular, ambos do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e a análise da capacidade antioxidante total foi feita em triplicata.

### 3.5.7.1 Quantificação dos níveis de nitritos plasmáticos

O método utilizado avalia simultaneamente as concentrações de nitritos e nitratos em microplacas de 96 poços. O princípio desta técnica é a redução para nitrito pelo vanádio (III) combinado com a detecção pela reação ácida de Griess, conforme descrito por Miranda e colaboradores (2001).

Brevemente, adicionou-se 250 µl de plasma e 250 µl ácido tricloroacético 10% (TCA) e centrifugou-se a 2600 rpm por 10 minutos, com o objetivo de desproteinizar a amostra. Nas placas, adicionou-se 100 µl da amostra desproteinizada com 100 µl da solução saturada de cloreto de vanádio ( $VCl_3$ ) para a redução de nitrato a nitrito. Após, adicionou-se 100 µl de reagente de Griess, incubou-se por 30 minutos em temperatura de 37 ° C e leu-se em leitora de ELISA a 540 nm. Uma curva padrão foi feita adicionando-se a diferentes volumes de nitrito de sódio ( $NaNO_3$ ) o volume de 100 µl de reagente de Griess, totalizando o mesmo volume final das amostras.

### 3.5.7.2 Quantificação de proteínas no plasma

As proteínas foram quantificadas pelo método que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (LOWRY et al., 1951).

Para a realização da técnica, fez-se uma curva padrão de proteína, onde foi adicionado aos tubos de ensaio diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) 0,5 mg/ml, completando-se o volume com água destilada, sendo que todos os tubos tiveram volume final de 200 µl. Da mesma forma, adicionou-se aos tubos 20 µl de amostra previamente dissolvida em tampão glicina (1:100) e completou-se o volume para 200 µl com  $H_2O$  destilada. Adicionou-se 100 µl de reagente C em cada tubo, agitou-se e aguardou-se 15 minutos. Ao final dos 15 minutos, adicionar 100 µl de Folin 1 N, agitou-se e aguardou-se 30 minutos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 700 nm.

### 3.5.7.3 Quantificação dos níveis de TBARS

Como índice de produção de espécies reativas de oxigênio, utilizou-se a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação em meio ácido. Esta técnica é amplamente aceita como um método sensível de medida de peroxidação lipídica, previamente descrita por Draper e Hadley (1990).

Brevemente, adicionou-se 300 µl de plasma e 600 µl ácido tricloroacético 10% (TCA) e centrifugou-se a 2600 rpm por 10 minutos. Reagiu-se 500 µl sobrenadante com 500 µl de TBA 0,67% e ferveu-se durante 20 minutos. Resfriou-se as amostras por 5 a 10 minutos e o TBARS foi determinado em espectrofotômetro sob absorvância de 532 nm. Os resultados foram expressos como nmol MDA.mg proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.7.4 Quantificação de grupamentos carbonil

O dano oxidativo a proteínas foi medido pela determinação de grupos carbonil pela reação com DNPH, como previamente descrito (Levine et al., 1990).

Em suma, a técnica consiste em separar 200 µl da amostra do plasma previamente congelado e mistura-se 100 µl da amostra com 100 µl HCl (2 M) em um microtubo, e 100 µl da amostra com 100 µl DNPH (10 mM) em outro microtubo. Após, incuba-se por 1 hora em temperatura ambiente agitando-se a cada 15 minutos. Ao término deste período, coloca-se 100 µl TCA a 20%, e centrifuga-se os microtubos a 14000 rpm, 4°C, por 3 minutos e descarta-se o sobrenadante. Lava-se o pelet 3 vezes com 500 µl de etanol com etilacetato, 1:1 (vórtex). Centrifuga-se durante 3 minutos (1400 rpm, 4°C) para cada lavagem. Entre cada lavagem aguardamos 15 minutos. Após este procedimento, redissolve-se as amostras com 1 ml de NaOH 3% e coloca-se em banho-maria por 20 minutos à 60 °C, com vórtex no 10º minuto. Após o banho-maria, centrifugamos durante 3 minutos a 1400 rpm, 4°C para remover qualquer material insolúvel. Enfim, lê-se o carbonil a 370 nm em espectrofotômetro.

Os resultados foram corrigidos pela proteína plasmática conforme descrito anteriormente.

#### **3.5.7.5 Determinação do potencial antioxidante não enzimático (TRAP)**

O princípio da técnica do TRAP foi previamente descrito por Wayner e colaboradores (1985). Brevemente, a reação é iniciada pela injeção de 10  $\mu\text{L}$  luminol e 4 mL de AAPH (um radical livre que produz radical peroxil em uma taxa constante) em tampão glicina, que resulta em emissão estável de luminescência. A adição do plasma diminui a luminescência proporcionalmente ao potencial antioxidante. O conteúdo de proteína do plasma foi determinado a partir da técnica proposta por Lowry et al (1951). A emissão de luz foi acompanhada por 30 minutos após a adição do plasma (100 $\mu\text{g}$  de proteína). A quimiluminescência foi lida em contador de cintilação líquida como contagem por minuto (cpm), considerando-se um antioxidante padrão como correspondente a 100% da capacidade antioxidante.

#### **3.5.7.6 Quantificação dos níveis de ácido úrico**

O ácido úrico é um antioxidante não enzimático que foi mensurado utilizando-se um kit comercial Wiener Lab. (Uricostat enzimatico AA, Rosario, ARG). Brevemente, 20 $\mu\text{L}$  de plasma foram misturados com 1 mL de reagente de trabalho. Incubou-se por 15 minutos em banho-maria a 37 °C, e o ácido úrico foi determinado em espectrofotômetro à absorvância de 505nm.

### 3.6 Suplementação:

A suplementação ocorreu por via oral, com a administração de cápsulas manipuladas em farmácia, sob a responsabilidade de um farmacêutico devidamente capacitado. O conteúdo das cápsulas era desconhecido tanto para os participantes da pesquisa quanto para os pesquisadores, e a suplementação foi realizada da seguinte maneira:

Grupo tratamento: recebeu cápsulas de administração oral de cloridrato de L-arginina (anexo 9), 7g ao dia, durante 7 dias. As cápsulas foram administradas em três momentos do dia, ou seja, pela manhã, tarde e noite (8h, 16h e 24h). Em cada horário, foi ingerido 4 cápsulas.

Grupo placebo: recebeu cápsulas de administração oral de um composto amido na mesma quantidade, cor, sabor e odor do grupo tratamento. A administração das cápsulas foi idêntica ao grupo tratamento, e foram manipuladas pelo mesmo profissional responsável pelas cápsulas de L-arginina.

### 3.7 Tratamento Estatístico:

Os dados foram estruturados e analisados utilizando o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 10.0 para Windows. A análise foi assim constituída:

a) Foi avaliada a distribuição de todas as variáveis para a verificação do pressuposto da normalidade, através do teste de Shapiro-Wilk, e a análise da homocedasticidade das variâncias através do teste de Levene (anexo 10).

b) Os grupos controle e diabéticos foram comparados entre si na admissão ao estudo, em relação às variáveis: características dietéticas, composição corporal, idade,  $VO_{2m\acute{a}x}$  e  $LV2$ , atividade física, glicemia em jejum, colesterol total e HDL, triglicérides, hemoglobina glicada e uréia na urina, utilizando-se teste  $t$  de Student para amostras independentes.

c) O efeito da doença sobre os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo nos grupos controle e diabéticos foram comparados utilizando-se teste *t* de Student para amostras independentes.

d) Os momentos antes e após o exercício antes da suplementação para as variáveis de função endotelial e estresse oxidativo foram comparados utilizando-se teste *t* para amostras dependentes.

e) Uma vez aplicado o protocolo de suplementação, foram comparados os efeitos do tratamento dentro do mesmo grupo utilizando-se análise de variância de duas vias com medidas repetidas (ANOVA Two Way) com teste *post hoc* Tukey, quando observou-se diferenças significativas.

Todos os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão e o nível de significância aceito foi de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E DIETÉTICAS

Os valores das características dos grupos em relação à idade, massa corporal, estatura, índice de massa corporal (IMC), percentual de gordura, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD),  $VO_{2máx}$ ,  $FC_{máx}$ . Conforme verificado, os grupo não apresentavam diferenças nas características de idade e antropometria, mas apresentavam diferenças significativas nas variáveis de aptidão física.

Tabela 2 – Características dos grupos em relação à idade, tempo de doença, massa corporal, estatura, IMC, PAS, PAD, percentual de gordura,  $VO_{2máx}$  e  $FC_{máx}$

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)	p
Idade (anos)	23,45 ± 0,59	23,37 ± 1,73	0,958
Tempo de doença (anos)	-	8,57 ± 5,94	-
Massa corporal (Kg)	75,27 ± 2,54	72,3 ± 4,25	0,574
Estatura (cm)	177,66 ± 1,81	173,75 ± 2,18	0,281
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23,75 ± 0,43	23,98 ± 1,43	0,883
Percentual gordura (%)	17,83 ± 1,20	19,06 ± 2,92	0,661
PAS (mmHg)	120,66 ± 2,53	126,66 ± 2,71	0,256
PAD (mmHg)	80,0 ± 2,54	85,0 ± 3,02	0,109
$VO_{2máx}$ (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	45,49 ± 1,75	37,17 ± 2,28	0,013
$FC_{máx}$ (bpm)	186,74 ± 2,19	179,71 ± 1,83	0,023

As figuras 7 e 8 apresentam as características de  $VO_{2máx}$  e  $FC_{máx}$ , respectivamente, que possuem diferenças estatisticamente significativa, conforme descrito acima.

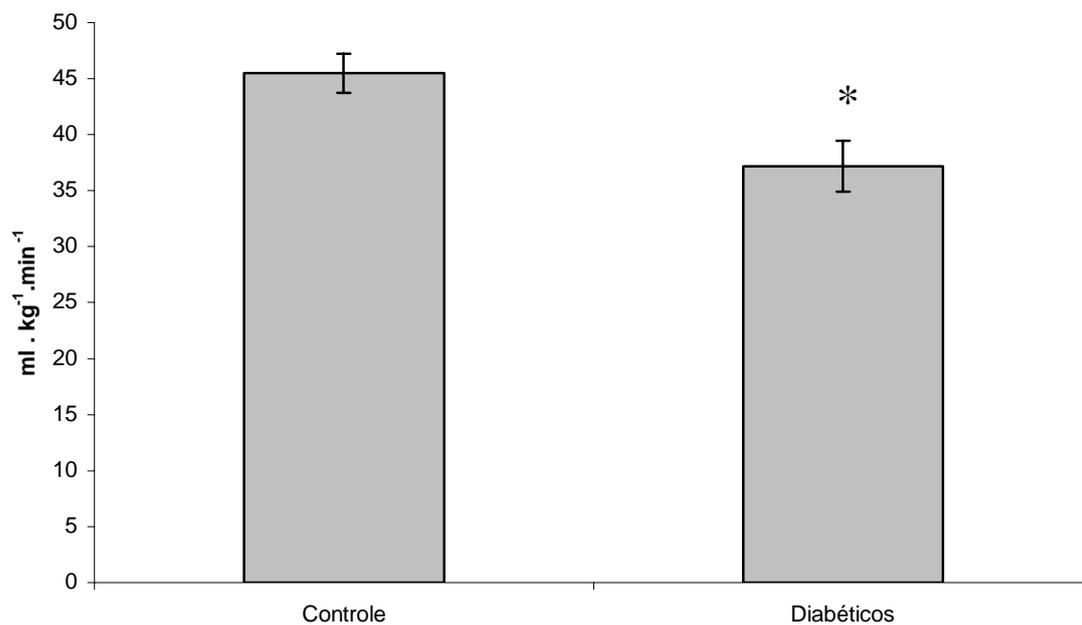


Figura 7 – Consumo máximo de oxigênio avaliado em teste de cargas progressivas em cicloergômetro. \*  $p < 0,05$  entre os grupos

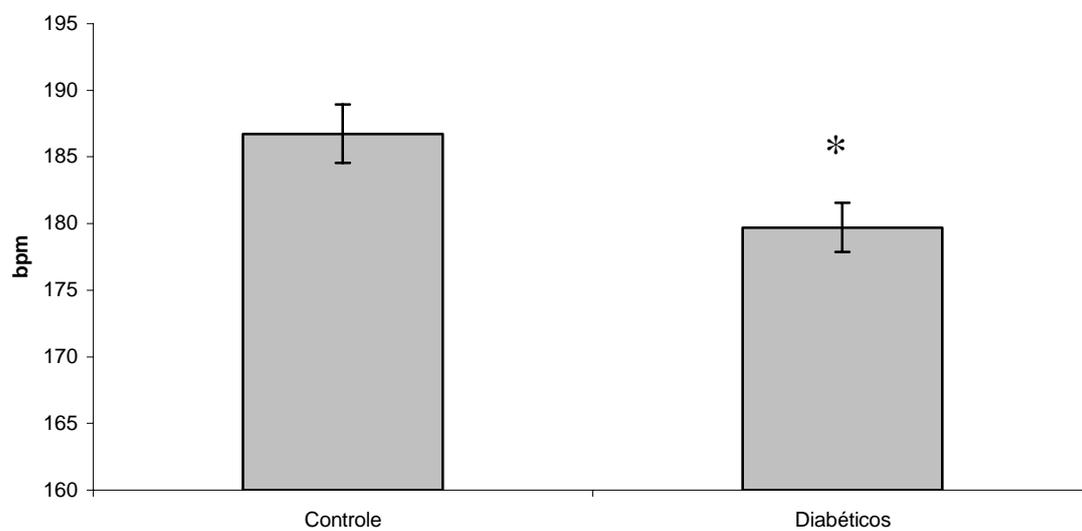


Figura 8 – Frequência cardíaca máxima avaliada em teste de cargas progressivas em cicloergômetro. \*  $p < 0,05$

A tabela 3 apresenta os resultados dos exames sangüíneos para caracterização do perfil lipídico e glicêmico dos grupos. Verificou-se diferenças significativas na glicemia em jejum e hemoglobina glicada ( $A_{1c}$ ) entre os grupos, conforme esperado devido à doença, entretanto os grupos não foram diferentes entre si quando avaliado o perfil lipídico.

Tabela 3 – Resultados dos exames de glicemia em jejum,  $A_{1c}$ , colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos dos grupos controle e diabéticos.

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)	p
Glicemia jejum (mg/dl)	94,84 $\pm$ 1,42	183,11 $\pm$ 19,13	0,000
$A_{1c}$ (%)	5,55 $\pm$ 0,03	8,38 $\pm$ 0,43	0,000
Colesterol Total (mg/dl)	146,79 $\pm$ 5,09	145,22 $\pm$ 7,37	0,863
Colesterol HDL (mg/dl)	42,89 $\pm$ 1,76	46,67 $\pm$ 2,58	0,236
Triglicerídeos (mg/dl)	113,69 $\pm$ 22,79	61,77 $\pm$ 16,44	0,153

As figuras 9 e 10 apresentam, respectivamente, as características da glicemia em jejum e  $A_{1c}$ , que possuem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme descrito acima.

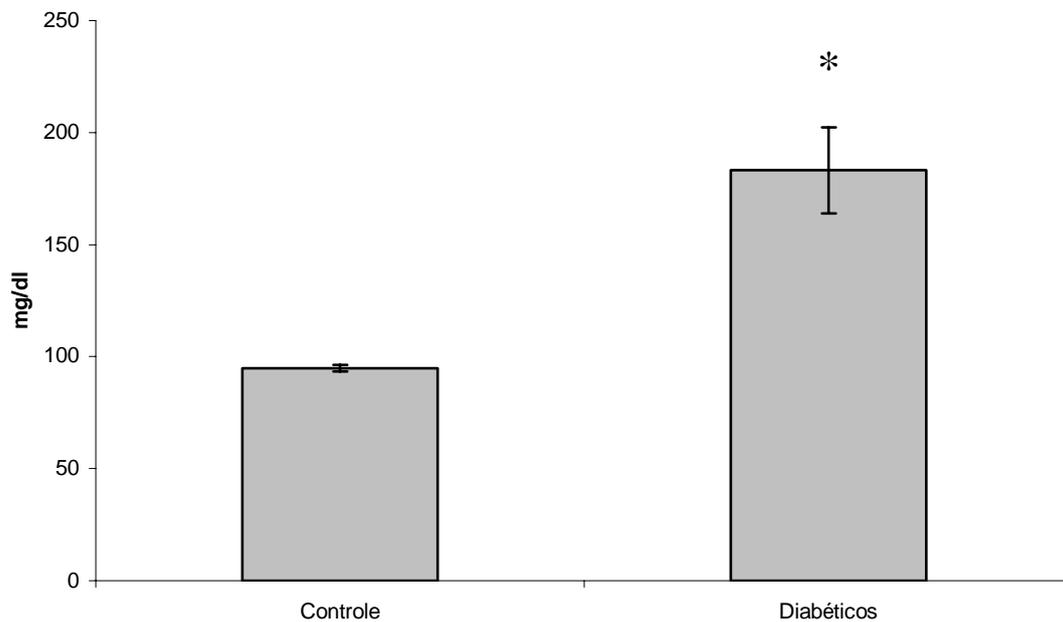


Figura 9 – Glicemia em jejum de indivíduos controle e diabéticos. \*  $p < 0,05$

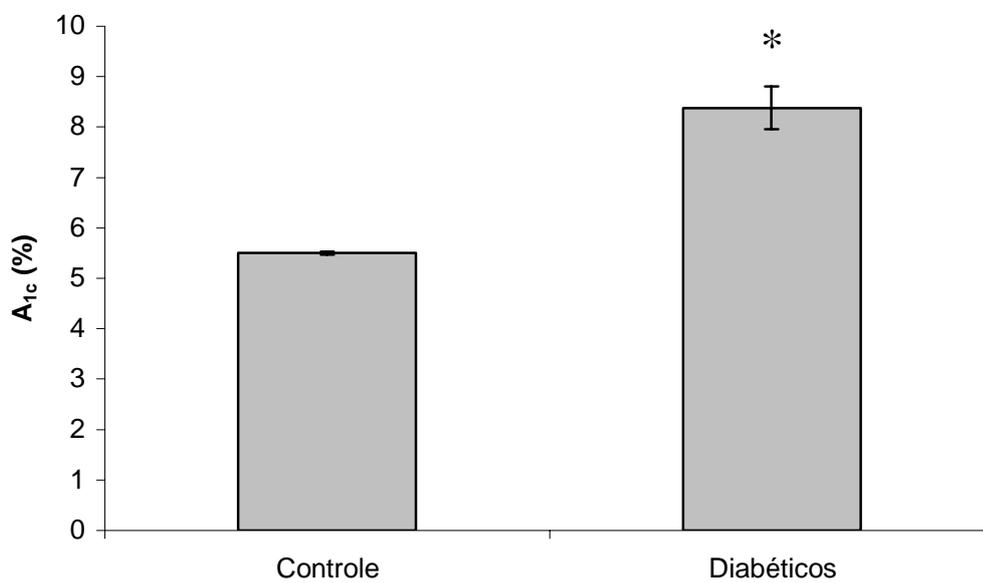


Figura 10 – Valores de A<sub>1c</sub> nos indivíduos controle e diabéticos. \*  $p < 0,05$

Os resultados da avaliação do consumo alimentar, realizada através da aplicação do recordatório alimentar de três dias nos dois grupos, estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação do consumo alimentar em relação à calorias, carboidratos, proteínas e lipídeos

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)	p
Necessidades energéticas	2628,97 ± 250,83	2532,15 ± 274,98	0,427
Calorias ingeridas	2874,36 ± 173,89	2655,21 ± 280,61	0,354
% Carboidrato	56,29 ± 1,51	52,75 ± 0,78	0,785
Gramas CHO/kg	5,23 ± 0,28	4,92 ± 0,68	0,857
% Proteína	16,29 ± 0,60	17,60 ± 0,70	0,963
Gramas PTN/kg	1,49 ± 0,07	1,54 ± 0,14	0,876
% Lipídeo	27,43 ± 1,37	29,65 ± 0,08	0,835
Gramas LIP/kg	1,12 ± 0,07	1,20 ± 0,15	0,768

Conforme os resultados da tabela acima, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nas necessidades energéticas, ingestão de calorias e macronutrientes nos dois grupos avaliados, bem como a relação da quantidade do macronutriente ingerido dividido pelo peso corporal.

Para um melhor controle da suplementação, realizou-se o exame de uréia na urina antes e após a suplementação em ambos os grupos, em repouso. Verificamos que os indivíduos que receberam L-arginina aumentaram sua excreção urinária de uréia, e este aumento foi observado tanto nos indivíduos controle quanto nos diabéticos. Os resultados estão expressos na tabela 5 e ilustrados na figura 11.

Tabela 5 – Uréia na urina antes e após a suplementação nos grupos experimentais. Resultados expressos em mg/dl.

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
Antes	2570,8±524,7	2684,1±475,2	2562,7±535	2647,5±428,7
Depois	2430,8±612,5	2967,2±409,7	2517,1±492	2832,7±528
p	0,567	0,002	0,675	0,015

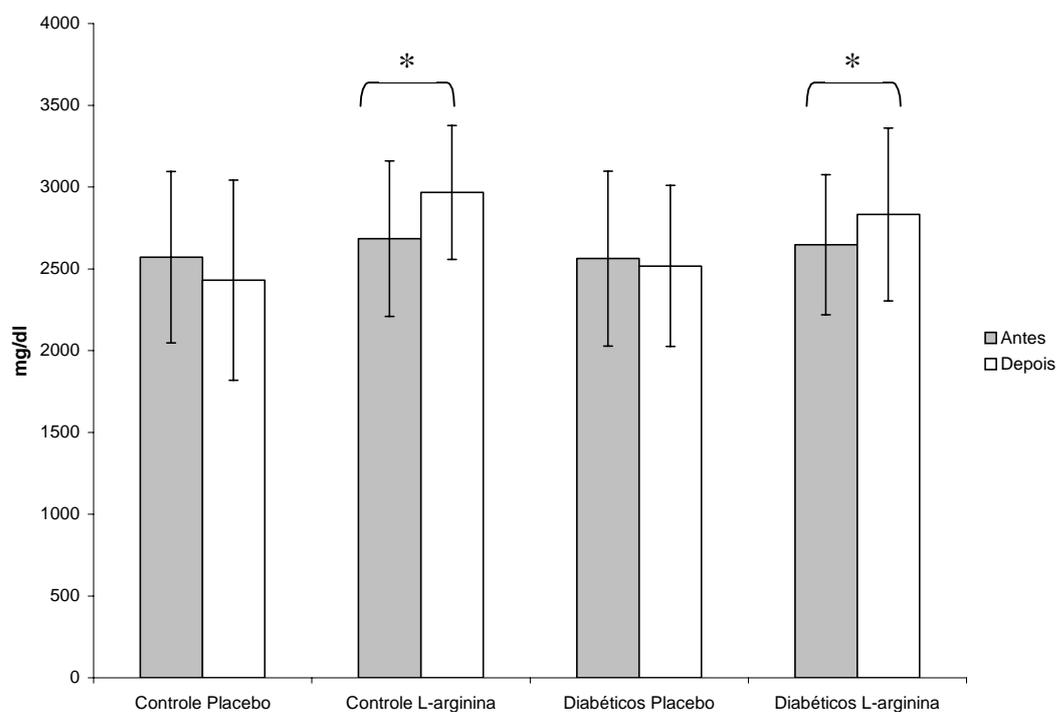


Figura 11 – Excreção de uréia na urina antes e após a suplementação nos grupos experimentais. \* p<0,05.

Os resultados de função endotelial e estresse oxidativo estão divididos em quatro tópicos: efeitos da doença, efeitos do exercício, efeitos da suplementação e efeitos combinados da suplementação e do exercício. Os parâmetros de função endotelial incluem as medidas de fluxo sanguíneo e nitritos plasmáticos, e os parâmetros de estresse oxidativo englobam as medidas de lipoperoxidação, oxidação de proteínas, capacidade antioxidante total e ácido úrico plasmático.

