

Efeito de 14 Semanas de Treino de Endurance na Funcionalidade Respiratória de Mitocôndrias Musculares Isoladas de Ratos Diabéticos

Dissertação apresentada com vista à obtenção
do Grau de Mestre em Análises Clínicas, no
âmbito do Curso de Mestrado em Análises
Clínicas, da Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto (Decreto-Lei nº 74/2006
de 24 de Março de 2006)

Orientadores. Prof. Doutor António Ascensão e Prof. Doutor José
Magalhães

Co-Orientador. Prof. Doutor Franklim Marques

Autor: Sérgio Ruben Soares Magalhães

Porto, Dezembro 2008

FICHA DE CATALOGAÇÃO

Magalhães, S. R. (2008). Efeitos de 14 Semanas de treino de endurance na funcionalidade respiratória de mitocôndrias musculares isoladas de ratos diabéticos - Porto: S. R. Magalhães. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

PALAVRAS-CHAVE: EXERCÍCIO; TOLERÂNCIA CRUZADA; HIPERGLICÉMIA SEVERA; BIOENERGÉTICA; RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL; POTENCIAL TRANSMEMBRANAR, STREPTOZOTOCINA

.

*Ao pequeno e “fitchê” **Gonçalo***

AGRADECIMENTOS

Aos incansáveis e resistentes Prof. Dr. António Ascensão e Prof. Dr. José Magalhães agradeço a dedicação, conselhos, críticas, tempo dispensado e árduo trabalho na concepção, planeamento e orientação desta dissertação. Esta foi concertiza uma das experiências mais gratificantes que levo na minha memória.

Ao Dr. José António Lumini o meu muito obrigado pelos conselhos, trabalho experimental e disponibilidade que sempre demonstrou.

Gostaria também de agradecer ao Prof. Dr. Paulo Oliveira e seus colaboradores do Centro de Neurociências e Biologia Celular, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra, que prestaram um importante apoio na componente experimental de todo o trabalho.

À Dra. Laura Pereira obrigado pela disponibilidade e ajuda que evidenciou no trabalho experimental desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Ao Prof Dr. Franklim Marques uma palavra de apreço, amizade e, sobretudo gratidão por todos os conselhos científicos e pessoais: realmente é neste "mundo" que me sinto bem!

À Raquel obrigado pelo apoio, paciência (muita paciência), amizade e carinho que em todo este difícil processo revelou. Esta dissertação deve-se em grande parte a esta minha GRANDE amiga, mulher e companheira.

Aos meus pais e avós agradeço por todo o apoio que me deram ao longo da vida. Sem eles, este trabalho seria muito mais difícil de realizar.

A todas as pessoas que directa ou indirectamente motivaram esta minha incursão pelo mundo da ciência e do conhecimento e, me incutiram um espírito aberto e crítico na discussão dos problemas profissionais do dia-a-dia, o meu profundo agradecimento.

As minhas desculpas ao meu pequeno filho pelos dias, horas, minutos e segundos em que estive ausente. A Ele dedico inteiramente este pequeno pedaço da minha vida. Contigo tudo faz sentido. A ti Gonçalo!

Índice Geral

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 EFEITO DA DIABETES MELLITUS NO METABOLISMO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....	5
2.2 PAPEL DAS MITOCÔNDRIAS NA HOMEOSTASIA CELULAR NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	7
2.3 ADAPTAÇÕES MITOCONDRIAS AO TREINO DE ENDURANCE.....	10
2.3.4.1 Treino e Stress oxidativo.....	19
2.3.4.2 Adaptações Antioxidantes	23
2.4 EFEITOS DO EXERCÍCIO NA FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL MUSCULAR DIABÉTICA.....	33
3. DEFINIÇÃO DO PROBLEMA E OBJECTIVOS.....	38
3.1 OBJECTIVOS GERAIS.....	38
3.2 OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	39
4.2 INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DIABETES INDUZIDA POR STREPTOZOTOCINA (STZ)	39
4.3 AVALIAÇÃO DA GLICÉMIA E DA HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1C)	40
4.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	40
4.5 TREINO DE ENDURANCE	40
4.6 ISOLAMENTO DAS MITOCÔNDRIAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	41
4.7 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL	42
4.8 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	43
4.9 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	44
5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	45
5.1 ADAPTAÇÕES INDUZIDAS PELO TREINO DE ENDURANCE NO PESO MUSCULAR, PESO CORPORAL, GLICÉMIA E HbA1C.....	45
5.2 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE NA ACTIVIDADE RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	46
5.3 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	49
5.4 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE NA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA ANTI-OXIDANTE	52
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	55
7. CONCLUSÕES	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. EFEITO DO TREINO DE ENDURANCE NO CONTEÚDO DE ENZIMAS MITOCONDRIAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS. VALORES MÉDIOS E RESPECTIVO ERRO PADRÃO DA MÉDIA ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (ADAPTADO DE BROOKS, FAHEY ET AL. 2000)	15
TABELA 2. BREVE DESCRIÇÃO FUNCIONAL DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONSTITUINTES DA CTE (ADAPTADO DE MONTEIRO, OLIVEIRA ET AL. 2003)	20
TABELA 3. ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS (ADAPTADO DE POWERS AND SEN 2000)	24
TABELA 4: ORGANIZAÇÃO METODOLÓGICA DO PROTOCOLO DE TREINO DE ENDURANCE	41
TABELA 5. EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE E DO TRATAMENTO COM STZ NO PESO (RELATIVO E TOTAL) MUSCULAR E CORPORAL DO RATO, CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE GLUCOSE SANGÜÍNEA E PERCENTAGEM DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA.	46
TABELA 6 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE E DO TRATAMENTO COM STZ NOS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS (ESTADO 3, ESTADO 4, RCR E ADP/O), DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DO MÚSCULO <i>GASTROCNEMIUS</i> DE RATOS, ENERGIZADAS COM MALATO E PIRUVATO	46
TABELA 7 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE E DO TRATAMENTO COM STZ NOS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS (ESTADO 3, ESTADO 4, RCR E ADP/O), DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DO MÚSCULO <i>GASTROCNEMIUS</i> DE RATOS, ENERGIZADAS COM SUCCINATO E ROTENONA	47
TABELA 8 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE E DO TRATAMENTO COM STZ NAS FLUTUAÇÕES DO POTENCIAL TRANSMEMBRANAR MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$) DO MUSCULO <i>GASTROCNEMIUS</i> COM ENERGIZAÇÃO DE MALATO E PIRUVATO	49
TABELA 9 EFEITOS DO TREINO DE ENDURANCE E DO TRATAMENTO COM STZ NAS FLUTUAÇÕES DO POTENCIAL TRANSMEMBRANAR MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$) DO MUSCULO <i>GASTROCNEMIUS</i> COM ENERGIZAÇÃO DE SUCCINATO E ROTENONA.	50
TABELA 10 EFEITO DO TREINO DE ENDURANCE E DO TRATAMENTO COM STZ NA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX), GLUTATIONA REDUTASE (GR) E O ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (TAS), NO HOMOGENATO DO MÚSCULO <i>GASTROCNEMIUS</i>	52
TABELA 11. SUBSTRATOS E INIBIDORES DOS COMPLEXOS DA CTE (ADAPTADO DE FONTAINE, ERIKSSON ET AL. 1998; MONTEIRO, OLIVEIRA ET AL. 2003).	59

Resumo

Alguns estudos demonstram uma relação entre a condição de hiperglicémia e a disfunção mitocondrial no músculo esquelético diabético. Por outro lado, o treino de endurance (TE) permite a melhoria da função mitocondrial.

Objectivo: Analizar *in vitro* a função mitocondrial do músculo *gastrocnemius* de animais com hiperglicémia severa e prolongada, induzida pela administração de streptozotocina (STZ), com especial relevo nos parâmetros respiratórios associados ao consumo de oxigénio (O_2) e ao potencial de membrana ($\Delta\Psi$).

Métodos: Vinte e quatro ratos Wistar adultos machos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=6 por grupo): sedentários (Sed), diabéticos sedentários (STZ; submetidos a uma única dose, intraperitonealmente, 50 mg/Kg.), treinados (T; 14 semanas em tapete rolante motorizado, 60 min/dia, 25 metros/min) e diabéticos treinados (TSTZ). Dezoito semanas após a injeção de STZ, foram realizados ensaios para a avaliação *in vitro* de parâmetros de consumo de O_2 e de $\Delta\Psi$ em mitocôndrias isoladas, utilizando substratos para o complexo I e II (malato + piruvato e succinato, respectivamente). Foram também determinadas as actividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e o status antioxidante total no homogeneizado de músculo *gastrocnemius*. **Resultados:** A condição de hiperglicémia prolongada induziu uma diminuição do rácio de control respiratório (RCR) e um aumento da taxa de respiração em estado 4 (malato+piruvato), tendo também ocorrido um aumento do $\Delta\Psi$ com substratos endógenos ($p<0,05$). O TE reverteu, na generalidade, as alterações respiratórias induzidas pelo tratamento com STZ. Quando utilizados malato + piruvato, as mitocôndrias do grupo TSTZ apresentaram um RCR mais elevado e uma diminuição da taxa respiratória em estado 4 e da lag phase, quando comparadas com o grupo STZ ($p<0,05$). Com succinato, o treino de endurance aumentou o estado 3 e estado 4 no grupo TSTZ relativamente ao grupo STZ ($p<0,05$). Foi observado um aumento da actividade enzimática das enzimas antioxidantes SOD e GPx no grupo STZ vs. Sed ($p<0,05$). Contudo, verificou-se uma diminuição significativa na actividade destas enzimas entre os grupos STZ e TSTZ ($p<0,05$). **Conclusão:** A condição

de hiperglicemia severa e prolongada induzida pelo tratamento de STZ resultou em alterações na função mitocondrial as quais foram atenuadas ou revertidas pelo treino de endurance.

Palavras chave: Exercício; tolerância cruzada; hiperglicemia severa; bioenergética, respiração mitocondrial; potencial transmembranar; streptozotocina

Abstract

Some studies have shown a link between hyperglycaemia and mitochondrial dysfunction in diabetic skeletal muscle. On the other hand, endurance training (ET) is known to improve skeletal muscle mitochondrial function. **Purpose:** To analyse the effects of ET on *in vitro* skeletal muscle mitochondrial function in long-term diabetes induced by streptozotocin (STZ) administration, with special emphasis on respiratory and transmembrane potential ($\Delta\Psi$) endpoints. **Methods:** Adult male Wistar rats were randomly divided (n=6/group) into sedentary (Sed), sedentary STZ (single dose, 50 mg/kg, i.p.), endurance trained (T; 14 wk treadmill running, 60 min/day, 25m/min) and ET+STZ (TSTZ). Eighteen weeks after STZ injection, isolated mitochondria from *gastrocnemius* muscle were used for *in vitro* assessment of oxygen consumption and $\Delta\Psi$ endpoints using complex I and II-linked substrates (malate+pyruvate and succinate, respectively). The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and the total antioxidant status (TAS) were also determined in *gastrocnemius* muscle homogenate. **Results:** Long term hyperglycemia decreased *gastrocnemius* mitochondrial respiratory control ratio (RCR) and increased respiratory rate in state 4 (malate+pyruvate); it also increased $\Delta\Psi$ with endogenous substrates. ET resulted in a general reestablishment of respiratory impairments caused by STZ treatment ($p<0,05$). When complex I-linked substrates were used, mitochondria from TSTZ group presented an increased RCR and lag phase and decreased state 4 when compared with STZ group ($p<0,05$). With complex II-linked substrates, ET increased state 3 and state 4 in TSTZ compared with STZ ($p<0,05$). There was an increase in SOD and GPx activities caused by STZ treatment in sedentary animals, although decreasing significantly in TSTZ but even higher than Sed group ($p<0,05$). **Conclusion:** STZ induced-severe and prolonged diabetes resulted in impairments on mitochondrial function, which were attenuated or reverted by ET.

Palavras chave: Exercise; cross-tolerance; severe hiperglicemia; bioenergetic, mitochondrial respiration; transmembrane potential, streptozotocin

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADP	Adenosina difosfato
Tim	Translocase da membrana interna
ADP/O	Rácio entre o ADP fosforilado e o oxigénio consumido
AIF	Factor indutor de apoptose
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Adenosina monofosfato quinase
ANT	Translocase de nucleótidos de adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro de boi
Ca ²⁺	Ião cálcio
CAT	Catalase
CK	Creatina quinase
CTE	Cadeia transportadora de electrões
CuZnSOD	Isoforma citosólica da superóxido dismutase
D	Dia
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERON	Espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo oxidado
FADH ₂	Dinucleótido de adenina flavina reduzido
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa reduzida
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HSP70	Proteínas de choque térmico de 70 Kilodaltons
IMF	Mitocôndrias intermiofibrilares
m	Metros
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
Mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
MnSOD	Isoforma mitocondrial da superóxido dismutase
PTP	Poro de permeabilidade transitória
MSF	Factor de estimulação de importação mitocondrial
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
NFkB	Factor nuclear kB

nM	Nanomolar
NRF1	Factor respiratório nuclear 1
NRF2	Factor respiratório nuclear 2
O ₂	Oxigénio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
°C	Graus célcus
PGC -1	Peroxisome proliferator-activated receptor
RCR	Rácio de controlo respiratório
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
s	Segundo
Sed	Sedentários
SOD	Superóxido dismutase
SS	Mitocôndrias subsarcolemas
T	Treinados
Tfam	Factor de transcrição mitocondrial A
TNF	Factor de necrose tumoral
Tom	Translocase da membrana externa
TPP+	Tetrafenilfosfónio
UCP	Proteínas desacopladoras
VDAC	Canal iónico dependente de voltagem
Vo _{2 máx}	Consumo máximo de oxigénio
ΔμH ⁺	Diferença de potencial químico
Δψ	Diferença de potencial eléctrico
μL	Microlitro
μM	Micromolar

1. Introdução

A *Diabetes Mellitus* é uma doença metabólica caracterizada principalmente por uma elevação da concentração sanguínea da glicose, resultante de defeitos na secreção e/ou na acção da insulina (Saltiel e Kahn 2001). A diabetes é um factor de risco implicado no desenvolvimento de diversas doenças crónicas e na mortalidade prematura, sendo considerada uma das doenças degenerativas mais comuns, apresentando uma elevada prevalência a nível mundial (Nigro et al. 2006). O paciente diabético apresenta uma maior susceptibilidade a uma variedade de complicações incluindo a retinopatia, nefropatia, complicações microvasculares e cardiovasculares, as quais afectam seriamente a sua saúde e qualidade de vida (Crimi et al. 1995). Deste modo, esta doença revela ser um grave problema com proporções epidémicas e, constitui uma séria ameaça à saúde pública mundial. Foi estimado que o número de pessoas afectadas por esta patologia irá aumentar de 135 milhões em 1995 para 300 milhões em 2025 (King et al. 1998).