## 4.2 EFEITO DA DOENÇA SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.2.1 Função endotelial

As figuras 12 e 13 apresentam as respostas de fluxo sanguíneo e concentração de nitritos em repouso dos participantes deste estudo.

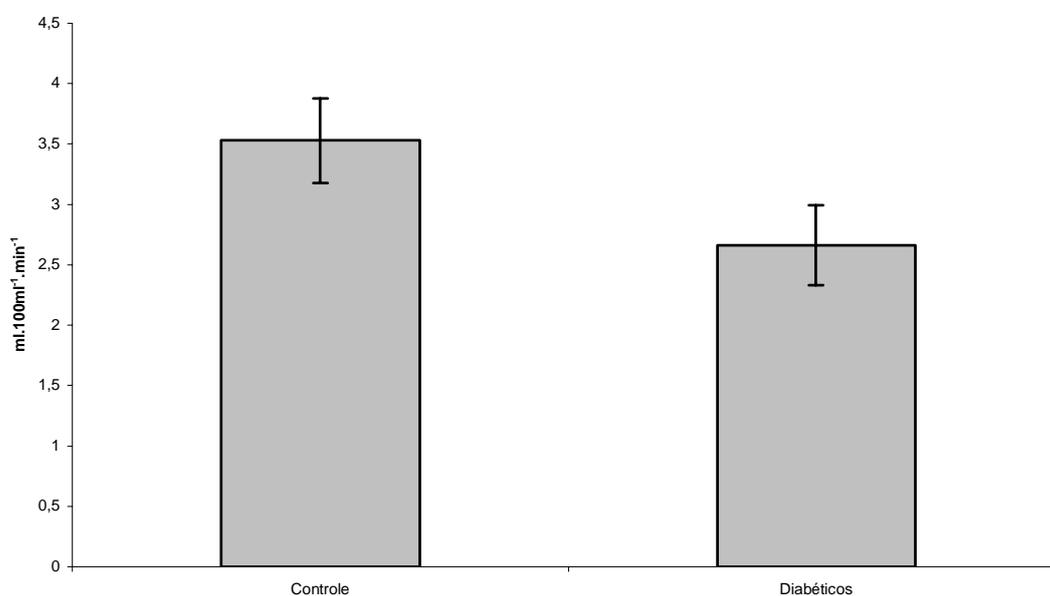


Figura 12 – Fluxo sanguíneo em repouso de indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

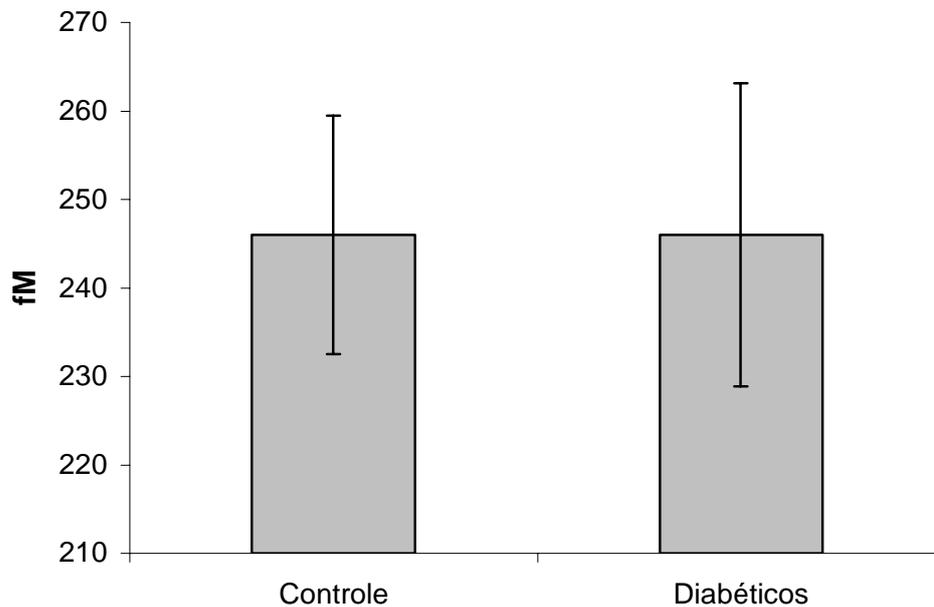


Figura 13 – Nitritos plasmáticos em repouso de indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

Conforme demonstrado nas figuras, não existem diferenças significativas nos parâmetros de função endotelial em repouso quando comparamos os indivíduos controle com os diabéticos do tipo 1. Apesar de o fluxo sanguíneo encontrar-se diminuído nos indivíduos com diabetes, esta diferença não foi significativa.

#### 4.2.2 Estresse oxidativo

Os diabéticos apresentam parâmetros de estresse oxidativo em repouso elevados em comparação aos indivíduos controle, evidenciado com diferenças significativas em todos os parâmetros analisados. As figuras a seguir apresentam os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo nos dois grupos estudados.

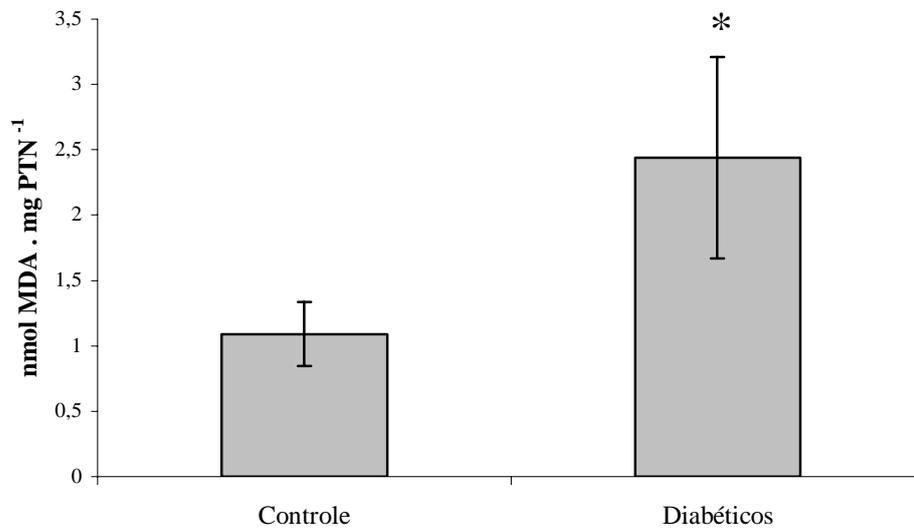


Figura 14 – TBARS em repouso de indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10). \*p=0,039.

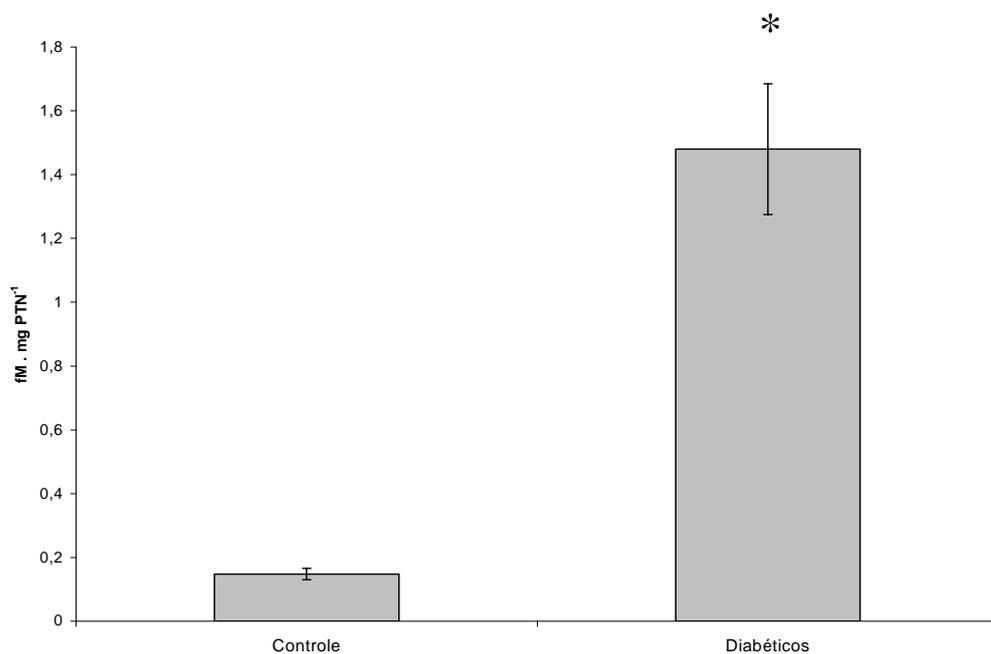


Figura 15 – Carbonil em repouso de indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10). \*p<0,000.

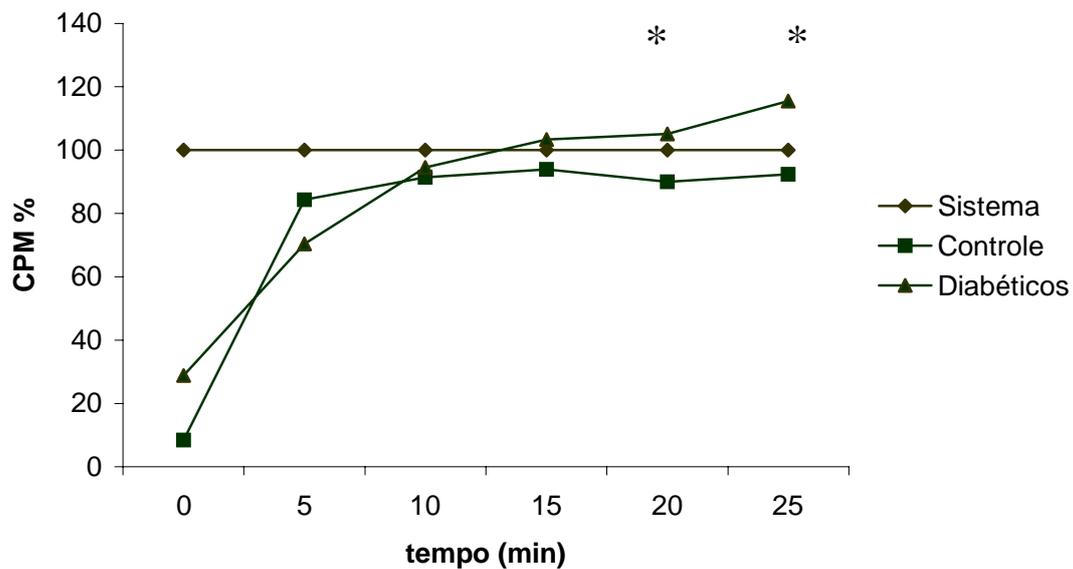


Figura 16 - TRAP em repouso de indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

\*p<0,05

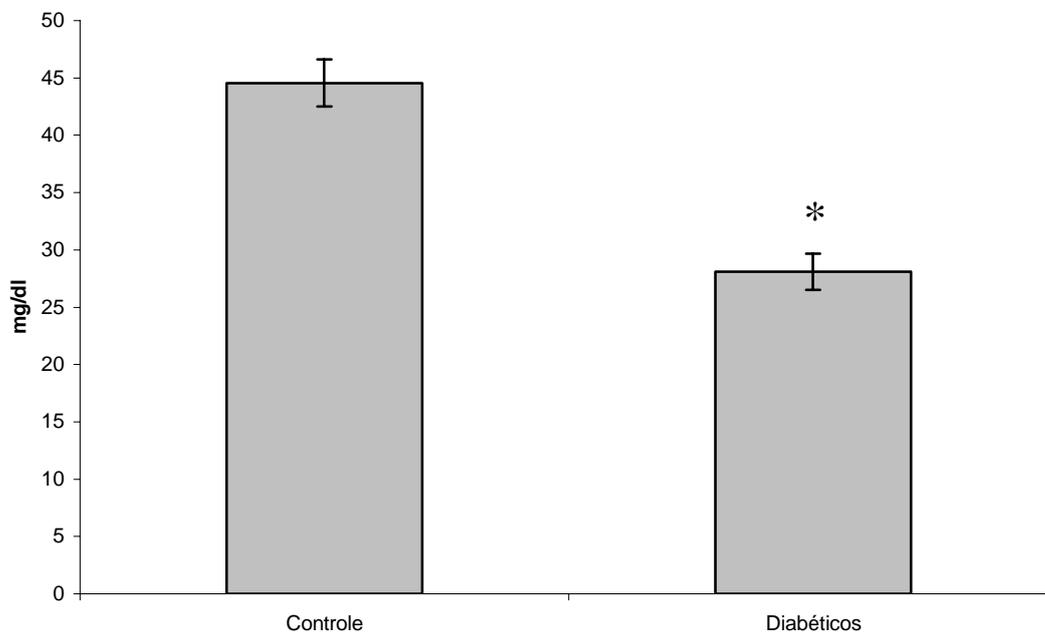


Figura 17 - Ácido úrico em repouso de indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

\*p<0,000.

### 4.3 EFEITO DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO

#### 4.3.1 Efeito do exercício sobre a função endotelial

O exercício aumentou o fluxo sanguíneo nos grupos controle e diabéticos. A figura abaixo ilustra os resultados de fluxo sanguíneo em repouso e após o exercício nos grupos controle e diabéticos.

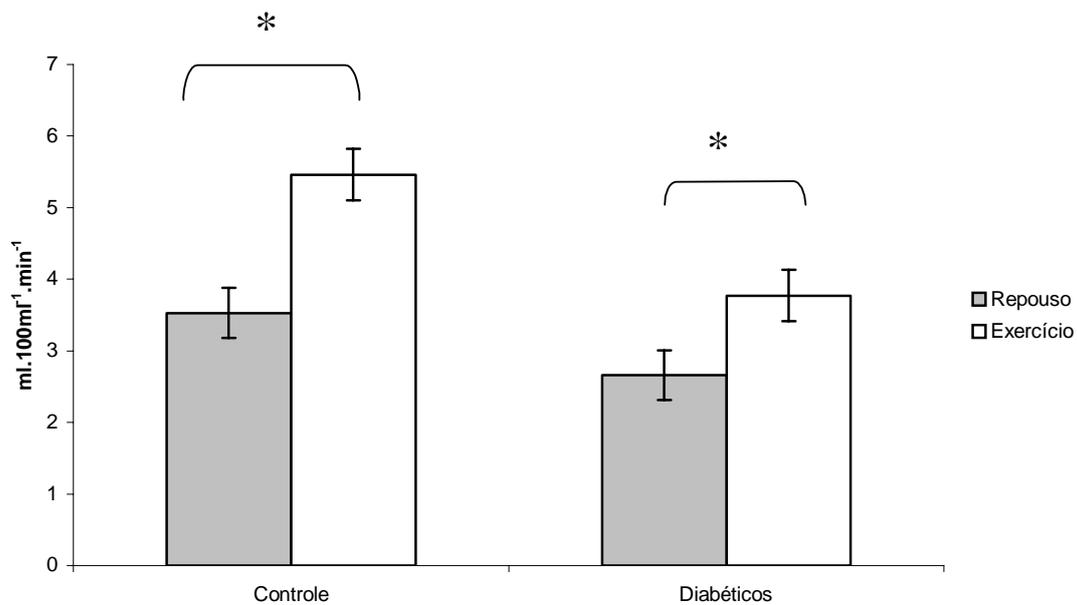


Figura 18 – Fluxo sanguíneo em repouso e depois do exercício nos indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10). \* p < 0,05

O exercício não provocou alterações nas concentrações plasmáticas de nitritos, tanto nos indivíduos controle quanto nos diabéticos. A figura a seguir ilustra os resultados de nitritos plasmáticos em repouso e após o exercício nos grupos controle e diabéticos.

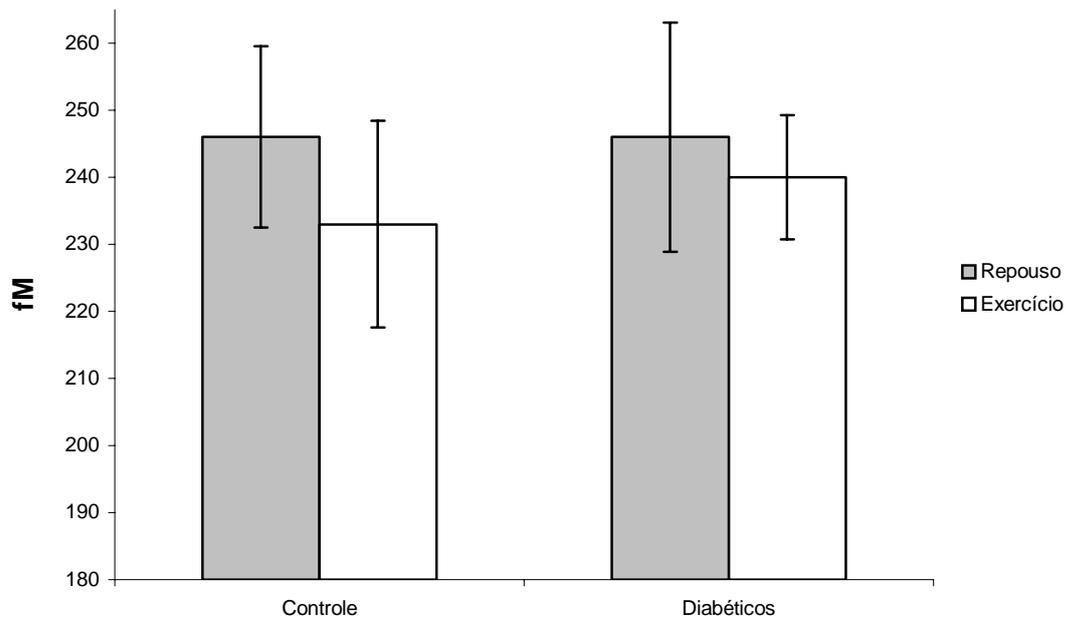


Figura 19 – Nitritos em repouso e depois do exercício nos indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

#### 4.3.2 Efeito do exercício no estresse oxidativo

O exercício não provocou alterações nos parâmetros de estresse oxidativo em ambos os grupos, avaliados pelas concentrações plasmáticas de TBARS, carbonil, TRAP e ácido úrico. As figuras a seguir ilustram os resultados de estresse oxidativo em repouso e após o exercício nos voluntários.

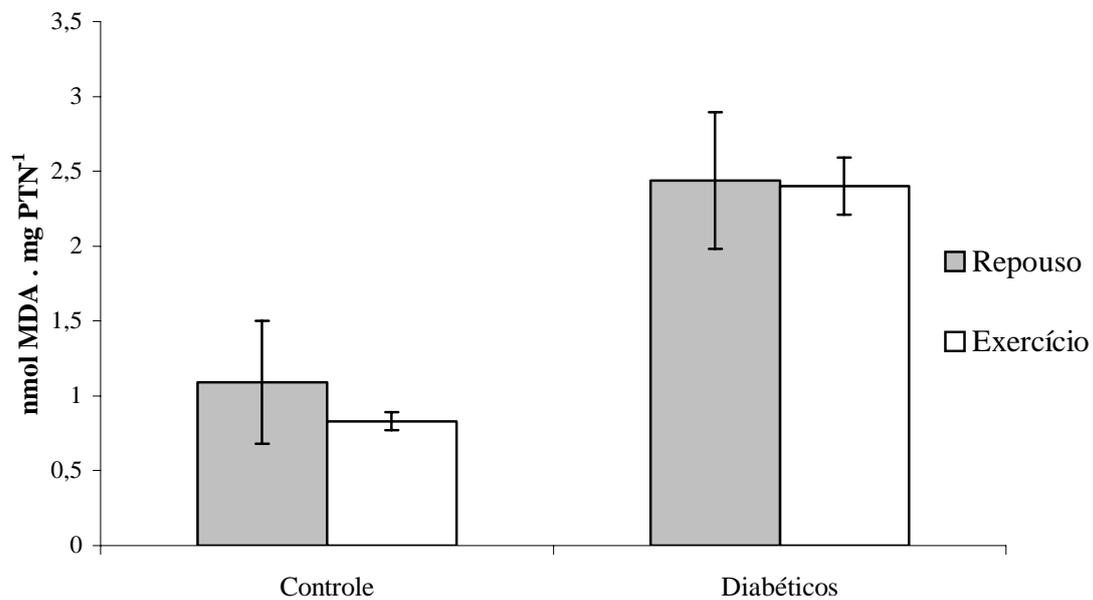


Figura 20 – TBARS em repouso e depois do exercício nos indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10)

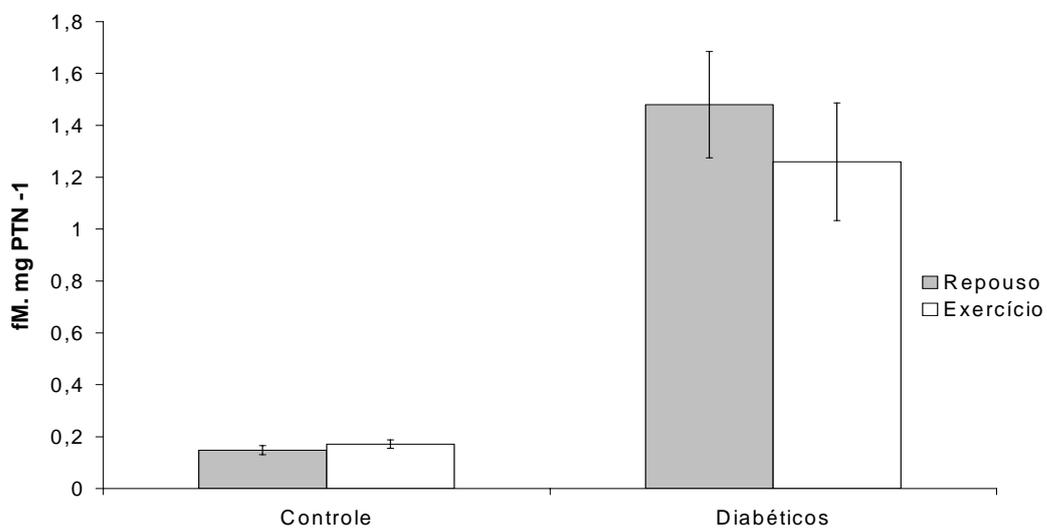


Figura 21 - Carbonil em repouso e após o exercício, nos indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

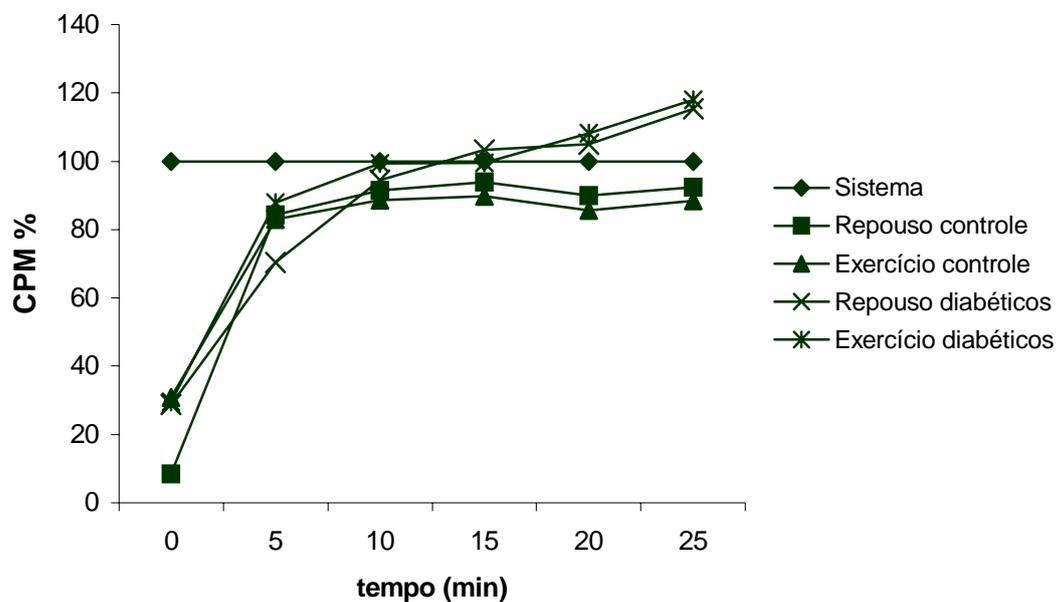


Figura 22 – TRAP em repouso e depois do exercício nos indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

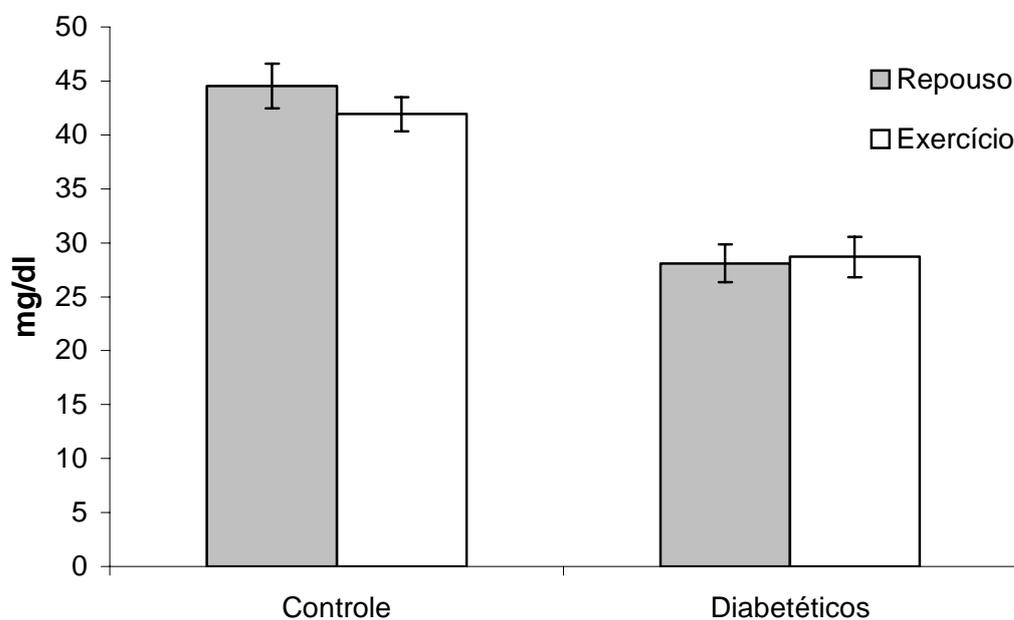


Figura 23 - Ácido úrico em repouso e após o exercício, nos indivíduos controle (n=20) e diabéticos (n=10).

A partir deste momento, os voluntários foram separados em quatro grupos, para apresentação dos resultados da suplementação e dos efeitos combinados da suplementação do exercício, sobre a função endotelial e estresse oxidativo. Os grupos são: controle placebo (n=10), controle L-arginina (n=10), diabéticos placebo (n=5) e diabéticos L-arginina (n=5).

#### 4.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO

##### 4.4.1 Função endotelial

A suplementação com L-arginina não foi capaz de alterar o fluxo sanguíneo nos indivíduos controle. Entretanto, os diabéticos que realizaram suplementação com L-arginina aumentaram significativamente os valores de fluxo sanguíneo em repouso, quando comparado aos seus valores antes da suplementação ( $p=0,03$ ). A figura 24 ilustra os resultados de fluxo sanguíneo antes e após a suplementação de L-arginina nos dois grupos.

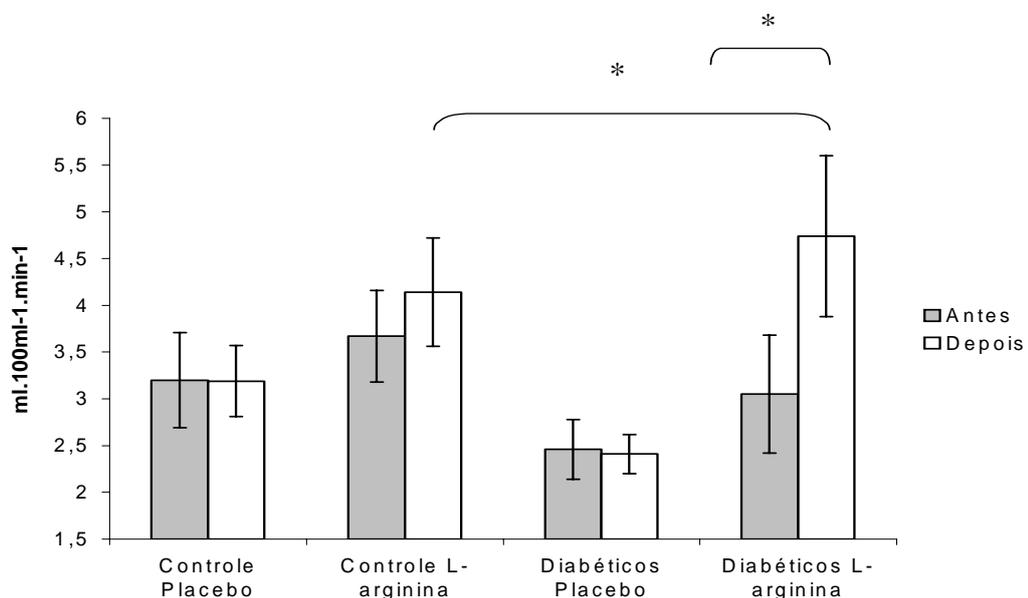


Figura 24 – Fluxo sanguíneo em repouso, nos momentos antes e depois da suplementação, nos grupos experimentais. \*  $p < 0,05$

Adicionalmente, quando comparamos os valores de fluxo sanguíneo dos diabéticos após a suplementação, verificamos que os indivíduos que realizaram suplementação com L-arginina apresentaram fluxo sanguíneo significativamente maior do grupo placebo ( $p=0,024$ ).

Embora a suplementação com L-arginina tenha sido efetiva no aumento do fluxo sanguíneo nos indivíduos diabéticos, esta não foi capaz de modificar a concentração de nitritos plasmáticos em nenhum dos grupos. A figura 25 ilustra os valores de nitritos antes e após a suplementação nos dois grupos estudados.

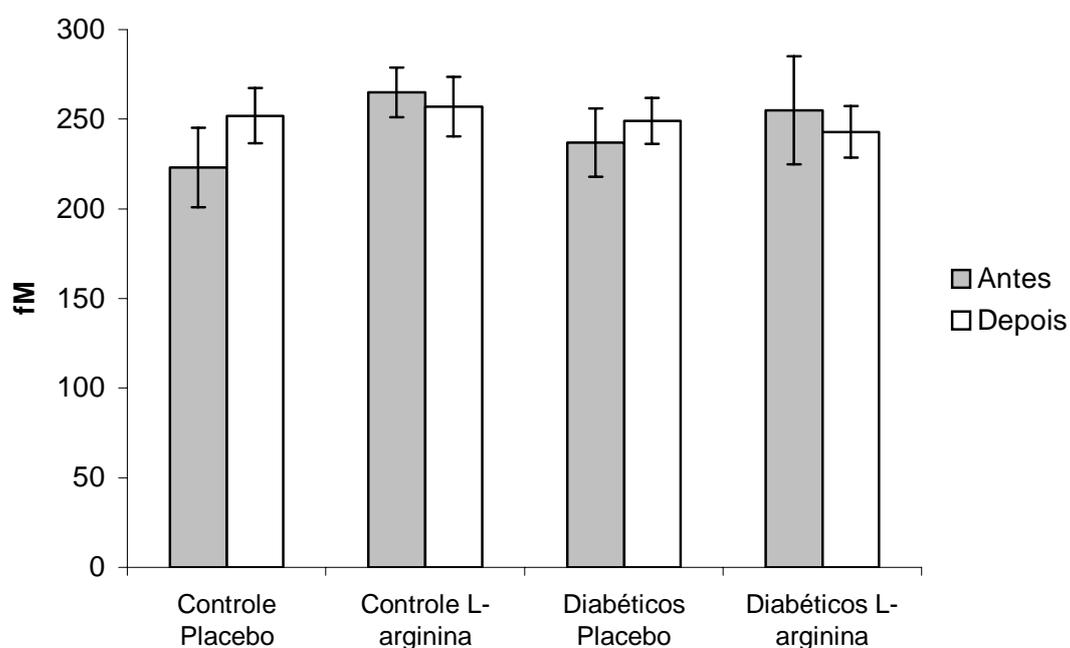


Figura 25 – Nitritos plasmáticos em repouso, nos momentos antes e depois da suplementação, nos grupos experimentais.

#### 4.4.2 Estresse oxidativo

A suplementação com L-arginina não modificou os parâmetros de estresse oxidativo nos grupos avaliados, conforme demonstram as figuras a seguir.

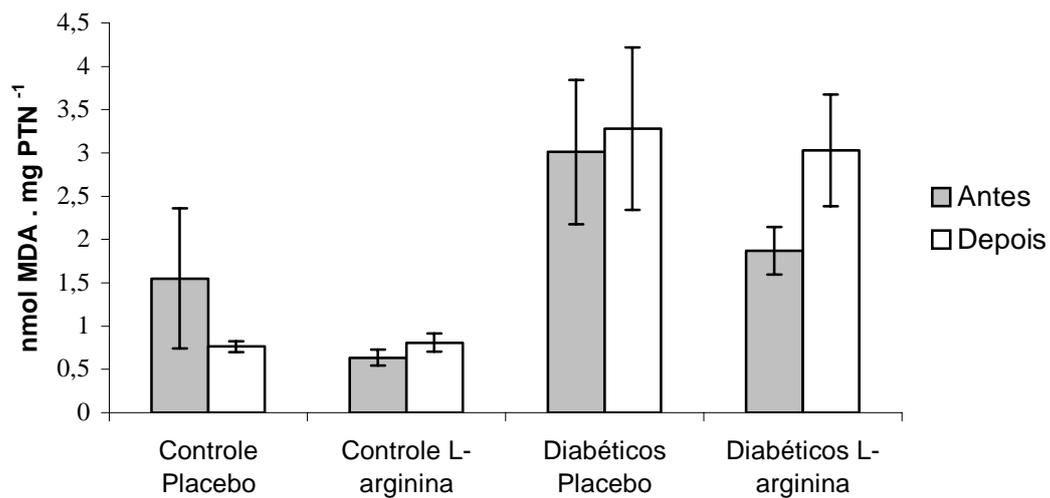


Figura 26 – TBARS em repouso, nos momentos antes e após a suplementação, nos grupos experimentais.

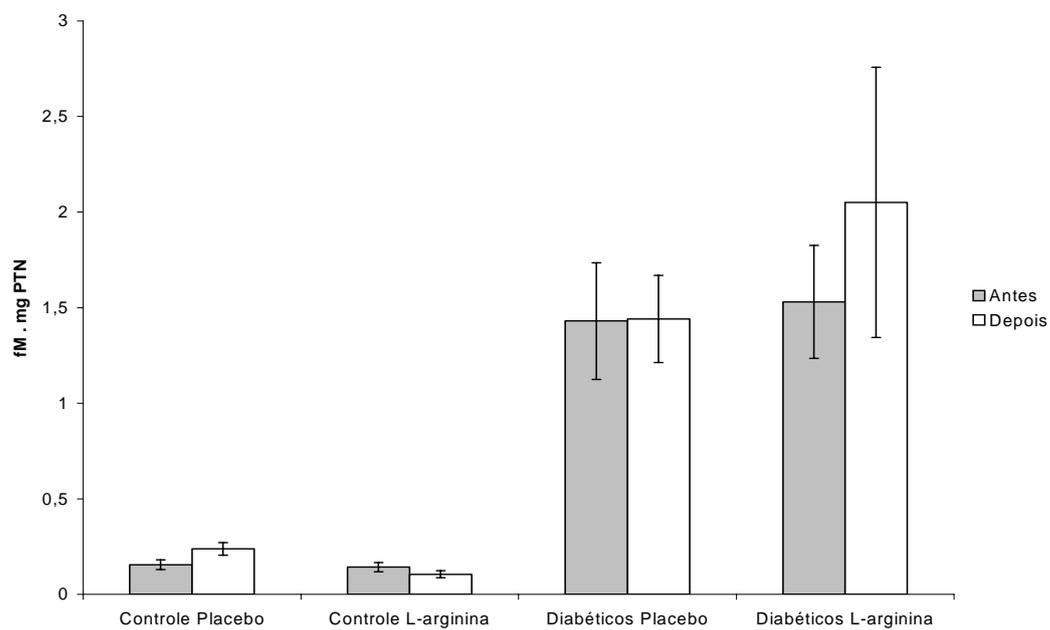


Figura 27 - Carbonil em repouso, nos momentos antes e após a suplementação, nos grupos experimentais.

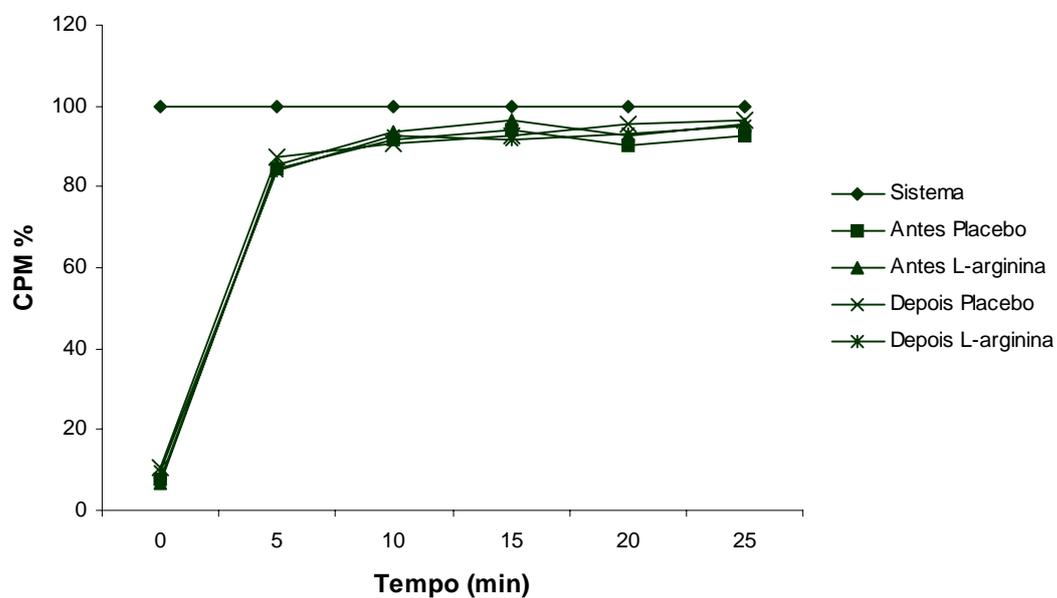


Figura 28 - TRAP em repouso, nos momentos antes e depois da suplementação do grupo controle.

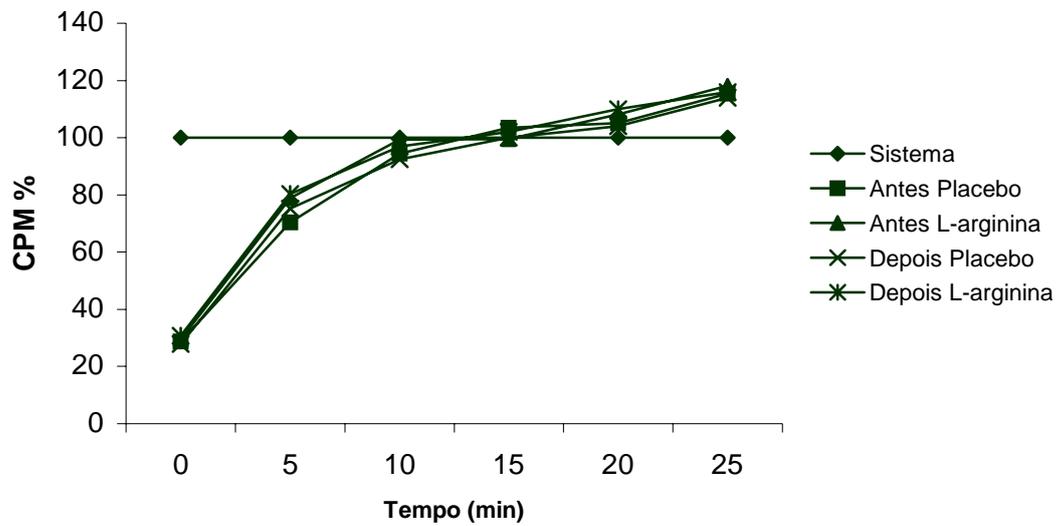


Figura 29 – TRAP em repouso, nos momentos antes e depois da suplementação do grupo diabético.

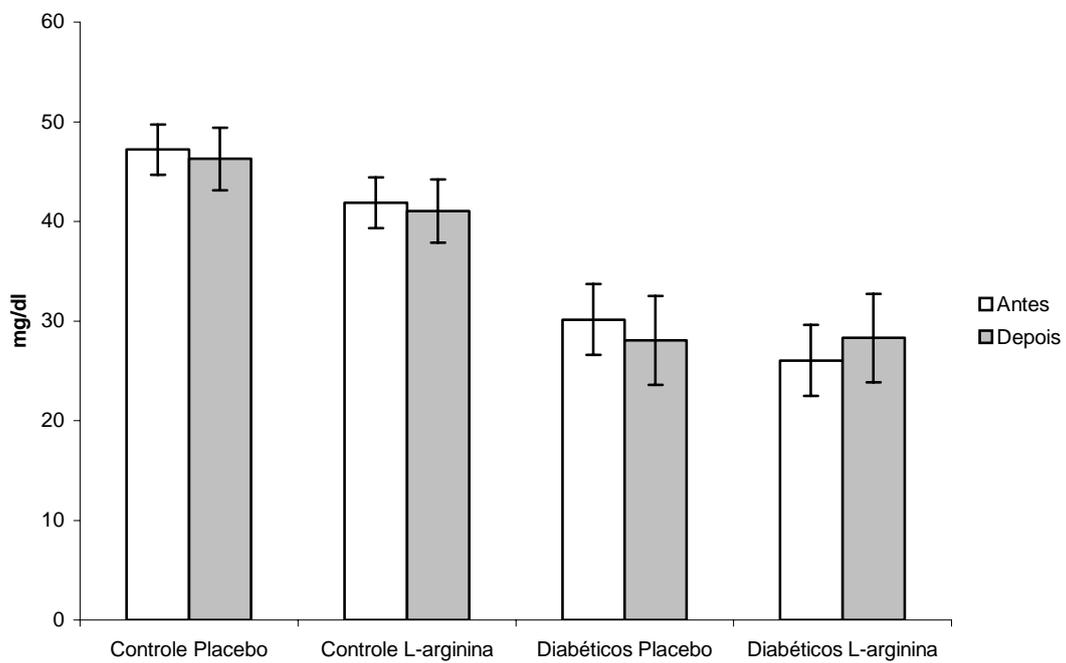


Figura 30 - Ácido úrico em repouso, nos momentos antes e após a suplementação, nos grupos experimentais.

#### **4.5 EFEITO COMBINADO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

Para a apresentação dos resultados dos efeitos combinados da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a função endotelial e estresse oxidativo, foi utilizado as seguintes siglas para a representação gráfica.

AA = antes da suplementação e antes do exercício

AD = antes da suplementação e depois do exercício

DA = depois da suplementação e antes do exercício

DD = depois da suplementação e depois do exercício

Para facilitar a interpretação das siglas, e primeira letra é referente aos momentos da suplementação (antes e depois) e a segunda letra refere-se aos momentos do exercício (antes e depois, igualmente).

Segundo os resultados prévios, a suplementação de L-arginina aumentou o fluxo sanguíneo de repouso nos diabéticos. Após o exercício, não foi observado aumento significativo do fluxo sanguíneo, conforme havia sido observado no período antes da suplementação (análise estatística dos momentos DA e DD,  $p= 0,012; 0,004; 0,03; 0,183$  para controle placebo, controle L-arginina, diabéticos placebo e diabéticos L-arginina, respectivamente). Entretanto, quando avaliamos a média de fluxo nos diferentes momentos, observamos que os indivíduos diabéticos que realizaram a suplementação com L-arginina partiram de um fluxo de repouso superior ao apresentado no momento após o exercício antes da suplementação. A figura 31 apresenta os resultados de fluxo sanguíneo nos momentos avaliados em todos os grupos experimentais.

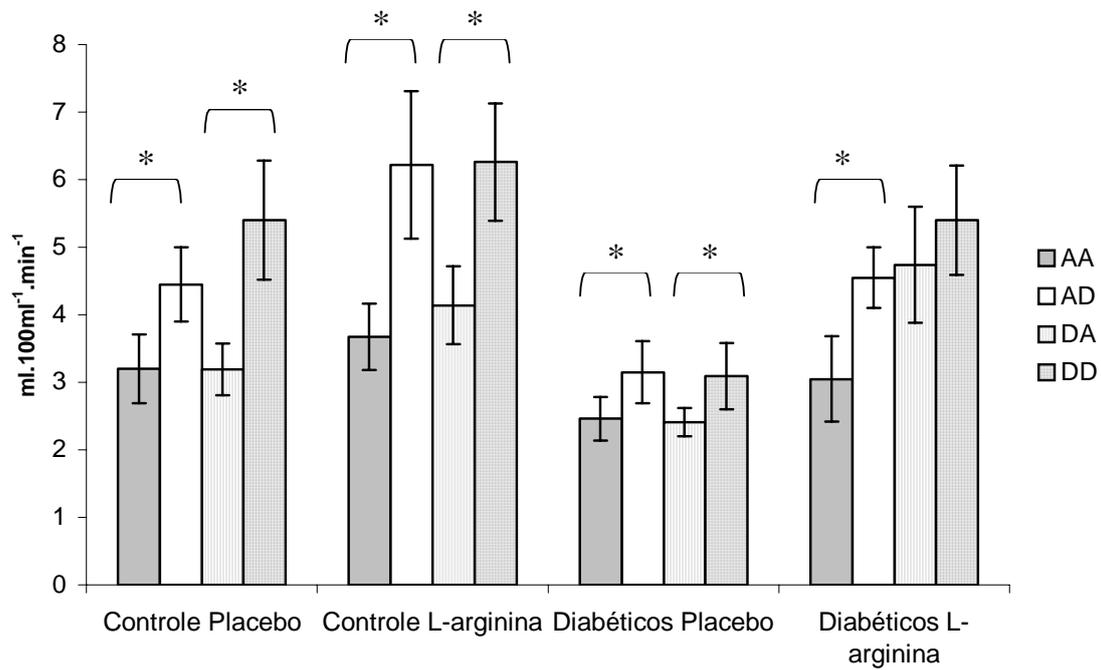


Figura 31 – Fluxo sanguíneo dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados. \*  $p < 0,05$ .

Nos demais parâmetros avaliados, não houve diferenças significativas entre os momentos em nenhum grupo experimental. As figuras 32, 33, 34 e 35 ilustram os resultados das concentrações de nitritos, lipoperoxidação, carbonil e ácido úrico plasmáticos nos quatro momentos avaliados, respectivamente, demonstrando que a L-arginina não influenciou a resposta ao exercício nestes parâmetros.