A homeostase da glucose no organismo depende do balanço entre a sua produção, que ocorre predominantemente no fígado e, a sua utilização, podendo este processo decorrer em tecidos dependentes da acção da insulina (músculo e tecido adiposo) ou em tecidos não dependentes da acção da insulina (cérebro, rins, eritrócitos) (Kahn 1994).

No músculo esquelético a contracção muscular é um fenómeno que requer uma produção constante de ATP por diversas vias sendo a oxidação mitocondrial de substratos (glucose, lípidos, proteínas) a mais importante. A incapacidade deste tecido utilizar correctamente os seus substratos aparenta ser um importante aspecto em estados de hiperglicémia (Goodpaster e Wolf

2004). Efectivamente a capacidade oxidativa do músculo esquelético está profundamente dependente da função mitocondrial e parece relacionar-se directamente com a sensibilidade deste tecido à insulina (Simoneau e Kelley 1997). Deste modo, a fisiopatologia da diabetes está fortemente associada a uma variedade de alterações funcionais, bioquímicas e morfológicas das mitocôndrias (Kelley et al. 2002). Estas alterações são visíveis em condições de hiperglicémia severa típica da diabetes tipo I, bem como em condições de hiperglicémia associada à insulino-resistência (Bonnard et al. 2008). Geralmente, compreendem um aumento da formação de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio (ERON) e uma diminuição da metabolização lipídica e da densidade mitocondrial (para refs ver Lumini et al. 2008).

Várias têm sido as estratégias preventivas e terapêuticas utilizadas contra esta condição, que compreendem acções farmacológicas e não farmacológicas ocupando o exercício físico um lugar de destaque neste último grupo. De facto, o exercício físico pode ser encarado como uma estratégia preventiva e/ou terapêutica contra múltiplas patologias em geral e, contra a diabetes em particular, sendo recomendado no seu controlo e prevenção (Henriksen 2002). Os efeitos benéficos deste tipo de intervenção na condição diabética englobam, em termos gerais, uma melhoria do transporte de glucose no músculo esquelético e tecido adiposo, bem como um aumento da sensibilidade à acção da insulina (Henriksen 2002).

Adicionalmente, o músculo esquelético é um tecido que possui uma plasticidade marcável em resposta a condições fisiológicas e patofisiológicas (Fluck e Hoppeler 2003). A um nível estrutural a plasticidade do músculo esquelético envolve modificações dos compartimentos celulares (mitocôndrias,

miofibrilas, etc) e extracelulares (vasos capilares, nervos, tecido conectivo) (Fluck e Hoppeler 2003).

As adaptações mitocondriais induzidas pela actividade contráctil são altamente específicas e dependentes do tipo de exercício (força ou endurance), sua duração, intensidade e frequência (Hoppeler e Fluck 2002). O treino de endurance tem sido um dos modelos adoptados para explorar a resposta adaptativa das mitocôndrias, podendo induzir alterações significativas nas características morfológicas, bioquímicas e funcionais das mitocôndrias musculares (Hoppeler et al. 1985). Vários são os estudos que implicam o treino de endurance na melhoria dos efeitos deletérios induzidos por diversas condições patológicas (para refs ver Starnes et al. 2007; Powers et al. 2008). Deste modo, existem fortes evidências que o exercício físico crónico, nomeadamente o treino de endurance, pode reverter e/ou atenuar as alterações nas densidades e tamanho mitocondrial, bem como no comprometimento da funcionalidade mitocondrial de que é exemplo a diminuição da actividade dos complexos da cadeia transportadora de electrões (CTE) e de todo o sistema fosforilativo, induzidas por esta patologia (Mokhtar et al. 1993).

Assim sendo, uma vez que na etiologia e/ou fisiopatologia da diabetes, a disfunção mitocondrial muscular esquelética se encontra implicada e, reconhecendo a acção modeladora do treino de endurance na referida condição patológica, pretendemos com este estudo analisar o efeito de 14 semanas de treino de endurance realizado em tapete rolante, na função de mitocôndrias isoladas do músculo *gastrocnemius* de animais com hiperglicémia severa e prolongada, induzida pela administração de STZ. Serão avaliados os

parâmetros associados ao consumo de oxigénio e ao $\Delta\Psi$ mitocondriais, assim como, a actividade de algumas enzimas antioxidantes e o status antioxidante total do músculo *gastrocnemius*.

2. Revisão da Literatura

2.1 Efeito da Diabetes Mellitus no metabolismo muscular esquelético

O metabolismo muscular tem por base a utilização eficiente dos carboidratos, proteínas e lípidos, consoante os estímulos e as necessidades energéticas. A glucose necessária ao músculo esquelético, provém de duas fontes: glucose sanguínea e glicogénio muscular (glicogenólise). O glicogénio é a maior fonte de armazenamento de energia no músculo e fígado: o glicogénio hepático representa o reservatório de glucose para todo o organismo (incluindo o músculo) enquanto que o glicogénio muscular serve apenas de reservatório para este tecido. Tanto a síntese como a degradação do glicogénio são reguladas por controlo hormonal que influencia a acção de duas enzimas: glicogénio sintetase e glicogénio fosforilase. A síntese de glicogénio é controlada, principalmente, pelas catecolaminas e insulina (Yeaman et al. 2001). As principais acções metabólicas da insulina são a estimulação do transporte de glucose para o músculo esquelético e coração e, a supressão de produção de glucose (gluconeogénese) e de lipoproteínas de muito baixa densidade no fígado. O transporte de glucose e o subsequente armazenamento em glicogénio, são factores cruciais para o controlo da homeostasia energética no músculo esquelético (Yeaman et al. 2001). A insulina exerce estes efeitos através de duas acções: translocação do transportador de glucose insulino-dependente (GLUT4) para a membrana plasmática (Holman e Kasuga 1997), resultando num aumento do transporte de glucose para o interior da célula e, a desfosforilação e activação da glicogénio sintetase (Cohen 1993). Outras accções metabólicas desta hormona incluem a

inibição da libertação de glucose do fígado, a inibição da libertação de ácidos gordos livres do tecido adiposo e a estimulação da síntese proteica.

A *Diabetes Mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por um estado de hiperglicémia, que resultam de deficiências na utilização da glicose como substrato energético. No que diz respeito ao músculo esquelético, a incapacidade deste órgão utilizar correctamente os seus substratos aparenta ser um importante aspecto em estados de hiperglicémia (Goodpaster e Wolf 2004). Um dos substratos frequentemente utilizado como uma importante fonte de energia para o músculo esquelético são os ácidos gordos livres (Guo 2007). No músculo esquelético existe uma competição entre substratos energéticos caracterizada principalmente, pela utilização de glucose ou de ácidos gordos consoante as necessidades e/ou estímulos (Randle et al. 1963). Esta competição é uma das hipóteses estudadas para explicar, pelo menos parcialmente, o decréscimo do fluxo metabólico dos carboidratos (produção de energia a partir da glucose) regularmente observado na diabetes mellitus. Este decréscimo metabólico, característico da condição de hiperglicémia, está por sua vez associado a um aumento das concentrações de ácidos gordos livres e, conseqüentemente a um aumento da preponderância do metabolismo lipídico (Felber et al. 1987). Em estados de hiperglicémia, o aumento da acumulação dos lípidos no músculo esquelético pode ocorrer primariamente quer pelo aumento da captação de ácidos gordos livres, quer por uma diminuição da oxidação mitocondrial dos mesmos (Bonen et al. 1998; Goodpaster e Wolf 2004). Uma característica única da diabetes mellitus não controlada é o decréscimo do peso corporal e uma marcada atrofia muscular. A perda real de proteína resulta não só de um aumento da protéolise como

também de uma diminuição da sua síntese (Grzelkowska et al. 1999). Como consequência, a concentração de aminoácidos dentro da célula muscular aumenta. A nível celular, a disponibilidade de substratos para a produção de energia, tais como ácidos gordos livres e aminoácidos, aparentam ter um papel muito importante na modulação da resposta da insulina neste órgão (Patti 1999), principalmente na captação de glucose. No entanto, existe muita controvérsia sobre o real papel dos aminoácidos na homeostase da glucose (Krebs et al. 2002).

Uma vez que as mitocôndrias se apresentam como um organelo fundamental no metabolismo energético muscular em geral e, revelam-se de crucial importância nos processos bioenergéticos do músculo esquelético de sujeitos em condições de hiperglicémia em particular, o sub-capítulo seguinte pretende analisar o seu papel extremamente plástico enquanto organelos na homeostase muscular.

2.2 Papel das mitocôndrias na homeostasia celular no músculo esquelético

A contracção muscular é um processo que requer uma produção constante de ATP a partir de várias fontes, incluindo a oxidação mitocondrial de substratos.

As mitocôndrias desempenham um papel preponderante no processo de produção de ATP através da fosforilação oxidativa. A fosforilação oxidativa ocorre na membrana mitocondrial interna, em contraste com a maior parte das reacções do ciclo do ácido cítrico e da oxidação dos ácidos gordos, que ocorrem na matriz (Fariss et al. 2005).

A produção mitocondrial de ATP depende do estabelecimento de um fluxo de electrões, que atravessa uma série de complexos moleculares da membrana

interna mitocondrial, conhecidos como a cadeia transportadora de electrões (CTE). Como resultado desta transferência de electrões, os protões são transferidos da membrana interna para o espaço intermembranar produzindo o $\Delta\psi$. O ATP é sintetizado quando se dá a reentrada dos protões para a matriz, através de um complexo enzimático conhecido como ATP sintetase. O princípio de conservação de energia na mitocondria (acima referido) leva à formação de um elevado gradiente electroquímico de iões H^+ , que pode ser utilizado pelo complexo enzimático ATP sintetase para promover a fosforilação do ADP (Duchen 2000; Rizzuto et al. 2000). Três das principais funções mitocondriais, geração de ATP, captação e armazenamento de cálcio (Ca^{2+}) e, a geração e destoxificação de ERON, são controladas pelo $\Delta\psi$ (Nicholls 2004). Estudos estruturais sobre o componente F0 da ATP sintetase indicam que o potencial de membrana é responsável pela rotação da sub-unidade F1 necessária à produção de ATP (Stock et al. 1999).

A capacidade das mitocôndrias moverem rapidamente o Ca^{2+} através das suas membranas é um postulado antigo da biologia celular e bioenergética (Rizzuto e Pozzan 2006). Face ao estímulo do Ca^{2+} a actividade mitocondrial poderá estar alterada. De facto, a quantidade, forma e distribuição de mitocôndrias nas células varia, pelo menos em parte, consoante a resposta dos organelos ao estímulo deste ião (Houten e Auwerx 2004), sendo controlada por várias vias de sinalização (Pinton et al. 2004). Outra das funções relevantes do ião cálcio é a sua influência no ciclo do ácido tricarboxílico (Rizzuto e Pozzan 2006). Três das enzimas metabólicas chave do ciclo do ácido tricarboxílico (piruvato desidrogenase, alfa-cetoglutarato desidrogenase e isocitrato desidrogenase) são activadas através de diferentes mecanismos: desfosforilação (piruvato

desidrogenase) e ligação directa deste ião ao complexo enzimático (alfacetoglutarato e isocitrato desidrogenases) (Hansford 1994). Por outro lado, a sobrecarga mitocondrial de cálcio e/ou a acção combinada de agentes apoptóticos ou condições fisiopatológicas (Jacobson e Duchon 2002) podem induzir profundas alterações na estrutura e funcionalidade mitocondriais (Pinton et al. 2001), podendo mesmo activar processos de morte celular através da apoptose e/ou necrose.

Para além da produção de ATP, as mitocôndrias são o principal local de produção de ERON. Estes produtos têm um tempo de semi-vida curto e, interagem rapidamente com DNA, proteínas e lípidos, levando a danos oxidativos que originam o chamado stress oxidativo. A desintegração dos constituintes lipídicos e proteicos pode comprometer os processos bioenergéticos mitocondriais e, já foi reconhecida como uma das causas do dano celular provocado por vários estímulos, incluindo o exercício (Primeau et al. 2002).

Uma alteração da integridade mitocondrial pode levar a uma redução da função muscular (Ascensao e Magalhaes 2006). Durante o exercício físico, o aumento da necessidade de ATP e, conseqüentemente, o aumento do transporte de electrões através da cadeia transportadora constituem as causas de fuga de electrões isolados, com uma redução univalente da molécula de O_2 originando o aumento da formação de espécies reactivas (para refs. ver Ascensao e Magalhaes 2006). Apesar da produção de energia ser uma das mais importantes funções mitocondriais, estes organelos podem participar no processo apoptótico e necrótico da morte celular (Green e Kroemer 2004). Deste modo, uma série de acontecimentos relacionados com as mitocôndrias

estão na base da morte celular (Petrosillo et al. 2004; Napier et al. 2005): alterações da permeabilidade mitocondrial; declínio do sistema de fosforilação oxidativa; aumento das concentrações de ião Ca^{2+} livre (acima referido) e ião ferroso; dano oxidativo dos principais constituintes e macromoléculas.

Tendo em conta que o exercício actua como um estímulo relevante para bioenergética mitocondrial e que este organelo revela uma considerável plasticidade em resposta à actividade contráctil, pretende-se com o sub-capítulo seguinte descrever e analisar algumas adaptações clássicas da rede mitocondrial ao treino de endurance.

2.3 Adaptações Mitocondriais ao Treino de Endurance

A estrutura e função do músculo esquelético pode ser alterada através de estímulos que, implicam a realização de actividade contráctil (treino de endurance, estimulação eléctrica), alteram os níveis de carga sobre os músculos (treino de força, microgravidade), influenciam o fornecimento de substratos (intervenção nutricional) ou simplesmente através de factores ambientais como a hipóxia e o choque térmico. A maleabilidade deste tecido é uma importante característica que permite evidenciar uma resposta adaptativa face a diferentes situações (Hoppeler e Fluck 2002).

O músculo esquelético exhibe uma adaptação marcável em resposta a condições fisiológicas e patofisiológicas. As adaptações mitocondriais induzidas pela actividade contráctil são altamente específicas e dependentes do tipo de exercício (força ou endurance) bem como da sua duração, intensidade e frequência. O treino de endurance tem sido um dos modelos adoptados para explorar a resposta adaptativa das mitocôndrias podendo

induzir alterações significativas nas características mitocondriais musculares esqueléticas. Essas características fenotípicas poderão ser analisadas pela expressão da sua morfologia, bioquímica e função.

2.3.1 Adaptações Morfológicas

O trabalho pioneiro de Jonh Holloszy (Holloszy 1967) mostrou que o treino de endurance pode aumentar o conteúdo mitocondrial do músculo esquelético, resultando numa melhoria da performance. O treino de endurance, com uma duração e frequência apropriadas, pode produzir um aumento do conteúdo mitocondrial, variando de 50 a 100% durante 6 semanas (Hood 2001). Em alguns estudos realizados constatou-se que a densidade total mitocondrial aumentava após o treino de endurance (Hoppeler et al. 1985). Estes dados são concordantes com o facto que somente uma pequena fracção do volume total de músculo é influenciada pelo estímulo referido e, que as mitocôndrias são o organelo que melhor se adapta à mesma condição (Hoppeler et al. 1985; Saltin 1986). As mitocôndrias do músculo esquelético constituem um complexo ramificado, formando uma rede reticular que varia em tamanho, forma e complexidade (Benard e Rossignol 2008). Este facto revela que a densidade numérica mitocondrial, por si só, pode não ser um parâmetro relevante para estimar o aumento da massa mitocondrial induzido pelo exercício de endurance crónico (Hoppeler e Fluck 2003).

O conteúdo mitocondrial pode ser medido directamente, utilizando estimativas morfológicas do volume do organelo em relação ao volume celular total, ou indirectamente através da alteração da actividade máxima de enzimas (como por exemplo, a citrato sintetase) ou, através da alteração do conteúdo em

citocromo c (Terjung 1979). Isto só é possível devido ao facto de alterações no volume mitocondrial serem paralelas às alterações na velocidade de actividades enzimáticas (Reichmann et al. 1985). O doseamento de proteínas específicas e/ou actividades enzimáticas podem ser úteis na determinação do *turnover* mitocondrial, desde que a função destas proteínas caracterize o estado global do organelo. O doseamento de certos marcadores proteicos como por exemplo, o citocromo c ou o doseamento da actividade de citocromo c oxidase, têm sido utilizados para provar que o conteúdo mitocondrial está alterado em resposta a programas de treino de endurance (Hoppeler 1986).

No músculo esquelético existem duas subfracções mitocondriais morfologicamente distintas, localizadas em regiões diferentes da fibra muscular: a sub-fracção subsarcolemal (SS) localizada nas proximidades da membrana sarcolemal e a sub-fracção intermiofibrilar (IMF) localizada entre as miofibrilas. Existe uma forte evidência que o treino de endurance induz um aumento em maior proporção do volume da sub-fracção subsarcolemal mitocondrial SS em relação ao volume da sub-fracção IMF (Roussel et al. 2000). Este facto pode ser explicado pelas diferenças estruturais (proteínas e lípidos), funcionais (respiração) e bioquímicas entre as duas fracções mitocondriais. As diferenças mencionadas determinam decisivamente a capacidade adaptativa específica destas duas fracções face ao estímulo do treino de endurance (Ljubicic et al. 2004).

2.3.2 Adaptações Metabólicas

No início da actividade contráctil, induzida pelo treino, um número de eventos rápidos (processos de sinalização) iniciam a síntese de proteínas e lípidos. Estes incluem o fluxo de cálcio, o turnover de ATP e a estimulação do consumo de oxigénio no interior das células musculares. No músculo esquelético o Ca^{2+} desempenha um papel preponderante, quer na contracção muscular, quer actuando como segundo mensageiro de sinais intracelulares capazes de alterar a expressão genética. Existe uma forte evidência que alterações no cálcio intracelular e no *turnover* de nucleótidos de adenina podem funcionar como os principais desencadeadores de activação de cascatas de sinalização responsáveis pela expressão genética (Adhihetty et al. 2003). Elevações na concentração de Ca^{2+} intracelular podem resultar da activação de proteínas cinases ou fosfatases, entre as quais, a proteína cinase dependente de calmodulina, a proteína cinase C e a calcineurina (Hood 2001). Aparentemente as elevações deste catião medeiam apenas parcialmente as alterações que ocorrem durante a actividade contráctil, sendo englobadas num mecanismo complexo de sinalização que envolve a enzima AMPK (Putman et al. 2003).

A cascata do AMPK é activada pelo stress celular que reduz o rácio ATP/ADP e aumenta o AMP como resultado da actividade da miocinase. Isto pode acontecer inibindo a produção de ATP ou acelerando o seu consumo. O aumento do *turnover* de ATP resulta sobretudo de uma diminuição do rácio ATP/ADP livre e do aumento do metabolismo muscular (Adhihetty et al. 2003). Estas alterações induzidas pelo treino, acompanhadas pela estimulação de outras vias de sinalização, irão originar uma resposta adaptativa metabólica do músculo esquelético.

Os benefícios fisiológicos das adaptações mitocondriais no músculo, para a mesma intensidade de exercício, consistem numa alteração da preferência metabólica, com um aumento da utilização dos lípidos em vez dos carboidratos. Como consequência destas adaptações do músculo esquelético em resposta ao exercício de endurance, mais concretamente ao treino sistemático, parece verificar-se uma redução da depleção de glicogénio, concomitantemente ao aumento da preponderância da oxidação lipídica, bem como uma redução dos níveis musculares e sanguíneos de lactato (Horowitz e Klein 2000). Este modelo de treino aumenta o conteúdo lipídico da célula muscular contribuindo deste modo para o aumento da utilização deste substrato como fonte energética (van Loon et al. 2001). Estas adaptações parecem decorrer não só do aumento da densidade mitocondrial e capilar (Hoppeler et al. 1985a), como também do resultado das adaptações enzimáticas mitocondriais (Holloszy e Coyle 1984). Deste modo, o aumento na capacidade respiratória do músculo esquelético parece desempenhar um papel crucial na melhoria da performance induzida pelo treino de endurance (Constable et al. 1987; Dudley et al. 1987). Foi demonstrado também que o conteúdo mitocondrial enzimático, nomeadamente de enzimas envolvidas na função respiratória, aumenta após o estímulo do treino de endurance. Como demonstrado na tabela 1 o conteúdo mitocondrial de enzimas do ciclo de Krebs e, alguns constituintes da CTE, pode aumentar mesmo para o dobro após o referido estímulo.

Tabela 1. Efeito do treino de endurance no conteúdo de enzimas mitocondriais do músculo esquelético de ratos. Valores médios e respectivo erro padrão da média ($X \pm \text{SEM}$) (adaptado de Brooks et al. 2000)

Efeitos do treino de endurance no conteúdo proteico de enzimas mitocondriais do músculo esquelético de ratos (mg.g⁻¹)		
Enzimas	Grupo Exercitado^a	Grupo Controlo
Piruvato-malato oxidase	25.1 $\pm$ 1.2	15.5 $\pm$ 0.7
Succinato oxidase	43.6 $\pm$ 2.1	20.1 $\pm$ 1.0
Carnitina palmitoil oxidase	50.4 $\pm$ 4.7	21.1 $\pm$ 2.6
Citocromo oxidase	38.3 $\pm$ 1.8	19.2 $\pm$ 0.8
Succinato desidrogenase	30.9 $\pm$ 1.8	14.9 $\pm$ 0.8
NADH desidrogenase	27.9 $\pm$ 1.7	17.5 $\pm$ 0.8
Colina desidrogenase	55.7 $\pm$ 3.8	25.9 $\pm$ 1.7
Citocromo c (+c1)	31.6 $\pm$ 1.2	16.2 $\pm$ 0.6
Citocromo a	36.5 $\pm$ 1.6	18.2 $\pm$ 0.7

^a Os valores encontrados para o grupo exercitado são significativamente superiores relativamente aos do grupo controlo ($P < 0.01$)

2.3.3 Biogénese Mitocondrial

A actividade contráctil do músculo pode induzir adaptações na célula muscular através do aumento da rede reticular mitocondrial, num processo conhecido por biogénese mitocondrial. Esta resposta adaptativa é caracterizada por uma complexa interacção entre os genomas mitocondrial e nuclear (Hood et al. 2003).

A actividade contráctil produz uma multiplicidade de eventos de transdução de sinais intracelulares, que por sua vez podem levar à biogénese mitocondrial através da alteração da velocidade dos processos moleculares, tais como, activação da transcrição proteica, estabilidade do mRNA, modificação proteica pós-translacional e/ou alteração da velocidade dos processos de formação de complexos proteicos (Hood et al. 2003).

Um dos sinais que, supostamente, poderá iniciar a biogénese mitocondrial é o desacoplamento mitocondrial (Rossmeisl et al. 2002). Este processo é

caracterizado pela dissipação do gradiente electroquímico ao longo da membrana interna, levando a uma diminuição da produção de ATP através de uma diminuição da actividade da ATP sintetase. Nestas condições o transporte de electrões é acelerado de modo a compensar a diminuição da concentração de ATP celular. A actividade contráctil induz, de maneira semelhante, um distúrbio metabólico através do aumento da necessidade de ATP, obrigando a um aumento do reservatório de ATP mitocondrial (Hood et al. 2003).

A activação da expressão genética aparenta ser o principal mecanismo para a acumulação de microadaptações pós-transcricionais responsáveis pela subsequente adaptação estrutural e bioquímica das mitocôndrias no músculo esquelético, face ao treino de endurance (Fluck e Hoppeler 2003). O genoma nuclear codifica a maioria das proteínas mitocondriais, incluindo sub-unidades proteicas constituintes do sistema respiratório e, todas as proteínas necessárias à transcrição, translação e replicação mitocondrial, sendo apenas 13 proteínas integrantes da CTE codificadas pelo genoma mitocondrial (Poyton e McEwen 1996; Scarpulla 2002). Deste modo, as proteínas codificadas por genes nucleares, bem como os fosfolípidos, deverão ser sintetizadas no citosol, importadas para a mitocôndria e incorporadas nos seus locais habituais, de modo a manter a normalidade do processo de biogénese mitocondrial (Hood 2001a). Por este facto, a expressão proteica, nuclear ou mitocondrial, necessita uma intensa coordenação (Puntschart et al. 1995).

O treino de endurance induz um aumento na transcrição dos genes nucleares, evidenciado através de um aumento no nível dos respectivos RNAm (Puntschart et al. 1995). Nos genes mitocondriais a velocidade de transcrição é inalterada, fazendo com que a proporção entre o RNA e DNA mitocondrial

permaneça constante (Fluck e Hoppeler 2003). Esta propriedade só é alcançada uma vez que o treino de endurance induz um aumento do factor de transcrição mitocondrial (Tfam) ao mesmo tempo que, aumenta a expressão das proteínas mitocondriais codificadas por ambos os genomas (Fluck e Hoppeler 2003). Por outro lado, foi documentado que se verifica igualmente um aumento transiente do factor respiratório nuclear (NRF) 1 e 2 concomitantemente ao aumento do Tfam (Bengtsson et al. 2001; Gordon et al. 2001). Deste modo, a expressão transiente do NRF pode também ser um factor importante na coordenação da transcrição dos dois genomas, no processo de biogénese mitocondrial do músculo esquelético exercitado. A descoberta de um coactivador de factores de transcrição denominado *PGC-1 alfa* (PGC1- α) evidenciou ser importantíssimo na regulação da biogénese mitocondrial muscular (Wu et al. 1999). A expressão deste coactivador tem a capacidade de determinar e modular a expressão de proteínas através da sua forte acção sobre o NRF1 que, por sua vez, actua na expressão de proteínas mitocondriais, incluindo o Tfam (Adhihetty et al. 2003).

Uma vez que a maior parte das proteínas são codificadas no núcleo e sintetizadas no citosol, existe um mecanismo de importação para o interior da mitocôndria. As alterações mitocondriais originadas a partir do treino incluem, entre outras, um aumento da expressão de proteínas de importação (Gordon et al. 2001). Os precursores destas proteínas são mantidos numa conformação compatível com o processo de importação através de *chaperones*. Nos mais referidos encontram-se a proteína de choque térmico citosólico 70 KDa (Hsp70) e o factor estimulante de importação mitocondrial (MSF). Posteriormente, as proteínas precursoras são importadas do citoplasma para o

espaço intermembranar através de uma translocase da membrana externa (complexo Tom) e, do espaço intermembranar para a matriz através de uma translocase da membrana interna (complexo Tim) (Hood et al. 2003; Hood e Joseph 2004).

As translocases Tom e Tim, juntamente com os *chaperones* localizados no citosol e cardiolipina (fosfolípido da membrana interna), parecem possuir um papel fundamental na translocação de proteínas. Porém, para uma efectiva importação de proteínas para a matrix mitocondrial parece ser fundamental: i) a presença de um potencial de membrana interna negativo de modo a atrair carga positiva para o interior da matrix e ii) a disponibilidade de concentrações apropriadas de ATP tanto ao nível do citosol como da matrix (Takahashi e Hood 1996).

O exercício de endurance crónico parece induzir um aumento na expressão de alguns componentes do mecanismo de importação proteico (Takahashi et al. 1998). Este incremento parece ser consistente com o aumento da taxa de translocação de proteínas nas mitocôndrias do músculo esquelético. O aumento destes componentes parecem incluir MSF, HSP70, HSP60 e Tom20 (Ornatsky et al. 1995; Takahashi et al. 1998; Hood et al. 2002). Neste sentido, parecem existir evidências que o exercício de endurance acelera a capacidade de importação de proteínas mitocondriais. Além disso, a regulação do conteúdo da cardiolipina induzida pelo exercício parece ser determinante na estrutura reticular mitocondrial, na medida em que interfere com a taxa de importação proteica (Takahashi e Hood 1993).

Adicionalmente, parece existir uma associação entre a expressão do Lon P, uma proteína intramitocondrial ATP dependente que parece mediar processos

específicos de degradação promovendo uma correcta junção dos componentes mitocondriais e nucleares (Bota e Davies 2001), a capacidade máxima respiratória e o PGC-1 α em sujeitos com diferentes níveis de apetência aeróbia (Garnier et al. 2005). Este estudo parece sugerir que a degradação de alguns componentes proteicos poderá, também, participar na adaptação mitocondrial ao treino de endurance.