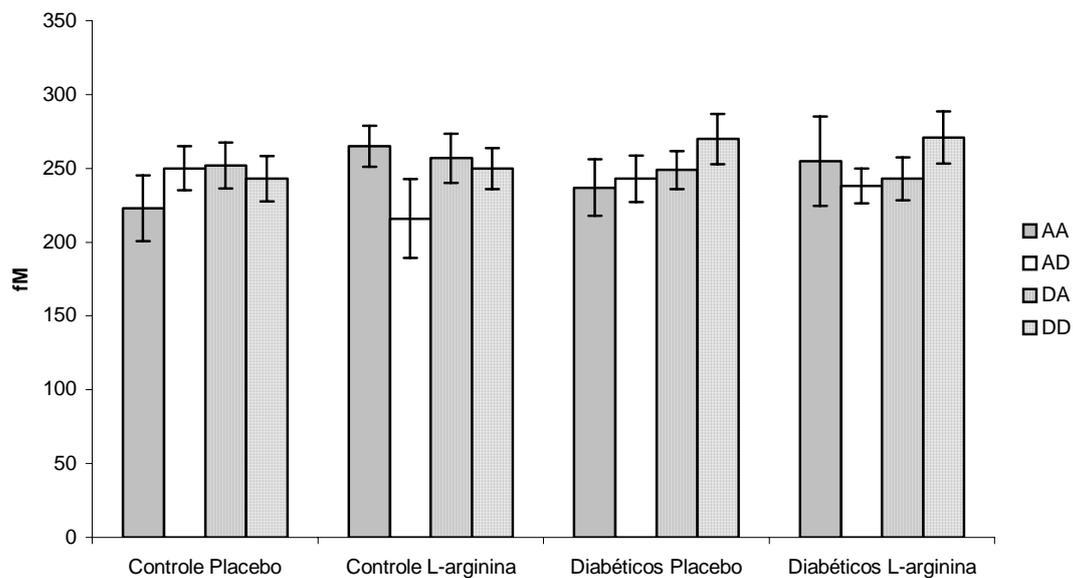


Figura 32 – Nitritos dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.

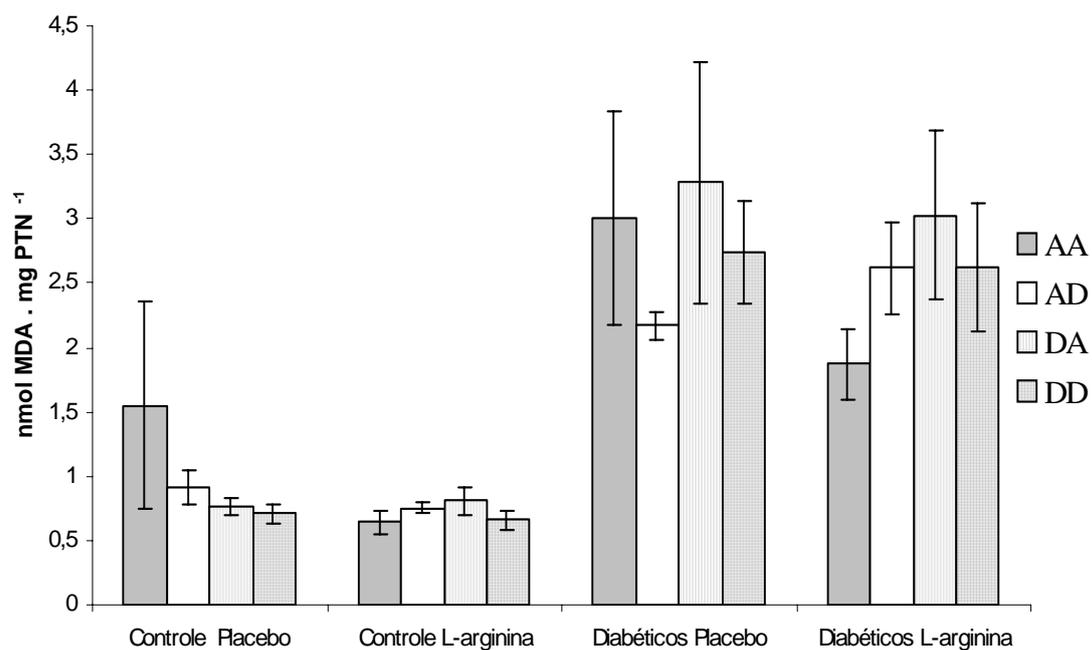


Figura 33 – TBARS dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.

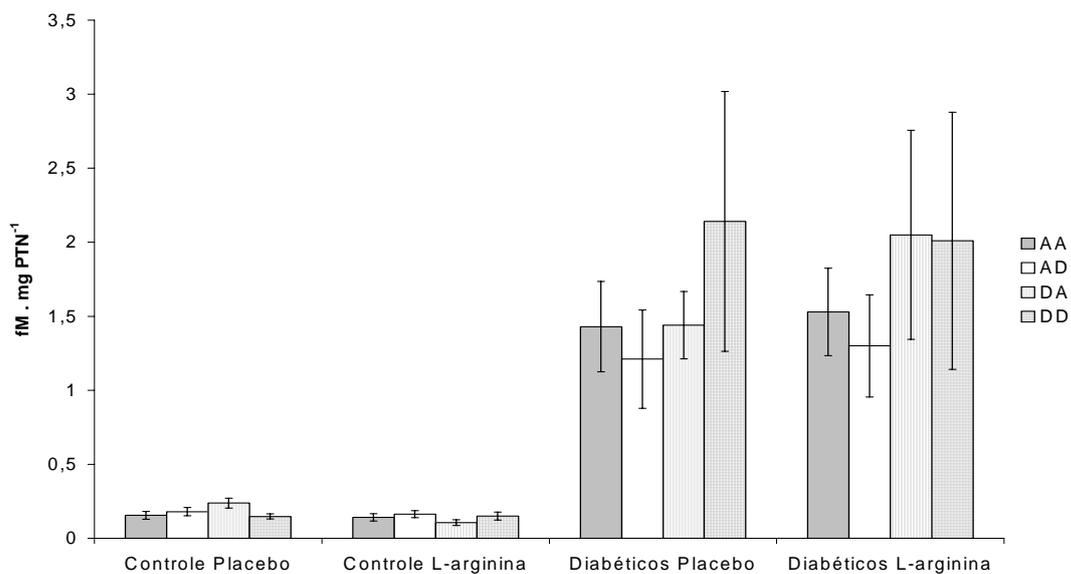


Figura 34 – Carbonil dos grupos experimentais nos quatro momentos.

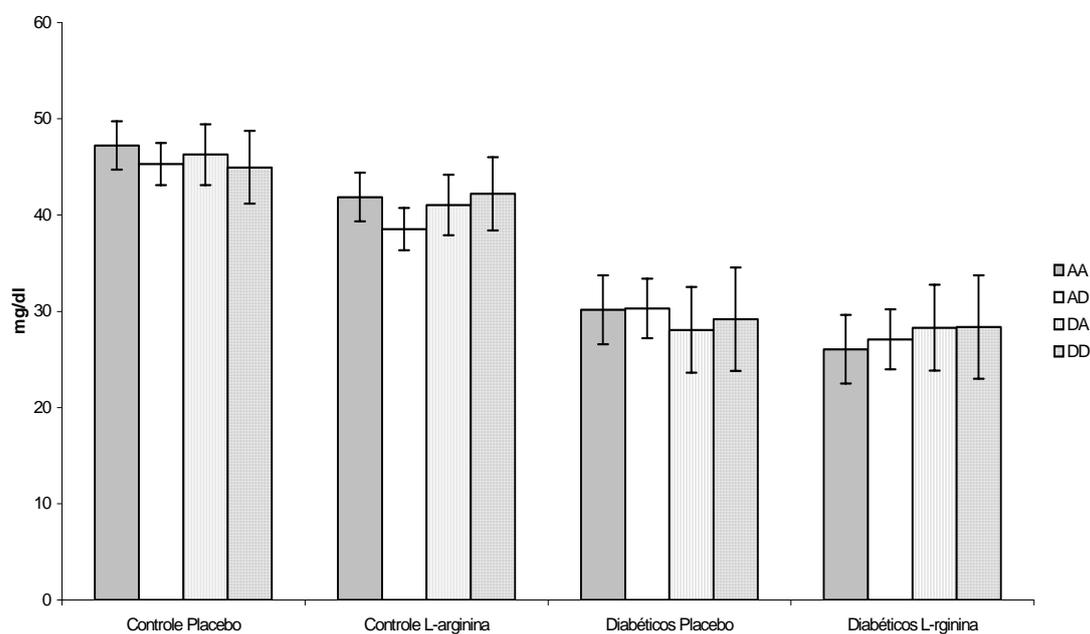


Figura 35 – Ácido úrico dos grupos experimentais nos quatro momentos avaliados.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E DIETÉTICAS

Os dois grupos estudados eram semelhantes quanto às características de idade, massa corporal, estatura, IMC e percentual de gordura, diferindo apenas nas características de  $VO_{2máx}$  e  $FC_{máx}$ . Os estudos encontrados na literatura que comparam estas características corroboram com nossos achados (MOSHER et al., 1998; DAVISON et al., 2002; KOMATSU et al., 2004), exceto nos parâmetros de  $VO_{2máx}$  e  $FC_{máx}$ , onde não são encontradas diferenças entre indivíduos jovens saudáveis e diabéticos tipo 1 sem complicações. Este resultado indica que nossos voluntários com diabetes possuem menor potência aeróbia quando comparados com os controles, embora nenhum participante estivesse envolvido em programa de treinamento físico. Este fato pode refletir um problema sócio-econômico, uma vez que é necessário um controle glicêmico acurado antes, durante e depois da atividade física, o que pode acabar desmotivando os pacientes com diabetes à prática de exercícios.

A glicemia e a  $A_{1c}$  são muito importantes para a avaliação do controle glicêmico e fornecem informações diferentes sobre os níveis de glicose sangüínea. Os resultados de  $A_{1c}$  refletem a glicemia média ao longo de dois ou três meses precedentes. Por outro lado, os níveis glicêmicos revelam o nível de glicose sangüínea na data e hora específicas em que o exame for realizado. A combinação de determinações de  $A_{1c}$  e testes de glicemia fornece aos pacientes e médicos as informações que necessitam para avaliar continuamente a eficácia da terapia para o diabetes.

Em nosso estudo, como era esperado, verificamos diferenças significativas nos níveis de  $A_{1c}$  e glicemia em jejum quando comparamos os voluntários controles e diabéticos. Os voluntários controles apresentaram níveis de  $A_{1c}$  considerados normais, e os indivíduos com diabetes, mesmo sem complicação, apresentaram valores de  $A_{1c}$  acima do recomendado. Atualmente, a manutenção do nível de  $A_{1c}$  abaixo de 7% é considerada como uma das principais metas no controle do diabetes. Os resultados do UKPDS

mostraram que o controle glicêmico é crucial para a avaliação de riscos de complicações microvasculares em pacientes com diabetes, ou seja, retinopatia e nefropatia, assim como complicações macrovasculares como derrame cerebral e doença arterial coronariana (UKPDS, 1998), e que as complicações crônicas começam a se desenvolver quando os níveis de A1c estão situados permanentemente acima de 7%.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no perfil lipídico quando comparamos os indivíduos controle e diabéticos, e nossos resultados corroboram com outros estudos que também avaliaram perfil lipídico em indivíduos com diabetes tipo 1 sem complicações (SKYRME-JONES et al., 2000; ERCIYAS et al., 2004). Os lipídios plasmáticos e suas frações lipoprotéicas possuem grande importância no desenvolvimento de doenças cardiovasculares; a manutenção dos seus níveis em valores recomendados reduz o risco de morbidade e mortalidades nos indivíduos com diabetes (ERCIYAS et al., 2004).

Poucas pessoas duvidam da importância da nutrição adequada nas diferentes etapas de vida do ser humano. Esse fato é motivado pelo fato da nutrição ser fonte de elementos essenciais e de blocos construtores para preservar a massa corporal magra, sintetizar novos tecidos, otimizar a estrutura esquelética, reparar as células existentes, maximizar o transporte e a utilização do oxigênio, manter um equilíbrio hidroeletrolítico ótimo e regular todos os processos metabólicos (EVANS et al., 1997). Uma alimentação equilibrada é composta por aproximadamente 55 a 60% de carboidratos, 12 a 15% de proteínas e 20 a 30% de lipídeos (McARDLE et al., 2001; CLARK, 1998). O fato de realizar atividades físicas de maneira assídua não implica necessariamente mudanças importantes na alimentação, salvo que se deverão consumir mais calorias quando houver maior gasto energético (FERNÁNDEZ et al., 2002).

A ingestão calórica dos grupos mostrou-se adequada às suas necessidades diárias. A distribuição de macronutrientes em ambos os grupos se mostrou adequada, e não diferiu entre os grupos. O consumo de proteínas mostrou-se acima das recomendações dietéticas segundo o Subcomitê das recomendações de ingestões dietéticas (IDR, 1989), que preconiza o consumo de proteínas para indivíduos não atletas de até 1g/kg de massa corporal.

Após a suplementação de L-arginina, encontrou-se um aumento significativo da excreção de uréia tanto nos indivíduos controle como nos diabéticos. Este aumento da

concentração de uréia nos indivíduos suplementados com L-arginina nos garante que a suplementação foi efetiva nesta quantidade. Por ser um intermediário do ciclo da uréia, a suplementação de L-arginina pode provocar um aumento da sua excreção urinária, através do estímulo da enzima arginase, que converte L-arginina em ornitina, liberando a uréia (BRODY, 1999).

## **5.2 EFEITO DA DOENÇA SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

### **5.2.1 Efeito da doença sobre a função endotelial**

As técnicas mais utilizadas para avaliação da vasoreatividade são a ultrasonografia Doppler e a pletismografia de oclusão venosa. A ultrasonografia examina acuradamente a integridade de um único conduto vascular, enquanto que a pletismografia de oclusão venosa permite uma avaliação da função vascular em uma região em particular e pode subsequente fornecer informações sobre a reatividade de artérias de pequena resistência, arteríolas e microvasculatura.

A partir dos nossos resultados, verificamos que os indivíduos com diabetes tipo 1 não apresentaram redução no fluxo sanguíneo quando comparado aos indivíduos controle. O endotélio modula o tônus vascular pela produção de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras (HERRMANN & LERMAN, 2001). Existem evidências que a vasodilatação mediada pelo NO derivado do endotélio está prejudicada em modelo animais e em humanos com diabetes do tipo 1 e do tipo 2 (COSENTINO & LÜSCHER, 1998; MAEJIMA et al., 2001; OUVIÑA et al., 2002; SYDOW & MÜNZEL, 2003). Embora o mecanismo preciso sobre o desenvolvimento das complicações diabéticas ainda não esteja bem estabelecidos, a disfunção endotelial tem sido enfatizada em relação ao desenvolvimento e progressão dessas complicações vasculares no diabetes (Maejima et al., 2001). Outro fator que deve ser considerado é a hiperglicemia uma vez que estudos demonstram que o aumento da glicemia a curto (Chakravarthy et al., 1998) e longo prazo

(Maejima et al., 2001) prejudicam a ação do vasodilatador óxido nítrico, contribuindo para a progressão da disfunção endotelial.

Encontramos na literatura uma discrepância nos resultados de vasoreatividade nos indivíduos jovens com diabetes tipo 1 quando comparados com indivíduos controle. Alguns estudos demonstraram que não existe diferença na vasoreatividade entre estes grupos (ALLEN et al., 2001; ENDERLE et al., 1998; LAMBERT et al., 1996; LEKAKIS et al.; 1997), entretanto outros estudos verificaram que os diabéticos apresentam menor vasoreatividade, mesmo na ausência de complicações (POSTON & TAYLOR, 1995; SMITS et al., 1993, SKYRME-JONES et al., 2000).

Nossos dados corroboram o estudo de Allen e colaboradores (2001), que avaliaram a vasoreatividade de 15 indivíduos com diabetes tipo 1 e compararam com 15 indivíduos controle, através da técnica de pletismografia de oclusão venosa. Eles não verificaram diferenças entre os grupos quando avaliaram a vasoreatividade em repouso e após um exercício de prensão manual (*handgrip*). Enderle e colaboradores (1998) avaliaram 17 diabéticos do tipo 1 sem complicações e 25 diabéticos do tipo 2 sem tratamento com insulina, e compararam as respostas de perfil glicêmico e função vascular com indivíduos controle. Os diabéticos do tipo 1 não apresentaram prejuízo na função vasodilatadora, em contraste com as respostas dos diabéticos tipo 2, que apresentaram prejuízo na função endotelial. Esta resposta poderia ser explicada pelo efeito benéfico do tratamento insulínico sobre a preservação da função endotelial.

Heitzer e colaboradores (2001) avaliaram a função endotelial de 39 diabéticos tipo 1 sem complicações vasculares através da técnica de pletismografia de oclusão venosa, e compararam os resultados com os de 11 indivíduos controle. Não foram encontradas diferenças significativas nos valores quando comparados os grupos.

Mas também encontram-se na literatura estudos que verificaram diferenças significativas nos indivíduos diabéticos tipo 1 quando comparados aos controle. Skyrme-Jones e colaboradores (2000) avaliaram 37 pacientes jovens com diabetes tipo 1, sem história de complicações vasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia), e 45 indivíduos saudáveis como controle. Neste trabalho, a vasodilatação dependente e independente do endotélio foi verificada através da ultrasonografia da artéria braquial e o fluxo sanguíneo foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa do antebraço. Eles

demonstraram um prejuízo na função de vasodilatação dependente do endotélio dos diabéticos, mesmo com satisfatório controle glicêmico e perfil lipídico normal.

A patogênese do diabetes pode envolver a redução da biodisponibilidade do NO (TELCI et al., 2000). A disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia pode resultar em uma diminuição na produção de NO, inativação do NO mediada pelos RLO, e/ou o aumento dos fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio (OUVIÑA et al., 2001). Recentemente têm-se utilizado a avaliação dos produtos estáveis de óxido nítrico nos fluidos biológicos, os nitritos ( $\text{NO}_2$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3$ ), através do método de Griess. Utilizando-se deste método, alguns autores não encontram diminuição nos valores de óxido nítrico nos indivíduos com diabetes, quando comparado aos controles (CATALANO et al., 1998; ELLIS et al., 1998). Entretanto, a literatura científica não apresenta consenso sobre as concentrações basais de óxido nítrico em pacientes com diabetes quando comparados aos controle.

Maejima e colaboradores (2001) avaliaram 129 pacientes com diabetes tipo 2 com idades de  $59 \pm 13$  anos e 76 indivíduos não diabéticos com idade entre  $58 \pm 18$  anos. Eles avaliaram as concentrações de nitritos e nitratos plasmáticos e função endotelial utilizando eco-Doppler da artéria carótida. Os indivíduos com diabetes apresentaram maiores níveis de nitratos, e que estes estavam correlacionados positivamente com a progressão das complicações diabéticas, peróxidos lipídicos e AGEs. Entretanto, a concentração plasmática de nitritos não era estatisticamente diferente dos indivíduos não diabéticos.

Os voluntários do presente estudo apresentavam níveis glicêmicos acima do recomendado, o que poderia contribuir para uma possível disfunção endotelial. Entretanto, este fenômeno não foi encontrado nestes pacientes. Poderia-se imaginar a existência de um mecanismo de adaptação nestes pacientes, onde mesmo exposto às agressões decorrentes da hiperglicemia, o endotélio manteve sua funcionalidade. Para a afirmação desta hipótese, são necessários outros estudos que auxiliem a esclarecer o mecanismo de funcionamento do endotélio frente a diferentes condições glicêmicas.

### 5.2.2 Efeito da doença sobre o estresse oxidativo

A partir dos resultados, verificou-se que os indivíduos com diabetes tipo 1 apresentam parâmetros elevados de estresse oxidativo quando comparados aos dos indivíduos controle. Estes resultados corroboram com outros estudos encontrados na literatura (GRIESMACHER et al., 1995, LAAKSONEN et al., 1996, ATALAY et al., 1997, SANTINI et al., 1997), que demonstram que indivíduos com diabetes tipo 1, independentemente de apresentar complicações da doença, apresentam maiores níveis de lipoperóxidos, demonstrando suscetibilidade aumentada a estresse oxidativo. Existe na literatura muitos trabalhos estudando parâmetros de estresse oxidativo em modelos humanos de diabetes tipo 1 e tipo 2, independente da presença de tratamento insulínico e complicações vasculares.

Apesar da técnica do TBARS como marcador de lipoperoxidação ser bastante criticada pela baixa especificidade, diversos estudos utilizam-na e encontram resultados consistentes (NOBARESCO et al., 1991; OZBEN et al., 1995; LAAKSONEN et al., 1996; SANTINI et al., 1997; VANDERJAGT et al., 2001). Estes estudos, entre outros, mostram que a lipoperoxidação está aumentada tanto nos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto nos indivíduos com diabetes tipo 2. Resultados contrários também podem ser citados, entretanto torna-se difícil explorar todos os resultados devido às diferentes metodologias e desenhos de estudo. Ainda não está totalmente esclarecido o motivo pelo qual encontra-se aumento de lipoperóxidos em indivíduos com diabetes, principalmente associado ao desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares. Uma hipótese seria que o aumento dos produtos finais de glicação (AGE) e oxidação no diabetes mellitus podem ser resultado da produção de superóxido, radical livre altamente deletério que estaria com produção aumentada no diabetes devido à deficiência da enzima superóxido dismutase (ATALAY et al., 2002). Também a formação de peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e a catálise de outros metais de transição devido à hiperglicemia provocariam uma diminuição da enzima antioxidante catalase, aumentando a formação destes produtos finais de glicação (LAAKSONEN, 1996).

Com o objetivo de avaliar parâmetros de estresse oxidativo de indivíduos jovens com diabetes tipo 1, sem complicações vasculares, Telci e colaboradores (2000) avaliaram

51 indivíduos com diabetes do tipo 1 e 48 indivíduos controle. Entre os parâmetros avaliados, encontra-se NO, carbonil e TRAP. Embora não tenham encontrado diferenças significativas nos níveis de NO de indivíduos diabéticos tipo 1 jovens, quando comparados com os seus controles, eles verificaram que a capacidade antioxidante total estava diminuída e os níveis de oxidação de proteínas estava aumentado. Estes resultados corroboram o presente estudo, que também demonstrou dano oxidativo independente do prejuízo da função endotelial.

Maejima e colaboradores (2001) avaliaram 129 pacientes com diabetes tipo 2 com idades de  $59 \pm 13$  anos e 76 indivíduos não diabéticos com idade entre  $58 \pm 18$  anos. Eles avaliaram as concentrações de nitritos, nitratos, perfil lipídico e glicêmico, peróxidos lipídicos e AGEs. Examinaram também a função endotelial utilizando eco-Doppler da artéria carótida, como discutido previamente. Os indivíduos com diabetes apresentaram maiores níveis de  $A_{1c}$ , nitratos, colesterol total e maior espessura da musculatura intima-media da artéria. Entretanto, não apresentavam maiores níveis de peróxidos lipídicos. Heitzer e colaboradores (2001) avaliaram a função endotelial e estresse oxidativo de 39 diabéticos tipo 1 sem complicações vasculares, e compararam os resultados com os de 11 indivíduos controle. Igualmente não foram encontradas diferenças significativas na função endotelial nos valores quando comparados os grupos. Entretanto, os níveis de TBARS estavam aumentados, mas os níveis de TRAP não diferiram entre controle e diabéticos. Embora tenham sido verificados parâmetros de estresse oxidativo alterados nos pacientes com diabetes tipo 1, este achado não foi correlacionado com o prejuízo da função endotelial nesta população, confirmando novamente os achados do presente estudo.