2.3.4 Treino, Stress Oxidativo e Adaptações Antioxidantes

2.3.4.1 Treino e Stress oxidativo

O stress oxidativo é definido por diversos fenómenos interrelacionados que incluem um aumento na formação de ERON e a danificação oxidativa dos constituintes celulares (Andreyev et al. 2005), acompanhado pela acção de vários sistemas antioxidantes capazes de neutralizar as acções deletérias destas moléculas. A verdadeira razão da etiologia do stress oxidativo não está somente na formação destas espécies reactivas mas sobretudo, no desequilíbrio entre a produção e os processos endógenos de neutralização. Contrariamente à ideia convencional de que as ERON apenas contribuem para lesar as estruturas biológicas, parece haver evidências de que ao nível fisiológico uma baixa, mas relevante concentração de ERON, pode regular uma variedade de mecanismos celulares (Nemoto et al. 2000; Cadenas 2004), incluindo a biogénese mitocondrial. De facto, estas moléculas desempenham um importante papel de sinalização celular na plasticidade muscular em geral e, na plasticidade mitocondrial em particular (Cadenas 2004).

As mitocôndrias, locais centrais das vias oxidativas metabólicas, são constituídas por vários transportadores redox que potencialmente podem

libertar univalentemente electrões para a molécula de oxigénio e convertê-la em anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (ver tabela 2).

Tabela 2. Breve descrição funcional dos complexos proteicos constituintes da CTE (adaptado de Monteiro et al. 2003)

Complexo	Função
I. NADH desidrogenase: Coenzima Q reductase	Tem a capacidade de oxidar o NADH. Bombeia prótons para o espaço intermembranar das mitocôndrias, contribuindo para o gradiente electroquímico de prótons e pode conduzir à geração de ERO (espécies reactivas de oxigénio).
II. Succinato desidrogenase: Ubiquinona reductase	Cataliza a oxidação do succinato em fumarato, com a formação de ubiquinol a partir da ubiquinona.
III. Ubiquinol: Citocromo c reductase	Através do ubiquinol e, ao mesmo tempo que ocorre a expulsão de um par de prótons, um electrão é transferido para o Citocromo c.
IV. Citocromo c oxidase	Reduz o O_2 a água e utiliza a energia produzida para bombear prótons.
V. F1F0: ATP sintase	O gradiente de prótons estabelecido pelos complexos anteriores é utilizado para a síntese de ATP.

Até 2 - 5% do oxigénio consumido através da respiração mitocondrial sofre uma redução de um electrão, principalmente nos locais correspondendo aos complexos I (NADH-coenzima Q), II (succinato desidrogenase) e III (coenzima QH₂-citocromo redutase), originando o radical superóxido e subsequentemente outras espécies reactivas como o peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo (Ascensao et al. 2005b).

Nas mitocôndrias os electrões são transferidos a partir do NADH e succinato para a espécie oxidada da coenzima Q, dando origem ao complexo reduzido (UQH₂), que transfere os electrões para o citocromo c oxidase. O citocromo c

pode ser, alternativamente, reduzido pela cadeia transportadora de electrões, ou superoxidado. Efectivamente algumas reacções de oxidação-redução na CTE podem estar na origem da destoxificação de $O_2^{\cdot -}$ via redução do citocromo c (Pereverzev et al. 2003).

Uma vez que o fluxo de electrões através da CTE aumenta durante o exercício é de esperar que o aumento do metabolismo aeróbio actue como uma das causas principais de alterações oxi-redutoras a nível mitocondrial (para refs ver Ascensao e Magalhaes 2006). A função contráctil do músculo esquelético é processada através de um alto custo energético que requer uma produção de ATP mitocondrial constante. Contudo, a alteração da integridade mitocondrial, em consequência do stress oxidativo, pode levar a uma redução da funcionalidade do músculo esquelético. A ruptura dos constituintes proteicos e lipídicos tem sido reconhecida como uma forma de lesão celular induzida por diversos estímulos incluindo o exercício e, pode comprometer a bioenergética a nível mitocondrial (Phaneuf e Leeuwenburgh 2001).

O treino pode diminuir ou aumentar os efeitos do stress oxidativo consoante a sua carga, especificidade e nível basal (Finaud et al. 2006). O exercício aeróbico geralmente é acompanhado por um aumento no consumo de oxigénio que pode aumentar a produção de ERON, como indicam vários estudos em animais e humanos (Liu et al. 1999; Mastaloudis et al. 2001; Vider et al. 2001; Palmer et al. 2003; Aguilo et al. 2005). De uma forma geral o aumento do metabolismo aeróbico no músculo esquelético está associado a um aumento na densidade da cadeia transportadora de electrões e consequentemente a um aumento da produção de ERON. Este fenómeno pode seriamente distorcer a homeostase celular se não for compensado, na mesma proporção, através do aumento da

capacidade antioxidante da célula (Tonkonogi et al. 2000b). A maior parte dos estudos demonstram que o treino de endurance reduz o stress oxidativo e o dano muscular, (Clarkson 1995; Leeuwenburgh et al. 1999; Radak et al. 1999; Miyazaki et al. 2001; Elosua et al. 2003), apesar de haver um aumento do consumo de oxigénio (aumento do VO_2 max) (Margaritis et al. 1997). Contudo, estes estudos não esclarecem se a diminuição observada foi devido a uma diminuição da produção de ERON ou, a um aumento da eficiência do sistema antioxidante.

Uma forma utilizada para estudar o stress oxidativo é a determinação da taxa de peroxidação da membrana lipídica ou dos ácidos gordos, induzida pelas ERON. A peroxidação lipídica origina a formação de vários produtos de oxidação entre os quais o malonildialdeído (MDA), que pode ser doseado directamente ou, indirectamente através da reacção com o ácido tiobarbitúrico, originando substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Por outro lado, as ERON podem também modificar as proteínas originando grupos carbonilos, sendo a sua determinação utilizada, também, para estimar o grau de indução de stress oxidativo. Em concordância ao que anteriormente foi referido, existem evidências que o treino de endurance pode diminuir os níveis de stress oxidativo no músculo esquelético tal como foi demonstrado pela diminuição dos níveis de TBARS (Frankiewicz-Jozko et al. 1996; Gul et al. 2002) e MDA (Alessio e Goldfarb 1988).

2.3.4.2 Adaptações Antioxidantes

As ERON, produzidas durante o estímulo de contracção, apresentam um papel importante na adaptação muscular ao stress oxidativo através da activação da transdução de sinais para a síntese de enzimas antioxidantes, sensíveis ao estado redox da célula (Allen e Tresini 2000). Estes mecanismos de sinalização, induzidos pelas ERON, podem ser vistos como uma maneira de modular a capacidade de defesa anti-oxidativa da célula muscular. O factor nuclear kB (NFkB) e a proteína MAPK são duas das mais importantes vias de sinalização que podem ser activadas pelo stress oxidativo (para refs. ver Ji 2007). A existência de inúmeros locais de ligação aos genes antioxidantes sugerem uma enorme interacção entre os mecanismos de sinalização e a expressão genética (para refs. ver Ji 2007). Estes mecanismos regulatórios garantem a correcta expressão dos genes mesmo em condições onde a homeostase celular está comprometida, como é o caso do stress oxidativo.

Diferentes sistemas de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, são capazes de converter as ERON em espécies mais estáveis e desempenham um papel preponderante neste esquema elaborado (Tiidus et al. 1996). De modo a promover uma máxima protecção intracelular, estes sistemas de defesa apresentam-se estrategicamente localizados, realizando diversas funções como exemplificado na tabela 3.

Por outro lado, a actividade dos sistemas de defesa no músculo esquelético está dependente da composição das fibras que o constitui: fibras de elevada capacidade oxidativa e fibras de baixa capacidade oxidativa (Powers e Sen 2000).

Tabela 3 Principais antioxidantes – localização e funções (adaptado de Powers e Sen 2000)

Antioxidantes	Propriedades
Superóxido dismutase	Localização: mitocôndria e citosol Dismuta radicais superóxido
Glutathiona peroxidase	Remove peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos orgânicos
Catalase	Localização: peroxissomas (principalmente) Remove peróxido de hidrogénio
Glutathiona redutase	Envolvida na protecção de grupos tiois proteicos e não proteicos
Vitamina E	Importante componente da membrana celular Envolvida em reacções de destoxificação das ERO
Vitamina C	Importante componente aquoso celular Envolvida em reacções de destoxificação de ERO e recicla a vitamina E

Por exemplo, alguns estudos demonstram que a indução da enzima superóxido dismutase (SOD), após o estímulo do exercício, pode ser condicionada pelos tipos de fibras que constituem o músculo. De facto, o músculo constituído por uma maior percentagem de fibras oxidativas aparenta ser o que mais induz um aumento da actividade da SOD (Laughlin et al. 1990; Criswell et al. 1993; Powers et al. 1994).

As quatro principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase, a glutathiona peroxidase (GPx), a glutathiona redutase (GR) e catalase (CAT) .

A SOD existente no músculo esquelético apresenta duas isoformas que variam na sua localização bem como, no ião metálico ligado ao seu centro activo. A CuZnSOD está localizada no citosol enquanto que a MnSOD se localiza na matriz mitocondrial. Apesar de alguns investigadores terem reportado que o treino de endurance não provoca um aumento na actividade da SOD no músculo esquelético (Alessio e Goldfarb 1988; Laughlin et al. 1990) outros, afirmam totalmente o contrário (Criswell et al. 1993; Leeuwenburgh et al. 1994;

Leeuwenburgh et al. 1997). Diferenças nos métodos experimentais utilizados para determinar a actividade da SOD, no protocolo de treino e na composição das fibras musculares, podem explicar este tipo de discrepâncias. Em relação à influência do treino de endurance na actividade das diferentes isoformas da SOD estudos indicam, em geral, um aumento de ambas (Oyanagui 1984; Ohishi et al. 1997). Outro aspecto a realçar é o facto do treino de endurance induzir um aumento na actividade das enzimas oxidativas e da SOD, concomitantemente. No entanto, este aumento da capacidade oxidativa não é proporcional ao aumento da SOD como comprovado por vários estudos (Hammeren et al. 1992; Criswell et al. 1993; Powers et al. 1994). De facto, a correlação entre a actividade enzimática oxidativa (ex: enzimas do ciclo de Krebs) e a actividade da SOD é relativamente baixa ($r = 0,17$) (Hammeren et al. 1992).

No que diz respeito ao efeito do treino de endurance na actividade da GPX do músculo esquelético, a literatura é razoavelmente concordante quanto ao seu aumento (Hellsten et al. 1996; Venditti e Di Meo 1997; Gul et al. 2002). Um estudo mais recente (Tonkonogi et al. 2000b) indica que a actividade muscular desta enzima não se altera após o estímulo do treino de endurance. Mais uma vez, as razões destas discrepâncias podem ser justificadas com os mesmos argumentos anteriormente referidos para a enzima SOD. Similarmente ao que acontece com a actividade da SOD, o treino de endurance também promove um maior aumento na actividade das enzimas oxidativas do que na actividade da GPX (Hammeren et al. 1992; Criswell et al. 1993; Powers et al. 1994).

Relativamente à enzima CAT, existem poucas evidências que o treino de endurance possa provocar um aumento da sua actividade no músculo

esquelético (Powers et al. 1994). Recentemente, um estudo realizado sobre o efeito do treino de endurance sobre o estado redox do músculo esquelético de ratos reporta um aumento da actividade da CAT (Plant et al. 2003). O mais interessante é que existem artigos que indicam mesmo uma diminuição da actividade desta enzima (Alessio e Goldfarb 1988; Laughlin et al. 1990)

A glutathione redutase (GR) aparenta ser essencial para o normal funcionamento antioxidante da GPX (Powers e Sen 2000). No que diz respeito ao efeito do treino de endurance na actividade desta enzima no músculo esquelético alguns investigadores reportam pequenas ou nenhuma alterações (Leeuwenburgh et al. 1994; Leeuwenburgh et al. 1997) e outros reportam aumentos (Venditti e Di Meo 1997).

Na célula muscular existem também vários sistemas antioxidantes não enzimáticos incluindo a glutathione, vitamina E, vitamina C, ácido lipóico, carotenoides, ácido úrico, bilirrubina e ubiquinona. Um dos antioxidantes mais estudados é a vitamina E, existindo alguma contradição nos resultados reportados. Alguns autores afirmam que o treino de endurance não altera as concentrações de vitamina E no músculo esquelético (Starnes et al. 1989; Tiidus e Houston 1993) enquanto outros, afirmam que diminui (Gohil et al. 1986; Bowles et al. 1991).

Em resumo, o papel do exercício de endurance na capacidade antioxidante aparenta ser controverso uma vez que se constata que existem estudos que não encontram alterações na actividade/concentração antioxidante, havendo outros, que sugerem um aumento ou mesmo uma diminuição. Contudo, parece existir uma tendência clara para uma acção modeladora positiva do treino relativamente a alguns compostos antioxidantes.

2.3.5 Apoptose

Uma vez que o exercício crónico, particularmente o treino de endurance, tem sido referido como um importante modelador da homeostase celular e que os mecanismos de morte celular (apoptose e necrose) parecem associados à maioria das condições fisiopatológicas, incluindo a *diabetes mellitus*, torna-se relevante referenciar o efeito deste estímulo na indução dos referidos mecanismos, particularmente na apoptose. A primeira evidência que sugeriu o envolvimento das mitocôndrias nos processos de morte celular surgiu de estudos de indução de citotoxicidade pelo factor alfa de necrose tumoral (TNF- α) (Lancaster et al. 1989; Schulze-Osthoff et al. 1992). De facto, uma alteração da função mitocondrial está associada à fase inicial do processo de morte celular e foi definida como sendo crucial para todo esse processo. A disfunção mitocondrial é causada por um colapso do $\Delta\Psi$, por uma diminuição da biogénese mitocondrial e por uma diminuição do fluxo do Ca^{2+} da matriz (Smaili et al. 2003). Estes fenómenos fisiológicos compreendem uma falência bioenergética, culminando na alteração da integridade da membrana plasmática e/ou na activação de proteases de cisteína-aspartato (caspases) reguladas por proteínas mitocondriais que escapam para o citosol.

Efectivamente, a activação dos mecanismos de morte celular por apoptose pode ser desencadeada através da transdução de sinais mitocondriais (Adhihetty et al. 2005). Existem duas razões para que as mitocôndrias estejam intimamente ligadas ao processo de apoptose: possuírem proteínas proapoptóticas e serem o produtor primário de ERON. As proteínas pró-apoptóticas citocromo c e o factor indutor de apoptose (AIF), localizadas

respectivamente, na superfície externa da membrana interna mitocondrial e no espaço intermembranar, podem ser libertadas e originar a morte celular (Li et al. 1997; Susin et al. 1999). No entanto, as vias de indução por cada uma destas proteínas são diferentes. A libertação de citocromo c no citosol desencadeia uma série de quebras proteólicas denominada de cascata de caspases e, em contraste, o AIF libertado do espaço intermembranar induz a apoptose independentemente da referida cascata, proporcionando uma ligação directa entre a mitocôndria e a fragmentação do DNA/destruição nuclear. A libertação destas duas proteínas está parcialmente dependente da formação de um canal especializado na membrana mitocondrial denominado poro de permeabilidade transitória (PTP) (Crompton 1999; Brookes et al. 2004). O PTP é constituído por um canal dependente de voltagem (VDAC), por uma translocase adenina nucleótido (ANT) e por ciclofilina (Crompton et al. 1998; Wallace 1999; Vieira et al. 2000). O estado conformacional do PTP é, pelo menos parcialmente, regulado por uma família de proteínas denominadas Bcl-2, que estão integradas na membrana externa da mitocôndria. Esta família é constituída por proteínas proapoptóticas (Bax, Bak, Bok, etc) e antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, etc) apresentando como funções a neutralização recíproca (Sedlak et al. 1995). Um aspecto extremamente relevante é a proporção relativa entre estas proteínas pois, aparenta ser um importante regulador na susceptibilidade ao processo de morte celular.

Como referido anteriormente, as ERON são um dos factores que podem desencadear a apoptose. O mecanismo de acção compreende a activação de vários factores de transcrição envolvidos na expressão genética das proteínas da família Bcl2 (Guyton et al. 1996; Bogoyevitch 2000).

Existem fortes evidências que o treino de endurance pode regular a apoptose no músculo esquelético através da diminuição da fragmentação do DNA, do aumento da proteína antiapoptótica Bcl2 e seus transcritos, da diminuição dos transcritos da proteína proapoptótica Bax, podendo também influenciar o mecanismo de activação das caspases (Siu et al. 2004). Deste modo, o exercício físico regular de intensidade moderada está associado a um aumento dos níveis das proteínas antiapoptóticas em detrimento dos níveis das proteínas proapoptóticas (Siu et al. 2004). Por outro lado, existe também uma modulação positiva de supressores apoptóticos, nomeadamente da proteína inibidora da apoptose (XIAP) e da proteína repressora da apoptose (ARC). Assim sendo a regulação evidenciada pelo treino de endurance implica não só o aumento das proteínas antiapoptóticas como também o aumento dos supressores apoptóticos (Siu et al. 2005). Tem sido sugerido que a HSP70 é uma potente proteína anti-apoptótica (Garrido et al. 2001). Existem evidências suportando a hipótese de que a HSP70 inibe a apoptose através da modulação da via mediada pela mitocôndria (Li et al. 2000; Saleh et al. 2000). Li et al. (2000) reportaram que a HSP70 inibe a apoptose, suprimindo a formação do apoptossoma, tendo um efeito inibidor sobre a libertação de citocromo-c e sobre a activação de determinadas caspases. O efeito supressivo da HSP70 sobre a formação do apoptossoma reduz a activação de caspases, diminuindo a ocorrência de apoptose e, subsequentemente, a fragmentação nuclear. O AIF, uma outra proteína (endonuclease) libertada pela mitocôndria, tem sido descrita, também, como uma das moléculas alvo envolvida na inibição da apoptose mediada pela HSP70 (Susin et al. 1999; Ravagnan et al. 2001). O efeito antiapoptótico das HSP70 sobre AIF sugere que as HSP70 inibem a

apoptose pela supressão das vias caspase independente e dependente. Siu et al. (2004) demonstraram, que após os ratos terem sido submetidos ao treino físico moderado de longa duração, houve uma correlação positiva significativa entre as expressões de HSP70 e Bcl-2 e também, entre os níveis transcricionais dessas proteínas (mRNA) na musculatura esquelética dos animais. Esse mesmo estudo mostrou haver também uma correlação positiva significativa entre as expressões de Mn-SOD (enzima anti-oxidante), níveis transcricionais de Bcl-2 e HSP70. Embora o mecanismo molecular para a atenuação da apoptose induzida pelo exercício não esteja ainda totalmente elucidado, estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a HSP70 e a Mn-SOD desempenham um papel importante no decréscimo da apoptose induzida pelo exercício em tecidos pós-mitóticos, tais como a musculatura esquelética.

2.3.6 Resposta Funcional

O treino de endurance parece induzir uma série de adaptações mitocondriais, entre elas o aumento da capacidade oxidativa mitocondrial, cujas consequências conduzem ao aumento da performance e à prorrogação da fadiga.

O treino de endurance origina uma rápida regulação na produção oxidativa de energia por parte do músculo esquelético (Turner et al. 1997) e, na actividade de certas enzimas (Tonkonogi et al. 2000b). A taxa de produção de ATP mitocondrial aparenta estar aumentada após o treino de endurance (Wibom et al. 1992; Berthon et al. 1995; Starritt et al. 1999). A informação obtida por este método somente reflecte os mecanismos associados à produção de ATP. A

análise do processo respiratório mitocondrial apresenta-se como um dos métodos que pode fornecer informações adicionais, quer da eficiência quantitativa (máxima energia oxidativa), quer da eficiência qualitativa (transferência da energia oxidativa – ADP/O; rácio do controlo respiratório - RCR) da função mitocondrial.

Um método clássico para estudar os processos bioenergéticos mitocondriais é a medição do consumo de oxigénio, utilizando um eléctrodo de O₂. Uma das informações, obtidas por este tipo de equipamento, sobre a função mitocondrial é a taxa de consumo de oxigénio na presença de ADP (estado 3) e na sua ausência (estado 4). O referido equipamento permite também obter informação sobre outros parâmetros qualitativos da respiração mitocondrial, nomeadamente o rácio do controlo de respiração (RCR), calculado a partir da relação estado 3/estado 4 e o rácio ADP/O, que reflecte a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial.

A respiração mitocondrial e a síntese de ATP estão associadas a um gradiente electroquímico de prótons ao longo da membrana interna da mitocondria. Devido a este facto, experiências *in vitro* do consumo de oxigénio mitocondrial podem ser controladas através de : 1) iões H⁺ que entram de novo na matriz; 2) a adição de protonóforos (CCCP e FCCP) que permeabilizam a membrana para o ião H⁺; 3) a inibição completa da ATPase pela oligomicina que diminui o consumo de oxigénio até um estado residual (o consumo de oxigénio após adição de oligomicina é devido ao escape de iões H⁺ para a matriz). Este último caso está dependente da condutividade da membrana fosfolipídica ao ião H⁺. Sendo assim, a determinação das taxas respiratórias utilizando um

eléctrodo sensível ao O_2 , permite identificar e localizar o dano e disfunção induzida por determinados estímulos *in vitro* ou *in vivo*.

É bem conhecida a indução de um largo número de adaptações, através do estímulo do treino de endurance, relacionadas com a capacidade de transporte de O_2 e com o aumento do fenómeno oxidativo da mitocôndria. Vários estudos foram realizados para avaliar os efeitos do exercício na função respiratória. A maior parte dos estudos realizados parecem encontrar uma relação positiva entre a capacidade aeróbica, (aumentada através do treino e/ou como função do Vo_2 máx - limiar anaeróbio) e, a função respiratória estimulada pelo ADP (estado 3) (Walsh et al. 2001; Zoll et al. 2002; Fernstrom et al. 2004). Porém, em alguns estudos tem sido sugerido que o aumento do potencial oxidativo induzido pelo treino de endurance poderá ocorrer em consequência do aumento da massa mitocondrial (Tonkonogi et al. 2000a; Fernstrom et al. 2004) uma vez que, não foram encontradas diferenças no estado 3. Como consequência do aumento da biogénese mitocondrial induzida pelo treino de endurance, poderá surgir um aumento da sensibilidade do músculo esquelético relativamente à fosforilação oxidativa do ADP.

Em estudos realizados com mitocôndrias isoladas após o treino de endurance, a taxa respiratória no estado 4 parece não sofrer alterações (Tonkonogi et al. 2000a). Contudo, após treino de endurance, outros estudos, revelam resultados controversos, havendo autores que sugerem um decréscimo significativo (Nemirovskaia et al. 1993), outros que apontam para um aumento (Walsh et al. 2001) e outros ainda que não encontraram alterações na taxa respiratória do estado 4 (Zoll et al. 2002). A explicação para estas discrepâncias poderá residir em razões do foro metodológico, características

da amostra ou, no desenho do protocolo realizado (Ascensao e Magalhaes 2006). Relativamente ao aumento da taxa respiratória do estado 4 (evidenciada por Tonkonogi et al. 2000b) este facto poderá indicar que, apesar da susceptibilidade dos complexos mitocondriais de fosforilação oxidativa ao stress oxidativo não ser afectado, a fuga de prótons da membrana aumenta, sugerindo que a membrana mitocondrial é mais propensa aos danos oxidativos após treino (Ascensao e Magalhaes 2006).

2.4 Efeitos do exercício na funcionalidade mitocondrial muscular diabética

A fisiopatologia da diabetes tem sido frequentemente associada a uma variedade de alterações histológicas, bioquímicas e funcionais a nível mitocondrial. Geralmente, as alterações compreendem um aumento da produção de ERON, uma diminuição da capacidade de metabolização lipídica e uma diminuição da densidade mitocondrial (para refs ver Lumini et al. 2008).

Em pacientes diabéticos as mitocôndrias musculares esqueléticas apresentam um tamanho reduzido e uma actividade reduzida da CTE (Toledo et al. 2006). Por outro lado, existe uma diminuição da expressão dos genes nucleares que codificam para proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (Patti et al. 2003) e concomitantemente uma redução da eficácia deste processo metabólico (Morino et al. 2005). Contudo, as mitocôndrias são organelos adaptáveis e o músculo esquelético pode manifestar uma considerável plasticidade no que diz respeito ao conteúdo mitocondrial, em resposta a vários estímulos (Adhihetty et al. 2003). A capacidade oxidativa no músculo esquelético diabético é profundamente dependente da função mitocondrial e relaciona-se directamente com a sensibilidade deste órgão à insulina (Simoneau e Kelley 1997).

Alterações qualitativas e quantitativas na morfologia das mitocôndrias são características comuns do músculo esquelético de pacientes diabéticos (Kelley et al. 2002). A administração de STZ encontra-se associada ao stress oxidativo e à morte celular por apoptose (Bonnard et al. 2008). Deste modo, não é surpreendente que exista um aumento dos níveis de lesão oxidativa expressos pelo incremento da carbonilação proteica bem como pelo aumento da libertação de citocromo c, com consequente activação da morte celular por apoptose, associada à disfunção mitocondrial (Bonnard et al. 2008). Neste mesmo estudo, foi também avaliada a densidade mitocondrial, o rácio mtDNA/nDNA e, as alterações estruturais induzidas pela administração de STZ. Para além da diminuição da densidade mitocondrial e do rácio mtDNA/nDNA observados neste modelo de hiperglicémia, a morfologia deste organelo também foi alterada como evidenciado pela diminuição do número de cristas e da densidade da matriz. Estas alterações morfológicas foram observadas quer, em mitocôndrias SS quer, em IMF, o que pressupõe que este modelo de hiperglicémia induz efeitos deletérios independentemente da localização subcelular mitocondrial.

De facto, Bonnard et al não foram os únicos a reportar alterações na morfologia mitocondrial induzida pelo tratamento por STZ. Chao et al (1976), observaram aumentos das gotículas lipídicas nas proximidades das mitocôndrias e do núcleo. Adicionalmente, Li et al (1990), utilizando a análise morfométrica, mostraram que a área de superfície da membrana interna e das cristas mitocondriais diminui concomitantemente à acumulação de gotículas lipídicas. Em relação às alterações bioquímicas do músculo esquelético, induzidas por esta condição de hiperglicémia, estas compreendem alterações das actividades

enzimáticas oxidativas com o consequente comprometimento em oxidar alguns substratos. Efectivamente, vários trabalhos pioneiros realizados durante as décadas de 70 e 80 mostraram alterações metabólicas sugestivas de um comprometimento do metabolismo mitocondrial. Deste modo, foram reportadas diminuições significativas das actividades de algumas enzimas chave do metabolismo oxidativo como, por exemplo, citrato sintetase, piruvato desidrogenase, succinato desidrogenase e hidroxiaçil CoA desidrogenase, em músculo esquelético de animais tratados com STZ (Ianzuzo et al. 1974; Chen e Ianzuzo 1982; Noble e Ianzuzo 1985).

A análise de indicadores da funcionalidade respiratória mitocondrial do músculo esquelético de animais com hiperglicémia severa, induzida pelo tratamento com STZ, tem igualmente sido alvo da atenção de alguns investigadores. Royer et al. (2007) demonstraram que esta condição de hiperglicémia severa altera significativamente as propriedades funcionais das mitocôndrias musculares esqueléticas de ratos, particularmente o grau de acoplamento entre a oxidação e a fosforilação e a actividade dos complexos I e II da CTE. Estas características foram demonstradas através de uma diminuição significativa do RCR utilizando os substratos glutamato e malato (complexo I) e succinato (complexo II), enquanto que, ao utilizar substratos do complexo IV (TMPD e ascorbato) a actividade funcional das mitocôndrias diabéticas aparenta estar protegida do dano provocado pelo referido tratamento. Por outro lado, um estudo de el Midaoui (1996) apresenta uma diminuição significativa do rácio de fosforilação oxidativa em mitocôndrias do músculo esquelético de ratos tratados com STZ, mas não apresenta alterações significativas nos parâmetros respiratórios estado 3, estado 4 e RCR.

Curiosamente, e contrariando todas as referidas alterações morfológicas e funcionais deletérias nas mitocôndrias diabéticas, Kayali et al (2004) não observaram alterações nos níveis de lesão oxidativa proteica mitocondrial, bem como da peroxidação lipídica das membranas mitocôndriais após 8 semanas de tratamento com STZ. Os autores afirmam que este efeito benéfico poderá ser devido quer a um aumento dos mecanismos de defesa antioxidante quer a uma outra resposta adaptativa que poderá estar aumentada por aumento do stress oxidativo, tão comum nesta condição de hiperglicémia.