As ERO podem prejudicar todos os tipos de moléculas biológicas. O dano oxidativo a proteínas, lipídeos ou DNA pode ser altamente deletério, e podem ocorrer concomitantemente. Os grupamentos carbonil tem sido utilizado como um marcador de oxidação protéica (CHEVION et al., 2000), e o acúmulo destes tem sido observado em algumas doenças humanas, incluindo doença de Alzheimers, diabetes, processos inflamatórios, artrites e alguns tipos de câncer (DALLE-DONNE etl al., 2003). O acúmulo de proteínas oxidadas reflete não apenas a taxa de oxidação protéica, mas também a taxa de degradação da proteína oxidada, que é também dependente de muitas variáveis, incluindo as concentrações de proteases que preferencialmente degradam as proteínas oxidadas bem

como do nível de oxidação de proteína, e outros fatores (íons metal, inibidores, ativadores e proteínas reguladoras), que afetam suas atividades proteolíticas (TELCI et al., 2000).

Verificou-se que os indivíduos com diabetes tipo 1 apresentaram maiores concentrações de carbonil em repouso quando comparados aos controle. Uma possibilidade para a maior formação de grupamentos carbonil nos diabéticos seria a glicação e a modificação com derivados de aldeídos oriundos da peroxidação lipídica (GOTO et al., 1999). Estes dados vêm ao encontro de outros estudos na literatura, que também demonstram um aumento da concentração de carbonil em indivíduos com diabetes, refletindo o estabelecimento de um processo oxidativo nestes pacientes (ENDERLE et al., 1998; TELCI et al., 2000; MARTÍN-GALLAN, 2003; ERYCIAS et al., 2004).

O presente estudo mostrou que os indivíduos com diabetes apresentam redução de seus antioxidantes plasmáticos não enzimáticos quando comparados com os indivíduos controle. Alguns estudos mostram que os indivíduos com diabetes tipo 1 sem complicações apresentam diminuição na sua capacidade antioxidante (SANTINI et al., 1997; MARTÍN-GALLAN, 2003), entretanto outros autores não confirmam este resultado (RAHIMI et al., 2005). O resultado do TRAP demonstrou que os indivíduos com diabetes perderam sua capacidade antioxidante total mais rapidamente do que os grupo controle, demonstrando possuir uma menor quantidade de compostos antioxidantes plasmáticos e, conseqüentemente, menor proteção contra a agressão de radicais livres. Esse fato fica demonstrado quando o grupo diabético ultrapassa o valor do antioxidante padrão, que possui uma atividade considerada como 100% ao longo de todo o tempo avaliado.

O ácido úrico, formado pelo catabolismo das purinas, é considerado um antioxidante não enzimático, mas sua produção aumentada pode aumentar a produção de radicais livres pela ativação do sistema xantina oxidase, gerando radicais superóxido (ANWAR & MEKI, 2003). Nas concentrações plasmáticas normais, interage diretamente o radical superóxido, bem como intermediários oxigenados do hemo com altos estados de valência do ferro e, adicionalmente, previne a formação do ácido ascórbico. Observou-se que os indivíduos diabéticos apresentavam menores concentrações de ácido úrico quando comparado ao seu controle, confirmando os achados do TRAP, que apontam que indivíduos com diabetes possuem menores concentrações de antioxidantes não enzimáticos. Este achado pode ser decorrente do consumo destes antioxidantes para tentar neutralizar a ação

dos radicais livres, que estariam sendo produzidos em excesso, conforme verificado pelas técnicas de lipoperoxidação e oxidação de proteínas.

### **5.3 EFEITO DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

#### **5.3.1 Efeito do exercício sobre a função endotelial**

A pletismografia de oclusão venosa tornou-se uma importante ferramenta para entendermos o fluxo sanguíneo da musculatura esquelética em resposta ao exercício em humanos (JOYNER et al., 2001). No presente estudo, o exercício aumentou o fluxo sanguíneo nos dois grupos estudados, e este aumento não foi diferente entre os grupos. Nossos resultados corroboram os estudos de outros autores que estudaram fluxo sanguíneo após o exercício aeróbio (COPELAND et al., 1996; BROWN et al., 2000; HAMBRECHT et al., 2000). Este aumento provavelmente deve-se à vasodilatação arterial promovida por agentes como óxido nítrico e prostaglandinas (JOYNER et al., 2001). O estresse de cisalhamento promovido pelo exercício é um importante componente do exercício, que através do influxo de cálcio irá sensibilizar a enzima óxido nítrico sintase (NOS) a converter L-arginina em L-citrulina, liberando óxido nítrico. Agewall e colaboradores (1999) também demonstraram um aumento no fluxo sanguíneo do antebraço verificado por pletismografia após exercício com *handgrip* em indivíduos saudáveis e com diabetes tipo 1. É interessante ressaltar que, com este tipo de exercício, foi detectado maior magnitude no aumento do fluxo com o exercício no grupo diabético, achado não verificado em nosso estudo. Estes achados podem indicar que, na ausência de complicações macrovasculares do diabetes, a resposta vascular seria similar em indivíduos saudáveis e diabéticos.

Quando medimos o fluxo com pletismógrafo imediatamente após o exercício, o óxido nítrico e as prostaglandinas também poderiam estar contribuindo para a dilatação (BROWN et al., 2000; DYKE et al., 1995; ENDO et al., 1994). Entretanto, este não é um achado universal. Outros estudos corroboram o presente estudo, pois os autores também observaram um aumento do fluxo sanguíneo independente de alterações na concentração de óxido nítrico. Wilson & Kapoor (1993) sugerem a contribuição de adaptações sistêmicas ao

exercício sobre a vasodilatação em pessoas não treinadas para explicar o aumento do fluxo sanguíneo induzido pelo exercício independente do aumento da produção de óxido nítrico em humanos saudáveis. Adicionalmente, enquanto o treinamento em membros superiores pode melhorar as respostas de fluxo sanguíneo ao exercício com handgrip, este resultado não parece ter relação com mecanismos endoteliais em humanos (GREEN et al., 1994).

Em pacientes com diabetes tipo 1, outro fator que poderia influenciar a vasorreatividade seria a aptidão física individual. O treinamento melhora significativamente o controle glicêmico, podendo significar diminuição no risco de doenças cardiovasculares tanto em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto no tipo 2 (ALLEN et al., 2001; DAVISON et al., 2002). Adicionalmente às modificações positivas sobre os parâmetros de risco cardiovascular, sugere-se que o exercício pode melhorar a função endotelial, pelo aumento do estresse de cisalhamento durante o trabalho muscular (AGEWALL et al., 1999). Até o momento, nenhum estudo foi encontrado relacionando a aptidão física e a vasorreatividade em indivíduos com diabetes tipo 1, na ausência de fatores de risco cardiovascular.

### **5.3.2 Efeito do exercício sobre o estresse oxidativo**

Sabemos que o exercício está associado com um aumento significativo do consumo de oxigênio da musculatura esquelética (ASTRAND & RODHAL., 2003). O  $VO_{2máx}$  aumenta 10-15 vezes durante o exercício em relação ao período de repouso, e uma pequena fração deste oxigênio (2-5%) é convertido a produtos intermediários de oxigênio, que podem produzir modificações bioquímicas e danos tissulares (ALESSIO, 1993). Durante o exercício, pode ocorrer dano tecidual ocasionado pela ativação muscular, e as reações de estresse oxidativo poderiam contribuir para este dano. Verificou-se que o exercício em cicloergômetro, em intensidade 10% abaixo do 2° LV durante 45 minutos não modifica os parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 1.

Na literatura, encontram-se diversos estudos que avaliaram as respostas de estresse oxidativo sob diferentes protocolos de exercício e em diferentes populações. Também em nosso grupo de pesquisa foram avaliados os efeitos do exercício, em diferentes intensidades, sobre os parâmetros de estresse oxidativo (SCHNEIDER, 2002; SILVEIRA,

2004). No primeiro trabalho, foram avaliados os efeitos de três diferentes intensidades de exercício em esteira rolante sobre parâmetros de estresse oxidativo em triatletas e indivíduos não-treinados (SCHNEIDER, 2002). As intensidades avaliadas correspondiam ao LV1, LV2 e uma intensidade intermediária entre o LV2 e a máxima atingida pelos voluntários durante um teste de cargas progressivas em esteira rolante. Os resultados apontam que o exercício utilizado não modificou a lipoperoxidação e capacidade antioxidante total em ambos os grupos estudados na intensidade correspondente ao LV2, muito próxima à utilizada no presente estudo.

Em outro estudo desenvolvido em nosso laboratório, Silveira (2004) avaliou os efeitos do exercício aeróbio e anaeróbio sobre os parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos não treinados e jogadores de vôlei de praia. O exercício aeróbio correspondeu a exercício em cicloergômetro em intensidade 10% abaixo do 2º LV durante 60 minutos; o teste de Potência Anaeróbia Láctica (Wingate) em cicloergômetro foi utilizado como exercício anaeróbio, onde cada indivíduo deveria pedalar o mais rapidamente durante 30 segundos, com uma carga aplicada de  $75 \text{ g.kg}^{-1}$  de peso. Este autor demonstrou que o exercício aeróbio durante 60 minutos aumentou significativamente os níveis plasmáticos de MDA em indivíduos não treinados, resultado não encontrado no presente estudo. Uma justificativa para esta discrepância de resultados entre os estudos de um mesmo laboratório poderia ser a diferença no tempo de exercício dos estudos, sendo que Schneider (2002) e o presente estudo realizaram exercícios de 40 e 45 minutos, respectivamente, sem encontrar diferenças significativas nos níveis de lipoperoxidação. Entretanto, Silveira (2004) utilizou-se de protocolo de exercício aeróbio de 60 minutos, que pode aumentar o dano oxidativo devido ao aumento do consumo de oxigênio durante um maior período de tempo. Neste último trabalho, também foram avaliadas as respostas de ácido úrico antes e depois do exercício aeróbio, sendo que este se mostrou elevado após o exercício, sendo justificado pelos autores como resultado do aumento do metabolismo das purinas após a atividade intensa.

Estudos demonstram que o exercício aumenta os níveis de MDA em indivíduos saudáveis (LIU et al., 2000) e em indivíduos com diabetes tipo 1 (LAAKSONEN et al., 1996; ATALAY et al., 2002; LAAKSONEN, 2003). Em humanos, as medidas de peroxidação lipídica em resposta ao exercício não são consistentes. Um aumento na

expiração de pentano foi encontrado durante o exercício em humanos (KIM et al., 1996) e em corredores de ultramaratona (WITT et al., 1992). Entretanto em outro estudo, Viinika e colaboradores (1984) não encontraram aumento na expiração de pentano em maratonistas, utilizando-se da mesma técnica e protocolo de exercício. A intensidade e duração do exercício também influenciam na produção de produtos de peroxidação lipídica, assim como o local onde o exercício está sendo executado (poluição, radiação solar) e capacidade física do indivíduo podem influenciar a resposta oxidativa celular (ALESSIO, 1993). Exercícios intensos ou exaustivos em indivíduos não treinados estão relacionado com dano oxidativo, que é mais freqüentemente observado no músculo do que no sangue.

Um aumento da concentração sangüínea de carbonil foi apontado por Alessio e colaboradores (2000) após o exercício aeróbio, mas não em um exercício isométrico repetitivo. Quando as ERO atacam os aminoácidos, os grupos carbonil são produzidos e podem ser detectados no plasma humano. Esta técnica ainda tem sido pouco explorada em estudos com exercícios em modelo humano, por ser pouco específica e com baixa reprodutibilidade (URSO, 2003). Entretanto, os grupamentos carbonil representam bons marcadores da oxidação de proteínas *in vivo*. Também utilizado como um parâmetro de estresse oxidativo, a capacidade antioxidante total não foi modificada após 30 minutos de atividade aeróbia em indivíduos controle (ALESSIO et al., 2000) .

Davison e colaboradores (2002), questionando a idéia de que indivíduos com diabetes do tipo 1 sem complicações vasculares apresentam parâmetros elevados de estresse oxidativo em repouso e induzido pelo exercício, avaliaram 12 indivíduos diabéticos tipo 1 jovens e do sexo masculino e compararam com 13 indivíduos saudáveis, em um modelo semelhante ao utilizado no presente estudo, com medidas pré e pós-exercício. Os pacientes diabéticos apresentaram parâmetros de estresse oxidativo em repouso estatisticamente diferentes dos indivíduos controle, e o exercício não foi capaz de alterar estes parâmetros, corroborando com os resultados do presente estudo. Entretanto, os resultados de Laaksonen e colaboradores (2003) apontam um aumento do estresse oxidativo induzido pelo exercício em indivíduos com diabetes tipo 1, sem complicações clínicas da doença. Provavelmente, diferenças no controle do perfil lipídico e glicêmico destes pacientes, bem como a diferença no tamanho das amostras, poderiam ser responsáveis pela discrepância de resultados encontrados na literatura até o momento.

Levando-se em consideração que a formação de radicais livres durante o exercício pode ser dependente da intensidade e do tempo de duração do mesmo, é necessário levar em consideração as características fisiológicas dos sujeitos estudados. No caso do presente estudo, diabéticos tipo 1 possuem limitações ao exercício decorrentes da doença, não sendo adequado a realização de exercício de longa duração devido à grande possibilidade de ocorrer hipoglicemia. Provavelmente o tempo de duração do exercício não foi suficiente para que fosse encontrado diferenças significativas nos produtos finais da lipoperoxidação, ou seja, na formação de MDA, principalmente porque a medida foi realizada no momento imediatamente após o término do exercício. Se tivesse sido quantificado a formação de dienos conjugados ao invés do MDA, talvez os resultados tivessem sofrido alterações pelo exercício.

#### **5.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

A suplementação de L-arginina não alterou os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo nos indivíduos controle. Nossos resultados corroboram outros autores, que igualmente suplementaram, por via oral, indivíduos sem disfunção endotelial e não encontraram resultados positivos nos parâmetros avaliados (ADAMS et al., 1994; TAPIERO et al, 2002). Entretanto, os indivíduos diabéticos que realizaram suplementação com L-arginina tiveram seu fluxo sanguíneo aumentado quando comparado com a situação antes da suplementação sem alterar suas concentrações plasmáticas de nitritos. Podemos imaginar que a suplementação apenas se justifique em casos de doenças que predisponham à disfunção endotelial, mesmo que estes pacientes ainda não apresentem manifestações clínicas, como no caso do presente estudo. Nossos pacientes, apesar de não apresentarem prejuízo significativo de sua função endotelial, beneficiaram-se com suplementação de L-arginina, aumentando seu fluxo sanguíneo de repouso.

Apesar da L-arginina ser o substrato da formação do NO, considerado um vasodilatador dependente do endotélio, após a suplementação não foi observado um aumento nas concentrações plasmáticas de nitritos. Alguns autores reportam que as

complicações vasculares do diabetes estão associadas com aumento das concentrações de metabólitos do óxido nítrico,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  (MAEJIMA et al., 2001; OUVIÑA et al., 2001). Portanto, um aumento do fluxo sanguíneo sem conseqüente aumento da concentração de nitritos pode ser benéfico para os pacientes com diabetes.

Quanto aos efeitos da suplementação com L-arginina sobre os parâmetros de estresse oxidativo, existe na literatura uma controvérsia sobre o papel do NO como oxidante ou antioxidante. O NO teria propriedades antioxidantes, inibindo a síntese de superóxido em nível celular e promovendo reações de terminação do processo oxidativo, ao mesmo tempo que pode interagir com os radicais superóxido, formando peroxinitrito e levando à oxidação do LDL (ITURRI-YAKAMOTO et al., 1997). Walker e colaboradores (2001) foram os pioneiros a avaliar o efeito da suplementação de L-arginina sobre parâmetros de estresse oxidativo, e não verificaram alterações nestes após a suplementação de 15g de L-arginina por via oral, durante duas semanas. Para que os efeitos da L-arginina sobre o estresse oxidativo em humanos seja esclarecido, mais estudos são necessários e em diferentes populações.

Em doenças caracterizadas por uma diminuição da atividade do NO, como diabetes, hipertensão e insuficiência cardíaca, a suplementação com L-arginina pode restaurar parcialmente a função do NO através seguintes mecanismos descritos na literatura:

-Na injúria por reperfusão, o NO é rapidamente degradado por radicais livres de oxigênio. A suplementação com L-arginina melhora a vasodilatação dependente do endotélio através da competição pelo oxigênio molecular como substrato para a transferência de elétrons e redução da geração de superóxido (HUK et al., 1997);

-Níveis elevados de dimetil-L-arginina assimétrica tem sido observado em ratos hipercolesterolêmicos. Postula-se que a dimetil-L-arginina assimétrica é um regulador endógeno da atividade da enzima NOs, e poderia atuar como um mecanismo competitivo, sendo corrigido pela suplementação de L-arginina (COOKE & DZAU, 1997);

-A L-arginina poderia atuar como um seqüestrador de radicais, neutralizando a ação dos radicais livres e aumentando a meia-vida do NO (HUK et al., 1997).

Os efeitos da suplementação de L-arginina sobre a responsividade vascular e pressão sanguínea em ratos diabéticos foi avaliada por Özçelikay e colaboradores (2000). Após quatro semanas com tratamento de L-arginina, os ratos diabéticos reverteram

totalmente a responsividade e sensibilidade da aorta à fenilefrina. A dilatação dependente do endotélio também aumentou significativamente após o tratamento com L-arginina, e os níveis plasmáticos de MDA, que inicialmente encontravam-se elevados, diminuíram significativamente. Todos estes efeitos encontrados com a suplementação de L-arginina foram específicos aos ratos diabéticos, portanto não encontrados nos ratos controles.

Foram desenvolvidos nos últimos anos estudos com o objetivo de verificar o efeito da suplementação deste aminoácido em algumas doenças cardiovasculares, como hipertensão, angina e insuficiência cardíaca. Lekakis e colaboradores (2002) randomizaram 35 pacientes hipertensos para receber 6g de L-arginina por via oral ou placebo, de forma aguda. Observou-se uma melhora na disfunção endotelial nos pacientes que receberam L-arginina, verificados através das medidas do diâmetro da artéria e fluxo sanguíneo em resposta à hiperemia avaliados por ultrassom. Maxwell e colaboradores (2002), também com um estudo randomizado, suplementaram pacientes com angina estável com 6,6g de L-arginina durante duas semanas ou placebo. Os voluntários que receberam L-arginina melhoraram a função vascular quando comparados aos indivíduos que receberam placebo. Estes resultados sugerem que indivíduos com disfunção endotelial podem se beneficiar com a suplementação de L-arginina, resultado não verificado em indivíduos controle.

Em um recente estudo, WELLS e colaboradores (2005) avaliaram o consumo dietético de L-arginina de 13.401 voluntários, através de recordatório alimentar de 24 horas, e correlacionaram estes valores com os níveis plasmáticos de proteína C-reativa, um marcador inflamatório fortemente relacionado com o aparecimento de DCV. Como não existe uma recomendação nutricional diária de L-arginina, e estudos intervencionais com L-arginina utilizam doses divergentes, os autores postularam que a ingestão diária correspondente ao percentil 90 seria 7,5g do aminoácido, estratificadas em três doses diárias de 2,5g. Os fatores intervenientes analisados foram a presença de diabetes, obesidade, hipertensão, sedentarismo e consumo de fibras. Os resultados foram divididos em 4 níveis de consumo de L-arginina: até 2,5g, de 2,5 a 5g, 5 a 7,5g e mais do que 7,5g de L-arginina ao dia. Este estudo demonstrou que quanto maior a ingestão diária de L-arginina, menor a probabilidade de aumento da proteína C-reativa, e quanto maior o consumo de L-arginina, menor a concentração de proteína C-reativa. Estes resultados

sugerem que indivíduos podem diminuir seus riscos de DCV aumentando a ingestão de alimentos ricos em L-arginina.

Poucos estudos foram encontrados em modelo humano investigando os efeitos da suplementação de L-arginina em diabéticos. Wascher e colaboradores (1997) conduziram um estudo visando verificar os efeitos de baixas doses de infusão intra-venosa de L-arginina em indivíduos controle, obesos e diabéticos tipo 2 sobre a vasodilatação mediada pela insulina e sensibilidade à insulina nestes voluntários. A L-arginina reverteu o prejuízo da vasodilatação mediada pela insulina observada nos voluntários obesos e nos diabéticos. Nos indivíduos controle, não foi observado efeito sobre a vasodilatação mediada pela insulina. Adicionalmente, a sensibilidade à insulina foi significativamente melhorada nos três grupos após a infusão de L-arginina. Estes dados sugerem que a vasodilatação prejudicada em indivíduos obesos e diabéticos do tipo 2 pode ser normalizada pela L-arginina intravenosa, e a melhora na sensibilidade à insulina pode indicar um possível mecanismo para a restauração da vasodilatação mediada pela insulina.

Thorne e colaboradores (1998) foram os primeiros a suplementar por via oral L-arginina em pacientes jovens com diabetes tipo 1. Eles demonstraram que a administração aguda de L-arginina não obteve efeitos benéficos sobre a função endotelial em pacientes com diabetes tipo 1, em contraste com os efeitos em hipercolesterolêmicos. Em um estudo posterior conduzido pelos mesmos autores, o objetivo foi determinar os efeitos da suplementação oral de L-arginina a longo prazo sobre a função endotelial em pacientes jovens com diabetes tipo 1 e comparar com um medicamento redutor de colesterol LDL (MULLEN et al., 2000). Neste estudo, 84 adultos jovens com diabetes tipo 1 e normocolesterolêmicos foram randomizados para receber 7g de L-arginina por dia sob a forma de suco com sabor de limão, ou placebo sob a mesma forma, ou atorvastatina (40mg/dia à noite) ou atorvastatina + L-arginina. O fluxo da artéria braquial foi mensurado pela técnica do ultrassom de alta resolução no início e após seis semanas do tratamento. A atorvastatina resultou em uma diminuição de  $48 \pm 10\%$  nos níveis séricos de colesterol LDL, enquanto que os níveis séricos de L-arginina aumentaram  $247 \pm 141\%$  após a terapia com L-arginina. O tratamento de seis semanas com atorvastatina aumentou significativamente o a dilatação mediada pelo fluxo, enquanto que a terapia com L-arginina

não teve efeito significativo sobre a função endotelial e a administração combinada também não modificou os efeitos observados.

Outros estudos foram encontrados com administração de L-arginina e diabéticos, entretanto realizados em modelo animal e avaliando os efeitos da suplementação sobre o perfil lipídico e glicêmico (FU et al., 2005; MÍGUEZ et al., 2004), demonstrando efeito benéfico da suplementação sobre estes parâmetros, o que poderia refletir sobre a melhora da função endotelial que teoricamente estaria prejudicada. Demais estudos são necessários para esclarecer os efeitos da suplementação oral de L-arginina em indivíduos diabéticos, principalmente sobre os parâmetros de estresse oxidativo, no qual nenhum estudo original foi encontrado para a discussão dos dados do presente estudo.

### **5.5 EFEITOS COMBINADOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DO EXERCÍCIO SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

Poucos estudos foram encontrados associando os efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a função vascular e estresse oxidativo. Adicionalmente, não foi encontrado nenhum estudo em indivíduos com diabetes tipo 1.

Um resultado bastante intrigante verificado no presente estudo foi que, embora a L-arginina tenha aumentado o fluxo sanguíneo em repouso nos indivíduos com diabetes, estes indivíduos tiveram o efeito vasodilatador do exercício atenuado após a suplementação, ou seja, não apresentaram aumento significativo de fluxo sanguíneo após o exercício, conforme havia sido observado antes da suplementação.

É interessante ressaltar que os indivíduos diabéticos que realizaram a suplementação com L-arginina apresentaram valores de fluxo sanguíneo em repouso acima do encontrado quando comparado ao momento após o exercício antes da suplementação. Isto poderia, em parte, explicar o porquê de não se encontrar aumentos dos valores de fluxo após o exercício com a suplementação. Em relação ao efeito do exercício no aumento do fluxo sanguíneo, estudos com cultura celular demonstram que a atividades da NOs e a liberação do NO são moduladas por alterações promovida pelo estresse de cisalhamento do fluxo sanguíneo (MO et al., 1998). O aumento da expressão de RNAm da enzima NOs

também ocorre em exercícios agudos ou treinamento (HAMBRECHT et al., 2000). Postula-se, então, que partindo de uma situação de vasodilatação dependente do endotélio aumentada, como no caso do diabéticos que receberam L-arginina, pode-se ter provocado um estresse de cisalhamento de menor magnitude durante o exercício e, conseqüentemente, não aumentar a vasodilatação após o exercício quando comparada ao momento de repouso.