Presentemente, o exercício é considerado uma intervenção não farmacológica e simples que pode melhorar a acção da insulina e o transporte de glucose dependente desta hormona (Henriksen 2002). Pode também estimular as vias enzimáticas oxidativas e a biogénese mitocondrial, e atenua os factores de risco e complicações associados à diabetes (Roberts et al. 2006). Diversos tipos de exercício podem induzir alterações consideráveis no metabolismo, morfologia e função mitocondriais (Ascensao et al. 2007), podendo alguns deles originar alterações benéficas neste organelo (Fritz et al. 2006; van Loon e Goodpaster 2006; Toledo et al. 2007), melhorando o metabolismo muscular nos pacientes diabéticos (Short et al. 2003; McCarty 2005; Toledo et al. 2007). O treino de endurance em ratos diabéticos está associado a um aumento da maquinaria proteica mitocondrial, bem como a um aumento da capacidade do músculo esquelético em oxidar substratos e produzir energia (Lehti et al. 2007). Este incremento da capacidade oxidativa mitocondrial pode levar a uma melhoria da homeostase da glucose como demonstrado por vários estudos em ratos diabéticos (Reaven e Chang 1981; Tancrede et al. 1982).

No tecido cardíaco o treino de endurance mostrou atenuar as alterações ultraestruturais mitocondriais observadas no modelo de diabetes induzido pelo STZ (Searls et al. 2004). As melhorias morfológicas induzidas pelo treino de endurance nas mitocôndrias cardíacas de ratos tratados com STZ estão em concordância com a melhoria observada nos parâmetros respiratórios reportada por Mokhtar et al (1993). As respostas adaptativas observadas por este estudo, sugestivas de um aumento da função mitocondrial do músculo diabético, poderão também beneficiar o metabolismo lipídico, evitando a acumulação intramitocondrial de espécies reactivas e certamente contribuir para a atenuação do fenótipo deletério diabético.

3. Definição do Problema e Objectivos

3.1 Objectivos Gerais

O objectivo fundamental do presente estudo foi analisar o efeito do treino de endurance na bioenergética de mitocôndrias isoladas do músculo *gastrocnemius*, atribuindo particular ênfase ao efeito do referido estímulo nos parâmetros respiratórios e no potencial de membrana de mitocôndrias musculares esqueléticas de ratos sujeitos a um tratamento com STZ.

3.2 Objectivos Específicos

Podemos definir como objectivos específicos deste trabalho a análise das adaptações induzidas pelo treino de endurance, associado à condição diabética:

- i) na actividade respiratória mitocondrial
- ii) no $\Delta\psi$
- iii) na capacidade antioxidante

4. Material e Métodos

4.1 Caracterização da Amostra

Integraram a amostra deste estudo vinte e quatro ratos Wistar machos (6-8 semanas e 200 g no início do protocolo). Durante o protocolo experimental os animais foram acolhidos em gaiolas colectivas (dois ratos por gaiola) e mantidos em biotério com atmosfera normal (21-22°C; ~50-60% humidade) comida e água *ad libitum* e num ciclo de 12h dia/noite. Para a realização do protocolo experimental, dividiu-se os animais aleatoriamente em quatro grupos (n=6 por grupo): sedentários (Sed) diabéticos sedentários (STZ), treinados (T) e diabéticos treinados (TSTZ). O protocolo experimental foi realizado de acordo com as normas para os cuidados na utilização e manipulação laboratorial de animais em investigação.

4.2 Indução e caracterização da diabetes induzida por Streptozotocina (STZ)

De modo a induzir um estado de hiperglicémia, um grupo (n=12) foi submetido a uma única injeção intraperitoneal de STZ (50 mg/kg), após um período de jejum de 16 horas. O volume de injeção utilizado foi sempre de 0.5 mL/200 g de peso corporal. Ao grupo não diabético foi injectado o mesmo volume de uma solução de citrato. Após 24 horas, os animais injectados com STZ foram alimentados oralmente com soro glicosilado, de modo a evitar a hipoglicémia resultante da destruição massiça das células beta e da libertação intracelular de insulina associadas ao tratamento por STZ. Durante o período experimental, foram realizadas medições do peso corporal, tendo sido colhido sangue da veia caudal para a determinação da glicémia. Os valores de glucose no sangue foram obtidos em condições de jejum, antes da administração de STZ e, em

condições pós-jejum, nas semanas seguintes. Se a glucose sanguínea excedesse 250 mg/dL, os animais seriam utilizados como diabéticos.

4.3 Avaliação da Glicémia e da Hemoglobina glicosilada (HbA1C)

A concentração de glucose sanguínea foi determinada no equipamento Glucometer-Elite, Bayer. Os valores de HbA1C foram determinados, através de cromatografia de troca iónica (Abbott Imx Glicohemoglobin, Abbott Laboratories, Portugal), em amostras de sangue total c/EDTA, colhidas no momento do sacrifício do animal.

4.4 Determinação da capacidade antioxidante total

A actividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente a 500 nm utilizando um kit comercial (Ransod SD 125, Randox, Crumlin UK). As actividades da GPx e da GR foram determinadas espectrofotometricamente a 340 nm utilizando kits comerciais (Ransel RS505 e GR GR2368, respectivamente) da Randox. O status antioxidante total foi determinado espectrofotometricamente a 600 nm utilizando um kit commercial (Randox NX2332, Randox, Crumlin UK). Todos estes ensaios foram adaptados ao aparelho Cobas Mira Plus, de acordo com as especificações da casa comercial.

4.5 Treino de endurance

Quatro semanas após o tratamento com STZ, os animais do grupo TSTZ e T, foram exercitados 5 dias por semana (de Segunda a Sexta-feira) durante 14 semanas em tapete rolante motorizado (Ascensao et al. 2006a). A velocidade e inclinação do tapete rolante foram aumentando gradualmente durante as 14 semanas. O protocolo incluiu 5 dias de habituação ao tapete rolante com 10min

de corrida, à velocidade de 15 m/min e 0% de inclinação, com um aumento diário de 5-10 min até perfazer 30min. A habituação ao treino foi seguida de uma semana com corrida contínua (30min/dia) a uma velocidade de 25 m/min e 0% de inclinação e foi gradualmente aumentando até atingir os 60min/dia na segunda semana (Tabela 4). Os animais do grupo STZ e Sed não foram exercitados, tendo sido colocados no tapete rolante imóvel cinco vezes por semana (10-30min/sessão) com o objectivo de minimizar o mais possível o ambiente de stress induzido pelo tapete rolante, sem promover qualquer adaptação induzida pelo treino.

Tabela 4: Organização metodológica do protocolo de treino de endurance

	Semanas de treino													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Tempo de Treino (min/dia)	30	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Velocidade do Tapete (m/min)	15	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Inclinação do Tapete (%)	0	0	0	0	0	3	3	6	6	6	6	6	6	6

4.6 Isolamento das Mitochondrias do Músculo Esquelético

Dois dias após a última sessão de treino os animais foram sacrificados por deslocação cervical e os músculos *gastrocnemius* foram extraídos para isolamento de mitocôndrias. As mitocôndrias do músculo esquelético foram isoladas por centrifugação diferencial de acordo com o descrito anteriormente por (Ascensao et al. 2005c; Ascensao et al. 2006a). Os músculos foram prontamente excisados e cortados num meio de isolamento (0-4°C) contendo 100 mM sacarose, 0.1mM EGTA, 50 mM Tris-HCL, 100 mM KCL, 1 mM KH_2PO_4 e 0.2% BSA, pH 7.4. Seguidamente, o tecido cortado e limpo foi

suspendido numa solução de 10 ml contendo 0.2 mg/mL de protease bacterial (Nagarse E.C.3.4.21.62, tipo XXVII; Sigma) e agitada durante 2 min. A amostra foi cuidadosamente homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador, acoplado a um pistão de teflon inserido num poter de vidro (Potter-Elvehjen). Posteriormente, foram adicionados três volumes de meio de isolamento sem Nagarse e a amostra foi centrifugada a 700 $\times$ g durante 10 min. O *pellet* resultante foi desperdiçado e o sobrenadante foi centrifugado a 10000 $\times$ g durante 10 min. Seguidamente, o sobrenadante foi decantado e o pellet foi delicadamente resuspenso em meio de isolamento (1.3 mL por 100 mg do tecido inicial) e centrifugado a 7000 $\times$ g durante 3 min. O sobrenadante foi desperdiçado e o *pellet* final, contendo mitocôndrias, foi gentilmente resuspenso (0.4 μ L.mg⁻¹ tecido inicial) em meio contendo 225 mM mannitol, 75 mM sacarose, 10 mM Tris e 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Todos os procedimentos de isolamento das mitocôndrias foram realizados a uma temperatura entre os 0 e os 4°C. A concentração de proteína da suspensão mitocondrial foi estimada espectrofotometricamente através do método do biureto, utilizando albumina de soro de boi (BSA) como solução padrão. A suspensão mitocondrial foi utilizada nas 4h seguintes e mantida entre 0° e 4°C, durante todo esse período. Não se observaram diferenças significativas do rácio de controlo respiratório (RCR) mitocondrial entre a primeira e a última medição para o mesmo animal.

4.7 Determinação da actividade respiratória mitocondrial

A função respiratória mitocondrial foi avaliada polarograficamente utilizando eléctrodo de oxigénio tipo Clark (Hansatech DW 1, Norfor, UK), acoplado a um registrador (Kipp & Zonen, BD 112). As reacções ocorreram numa câmara de

vidro fechada, termoregulada (25°C) e agitada magneticamente, com um volume de 1mL, contendo 0.5 mg de proteína mitocondrial num meio de reacção (225mM manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM Tris, 10 mM K₂HPO₄ e 0.1 mM EDTA, pH 7.5) de acordo com Tonkonogi et al (2000). Após 1 min de período de equilíbrio, a respiração mitocondrial foi iniciada através da adição de piruvato (5 mM) e malato (2 mM) ou succinato (10 mM) e rotenona (4 µM). A determinação do estado 3 respiratório foi efectuada após a adição de ADP numa concentração final de 400 µM; O estado 4 respiratório foi medido como a taxa de consumo de oxigénio, posterior à total fosforilação do ADP. O RCR (o rácio entre o estado 3 e o estado 4) e o rácio entre o ADP adicionado e o oxigénio consumido (ADP/O) foram calculados segundo Estabrook (1967) e usando 235 nmol O₂/mL como valor da solubilidade do oxigénio a 25°C.

4.8 Potencial de membrana mitocondrial

O $\Delta\psi$ foi estimado com base na actividade do catião lipofílico (TPP⁺) tetrafenilfosfónio utilizando um eléctrodo selectivo para TPP⁺, preparado no nosso laboratório de acordo com Kamo et al (1979), e um eléctrodo de referência de cloreto de prata (Tacussel, Model MI 402), acoplados a um equipamento de medição de pH (Jenway, Model 3305). Os sinais obtidos foram enviados a um registador (Kipp & Zonen, Model BD 121). Não foi usado qualquer factor de correcção para rectificar a contribuição passiva do TPP⁺ para o potencial de membrana, uma vez que o objectivo deste trabalho abrange o estudo das alterações relativas em detrimento de valores absolutos. Foi assumido 1.1 µL/mg como valor de proteína matricial mitocondrial.

O $\Delta\psi$ foi calculado a partir da seguinte equação (a 25°C):

$$\Delta\psi = 59 \times \log (v/V) - 59 \times \log (10 \Delta E/59 - 1)$$

v - volume mitocondrial

V - volume do meio de incubação

ΔE - desvio do potencial a partir da linha de base

As reacções ocorreram em 1 mL de meio de reacção (225mM manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM Tris, 10 mM K_2HPO_4 e 0.1 mM EDTA, pH 7.5) suplementado com 3 μ M TPP+ e 0.5 mg/ml de proteína mitocondrial, mantendo a temperatura a 25 °C. Para a monitorização do $\Delta\psi$ com substratos para o complexo I, adicionou-se malato (2 mM) e piruvato (5 mM) e o potencial de despolarização foi registado após a adição de ADP (400 μ M). Para a monitorização do $\Delta\psi$ com substratos para o complexo II foi adicionado ao meio de reacção, succinato (10 mM) e rotenona (4 μ M). Foram também registadas medições do potencial sem a adição de substratos exógenos (substratos endógenos), na presença e ausência de rotenona. A *lag phase*, expressa em segundos, reflecte a capacidade mitocondrial para despolarizar e repolarizar após a adição de ADP, tendo sido determinada utilizando substratos para o complexo I e II da CTE.

4.9 Procedimentos estatísticos

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, version 12.0 para Windows). A média e o erro padrão significativo (SEM) foram calculados para todas as variáveis em estudo de cada grupo. Para comparar os resultados entre os grupos nos diferentes parâmetros, foi utilizada uma análise de variância ANOVA one – way, seguida de um teste pós hoc de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de 5%.

5. Apresentação dos Resultados

5.1 Adaptações Induzidas pelo Treino de Endurance no Peso Muscular, Peso Corporal, Glicemia e HbA1c

Os pesos corporais e do músculo *gastrocnemius*, o rácio entre o peso muscular e o peso corporal, a glicémia e a hemoglobina glicosilada podem ser observados na tabela 5. O tratamento de 18 semanas com STZ originou um decréscimo no peso corporal e do músculo *gastrocnemius* dos animais ($p < 0.05$). A concentração de glucose sanguínea, determinada imediatamente após sacrifício dos animais, foi significativamente mais elevada nos ratos diabéticos quando comparada com os não diabéticos. Para estimar a severidade da diabetes foi igualmente determinada a HbA1C, uma vez que este parâmetro indica a concentração de glucose sanguínea média presente, durante os 2-3 meses anteriores. Os valores de HbA1C corroboraram os valores de glicémia reportados nos ratos tratados com STZ.

Os resultados obtidos após o protocolo de treino de endurance revelaram alterações significativas no peso corporal e musculares, tendo sido reportado um aumento para o grupo TSTZ relativamente ao grupo STZ. No que diz respeito ao grupo de ratos não diabéticos treinados (T) estes apresentaram uma diminuição significativa em ambos os parâmetros referidos, quando comparados com o grupo de ratos sedentários (Sed).

Tabela 5. Efeitos do treino de endurance e do tratamento com STZ no peso (relativo e total) muscular e corporal do rato, concentração de glucose sanguínea e percentagem de hemoglobina glicosilada.

Grupos	Peso corporal total (g)	Peso muscular (g)	Peso muscular/Peso corporal total (mg.g ⁻¹)	Concentração de glucose sanguínea (mg/dL)	HbA1c (% total)
Sed	459,30 ± 12,32	5,40 ± 0,12	11,79 ± 0,33	104,83 ± 1,72	4,37 ± 0,18
STZ	255,50 ± 3,31*	3,18 ± 0,6*	12,42 ± 0,39	580,50 ± 12,82*	12,63 ± 0,47*
T	373,33 ± 7,23*	4,52 ± 0,16*	12,34 ± 0,46	103,17 ± 4,46	4,03 ± 0,15
TSTZ	345,33 ± 6,54†	4,52 ± 0,31†	13,12 ± 0,29	580,50 ± 11,25	12,20 ± 0,27

Nota: Os dados correspondem: média±SEM; * vs. **Sed**; † vs. **STZ** (p<0.05)

5.2 Efeitos do Treino de Endurance na Actividade Respiratória Mitochondrial

Nas tabelas 6 e 7 encontram-se os resultados obtidos dos ensaios de consumo de O₂ utilizando a oxidação de substratos para os complexos I (malato + piruvato) e II (succinato) da CTE.

Tabela 6 Efeitos do treino de endurance e do tratamento com STZ nos parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4, RCR e ADP/O), de mitocôndrias isoladas do músculo *gastrocnemius* de ratos, energizadas com malato (2mM) e piruvato (5mM).

Grupos	Estado 3 (natomO.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	Estado 4 (natomO.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)	RCR	ADP/O
Sed	165.6±6.8	16.7±0.6	9.9±0.4	3.9±0.1
STZ	136,7±5,7	27,3±2,5*	4,9±0,3*	3,4±0,2
T	185.9±9.9	13.1±0.6	14.1±0.3*	3.3±0.3
TSTZ	159.9±8.0	18.5±0.8†	9.4±0.9†**	3.6±0.1

Nota: Os dados correspondem à média±SEM relativamente a mitocôndrias do músculo esquelético (0.5mg/mL protein) obtidas de diferentes preparações para cada um dos grupos experimentais. A fosforilação oxidativa foi medida poligraficamente, a 25°C num volume total de meio de 1 mL. O meio respiratório e outros detalhes experimentais estão descritos no capítulo dos métodos. RCR – rácio de control respiratório (estado 3/estado 4); ADP/O – rácio entre os nmol de ADP fosforilados e os nmol de O₂ consumidos.* vs. **Sed**; † vs. **STZ**; ** vs. **T** (p<0.05).

Relativamente à tabela 6 constata-se que o tratamento com STZ diminuiu significativamente o RCR (50,5%) e aumentou o estado 4 de respiração (63,5%) das mitocôndrias energizadas com malato e piruvato. Não foram encontradas alterações significativas no estado 3 (apesar de ter sido observado uma diminuição de 17,5%) e no rácio ADP/O quando se compara os grupos STZ vs. Sed. No que diz respeito aos resultados dos grupos de animais treinados (T e TSTZ), utilizando os substratos acima referidos, constata-se que houve um aumento significativo do parâmetro RCR, 42,4% para o grupo T e 91,8% para o grupo TSTZ, quando se compara com os respectivos grupos sedentários (Sed e STZ). Por outro lado, o protocolo de treino de endurance utilizado não alterou significativamente os restantes parâmetros, com a excepção dos resultados do estado 4 em que foi observada uma diminuição de 32% para o grupo TSTZ. Foi também observada uma diminuição significativa do parâmetro RCR quando se compara o estímulo do treino associado à condição diabética (TSTZ) e o estímulo de treino *per se* (T).

Utilizando o succinato, na presença de rotenona, como substrato para o complexo II, verificou-se que a taxa respiratória do estado 4 diminuiu significativamente (20,5%) após o tratamento de 18 semanas com STZ, enquanto que não foram observadas quaisquer alterações significativas no estado 3 (apesar de ter sido observado uma tendência para uma diminuição de aproximadamente 15,2%), no RCR e na eficiência da fosforilação oxidativa expressa pelo rácio ADP/O (tabela 7).

Após o protocolo de treino de endurance foram observadas alterações significativas no estado 3 (aumento de 25% Sed vs T) e no RCR (aumento de 44,1% Sed vs T). Nenhuma alteração foi evidenciada no rácio ADP/O

após o referido protocolo de treino, utilizando o succinato como substrato (tabela 7).

Tabela 7 Efeitos do treino de endurance e do tratamento com STZ nos parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4, RCR e ADP/O), de mitocôndrias isoladas do músculo *gastrocnemius* de ratos, energizadas com succinato (10mM) e rotenona (4 μ M).

Grupos	Estado 3 ($\text{natomO.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$)	Estado 4 ($\text{natomO.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$)	RCR	ADP/O
Sed	179.3 $\pm$ 6.4	52.7 $\pm$ 2.5	3.4 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.1
STZ	152.1 $\pm$ 3.0	41.9 $\pm$ 0.6*	3.6 $\pm$ 0,1	2.6 $\pm$ 0,2
T	224.5 $\pm$ 14.4*	48.6 $\pm$ 1.8	4.9 $\pm$ 0.4*	2.4 $\pm$ 0.1
TSTZ	207.9 $\pm$ 11.8†	50.8 $\pm$ 1.9†	4.12 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.1

Nota: Os dados correspondem à média $\pm$ SEM relativamente a mitocôndrias do músculo esquelético (0.5mg/mL protein) obtidas de diferentes preparações para cada um dos grupos experimentais. A fosforilação oxidativa foi medida poligraficamente, a 25°C num volume total de meio de 1 mL. O meio respiratório e outros detalhes experimentais estão descritos no capítulo dos métodos. RCR – rácio de control respiratório (estado 3/estado 4); ADP/O – rácio entre os nmol de ADP fosforilados e os nmol de O₂ consumidos.* vs. **Sed**; † vs. **STZ**; ($p < 0.05$).

Foram ainda observadas diferenças significativas nos estados 3 e 4 entre os grupos TSTZ e STZ. De facto, a tendência manifestada pelo grupo STZ, para uma diminuição do estado 3 relativamente ao grupo Sed, foi completamente revertida pelo treino de endurance nos animais tratados com STZ (aumento de 36,7% STZ vs. TSTZ). Adicionalmente o decréscimo do estado 4, induzido pela diabetes nos animais sedentários, foi completamente revertido pelo treino (aumento de 21,2% STZ e TSTZ).

5.3 Efeitos do Treino de Endurance no Potencial de Membrana Mitocondrial

De modo a clarificar os efeitos da hiperglicémia induzida por STZ, bem como, os efeitos do treino de endurance em ratos diabéticos e não diabéticos na capacidade mitocondrial em utilizar a energia derivada do metabolismo oxidativo, foram investigadas flutuações no potencial de membrana associadas com a respiração mitocondrial e o ciclo fofosforilativo induzidos pelo ADP. Tendo em conta os ensaios envolvendo os substratos do complexo I e II, as mitocôndrias isoladas do grupo Sed e STZ não apresentaram diferenças significativas no potencial desenvolvido nas condições de energização, despolarização induzida pelo ADP e repolarização, com a excepção da despolarização utilizando o succinato como substrato (tabela 8 e 9).

Tabela 8 Efeitos do treino de endurance e do tratamento com STZ nas flutuações do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\psi$) do musculo *gastrocnemius* com energização de malato e piruvato

Grupos	$\Delta\psi$ (-mV)				
	Substratos endógenos	Energização malato+piruvato	Despolarização	Repolarização	Lag phase (s)
Sed	150.6±4.9	194.3±2.2	176.4±2.1	196.4±4.2	100.0±8.7
STZ	160.3±5.1	184.9±2.9	169.1±4.9	196.1±4.1	118.0±3.5
T	181.2±2.8*	199.2±2.2	181.6±2.5	204.0±2.1	73.7±2.1*
TSTZ	173.3±6.3	200.2±3.9†	174.0±3.7	203.4±4.22	103.8±7.5†

Nota: Os dados correspondem à média±SEM relativamente a mitocôndrias do músculo esquelético (0.5mg/mL protein) obtidas de diferentes preparações, para cada um dos grupos experimentais. A tabela evidencia a resposta média do potencial mitocondrial sem adição de substratos exógenos (substratos endógenos), com energização de malato (2mM) e piruvato (5 mM), a diminuição do potencial membranar após a adição de ADP (despolarização), repolarização do potencial após fosforilação do ADP e a lag fase que antecede a repolarização. O potencial transmembranar foi medido utilizando um eléctrodo selectivo para TPP⁺. a 25°C num volume total de 1 mL. O meio respiratório e outros detalhes experimentais estão descritos no capítulo dos métodos.* vs. **Sed**; † vs. **STZ** (p<0.05).

Após energização com malato e piruvato, as mitocôndrias musculares isoladas dos dois grupos (Sed e STZ) desenvolveram um potencial na ordem dos -195mV e -185mV, respectivamente, enquanto que nas condições de energização com succinato desenvolveram um potencial de -208mV e -215mV, respectivamente.

Na presença de rotenona no meio de reacção, as mitocôndrias isoladas dos animais STZ evidenciaram, sem a adição de substratos exógenos ($\Delta\psi$ com substratos endógenos), um $\Delta\psi$ significativamente mais elevado, quando comparado com o grupo Sed (Tabela 9).

Tabela 9 Efeitos do treino de endurance e do tratamento com STZ nas flutuações do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\psi$) do musculo *gastrocnemius* com energização de succinato e rotenona.

Grupos	$\Delta\psi$ (-mV)				
	Substratos endógenos	Energização succinato + rotenona	Despolarização	Repolarização	Lag phase (s)
Sed	139.9±5.4	207.7±3.8	173.7±1.1	207.9±3.1	126.8±7.2
STZ	155.9±2.1*	215.3±1.0	183.7±2.2*	209.7±2.1	132±11.4
T	158.7±2.4*	213.2±2.8	180.9±3.3	213.4±2.9	86.7±5.6*
TSTZ	164.7±3.2	212.7±1.1	167.1±2.0†**	210.8±5.5	108.5±2.6

Nota: Os dados correspondem à média±SEM relativamente a mitocôndrias do músculo esquelético (0.5mg/mL protein) obtidas de diferentes preparações, para cada um dos grupos experimentais. A tabela evidencia a resposta média do potencial mitocondrial sem adição de substratos exógenos (substratos endógenos), com energização de succinato (10 mM) e rotenona (4uM), a diminuição do potencial membranar após a adição de ADP (despolarização), repolarização do potencial após fosforilação do ADP e a lag fase que antecede a repolarização. O potencial transmembranar foi medido utilizando um eléctrodo selectivo para TPP⁺. a 25°C num volume total de 1 mL. O meio respiratório e outros detalhes experimentais estão descritos no capítulo dos métodos. † vs. **STZ**; ** vs. **T** (p<0.05).

Não foram observadas diferenças significativas (Sed vs. STZ) no que diz respeito à lag phase, que antecede a repolarização da membrana mitocondrial, utilizando ambos os substratos (complexo I e II), apesar de ter sido observado uma tendência para um ligeiro incremento (18 e 14 % respectivamente). Verificou-se igualmente que o $\Delta\psi$ desenvolvido pelas mitocôndrias sem a adição de substratos exógenos ($\Delta\psi$ com substratos endógenos), com e sem rotenona no meio, dos animais do grupo T é mais elevado que o alcançado pelo grupo Sed.

Ao comparar-se o potencial gerado, após energização com malato e piruvato dos grupos de animais tratados com STZ, verifica-se que o grupo que foi sujeito ao protocolo de treino (TSTZ) desenvolve um potencial mais elevado (-200mV) relativamente ao grupo STZ (-185mV), não se verificando alterações significativas quando se utiliza o succinato como substrato. Examinando os resultados obtidos após despolarização induzida pelo ADP e repolarização observa-se apenas uma diminuição significativa do potencial de despolarização do grupo TSTZ quando comparado com o grupo STZ (-167mV vs. -184mV, respectivamente). Foi também evidenciada uma diminuição significativa do potencial de despolarização no grupo de ratos diabéticos treinados (TSTZ) quando comparados com o grupo de ratos sedentários treinados (T). Estes dados foram obtidos utilizando como substrato o succinato, não se observando alterações significativas quando se utilizaram os substratos do complexo I (malato e piruvato).

O protocolo de treino *per se* resultou igualmente em alterações significativas na lag phase (T vs. Sed). De facto, foram observados decréscimos significativos deste parâmetro quando se utilizou quer os substratos do complexo I quer os

substratos do complexo II, da CTE. O efeito do treino nos animais tratados com STZ só foi significativo (diminuição do tempo da fase lag) quando se utilizou a energização com malato e piruvato não tendo sido observadas quaisquer alterações com o succinato.

5.4 Efeitos do Treino de Endurance na Actividade Enzimática Anti-oxidante

Foram igualmente analisados os efeitos de 18 semanas de tratamento com STZ e, de 14 semanas de treino de endurance na capacidade antioxidante do homogeneizado muscular, expressa pela actividade da SOD, GPx, GR bem como pelo status antioxidante total (TAS) (tabela 10). Pela observação da tabela 10, constata-se que o tratamento com STZ induz um aumento significativo da actividade da SOD e GPx (62,5% e 86%, respectivamente) e nenhuma alteração significativa no status antioxidante total ou na actividade da GR.

Tabela 10 Efeito do treino de endurance e do tratamento com STZ na actividade antioxidante do superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e o status antioxidante total (TAS), no homogenato do músculo *gastrocnemius*.

Grupos	SOD (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GR (U/mg protein)	TAS (mM)
Sed	2.78±0.26	0.86±0.04	0.04±0.007	0.22±0.01
STZ	4.52±0.35*	1.60±0.14*	0.39±0.06	0.19±0.01
T	4.11±0.40*	1.06±0.14	0.16±0.01	0.26±0.01
TSTZ	2.70±0.09†**	0.54±0.01†**	0.40±0.2	0.19±0.02

Nota: Os dados correspondem: média±SEM; * vs. **Sed**; † vs. **STZ**; ** vs. **T** (p<0.05)

O programa de treino de endurance afectou também, algumas das enzimas estudadas, nomeadamente a SOD, tendo induzido um aumento da actividade

na ordem dos 48% (T vs Sed). Apesar de uma ligeira tendência para aumentar, não foram observadas alterações significativas na actividade da GPx com o treino per si (T vs Sed). Relativamente ao efeito do treino na actividade das enzimas antioxidantes do grupo de animais tratados com STZ (TSTZ vs STZ) verifica-se uma diminuição significativa da actividade da SOD (40,3%) e GPx (66,3%). Ao compararmos os resultados obtidos, para o estímulo de treino associado à condição diabética (TSTZ) com o estímulo de treino per si (T), verificou-se uma diminuição significativa das actividades das enzimas SOD e GPx. Constata-se também que o programa de treino não altera significativamente a actividade da GR nem o status antioxidante total do homogeneizado do músculo *gastrocnemius*.