Outros estudos têm-se preocupado em avaliar as respostas da suplementação de L-arginina sobre a tolerância ao exercício e capacidade aeróbia, uma vez que a propriedade vasodilatadora poderia aumentar o consumo de oxigênio nos músculos exercitados. Utilizando-se de modelo animal, Maxwell e colaboradores (2001) testaram se a suplementação de L-arginina seria capaz de aumentar a capacidade aeróbia em um modelo experimental de ratos com atividade reduzida de NO derivado do endotélio, e compararam com ratos controles. Eles concluíram que a administração de L-arginina restaurou a síntese do NO derivado do endotélio induzida pelo exercício nos ratos previamente deficientes, e que a L-arginina aumentou a capacidade aeróbia em ambos os grupos. No ano seguinte, utilizando-se de um modelo em humanos, os mesmos autores também verificaram uma maior capacidade ao exercício e melhora na função vascular indivíduos com angina estável após duas semanas de suplementação de 6,6g de L-arginina ao dia (MAXWELL et al., 2002).

Com o objetivo de investigar o efeito da suplementação com L-arginina sobre a capacidade ao exercício em pacientes com infarto do miocárdio e angina estável, CEREMUZYNSKI e colaboradores (1997) desenvolveram um estudo com delineamento duplo-cego e randomizado, com um período de três dias de tratamento. Os pacientes receberam duas cápsulas de 1g de L-arginina três vezes ao dia (totalizando 6g/dia) durante o período de treinamento (n=12) ou placebo (n=10) com aparência idêntica. Os testes de exercício consistiram de teste máximo em esteira rolante, conforme protocolo modificado de Bruce, que ocorreram antes e imediatamente depois da suplementação. Os resultados demonstraram que a suplementação com L-arginina aumentou a tolerância ao exercício nestes pacientes, entretanto estes achados podem ser questionáveis se considerarmos a possibilidade de aprendizagem ao exercício durante o protocolo de estudo, que também poderia influenciar no tempo de exercício.

Um estudo conduzido por Hambrecht e colaboradores (2000) avaliou o efeito da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a função endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca. Foram avaliados 40 pacientes, previamente randomizados em quatro grupos: grupo controle, grupo suplementação, grupo treinamento e grupo suplementação mais treinamento. O período de tratamento durou 4 semanas; a suplementação foi de 8g de L-arginina via oral, em cápsulas, e o treinamento foi realizado com o ergômetro handgrip, a 70% da força máxima. A função endotelial foi avaliada através da aferição do diâmetro arterial pela ultrasonografia. Os resultados demonstraram que tanto a suplementação de L-arginina quanto o treinamento melhoraram a função endotelial destes pacientes. Entretanto, o grupo que realizou suplementação adicionada do treinamento apresentou uma melhora significativamente maior quando comparada aos outros grupos. Este estudo é pioneiro em demonstrar que a suplementação de L-arginina adicionada ao treinamento submáximo apresenta efeitos benéficos quando comparados à suplementação ou treinamento isolados.

Conforme verificado nesta presente discussão, existe na literatura científica uma carência de estudos acerca dos efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício em diabéticos do tipo 1. Nossos resultados sugerem que a suplementação de L-arginina tenha efeitos benéficos sobre a vasodilatação dependente do endotélio e que o exercício aeróbio de 45 minutos não provoca danos oxidativos nestes pacientes, sendo ambos recomendáveis para esta população. Entretanto, a carência de estudos na área não nos permite afirmar com segurança esta premissa. Outros estudos são necessários para esclarecer os efeitos combinados da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a função endotelial e estresse oxidativo em indivíduos com diabetes, tanto no tipo 1 quanto no tipo 2. O treinamento físico também poderia modular estas respostas de forma positiva, uma vez que encontramos em nosso estudo um efeito benéfico da L-arginina em repouso e não responsivo ao exercício agudo. Talvez o treinamento físico consiga modular a ação do RNAm da enzima eNOs, provocando o aumento da vasodilatação dependente do endotélio tanto no repouso, conforme verificado no presente estudo com a suplementação, quanto na situação pós-exercício, fato não verificado após a realização de um exercício agudo nestes pacientes.

## 5.6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo apresentou informações sobre a suplementação de L-arginina e do exercício em cicloergômetro sobre a função endotelial e parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos saudáveis e com diabetes tipo 1. Entretanto, como todo estudo, este apresenta limitações. Algumas derivadas da metodologia adotada, outras decorrentes da visão unilateral do pesquisador, e outras influenciadas por condições externas.

Inicialmente, cita-se o pequeno tamanho amostral avaliado no estudo, devido à dificuldade de se contatar voluntários com diabetes tipo 1 que atendessem os critérios de inclusão do estudo, como ter idade entre 18 e 30 anos e não apresentar complicações vasculares. Ao longo do período de contato e avaliação dos voluntários, apenas 10 que atendessem a este perfil se disponibilizaram a participar do estudo. Acredita-se que, se fosse avaliado um número maior de pacientes, alguns resultados que não apresentaram significância estatística poderiam passar a tê-la.

Também não ter-se realizado um modelo de estudo cruzado representou uma limitação para este estudo. Neste caso, o voluntário receberia os dois tipos de suplementação separados por um período de tempo para que o suplemento anterior não esteja mais no organismo (*wash-out*), sendo os indivíduos os seus próprios controles. Os voluntários com diabetes relataram que seria bastante complicado ficar mais do que dez dias envolvidos com o estudo, principalmente porque alguns deles não moravam na cidade onde foram realizadas as avaliações e também pelo desconforto de ficar controlando o horário da suplementação.

A não realização de um controle alimentar nos voluntários pode ter alterado alguns parâmetros de estresse oxidativo, pois é conhecido que a alimentação pode influenciar estes parâmetros. Como alguns voluntários com diabetes realizavam acompanhamento nutricional, preferiu-se não modificar seus hábitos nutricionais, para que o protocolo de teste não oferecesse mais um desconforto a eles. Também é importante ressaltar que, quando não modificamos os hábitos alimentares dos indivíduos durante o protocolo, temos uma resposta da suplementação de acordo com a realidade do participante, não representando a dieta um fator de confusão para o estudo. Para atenuar este fato, foi solicitado aos indivíduos que preenchessem recordatório alimentar de três dias na semana

anterior ao início do protocolo e também durante o período de suplementação, bem como orientados a não consumir certos tipos de alimentos nas 24 horas antes dos testes de exercício.

O tempo de suplementação de apenas 7 dias pode ter sido insuficiente para alterar os parâmetros de estresse oxidativo, entretanto o período foi escolhido em função da revisão de literatura realizada. A grande maioria dos estudos revisados apresentava tempo de suplementação entre três e vinte dias. No estudo preliminar realizado em nosso laboratório, três dias de suplementação não representou tempo suficiente para alterar os parâmetros de fluxo sanguíneo e estresse oxidativo em indivíduos não diabéticos. Devido ao fato de que alguns estudos apontavam alterações nos parâmetros de função endotelial após um período de suplementação de sete dias, optou-se por adotar tal protocolo, visando o conforto dos participantes do estudo.

O tempo de duração do exercício foi igualmente insuficiente para alterar os parâmetros de estresse oxidativo. Entretanto, a limitação de tal protocolo deve-se ao fato de que indivíduos com diabetes tipo 1 apresentam grande possibilidade de apresentar hipoglicemia durante o exercício de longa duração. Lembrando-se que os voluntários não deveriam se alimentar durante o exercício, este se tornou um fator limitante para os diabéticos realizar exercício de maior duração.

Outro aspecto limitante das respostas de estresse oxidativo foi a ausência da análise de enzimas antioxidantes. A enzima SOD, principalmente, poderia auxiliar a esclarecer o mecanismo de ação do NO, no qual observou-se aumento da vasodilatação independente da alteração das concentrações plasmáticas de nitritos. Foi realizado a preparação do plasma para armazenamento, impossibilitando a análise da enzima CAT nos eritrócitos. Uma alteração na técnica da SOD em nosso laboratório fez com que nosso plasma ficasse armazenado durante um período superior a três meses, e foi decidido então não realizar tal análise para que não fosse realizada interpretação equivocada desta variável.

E finalmente, a ausência do treinamento pode ser considerada uma limitação do presente estudo, pois poderia potencializar os efeitos da L-arginina sobre o aumento da vasodilatação dependente do endotélio modulando a ação da enzima eNOs. Entretanto, cabe ressaltar que este não era objetivo do estudo, que visou identificar as respostas de função endotelial e estresse oxidativo ao exercício agudo.

## 6 CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício em cicloergômetro sobre a função endotelial e parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos com diabetes tipo 1. A partir da apresentação e discussão dos resultados, chegou-se às seguintes conclusões:

a) **Quanto ao efeito da doença:** Os indivíduos com diabetes tipo 1 sem complicações apresentaram parâmetros aumentados de estresse oxidativo quando comparado aos controle, embora não tivessem função endotelial prejudicada.

b) **Quanto ao efeito do exercício:** O exercício aumentou o fluxo sanguíneo nos dois grupos estudados, mas não alterou a concentração de nitritos plasmáticos nem os parâmetros de estresse oxidativo.

c) **Quanto ao efeito da suplementação:** A suplementação de L-arginina aumentou o fluxo sanguíneo em repouso nos indivíduos com diabetes, mas não alterou nos controle. A suplementação não alterou as respostas dos demais parâmetros estudados nos grupos estudados.

d) **Quanto ao efeito combinado da suplementação e do exercício:** A suplementação com L-arginina atenuou o aumento do fluxo após o exercício nos indivíduos com diabetes, impedindo que o aumento do fluxo sanguíneo após o exercício, neste grupo, fosse estatisticamente significativo.

Estes resultados confirmam as hipóteses 2 e 5, que afirmavam que os indivíduos diabéticos apresentavam parâmetros de estresse oxidativo elevados quando comparados aos saudáveis e que a suplementação de L-arginina provocaria melhoras na função endotelial destes pacientes. A hipótese 3 foi parcialmente confirmada, ou seja, o exercício aumentou o fluxo sanguíneo, mas não as concentrações de nitritos, em ambos os grupos estudados. As demais hipóteses foram rejeitadas, demonstrando que a suplementação de L-arginina não

modificou os parâmetros de função endotelial e estresse oxidativo em indivíduos controle, igualmente não modificando os parâmetros de estresse oxidativo nos diabéticos e a ausência de efeitos combinados benéficos da suplementação e do exercício sobre a função endotelial e estresse oxidativo em indivíduos controle e diabéticos do tipo 1.

## REFERÊNCIAS

ABDELHAMED, A.I.; REIS, S.E.; SANE, D.C.; BROSNIHAN, K.B.; PRELI, R.B.; HERRINGTON, D.M. No effect of an L-arginine enriched medical food (heartbars) on endothelial function and platelet aggregation in subjects with hypercholesterolemia. **American Heart Journal**, 2003; 145: G1-G6.

ADAMS, M.R.; FORSYTH, C.J.; JESSUP, W.; CELERMAJER, D.S. Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in young men. **Journal of American College of Cardiology**, 1995; 26: 1054-1061.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, 2005; 28: S4-S36.

ALAM, T.A.; SEIFALIAN, A.M.; BAKER, D. A review of methods currently used for assessment of *in vivo* endothelial function. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, 2005; 29: 269-276.

ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 1993; 25: 218-224.

ALESSIO, H.M.; HAGERMAN, A.E.; FULKERSON, B.K.; AMBROSE, J.; RICE, R.E.; WILEY, R.L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 2000; 32:1576-1581.

ALLEN, J.D.; WELSCH, M.; AUCOIN, N.; WOOD, R.; LEE, M.; LeBLANC, K.E. Forearm vasoreactivity in type 1 diabetic subjects. **Canadian Journal of Applied Physiology**, 2001; 26: 34-43.

ANWAR, M.M.; MEKI, A.R.M.A. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 2003; 135: 539–547.

ASAYAMA, K.; UCHIDA, N.; NAKANE, T.; HAYASHIBE, H.; DOBASHI, K.; AMEMIYA, S.; KATO, K. Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Free Radical in Biology and Medicine**, 1993; 15: 597-602.

ASTRAND, P.O.; RODHAL, K.; DAHL, H.A.; STROMME, S.B. **Textbook of Work Physiology: Physiological Bases of Exercise**. 4 ed. Windsor: Human Kinetics, 2003.

ATALAY, M.; LAAKSONEN, D. E.; NISKANEN, L. Altered antioxidant enzymes defences in insulin dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. **Acta Physiologica Scandinavica**, 1997; 161: 195-201.

ATALAY, M.; LAAKSONEN, D. E. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. **Journal of Sports Science and Medicine**, 2002; 1: 1-14.

AVOGARO, A.; TOFFOLO, G.; KIWANUKA, E.; VIGILI DE KREUTZENBERG, S.; TESSARI, P.; COBELLI, C. L-Arginine–Nitric Oxide Kinetics in Normal and Type 2 Diabetic Subjects: a Stable-Labelled 15 N Arginine Approach. **Diabetes**, 2003; 52: 795-202.

BAYNES, J.; THORPE, S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on na old paradigm. **Diabetes**, 1999; 48: 1-9.

BEDNARZ, B.; WOLK, R.; CHAMIEC, T.; HERBACZYNSKA-CEDRO, K.; WINEK, D.; CEREMUZYNSKI, L. Effects of oral L-arginine supplementation on exercise-induced QT dispersion and exercise tolerance in stable angina pectoris. **International Journal of Cardiology**, 2000; 75: 205-210.

BLUM, A.; PORAT, R.; ROSENSCHEIN, U.; KEREN, G.; ROTH, A.; LANIADO, S.; MILLER, H. Clinical and inflammatory effects of dietary L-arginine in patients with intractable angina pectoris. **American Journal of Cardiology**, 1999; 1488-1490.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electron to tissues. **Medicina** (Buenos Aires), 1998; 58: 350-356.

BRODY, Tom. **Nutritional Biochemistry**. 2 ed. London: Academic Press, 1999.

BROWN, M.D.; SRINIVASAN, M.; HOGIKYAN, R.V.; DENGEL, D.R.; GLICKMAN, S.G.; GALECKI, A.; SUPIANO, M.A. Nitric Oxide Biomarkers Increase During Exercise-Induced Vasodilation in the Forearm. **International Journal of Sports Medicine**, 2000; 21:83-89

CATALANO, M.; CARZANIGA, G.; PERILLI, E.; SCANDALE, G.; ANDREONI, S.; CAROTTA, M. Basal nitric oxide production is not reduced in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Vascular Medicine**, 1998; 2: 302-305.

CEREMUZYNSKI, L.; CHAMIEC, T.; HERBACZYNSKA-CEDRO, K. Effect of Supplemental Oral L-Arginine on Exercise Capacity in Patients With Stable Angina Pectoris. **The American Journal of Cardiology**, 1997; 80: 331-333.

CERIELLO, A., BORTOLOTTI, N.; MOTZ, E.; PIERRI, C.; MARRA, M.; TONUTTI, L.; LIZZIO, S.; FELETTI, F.; CATONE, B.; TOBOGA, C. Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia. **Metabolism**, 1999; 48: 1503-1508.

CHEVION, M.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E.R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. **Free Radicals Research**, 2000; 32: 307-326.

CLAPP, B.R.; HINGORANI, A.D.; KHARBANDA, R.K.; MOHAMED-ALI, V.; STEPHENS, J.W.; WALLANCE, P.; MacALLISTER, R.J. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. **Cardiovascular Research**, 2004; 64: 172-178.

CLARK, N. **Guia de Nutrição Desportiva**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

CLARKSON, P.; ADAMS, M.R.; POWE, A.J.; DONALD, A.E.; McCREDIE, R.; ROBINSON, J.; McCARTHY, S.N.; KEECH, A.; CELERMAJER, D.S.; DEANFIELD, J.E. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. **Journal of Clinical Investigation**, 1996; 97:1989-94.

COOKE, J.P.; DZAU, V.J. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular disease. **Circulation**, 1997; 96: 379-382.

COPELAND, S.R.; MILLS, M.C.; LERNER, J.L.; CRIZER, M.F.; THOMPSON, C.W.; SULLIVAN, J.M. Hemodynamic effects of aerobic vs resistance exercise. **Journal of Human Hypertension**, 1996; 10:747-753.

COSENTINO, F.; LÜSCHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Journal Cardiovascular Pharmacologic**, 1998; 32 (suplem. 3): S54-S61.

CREAGER, M.A.; COOKE, J.P.; MENDELSON, M.E.; GALLAGHER, S.J.; COLEMAN, S.N.; LOSCALZO, J.; DZAU, V.J. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. **Journal of Clinical Investigation**, 1990: 2546-2551.

DALLE-DONE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, 2003; 329: 23-38.

DARLEY-USMAR, V.M.; Mc ANDREW, J.; PATEL, R. Nitric oxide, free radicals and cell signalling in cardiovascular disease. **Biochemical Society Transactions**, 1997; 25: 925-929.

DAVISON, G.W.; GEORGE, L.; JACKSON, S.K.; YOUNG, I.S.; DAVIES, B.; BAILEY, D.M.; PETERS, J.R.; ASHTON, T. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type 1 diabetes mellitus. **Free Radical Biology and Medicine**, 2002; 33: 1543-1551.

DCCT: THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT) RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, 1993; 329: 977-986.

De ANGELIS, K. L. D.; CESTARI, I. A.; BARP, J.; DALL'AGO, P.; FERNANDES, T.G.; DE BITTENCOURT, P.I.; BELLO-KLEIN, A.; BELLO, A.A.; LLESUY, S.; IRIGOYEN, M.C. Oxidative stress in the latissimus dorsi muscle of diabetics rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2000; 33:1363-1368.

DE MATTIA, G.; LAURENTI, O.; FAVIA, D. Diabetic endothelial dysfunction. Effect of free radical scavenging in type 2 diabetic patients. **Journal of Diabetes and its Complications**, 2003; 17: 30-35.

DEROUICH, M.; BOUTAYEB, A. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. **Journal of Biomechanics**, 2002; 35: 911-917.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 1990;186:421- 31.

DYKE, C.K.; PROCTOR, D.N.; DIETZ, N.M.; JOYNER, M.J. Role of nitric oxide in exercise hyperaemia during prolonged rhythmic handgripping in humans, **Journal of Physiology**, 1995; 488: 259-265.

ELLIS, G.; ADATIA, I.; YAZDANPANA, M.; MAKELA, S.K. Nitrite and nitrate analysis: a clinical biochemistry perspective. **Clinical Biochemistry**, 1998; 31: 195-220.

ENDERLE, M.; BENDA, N.; SCHMUELLING, R.M.; HAERING, H.U.; PFOHL, M. Preserved endothelial function in IDDM patient, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. **Diabetes Care**, 1998; 21: 271-277.

ENDO, T.; IMAIZUMI, T.; TAGAWA, T.; SHIRAMOTO, M.; ANDO, S.I.; TAKESHITA, A. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation in forearm. **Circulation**, 1994; 90: 2886-2890.

ERCIYAS, F.; TANELI, F.; ARSLAN, B.; USLU, Y. Glycemic Control, Oxidative Stress, and Lipid Profile in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. **Archives of Medical Research**, 2004; 35: 134-140.

ERIKSSON, J.; TAIMELA, S.; KOIVISTO, V.A. Exercise and the metabolic syndrome. **Diabetologia**, 1997;40:125-35.

EVANS, W.J.; CYR-CAMPBELL, D. Exercise, nutrition and healthy aging. **Journal of American Diet Association**, vol.97, n.6, p. 632-638, 1997.

FERNÁNDEZ, M.D.; SAÍNZ, A.G.; GARZÓN, M.J.C. **Treinamento físico-desportivo e alimentação**. Da infância à idade adulta. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FLEMING, I.; BUSSE, R. NO: the primary EDRF. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 1999; 31: 5-14.

FRONTERA, W.R.; DAWSON, D.M.; SLOVIK, D.M. **Exercício Físico e Reabilitação**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

FU, W.J.; HAYNES, T.E.; KOHLI, R.; HU, J.; SHI, W.; SPENCER, T.E.; CARROLL, R.J.; MEININGER, C.J.; WU, G. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Nutrition**, 2005; 135: 714-721.

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

GADSBY, R. Epidemiology of diabetes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2002; 54: 1165-1172

GARRETT, W.E.; KIRKENDALL, D.T. **Exercise and Sports Science**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, 2002; 55:250-260.

GIUGLIANO, D.; MARFELLA, R.; VERRAZZO, G.; ACAMPORA, R.; NAPPO, F.; ZICCARDI, P.; COPPOLA, L.; D'ONOFRIO, F. L-arginine for testing endothelium-dependent vascular functions in health and disease. **American Journal of Physiology**, 1997; 273: E606-E612.

GOTO, S.; NAKAMURA, A.; RADAK, Z.; NAKAMOTO, H.; TAKAHASHI, R.; YASUDA, K.; SAKURAI, Y.; ISHII, N. Carbonylated protein in aging and exercise: immunoblot approaches. **Mechanisms of Ageing and Development**, 1999; 107: 245-253.

GREEN, D.J.; CABLE, N.T.; FOX, C.; RANKIN, J.M.; TAYLOR, R.R. Modification of forearm resistance vessels by exercise training in young men. **Journal of Applied Physiology**, 1994; 77: 1829-1833.

GREEN, D.J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **Journal of Physiology**, 2004; 561(Pt 1):1-25.

GRIESMACHER, A.; KINDHAUSER, M.; ANDERT, S.E.; SCHREINER, W.; TOMA, C.; KNOEBL, P.; PIETSCHMANN, P.; PRAGER, R.; SCHNACK, C.; SCHERNTHANER, G. *et al.* Enhanced serum levels of thiobarbituric acid reactive substances in diabetes mellitus. **American Journal of Medicine**, 1995; 98: 469-475.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HAMBRECHT, R.; WOLF, A.; GIELEN, S.; LINKE, A.; HOFER, J.; ERBS, S.; SCHOENE, N.; SCHULER, G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. **New England Journal Medicine**, 2000;342:454-460.

HAMBRECHT, R.; HILBRICH, L.; ERBS, S.; GIELEN, S.; FIEHN, S.; SCHOENE, N.; SCHULER, G. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. **Journal of American College of Cardiology**, 2000; 35: 706-713.

HASEGAWA, Y.; SUEHIRO, A.; HIGASA, S.; NAMBA, M.; KAKISHITA, E. Enhancing effect of advanced glycation end products on serotonin-induced platelet aggregation in patients with diabetes mellitus. **Thrombosis Research**, 2002; 107: 319-323.

HEITZER, T.; FINCKH, B.; ALBERS, S.; KROHN, K.; UTTER, A.K.; MEINERTZ, T. Beneficial effects of  $\alpha$ -lipoic and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, 2001; 31: 53-61.

HERRMANN, J.; LERMAN, A. The endothelium: dysfunction and beyond. **Journal of Nuclear Cardiology**, 2001; 8: 197-206.

HEUNKS, L.M.A.; VIÑA, J.; VAN HERWAADEN, C.L.A.; FOLGERING, H.T.M.; GIMENO, A.; DEKHUIJZEN, P.N.R. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Physiology**, 1999; 277: R1697-R1704.

HOPKINS, D. Exercise induced and other daytime hypoglycemic events in patients with diabetes: prevention and treatment. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2004; 65S S35-S39.

HORTON, E.S. Role and management of exercise in diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 1988; 11: 201-211.

HUK, I.; NANOBASHVILI, J.; NEUMAYER, C.; PUNZ, A.; MUELLER, M.; AFKHAMPOUR, K.; MITTLBOECK, M.; LOSERT, U.; POLTERAUER, P.; ROTH, E.; PATTON, S.; MALINSKI, T. L-arginine treatment alters kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. **Circulation**, 1997; 96: 667-675.

ITURRY-YAMAMOTO, G.; ALVES, A.A.; PICON, P.D. Prpriedades anti-aterogências do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 1997; 69: 349-356.

JACKSON, A.S.; POLLOCK, M.L. Generalized equations for predicting body density of men. **British Journal of Nutrition**, 1978; 40: 497.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

JENSEN, T.; BJERRE-KNUDSEN, J.; FELDT-RASMUSEN, B.; DECKERT, T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. **Lancet**, 1987; 461-436.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry relationship to exercise. **Sports Medicine**, 1988; 5:156-170.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 2002; 133: 493–505.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; KATHLEEN, M.S. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent DM. **Circulation**, 1993; 88: 2510-2516.

JOYNER, M.J.; DIETZ, N.M.; SHEPHERD, J.T. From Belfast to Mayo and beyond: the use and future of plethysmography to study blood flow in human limbs. **Journal of Applied Physiology**, 2001; 91: 2431-2441.

JUNGERSTEN, L.; AMBRING, A.; WALL, B.; WENNMALM, A. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. **Applied Journal of Physiology**, 1997; 82:760-764.

KASSAB, A.; LARADI, S.; FERCHICHI, S.; OMEZZINE, A.; CHARFEDDINE, B.; AMMAR, H.; CHAIEB, L.; MILED, A. Oxidative stress parameters in type 2 diabetes mellitus. **Immuno-analyse & Biologie spécialisée**, 2003; 18: 79-85.

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**, 2002; 161: 375-380.

KENNEY, W.L.; KAMON, E.; BUSKIRK, E.R. Effect of mild essential hypertension on control of forearm blood flow during exercise in the heat. **Journal of Applied Physiology**, 1984; 56: 930-935.

KHAN MT, FURCHGOTT RF. Similarities of behavior of nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor in a perfusion cascade bioassay system. **Fed Proc** 1987; 46: 385.

KIM, J.D.; YU, B.P.; McCARTER, R.J.M.; LEE, S.Y.; HERLIHY, J.T. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, 1996; 20: 83-88.

KINGWELL, B. A. Nitric oxide as a metabolic regulator during exercise: effects of training in health and disease. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, 2000; 27: 239-250.

KOMATSU, W.R.; GABBAY, M.A.L.; DIB, S.A. Early subclinical limited axial and large joint flexibility in type 1 diabetes mellitus adolescents. **Journal of Diabetes and Its Complications**, 2004; 18: 352-355.

LAAKSO, M.; LEHTO, S.; PENTTILA, I.; PYORALA, K. Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. **Circulation**, 1993; 88:1421-1430.

LAAKSONEN, D.E.; ATALAY, M.; NISKANEN, L.; UUSITUPA, M.; HANNINEN, O.; SEN, C.K. Increased Resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. **Diabetes Care**, 1996; 19: 569-574.

LAAKSONEN, D. E. Role of Physical Exercise, Fitness and Aerobic Training in Type 1 Diabetic and Healthy Men in Relation to the Lipid Profile, Lipid Peroxidation and the Metabolic Syndrome. **Journal of Sports Science and Medicine**, 2003; 2, Suppl. 1: 1-65.

LAMBERT, J.; AARSEN, M.; DONKER, A.J.; STEHOUWER, C.D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-

dependent diabetes mellitus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1996; 16(5): 705-711.

LAROIA, S.T.; GANTI, A.K.; LAROIA, A.T.; TENDULKAR, K.K. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. **International Journal of Cardiology**, 2003; 88:1-9.

LAURINDO, F.R.M.; LUZ, P.L. Influência do processo redox na resposta de reparação vascular à lesão. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, 1996; 6: 171-189.

LEKAKIS, J.; PAPAMICHAEL, C.; ANASTASIOU, H.; ALEVIZAKI, M.; DESSES, N. SOUVATZOGLOU, A.; STAMATELOPOULOS, S.; KOUTRAS, D.A. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. **Cardiovascular Research**, 1997; 34 (1):164-168.

LEKAKIS, J.P.; PAPATHANASSIOU, S.; PAPAIOANNOU, T.G.; PAPAMICHAEL, C.M.; ZAKOPOULOS, N.; KOTISIS, V.; DAGRE, A.G.; STAMATELOPOULOS, K.; PROTOGEROU, A.; STAMATELOPOULOS, S.F. Oral L-arginina improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. **International Journal of Cardiology**, 2002; 86: 317-323.

LEVINE R.L.; GARLAND, D., OLIVER, C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 1990;186:464– 78.

LIU, J.; YEO, H. C.; ÖVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S.J.; CHYU, D.W.; BROOKS, G.A.; AMES, B.N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Applied Physiology**, 2000; 89: 21-28.

LÓPEZ-JARAMILLO, P.; GONZÁLES, M.C.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. The crucial role of physiological  $\text{Ca}^{++}$  concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. **British Journal of Pharmacological**, 1990; 101:489-483.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193:265– 275.

MAEJIMA, K.; NAKANO, S.; HIMENO, M.; TSUDA, S.; MAKIISHI, H.; ITO, T.; NAKAGAWA, A.; KIGOSHI, T.; ISHIBASHI, T.; NISHIO, M. UCHIDA, K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetes subjects. Relationship to microvascular complications. **Journal of Diabetes and its Complications**, 2001; 15:135-143.

MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; CHEETHAM, C.; DEMBO, L.; STANTON, K.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. **Journal of the American College of Cardiology**, 2001; 38:860-866.

MARTÍN-GALLÁN, P.; CARRASCOSA, A.; GUSSINYÉ, M.; DOMÍNGUEZ, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radical Biology and Medicine**, 2003; 34: 1563-1574.

MARWICK, T.H. Coronary flow responses to exercise training: further evidence of the benefit of an underutilized therapeutic modality. **Clinical Science**, 2005; 109:265-6.

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

MAXWELL, A. J.; ZAPIEN, M. P.; PEARCE, G. L.; MacCALLUM, G.; STONE, P.H. Randomized trial of a medical food for the dietary management of chronic, stable angina. **Journal of the American College of Cardiology**, 2002; 39: 37-45.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Nutrição para o desporto e o exercício**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MÍGUEZ, I.; MARIÑO, G.; RODRÍGUEZ, B.; TABOADA, C. Effects of dietary L-arginine supplementation on serum lipids and intestinal enzyme activities in diabetic rats. **Journal of Physiological Biochemistry**, 2004; 60:31-37.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil na população de 30 a 69 anos em nove capitais brasileiras entre 1986 e 1988. Acessado em <http://www.diabetes.org.br/imprensa/estatisticas/numerosnobrasil.php> em 30/04/2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Número de diabéticos, hipertensos e diabéticos com hipertensão por sexo, tipo e risco. Agrupado por UF, no período de 01/1999 até 04/2005. Acessado em <http://hiperdia.datasus.gov.br> em 18/04/2005.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, 2001; 5: 62-71.

MO, M.; ESKIN, S.G.; SCHILLING, W.P. Flow-induced changes in Ca<sup>2+</sup> signaling of vascular endothelial cells: effects of shear stress and ATP. **American Journal of Physiology**, 1998; 260: H1698-H1707.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, 1988;12:365-72.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Nitric oxide: role in human disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001. Disponível em [www.els.net](http://www.els.net) em 20 dez 2001.

MOSHER, P.E.; NASH, M.S.; PERRY, A.C.; LAPERRIERE, A.R.; GOLDBERG, R.B. Aerobic circuit exercise training: effect on adolescents with well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 1998; 79:652-657.

MULLEN, M.J.; WRIGHT, D.; DONALD, A.E.; THORNE, S.; THOMSON, H.; DEANFIELD, J.E. Atorvastatin but not L-arginine improves endothelial function in type 1 diabetes mellitus: a double-blind study. *Journal of American College of Cardiology*, 2000; 36: 410-416.

NICOLOFF, G.; BAYDANOFF, S.; PETROVA, C.; CHRISTOVA, P. Antibodies to advanced glycation end products in children with diabetes mellitus. **Vascular Pharmacology**, 2002; 39: 39-45.

NODE, K.; KITAKAZ, M.; SATO, H.; KORETSUNE, Y.; KATSUBE, Y.; KARITA, M.; KOSAKA, H.; HIROAKI, K.; MASATSUGU, H. Effect of acute dynamic exercise on circulating plasma nitric oxide level and correlation to norepinephrine release in normal subjects. **American Journal of Cardiology**, 1997; 79:526-528.

NOYMAN, I.; MARIKOVSKY, M.; SASSON, S.; STARK, A.H.; BERNARTH, K.; SEGER, R.; MADAR, Z. Hyperglycemia reduces nitric oxide synthase and glycogen synthase in endothelial cells. **Nitric Oxide**, 2002; 7: 187-193.

OLIVEIRA, E.M.; RAMIRES, P.R.; LANCHA JUNIOR, A.H. Nutrição e Bioquímica do Exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, 2004; 18: 7-19.

OOMEN, C.M.; VAN ERK, M.J. FESKEN, E.J.; KOK, F.J.; KROMHOUT, D. Arginine intake and risk of coronary heart disease mortality in elderly men. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2000; 20:2134-2139.

OUVIÑA, S.M.; LA GRECA, R.D.; ZANARO, N.L.; PALMER, L. SASSETTI, B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. **Thrombosis Research**, 2001; 102: 107-114.

ÖZÇELİKAY, A.T.; TAY, A.; GÜNER, S.; TASYARAN, V.; YILDIZOĞLU-ARI, N.; DİNÇER, D.; ALTAN, M. Reversal effects of L-arginine treatment on blood pressure and vascular responsiveness of streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacological Research**, 2000; 41: 201-209.

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 1987; 327: 524-6.

PESTANA, M.; GAGEIRO, J.N. **Análise de dados para ciências sociais: a complementaridade do SPSS**. Lisboa: Edições Silabo, 1998.

PIEPER, G.M.; JORDAN, M.; ADAMS, M.B.; ROZA, A.M. Restoration of vascular endothelial function in diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 1996; 31: S157-S162.

POSTON, L.; TAYLOR, P. Endothelium-mediated vascular function in insulin-dependent diabetes mellitus. **Clinical Science**, 1995; 88: 245-255.

POVEDA, J.J.; Riestra, A.; SALAS, E.; CAGIGAS, M.L.; LOPEZ-SOMOZA, C.; AMADO, J.Á.; BERRAZUETA, J.R. Contribution of nitric oxide to exercise-induced changes in healthy volunteers: effects of acute exercise and long-term physical training. **European Journal of Clinical Investigation**, 1997; 27:967-971.

PRATICO, D. Antioxidants and endothelium protection. **Atherosclerosis**, 2005; 181: 215-224.

PRELI, R. B.; KLEIN, K. P.; HERRINGTON, D. M. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. **Atherosclerosis**, 2002; 162: 1-15.

RADOMSKI MW, PALMER RMJ, MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, 1987; 11:1057-58.

RAGHAVAN, S.A.V.; DIKSHIT, M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. **Pharmacological Research**, no prelo, 2003.

RAHIMI, R.; KIKFAR, S.; LARINJI, B.; ABDOLLAHI, M. A review on the role os antioxidants in the manegement of diabetes and its complications. **Biomedicine & Pharmacology**, 2005. Artigo no prelo.

RAITAKARI OT, CELERMAJER DS. Testing for endothelial dysfunction. **Annals of Medicine**, 2000; 32: 293-304.

RIBEIRO, J.P.; HUGHES, V.; FIELDING, R.A.; HOLDEN, W.; EVANS, W.; KNUTTGEN, H.G. Metabolic and ventilatory response to stady state exercise relative to lactate thresholds. **European Journal of Applied Physiology**, 1986; 55: 215-221.

SACHECK, J.M.; BLUMBERG, J.B. Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. **Nutrition**, 2001; 17: 809-814.

SAKAMOTO, S.; MINAMI, K.; NIWA, Y.; OHNAKA, M.; NAKAYA, Y.; MIZUNO, A.; KUWAJIMA, M.; SHIMA, K. Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rat, a model of spontaneous NIDDM. **Diabetes**, 1998; 47: 82-86.

SANTINI, S.A.; MARRA, G.; GIARDINA, B.; COTRONEO, P.; MORDENTE, A.; MARTORANA, G.E.; MANTO, A.; GHIRLANDA, G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes**, 1997; 46: 1853-1858.

SAPATA, K.B.; FAYH, A.P.T.; AZEVEDO, D.; SILVEIRA, M.M.; SILVA, E.G.; MOREIRA, J.C.F.; OLIVEIRA, A.R. O efeito da suplementação de L-arginina e do exercício de preensão palmar sobre índices de estresse oxidativo. **Livro de Resumos do XVI Salão de Iniciação Científica**, p. 550, 2003.

SCHINI-KERTH, V.B. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. **Transfusion Clinique et Biologique**, 1999; 6: 355-363.

SCHNEIDER, C.D. **Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício em esteira rolante**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, [2002].

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2004; 10: 308-313.

SEGHROUCHNI, I.; DRAI, J.; BANNIER, E.; RIVIÈRE, J.; CALMARD, P.; GARCIA, I.; ORGIAZZI, J.; REVOL, A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus: insulin treatment efficiency. **Clinica Chimica Acta**, 2002; 321: 89-96.

SESSA, W.C.; HARRISSON, J.K.; BARBER, C.M. et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, 1992; 267:15274-15276.

SIGNORINI, J.L.; SIGNORINI, S.S. **Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos**. São Paulo: Ícone, 1993.

SILVEIRA, MM. **Comparação de parâmetros de dano oxidativo em atletas profissionais de voleibol de quadra, jogadores de vôlei de praia e indivíduos não treinados, quando submetidos a exercício em cicloergômetro**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, [2004].

SKYRME-JONES, A.P.; O'BRIEN, R.C.; LUO, M.; MEREDITH, I.T. Endothelial vasodilator function is related to low-density lipoprotein particle size and low-density lipoprotein vitamin E content in type 1 diabetes. **Journal of American College of Cardiology**, 2000; 35: 292-299.

SMITH, J.K. Exercise and atherogenesis. **Exercise and Sports Science Reviews**, 2001; 29:49-53.

SMITS, P.; HERBACH, F.M.; JANSEN, T.L.; THIEN, T.; LUTTERMAN, J.A. Impaired vasodilator response to atrial natriuretic factor in IDDM. **Diabetes**, 1993; 42: 1454-1461.

St. CROIX C.M.; WETTER, T.J.; PEGELOW, D.F.; MEYER, K.C.; DEMPSEY, J.A. Assessment of nitric oxide formation during exercise. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, 1999;159:1125-1133.

STENSTRÖM , U.; GÖTH A, A. CARLSSON, C.;ANDERSSON, P-O. Stress management training as related to glycemic control and mood in adults with Type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2003; 60: 147-152.

SYDOW, K.; MÜNZEL, T. Diabetes, oxidative stress and endothelial dysfunction. **International Congress Series**, 2003; 1253: 125-138.

TAPIERO, H.; MATHE, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies. I. Arginine. **Biomedical Pharmacotherapy**, 2002; 56: 439-445.

TELCI, A.; CAKATAY, U.; SALMAN, S.; SATMAN, I.; SIVAS, A. Oxidative protein damage in early stage type 1 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2000; 50: 213-223.

THORNE, S.; MULLEN, M.J.; CLARKSON, P.; DONALD, A.F.; DEANFIELD, J.E. Early endothelial dysfunction in adults at risk from atherosclerosis: different responses to L-arginine. **Journal of American College of Cardiology**, 1998; 32: 110-116.

UK Prospective diabetes study group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, 1998; 352: 837-853.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology**, 2003; 189: 41-54.

VIINIKKA, L.; VUORI, J.; YLIKORKKALA, O. Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A<sub>2</sub> in runners during acute exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 1984; 16: 275-277.

VILLA-CABALLERO, L.; NAVA-OCAMPO, A.A.; FRATI-MUNARI, A.; PONCE-MONTER, H. Oxidative stress, acute and regular exercise: are they really harmful in the diabetic patient. **Medical Hypotheses**, 2000; 55: 43-46.

WISEK, W.J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. **Journal of Nutrition**, 1986; 116: 36-46.

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2002; 46: 514-519.

WALKER, H. A.; MCGING, E.; FISHER, I.; BOGER, R.H.; BODE-BOGER, S.M.; JACKSON, G.; RITTER, J.M.; CHOWIENCZYK, P.J. Endothelium-dependent vasodilation is independent of the plasma L-arginine/ADMA ratio in men with stable angina. **Journal of the American College of Cardiology**, 2001; 38: 499-505.

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

WATTS, G.F.; PLAYFOLD, D.A. Dislipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. **Atherosclerosis**, 1998; 141: 17-30.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. **FEBS Lett** 1985;187:33– 7.

WELLS, B.J.; MAINOUS, A.G.; EVERETT, C.J. Association between dietary arginine and C-reactive protein. **Nutrition**, 2005; 21: 125-130.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of the nitric oxide in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, 2001; 64: 365-391.

WILSON, J.R.; KAPOOR, S. Contribution of endothelium-derived relaxing factor to exercise-induced vasodilation in humans. *Journal of Applied Physiology*, 1993; 75: 2740-2744.

WITT, E.H.; REZNICK, A.Z.; VIGUIE, C.A. STARKE-REED, P. PACKER, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. **Journal of Nutrition**, 1992; 122: 766-773.

WOLF, A.; ZALPOUR, C.; THEILMEIER, G.; WANG, B.Y.; MA, A.; ANDERSON, B.; TSAO, P.S.; COOKE, J.P. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. **Journal of American College of Cardiology**, 1997; 29: 479-485.

WU, G., FLYNN, N.E., JOLLY, C.A., DAVIS, P.K. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive or inducible nitric oxide synthesis by young rats. **Journal of Nutrition**, 1999; 129: 1347-1354.

YAMAKITA, T.; ISHII, T.; YAMAGAMI, K.; YAMAMOTO, T.; MIYAMOTO, M.; HOSOI, M.; SATO, T.; ONISHI, S.; TANAKA, S.; FUJII, S. Glycemic response during exercise after administration of insulin lispro compared with the after administration of regular human insulin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2002; 57: 17-22.

YKI-JARVINEN, H. Insulin resistance and endothelial dysfunction. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2003; 17: 411-430.

YOKOYAMA, H.; EMOTO, M.; FUJIWARA, S.; MOTOYAMA, K.; MORIOKA, T.; KOYAMA, H.; SHOJI, T.; INABA, M.; NISHIZAWA, Y. Short-term aerobic exercise improves arterial stiffness in type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2004. Artigo no prelo.

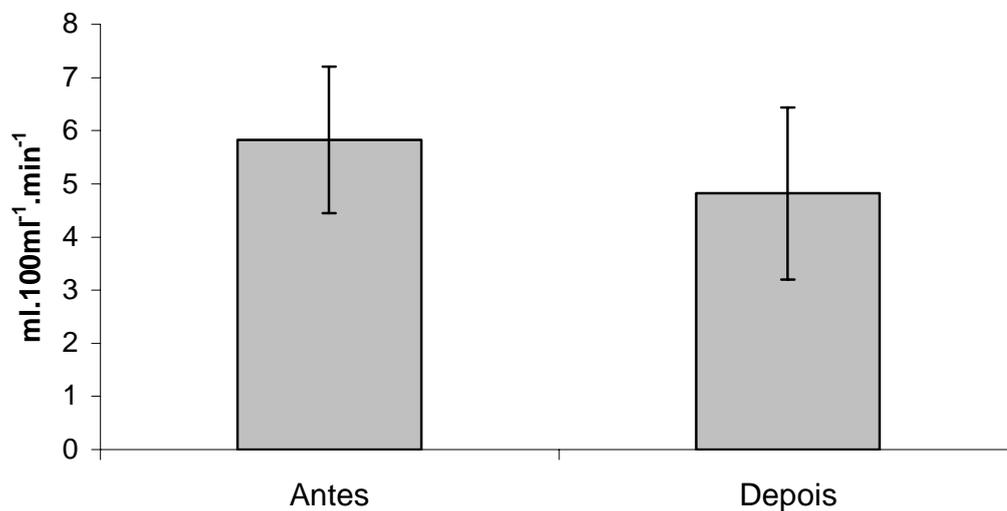
**Anexo 1 - Resultados do piloto realizado em novembro de 2003**

Figura 1 - Efeito da suplementação de L-arginina sobre o fluxo sangüíneo dos voluntários na situação de repouso ( $p=0,267$ ).

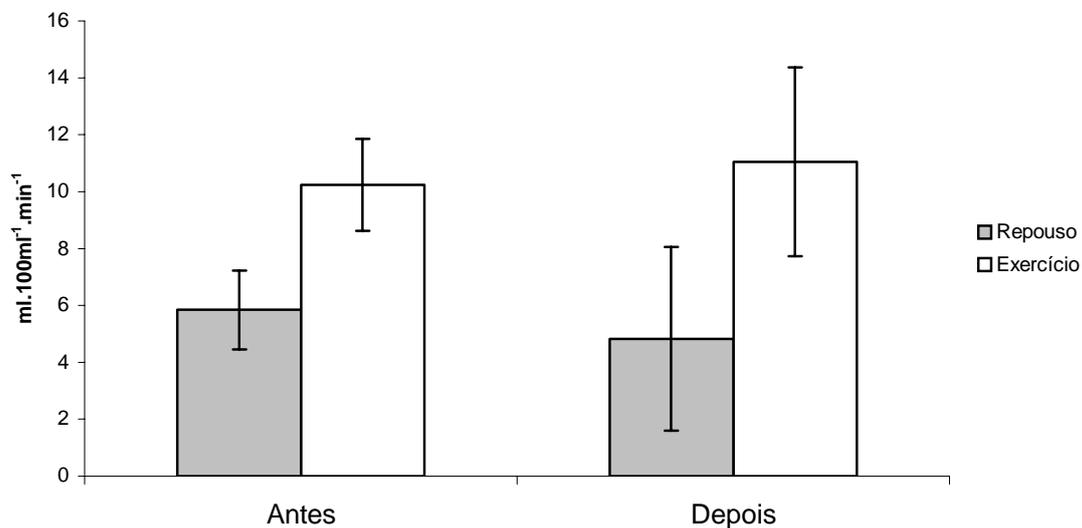


Figura 2 – Efeito do exercício sobre o fluxo sangüíneo nos voluntários nas situações antes e depois da suplementação ( $p = 0,003$  e  $0,002$ , respectivamente).

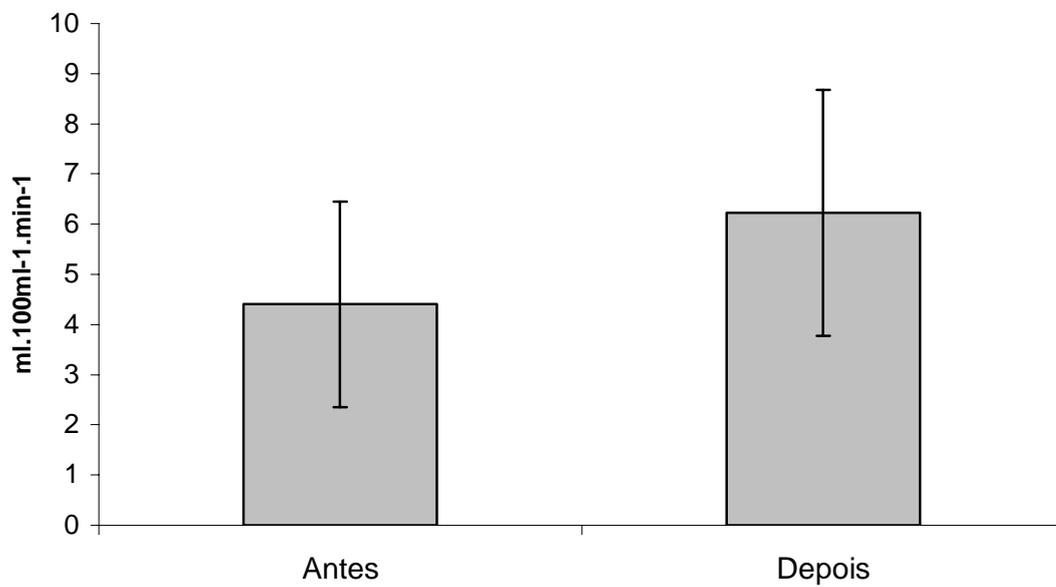


Figura 3 – Delta de fluxo em decorrência do exercício nos momentos antes e depois da suplementação ( $p=0,193$ ).

## **ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

Você está sendo convidado a participar de um estudo que visa verificar os efeitos da suplementação de L-arginina sobre a resposta vascular durante o exercício. Será necessário a realização de uma dieta personalizada e calculada por nutricionista aos voluntários saudáveis, mas os indivíduos diabéticos que fazem acompanhamento nutricional prévio com dieta planejada por profissional serão orientados a não modificar sua dieta habitual.

Sua presença será necessária no Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da UFRGS, onde um teste máximo será feito em bicicleta ergométrica para determinar a carga em que será realizado o exercício. Este exercício, denominado teste submáximo, terá duração de 45 minutos e será realizado no Serviço de Hemodinâmica do HCPA, com coletas de sangue e pletismografia nos momentos antes e depois do exercício. Neste dia, você receberá cápsulas que deverão ser ingeridas durante 7 dias antes da repetição do protocolo de exercício, e estas consistem em cápsulas do aminoácido L-arginina **ou** placebo (amido). A escolha se o indivíduo irá receber doses de L-arginina ou de placebo será aleatória e nem o voluntário nem o pesquisador saberão o que está sendo ingerido. Após este período, você deverá retornar ao HCPA para realizar novamente o protocolo de exercício, coletas de sangue e pletismografia. Duas coletas de sangue em jejum deverão ser realizadas no LAPEX nos dias anteriores aos testes submáximos.

A suplementação de L-arginina, nesta dosagem, pode causar como efeito adverso um aumento na sonolência, leves enjôos e náuseas. Entretanto, são raras as notificações destes eventos. Por outro lado, a participação neste projeto terá como benefícios uma avaliação completa física e nutricional aos participantes, bem como avaliação da sua glicemia, colesterol e triglicerídeos.

O participante estará envolvido com o projeto por um tempo de 10 dias, se não ocorrer nenhum contratempo por parte do participante do estudo ou problemas nos equipamentos de coleta de dados. Entretanto, cabe lembrar que a participação no estudo é voluntária, e o participante poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem que isso represente qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da instituição onde o projeto está sendo realizado. Os resultados deste estudo serão mantidos confidenciais e quando divulgados preservarão o anonimato dos participantes.

Os custos de deslocamento dos voluntários até os centros de pesquisa onde ocorrerão as coletas de dados serão ressarcido pelos pesquisadores.

O pesquisador responsável se compromete a acompanhar os participantes e prestar eventuais informações aos participantes a qualquer momento do estudo. Também se compromete, caso houver uma nova informação que altere o que foi previsto durante a obtenção deste consentimento informado, avisar imediatamente aos participantes e ao Comitê de Ética em Pesquisa, providenciando uma nova versão deste termo de consentimento.

Este termo de consentimento livre e esclarecido deverá ser preenchido em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa, ou por seu representante legal, e outra arquivada pelo pesquisador.

Os pesquisadores deste projeto de pesquisa são os Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira (Fone: 3316.5861), Nut<sup>a</sup> Ana Paula Trussardi Fayh (Fone: 3361.3757) e o pesquisador responsável é Prof. Dr. Rogério Friedman, que pode ser contatado a qualquer momento pelo telefone 3346.7041, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Fone: 2101.8304) em 15/04/2005.

Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Voluntário

RG: \_\_\_\_\_

Telefone de contato: \_\_\_\_\_



**ANEXO 4 – FICHA DE ANAMNESE**

Nome: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( )M ( )F Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Doença principal: \_\_\_\_\_ Diagnosticada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Doenças associadas: \_\_\_\_\_

**Medicamentos em uso**

Nome do medicamento	Quantidade	Horários	Observações

Fumante: ( ) sim ( ) não      Dieta prescrita por profissional: ( ) sim ( ) não

Se sim: Calorias: \_\_\_\_\_ Adesão: ( ) boa ( ) regular ( ) ruim

Utiliza suplementos alimentares? \_\_\_\_\_

Pratica atividade física regular: ( ) sim ( ) não

Se sim: \_\_\_\_\_ vezes por semana durante \_\_\_\_\_ minutos      Total semanal: \_\_\_\_\_ min

Pressão arterial: \_\_\_\_\_

Observações adicionais: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **ANEXO 5 - PAR-Q: QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE FÍSICA**

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

O PAR-Q é designado para ajudar você a ajudar a si mesmo. Muitos benefícios de saúde estão associados ao exercício regular, e o preenchimento do PAR-Q é um primeiro passo sensível a ser dado se você está planejando aumentar a quantidade de atividade física em sua vida.

Para muitas pessoas, a atividade física não deve representar qualquer problema ou risco. O PAR-Q tem sido designado para identificar o pequeno número de adultos para quem a atividade física pode ser imprópria ou para aqueles que devem receber orientação médica sobre o tipo de atividade mais adequada para o seu caso.

O bom senso é o seu melhor guia para responder a estas perguntas. Leia-as cuidadosamente e marque (✓) no  SIM ou  NÃO ao lado da questão, dependendo se ela se aplica a você.

### **SIM    NÃO**

- |                          |                          |    |  |
|--------------------------|--------------------------|----|--|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 1. | Seu médico alguma vez já lhe disse que você tem problema cardíaco?   |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 2. | Você sente freqüentemente dores no coração ou no peito?  |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 3. | Você muitas vezes se sente fraco ou tem fortes episódios de tontura?   |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 4. | Algum médico já lhe disse que sua pressão arterial estava muita alta?  |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 5. | Seu médico alguma vez já lhe disse que você tem um problema ósseo ou articular tal como artrite que tenha sido agravado por exercício ou possa piorar com exercício? |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 6. | Há uma boa razão física não mencionada aqui pela qual você não deva seguir um programa de atividade mesmo que quisesse?  |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 7. | Você tem mais de 65 anos e não está acostumado com exercício vigoroso?   |

## ANEXO 6 – RECORDATÓRIO ALIMENTAR

O objetivo deste registro é conhecer os seus hábitos alimentares. Para que eles estejam o mais próximo possível da sua realidade, é importante que você anote TUDO o que comer e beber durante estes 3 dias. Isto quer dizer o que comeres na hora das refeições e fora delas também (as conhecidas “beliscadas”). Sempre que souber procure anotar as marcas dos fabricantes (por exemplo, requeijão da *lacesa*, pão integral da *seven boys*, etc.), indicar quando o alimento for *light* ou *diet*. Procure anotar com detalhes as quantidades (em medidas caseiras como colheres de sopa/chá, copo, caneca, etc.) e qualidades (se comer fruta diga qual foi: banana, maçã, etc.). Conforme exemplo abaixo:

<p><i>DESJEJUM</i> – 7h</p> <p>1 copo (de requeijão) de leite desnatado</p> <p>1 colher de sopa cheia de nescau</p> <p>1 banana caturra</p> <p>1 pão francês de 50g</p> <p>1 colher de sopa rasa - margarina becel</p> <p>1 colher de sopa cheia de mel</p> <p>1 fatia de queijo lanche fatiado</p> <p><i>COLAÇÃO</i> – 10h</p> <p>1 barra de cereal trio de morango com chocolate</p> <p><i>ALMOÇO</i> – 12:30</p> <p>1 prato fundo de macarrão com 4 colheres de sopa cheias de molho de tomate pomarola, mais 1 colher de sopa cheia de queijo parmesão ralado.</p> <p>1 coxa de frango sem pele mais 1 sobrecoxa sem pele</p> <p>2 rodela finas de beterraba cozida e 2 folhas médias de alface sem tempero</p> <p>2 copos (de requeijão) de suco de uva <i>izzi</i></p> <p>1 picolé chicabom de sobremesa</p>	<p><i>LANCHE</i> – 18h</p> <p>1 banana média e 3 bolachas de água e sal</p> <p><i>JANTA</i> – 22h</p> <p>½ pizza sadia sabor calabresa</p> <p>2 copos de coca-cola</p> <p>3 bombons sonho de valsa</p> <p><i>CEIA</i> – não comi nada</p>
--	---

	1º dia	2º dia	3º dia
DESJEJUM -----h			
COLAÇÃO -----h			
ALMOÇO -----h			
LANCHE -----h			
JANTAR -----h			
CEIA -----h			

**ANEXO 7 – INQUÉRITO DE ATIVIDADE FÍSICA**

Nome: \_\_\_\_\_ Data da entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Código do participante: \_\_\_\_\_

Liste abaixo suas atividades físicas realizadas com planejamento prévio, que sejam parte integrante de sua rotina. Segue exemplo abaixo para orientação.

MODALIDADE	FREQÜÊNCIA SEMANAL	DURAÇÃO	INTENSIDADE PERCEBIDA
Musculação	3 x	60min	Moderada
Caminhada	5 x	45min	Intensa
Ciclismo	2x	30min	Leve (passeio)

MODALIDADE	FREQÜÊNCIA SEMANAL	DURAÇÃO	INTENSIDADE PERCEBIDA

Responda atentamente as questões abaixo:

Quanto tempo em minutos você passa em frente à televisão diariamente?  
 \_\_\_\_\_

Quanto tempo em minutos você utiliza o computador com atividades de trabalho/lazer diariamente? \_\_\_\_\_

Quantas horas você costuma dormir por noite de descanso? \_\_\_\_\_

Quais suas atividades de lazer mais frequentes (ex: ler, ir no cinema, passear, dançar, ir ao teatro)? \_\_\_\_\_

Você realiza alguma atividade doméstica (ex: lavar louça, lavar roupa no tanque, varrer a casa, lavar o carro, jardinagem, etc)? Cite e aponte a periodicidade da tarefa:  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## **ANEXO 8 – ORIENTAÇÕES PARA O PERÍODO DO PROTOCOLO**

### **1) Sobre a alimentação**

Não é necessário a modificação de seus hábitos alimentares, entretanto alguns cuidados serão necessários durante o período dos experimentos, iniciando três dias antes da primeira coleta de sangue:

- Evite o consumo de álcool, principalmente nos dias anteriores às coletas de sangue.
- Evite o consumo excessivo de frituras, alimentos gordurosos, chocolates, balas, alimentos enriquecidos com vitamina C e chimarrão. Não consuma enlatados, embutidos, salsichas, salames italianos, alimentos muito temperados ou temperos prontos, pepino, conservas, catchup e mostarda. Não consuma alimentos que não façam parte de sua alimentação habitual.
- Nas 24 horas anteriores aos testes de exercício, não tome café preto e chimarrão, e não coma alimentos embutidos/enlatados.
- Na manhã do teste de exercício, você deverá comparecer ao HCPA em jejum para coleta de sangue. Lá você receberá alimentação que será previamente combinada com a pesquisadora, de acordo com sua alimentação habitual.

### **2) Sobre as coletas de sangue**

As coletas de sangue acontecerão da seguinte forma:

- No dia do exercício, você deverá comparecer ao LAPEX em jejum de no mínimo 8 horas. Serão coletados 10mL de sangue para exames de colesterol, triglicerídeos, glicemia e hemoglobina glicada.
- Cerca de 60min após a refeição será realizado o exercício, e novamente será necessário coletar sangue (15mL) antes e depois do exercício para análises de estresse oxidativo e função vascular.

### **3) Sobre as coletas de urina**

A urina será coletada no HCPA na manhã dos testes de exercício, em jejum.

### **4) Sobre a suplementação**

As cápsulas deverão ser administradas por um período de uma semana (7 dias), sendo 12 cápsulas ao dia que deverão ser ingeridas 4 cápsulas às 8h, 4 cápsulas às 16h e 4 cápsulas às 24 horas. Caso aconteça de esquecer de tomar por um período de até 16h, ingira imediatamente as cápsulas esquecidas. Caso o esquecimento seja superior a 24 horas, contate imediatamente a pesquisadora.

### **5) Sobre o exercício: para os voluntários diabéticos!**

O exercício será realizado no HCPA em manhãs previamente agendadas, em bicicleta ergométrica e terá duração de 45 minutos. Não se esqueça que você **não deverá aplicar** a insulina na coxa ou na nádega na manhã do teste, bem como não deverá aplicar insulina regular antes do exercício. Ao longo do dia, não pule refeições, capriche nas frutas e fique atento a sinais de hipoglicemia.

Qualquer dúvida ou dificuldades para cumprir as recomendações acima especificadas ligue a qualquer momento para os telefones (51) 3316.5861 – 3361.3757 – 8122.1041 ou mande e-mail para [apfayh@hotmail.com](mailto:apfayh@hotmail.com)



**ANEXO 10 – RESULTADOS DO TESTE DE NORMALIDADE**

Teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (Levene) para os grupos controle e diabéticos ( $p < 0,05$ ).

Variáveis	Normalidade		
	Controle	Diabéticos	Homegeneidade
Idade	0,458	0,621	0,842
Peso	0,364	0,287	0,628
Estatura	0,432	0,624	0,245
IMC	0,154	0,248	0,389
% G	0,350	0,624	0,457
PAS	0,260	0,152	0,129
PAD	0,187	0,178	0,204
Glicemia	0,157	0,087	0,145
A1c	0,378	0,568	0,285
Colesterol	0,288	0,429	0,479
HDL	0,375	0,426	0,356
Triglicerídeos	0,226	0,168	0,441
Uréia	0,147	0,469	0,315

Teste de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade das variâncias (Levene) para os grupos controle e diabéticos ( $p < 0,05$ ).

Variáveis	Normalidade				Homogeneidade
	Controle L-arginina	Controle placebo	Diabéticos L-arginina	Diabéticos placebo	
Uréia antes	0,248	0,277	0,548	,0367	0,788
Uréia depois	0,415	0,352	0,247	0,143	0,578
AA Fluxo	0,220	0,650	0,305	0,407	0,369
AD Fluxo	0,460	0,131	0,286	0,824	0,010
DA Fluxo	0,377	0,055	0,260	0,295	0,086
DD Fluxo	0,606	0,010	0,620	0,104	0,518
AA Nitritos	0,143	0,591	0,466	0,011	0,508
AD Nitritos	0,010	0,950	0,922	0,080	0,755
DA Nitritos	0,183	0,673	0,184	0,148	0,734
DD Nitritos	0,046	0,378	0,496	0,184	0,990
AA TBARS	0,390	0,010	0,059	0,069	0,203
ADTBARS	0,286	0,312	0,457	0,251	0,065
DATBARS	0,933	0,722	0,031	0,044	0,025
DD TBARS	0,569	0,949	0,049	0,344	0,000
AA Carbonil	0,423	0,711	0,459	0,287	0,092
AD Carbonil	0,030	0,535	0,245	0,308	0,120
DA Carbonil	0,191	0,352	0,068	0,054	0,064
DD Carbonil	0,210	0,699	0,010	0,061	0,001
AA Ác úrico	0,037	0,227	0,128	0,153	0,385
AD Ác úrico	0,746	0,422	0,248	0,410	0,223
DA Ác úrico	0,010	0,201	0,547	0,200	0,833
DD Ác úrico	0,011	0,497	0,203	0,254	0,687

Apesar de algumas variáveis apresentarem um índice de significância abaixo de 0,05, nenhuma variável obteve, nos quatro grupos e momentos, uma significância abaixo do proposto, portanto oferecendo uma possibilidade segura de utilização de testes paramétricos (PESTANA & GAGEIRO, 1998).

**ANEXO 11 – Tabelas com os resultados de função endotelial e estresse oxidativo**

Fluxo sanguíneo e nitritos plasmáticos em repouso nos grupos controle e diabéticos.

	Fluxo (ml.100ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	Nitritos (fM)
Controle (n=20)	3,53 ± 0,35	246 ± 13,5
Diabéticos (n=10)	2,66 ± 0,33	246 ± 17,1
p	0,111	0,981

Parâmetros de estresse oxidativo nos grupos controle e diabéticos .

	TBARS (nmolMDA.mg ptn <sup>-1</sup> )	Carbonil (fM.mg ptn <sup>-1</sup> )	AU (mg/dl)
Controle (n=20)	1,09 ± 0,41	0,148 ± 0,019	44,55 ± 2,06
Diabéticos (n=10)	2,44 ± 0,46	1,48 ± 0,205	28,10 ± 1,57
p	0,039	0,000	0,000

Resultados de fluxo sanguíneo em repouso e depois do exercício nos grupos controle e diabéticos. Valores expressos em ml.100ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)
Repouso	3,53 ± 0,35	2,66 ± 0,33
Exercício	5,46 ± 0,65	3,77 ± 0,36
p	0,001	0,000

Resultados de nitritos em repouso e após o exercício, nos grupos controle e diabéticos. Valores expressos em fM

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)
Repouso	246 ± 13,5	246 ± 17,1
Exercício	233 ± 15,4	240 ± 9,3
p	0,487	0,758

Resultados de lipoperoxidação em repouso e após o exercício nos grupos controle e diabéticos. Resultados expressos em nmol MDA.mg PTN<sup>-1</sup>

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)
Repouso	1,09 ± 0,41	2,44 ± 0,46
Exercício	0,83 ± 0,68	2,40 ± 0,19
p	0,517	0,937

Resultados de carbonil em repouso e após o exercício, nos grupos controle e diabéticos. Resultados expressos em fM.mg PTN<sup>-1</sup>

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)
Repouso	0,148 ± 0,0176	1,48 ± 0,205
Exercício	0,171 ± 0,016	1,26 ± 0,227
p	0,261	0,578

Resultados de ácido úrico em repouso e após o exercício, nos grupos controle e diabéticos. Resultados expressos em mg/ml.

	Controle (n=20)	Diabéticos (n=10)
Repouso	44,55 ± 2,06	28,10 ± 1,58
Exercício	41,93 ± 1,76	28,69 ± 1,87
p	0,104	0,387

Resultados de fluxo sanguíneo antes e após a suplementação, nos grupos experimentais. Resultados expressos em  $\text{ml} \cdot 100\text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
Antes	$3,20 \pm 0,51$	$3,67 \pm 0,49$	$2,46 \pm 0,32$	$3,05 \pm 0,63$
Depois	$3,19 \pm 0,38$	$4,14 \pm 0,58$	$2,41 \pm 0,21$	$4,74 \pm 0,86$
p	0,979	0,485	0,848	0,036

Resultados de nitritos antes e após a suplementação, nos grupos experimentais. Resultados expressos em fM

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
Antes	$223 \pm 22,2$	$265 \pm 14,0$	$237 \pm 19,0$	$255 \pm 30,2$
Depois	$252 \pm 15,4$	$257 \pm 16,6$	$249 \pm 12,8$	$243 \pm 14,4$
p	0,136	0,558	0,967	0,638

TBARS antes e depois da suplementação, nos grupos experimentais. Resultados expressos em  $\text{nmol MDA} \cdot \text{mg PTN}^{-1}$

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
Antes	$1,55 \pm 0,81$	$0,64 \pm 0,092$	$3,01 \pm 0,83$	$1,87 \pm 0,28$
Depois	$0,76 \pm 0,062$	$0,81 \pm 0,10$	$3,28 \pm 0,94$	$3,03 \pm 0,65$
p	0,346	0,254	0,852	0,176

Carbonil antes e após a suplementação nos experimentais. Resultados expressos em fM.mg PTN<sup>-1</sup>

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
Antes	0,155±0,026	0,142 ±0,0248	1,43 ± 0,305	1,53 ± 0,295
Depois	0,238 ±0,033	0,105 ± 0,0198	1,44 ± 0,228	2,05 ± 0,707
p	0,005	0,317	0,976	0,547

Concentração de ácido úrico plasmático antes e após a suplementação nos grupos experimentais. Resultados expressos em mg/dl.

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
Antes	47,22 ± 2,52	41,87 ± 2,52	30,15 ± 3,57	26,05 ± 3,57
Depois	46,27 ± 3,15	41,04 ± 3,15	28,07 ± 4,46	28,29 ± 4,46
p	0,801	0,758	0,423	0,393

Legenda para as próximas tabelas:

AA – antes da suplementação e antes do exercício

AD – antes da suplementação e depois do exercício

DA – depois da suplementação e antes do exercício

DD – Depois da suplementação e depois do exercício

Efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício sobre o fluxo sanguíneo nos grupos experimentais. Resultados expressos em  $\text{ml} \cdot 100\text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
AA	$3,20 \pm 0,51$	$3,67 \pm 0,49$	$2,46 \pm 0,32$	$3,05 \pm 0,63$
AD	$4,45 \pm 0,55$	$6,22 \pm 1,09$	$3,15 \pm 0,46$	$4,55 \pm 0,45$
DA	$3,19 \pm 0,38$	$4,14 \pm 0,58$	$2,41 \pm 0,21$	$4,74 \pm 0,86$
DD	$5,40 \pm 0,88$	$6,26 \pm 0,87$	$3,09 \pm 0,49$	$5,40 \pm 0,81$

Efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a concentração plasmática de nitritos nos grupos experimentais. Resultados expressos em fM

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
AA	$223 \pm 22,2$	$265 \pm 14,0$	$237 \pm 19,0$	$255 \pm 30,2$
AD	$250 \pm 14,9$	$216 \pm 26,9$	$243 \pm 15,8$	$238 \pm 11,8$
DA	$252 \pm 15,4$	$257 \pm 16,6$	$249 \pm 12,8$	$243 \pm 14,4$
DD	$243 \pm 15,4$	$250 \pm 13,8$	$270 \pm 17,0$	$271 \pm 17,7$

Efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a lipoperoxidação nos grupos experimentais. Resultados expressos em nmol MDA.mg PTN<sup>-1</sup>

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
AA	1,55 ± 0,81	0,64 ± 0,092	3,01 ± 0,83	1,87 ± 0,28
AD	0,91 ± 0,13	0,75 ± 0,044	2,17 ± 0,11	2,62 ± 0,36
DA	0,76 ± 0,062	0,81 ± 0,11	3,28 ± 0,94	3,03 ± 0,65
DD	0,71 ± 0,073	0,66 ± 0,072	2,74 ± 0,40	2,63 ± 0,50

Efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício sobre a oxidação de proteínas nos grupos experimentais. Resultados expressos em fM.mg proteína<sup>-1</sup>

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
AA	0,155 ± 0,026	0,142 ± 0,0248	1,43 ± 0,305	1,53 ± 0,295
AD	0,180 ± 0,0228	0,163 ± 0,0234	1,21 ± 0,333	1,30 ± 0,345
DA	0,238 ± 0,033	0,105 ± 0,0198	1,44 ± 0,228	2,05 ± 0,707
DD	0,147 ± 0,0171	0,150 ± 0,0271	2,14 ± 0,878	2,01 ± 0,869

Efeitos da suplementação de L-arginina e do exercício sobre o AU nos grupos experimentais. Resultados expressos em mg/dl.

	Controle Placebo (n=10)	Controle L-arginina (n=10)	Diabéticos Placebo (n=5)	Diabéticos L-arginina (n=5)
AA	47,22 ± 2,52	41,87 ± 2,52	30,15 ± 3,57	26,05 ± 3,57
AD	45,31 ± 2,21	38,55 ± 2,20	30,30 ± 3,1	27,07 ± 3,11
DA	46,27 ± 3,15	41,04 ± 3,15	28,07 ± 4,46	28,29 ± 4,46
DD	44,96 ± 3,80	42,22 ± 3,80	29,18 ± 5,37	28,36 ± 5,37