6. Discussão dos Resultados

O presente estudo analisou o efeito de tolerância cruzada de 14 semanas de treino de endurance, realizado em tapete rolante contra as consequências do tratamento de animais com STZ e portanto, da condição de hiperglicémia severa, na funcionalidade de mitocôndrias isoladas do músculo *gastrocnemius* de rato. Foram utilizadas variações nos parâmetros associados ao consumo de O_2 e de potencial $\Delta\psi$ em mitocôndrias energizadas com substratos específicos para o complexo I (malato + piruvato) e para o complexo II (succinato). Adicionalmente, foram avaliadas, embora no homogeneizado muscular, as actividades de algumas enzimas antioxidantes, bem como o status antioxidante total muscular.

Com base nos dados da literatura relativos ao efeito deletério do tratamento com STZ na morfologia e bioquímica de mitocôndrias musculares esqueléticas, bem como na descrita acção protectora do treino de endurance na funcionalidade de mitocôndrias isoladas do mesmo tecido, antecipamos como hipótese principal que as 14 semanas de treino em tapete rolante resultam na reversão e/ou atenuação das alterações induzidas pelo tratamento com STZ na funcionalidade mitocondrial.

Os resultados do nosso estudo mostram que a hiperglicémia decorrente da administração de STZ resultou numa diminuição da funcionalidade respiratória expressa no RCR quando foram utilizados substratos para o complexo I. Quer o treino *per se* (T) quer associado à condição diabética (TSTZ), resultaram num aumento do RCR, revertendo (no caso do grupo TSTZ) o decréscimo observado no grupo STZ. Apesar de não se terem verificado diferenças

significativas, parece observar-se uma tendência semelhante nos parâmetros de consumo de O_2 quando o succinato é utilizado como substrato. Relativamente aos resultados das flutuações no potencial transmembranar, verificou-se que o tratamento de ratos com STZ induziu um aumento significativo do potencial de despolarização quando se utilizou o succinato como substrato. Por outro lado o potencial desenvolvido sem adição de substratos exógenos (substratos endógenos) é, nesta condição de hiperglicémia (STZ), mais elevado que no grupo sedentário (Sed). A influência do treino *per se* no potencial transmembranar induziu alterações significativas, nomeadamente, um aumento do potencial sem adição de substrato exógenos e uma diminuição da fase lag, em ambas as condições de energização. Estes resultados foram também observados quando este estímulo (treino de endurance) se encontra associado à condição de hiperglicémia (TSTZ), embora o aumento do potencial desenvolvido apenas com substratos endógenos não tenha sido estatisticamente significativo. Por outro lado, também foi observado um aumento do potencial de energização dos ratos diabéticos treinados (TSTZ) comparativamente ao grupo STZ apenas quando utilizados malato e piruvato como substratos.

Os resultados referentes aos pesos corporais, bem como as concentrações de glicose sanguínea e HbA1C, apresentaram uma variação esperada para os diferentes grupos estudados. De facto, verificou-se um decréscimo dos pesos corporais dos animais sedentários tratados com STZ, bem como um aumento da glicémia e da HbA1c nos animais do grupo STZ e TSTZ. Este aumento é

ilustrativo da condição de hiperglicémia pretendida inicialmente para estes animais.

O aumento da massa muscular esquelética ocorre sobretudo quando existe uma alteração no *turnover* proteico, ou seja, do equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica. A insulina é uma hormona que estimula a síntese proteica (Garlick et al. 1983) e inibe a proteólise (Smith et al. 1989). O tratamento de ratos com STZ é um modelo de hiperglicémia sem o aparecimento de insulino-resistência e obesidade (Bonnard et al. 2008). No estudo de Bonnard et al (2008), onze dias após a administração de STZ, os ratos tornaram-se hiperglicémicos tendo-se verificado uma redução do peso do corporal total. Por outro lado, a administração de insulina melhorou os níveis de glucose sanguíneos, restaurou as reservas lipídicas e de glicogénio, diminuiu o dano oxidativo e reverteu algumas das alterações estruturais mitocondriais observadas após o tratamento com STZ (Bonnard et al. 2008).

No músculo esquelético, a matriz extracelular encontra-se associada ao suporte mecânico das fibras musculares e às propriedades elásticas evidenciadas por este tecido (Lehti et al. 2006). Os autores reportam que o treino de endurance aumentou a velocidade de síntese dos componentes da matriz extracelular, nomeadamente a síntese de colagénio, uma importante proteína responsável pela sustentação e firmeza do tecido muscular esquelético e, deste modo, responsável por variações da massa muscular (Lehti et al. 2006). Por outro lado, ao determinar a actividade das enzimas responsáveis pela síntese de colagénio, Han et al (1995) sugeriram que a diabetes induzida por STZ diminui a síntese de colagénio enquanto que o treino de endurance tem o efeito oposto. Este efeito do treino de endurance só foi

observado nos ratos não diabéticos, uma vez que nos ratos tratados com STZ, este estímulo não conseguiu reverter o decréscimo da síntese de colagénio.

Efectivamente o aumento da massa muscular nos ratos diabéticos tratados com STZ após o treino de endurance (TSTZ) observado no nosso estudo poderá sugerir que o exercício crónico parece ter um efeito mais pronunciado na síntese proteica do que nos mecanismos associados à proteólise de proteínas estruturais, o que hipoteticamente ou pelo menos em parte, justifica o turnover positivo observado.

Uma das formas clássicas de estudar a função mitocondrial *in vitro* é utilizar parâmetros respiratórios associado a variações nas taxas de consumo de oxigénio em mitocôndrias isoladas. Estes parâmetros respiratórios podem ser úteis para analisar os mecanismos responsáveis por alterações metabólicas em vários tecidos em geral e, no músculo esquelético, em particular. Uma apreciação global dos resultados do presente estudo mostram que as alterações induzidas pela condição de 18 semanas de hiperglicémia severa nos ratos sedentários (STZ) foram revertidas após o programa de 14 semanas de treino de endurance (STZ vs. TSTZ). Estas alterações são particularmente evidentes no RCR quando utilizados substratos para o complexo I da CTE.

Nas mitocôndrias os electrões resultantes dos equivalentes reduzidos, reduzem por sua vez a molécula de oxigénio via transportadores redox da cadeia respiratória, sendo este processo acoplado com o bombeamento de iões H^+ através dos complexos I, III e IV. Experimentalmente, o decréscimo do oxigénio total dissolvido no meio de reacção, derivado da redução tetravalente da molécula de O_2 a água, pode ser utilizado para estudar as alterações na

bioenergética mitocondrial induzida por vários estímulos e condições fisiopatológicas. A utilização de vários substratos e inibidores nos ensaios realizados permite examinar de forma detalhada as contribuições, defeitos e alterações nos diferentes complexos do sistema fosforilativo, nomeadamente os complexos da CTE, a ATP sintetase, bem como os diferentes sistemas de transporte da membrana interna mitocondrial.

Na tabela 11 estão descritos os diferentes substratos e inibidores utilizados na maioria dos estudos.

Tabela 11. Substratos e inibidores dos complexos da CTE (adaptado de Fontaine et al. 1998; Monteiro et al. 2003).

Complexo da CTE	Substratos	Inibidores
I. NADH: Coenzima Q reductase	Glutamato+Malato, Malato + Piruvato/ 2-oxoglutarato	Rotenona Óxido nítrico Neurotoxina 1-metil-4-Fenilpiridina (MPP ⁺).
II. Succinato: Ubiquinona reductase	Succinato	Ácido 3-nitropropiónico Malonato Óxido nítrico
III. Ubiquinol: Citocromo c reductase		Antimicina A
IV. Citocromo c oxidase	Ascorbato/TMPD	Cianeto Azeto Monóxido de carbono
V. ATP sintase		Oligomicina

No presente estudo foi observada uma diminuição da função respiratória das mitocôndrias do músculo esquelético de ratos tratados com STZ, representado pela diminuição do RCR, resultante do aumento do estado 4 e da tendência para um decréscimo do estado 3 utilizando os substratos do complexo I (tabela 6). Apesar da diminuição observada na taxa de consumo de O₂ em estado 3

não ter sido significativa, este dado sugere uma inibição intrínseca ou dano de um ou mais componentes do sistema fosforilativo.

A respiração mitocondrial resulta de uma complexa interacção entre a funcionalidade do ciclo de Krebs, a actividade dos componentes da CTE, a utilização do potencial de membrana, a funcionalidade da ATP sintetase e do translocador de nucleótidos de adenina (Ascensao e Magalhaes 2006). Através dos dados obtidos não é possível determinar qual(ais) do(s) mecanismo(s) acima referidos foram responsáveis pela tendência observada do estado 3. Um estudo de Royer et al (2007) sobre o efeito da hiperglicémia induzida por STZ no estado 3 de respiração demonstrou que existe uma relação inversa entre a concentração de glicose sanguínea e o estado 3, bem como entre actividade fosforilativa da ATP sintetase e os níveis de glucose. Vários estudos têm reportado alterações deletérias na morfologia e funcionalidade respiratória mitocondrial do músculo esquelético de ratos diabéticos. De facto, estudos pioneiros da década de 70 e 80 e, outros mais recentes, revelaram que animais submetidos à administração de STZ mostraram sinais de degenerescência mitocondrial visíveis à microscopia electrónica (Chao et al. 1976), os quais foram acompanhadas por diminuições de actividade enzimática oxidativa (Ianzuzzo et al. 1974; Noble e Ianzuzzo 1985) e por um comprometimento da funcionalidade respiratória avaliada através das taxas de consumo de O_2 em eléctrodos polarográficos (el Midaoui et al. 1996; Rouyer et al. 2007). Como referido anteriormente, a administração de STZ e a consequente condição de hiperglicémia prolongada (18 semanas) resultaram num comprometimento significativo do RCR, um parâmetro que traduz os níveis de acoplamento entre

a oxidação de substratos e a fosforilação de ADP. Este acoplamento diminuído dos ratos diabéticos treinados resultou, pelo menos em parte, do aumento da taxa respiratória em estado 4 quando utilizados substratos para o complexo I (malato + piruvato). Este incremento é habitualmente atribuído a um aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial a prótons. De facto, a sugestão de permeabilidade decorrente do aumento do estado 4 parece estar de acordo com a tendência de diminuição do potencial transmembranar observado (tabela 8).

Em condições normais a membrana interna mitocôndrial exibe uma fuga de prótons basal cuja contribuição para a taxa metabólica nos ratos foi estimada em 20 – 25% (Rolfe e Brown 1997). De entre os factores que afectam o grau de acoplamento mitocondrial, a permeabilidade da membrana interna aos iões H^+ é o que apresenta o papel mais importante. Este fenómeno pode ser o resultado de alterações da composição e fluidez da membrana das mitocôndrias (Paradies et al. 1998; Lesnefsky et al. 2001). Para além das alterações referidas na permeabilidade da membrana interna, o estudo de Paradies et al (1998) sugere também que as alterações induzidas pelo stress oxidativo na cardiolipina da membrana mitocondrial podem levar a uma diminuição da actividade da citocromo oxidase, sendo a actividade deste complexo da CTE profundamente dependente deste fosfolípido. Adicionalmente, a cardiolipina apresenta também um papel importante no mecanismo de importação de proteínas mitocondriais sendo este mecanismo influenciado pelo conteúdo do referido fosfolípido (Mandieu et al. 1995).

Apesar da tendência para a diminuição da taxa de consumo de O_2 em estado 3 ter sido evidenciada nas duas condições de substratos consideradas

(substratos para o complexo I e II), o mesmo não se observou para o estado 4 . Efectivamente quando utilizamos succinato na presença de rotenona, verificou-se uma diminuição significativa deste parâmetro respiratório, sugestiva de diminuição de permeabilidade da membrana interna mitocondrial (tabela 4). Estes resultados não foram acompanhados por variações significativas no $\Delta\Psi_m$ avaliado (tabela 6).

O que determina a eficiência da fosforilação oxidativa é o grau de acoplamento entre o consumo de oxigénio e a produção de ATP, variando consoante as necessidades celulares (Stucki 1980). O índice ADP/O reflecte esta eficiência sendo definido pelo rácio entre o número de nanomoles de ADP fosforiladas e o de átomos de oxigénio consumidos. Deste modo, rácios elevados são observados em mitocôndrias que apresentam uma boa eficiência fosforilativa. Perante os resultados obtidos, parece haver evidências sugestivas de que a hiperglicémia severa e prolongada não altera a eficiência fosforilativa, uma vez que o índice ADP/O do grupo de ratos diabéticos sedentários (STZ) não apresentou diferenças significativas relativamente ao grupo Sed.

Os resultados relativos ao ADP/O referidos (Sed vs STZ) estão de acordo com a lag phase observada aquando da avaliação do potencial induzido pela adição de ADP. Contudo, e considerando ambas as condições de substratos utilizadas, verificou-se uma tendência para que este parâmetro aumente (18 segundos com a utilização de malato + piruvato e 6 segundos com a utilização de succinato), o que sugere que o tempo necessário para restabelecer o potencial de membrana após a adição de ADP e deste modo induzir a sua fosforilação, poderá ser superior nas mitocôndrias dos ratos diabéticos (STZ) do que nas mitocôndrias dos ratos sedentários (Sed). Estes resultados,

contrariamente ao que anteriormente foi referido em relação ao potencial de despolarização e ao potencial desenvolvido com substratos endógenos, sugerem um efeito deletério induzido por esta condição patológica.

O aumento do $\Delta\psi$ com substratos endógenos observado nas mitocôndrias dos ratos diabéticos (STZ) foi um dos achados interessantes do presente estudo. Quando as mitocôndrias são adicionadas ao meio de reacção, o potencial de membrana aumenta e diminui imediatamente em poucos segundos. Este processo está profundamente dependente da quantidade de substratos endógenos e o aumento do potencial de membrana anteriormente referido para as mitocôndrias diabéticas reflecte uma maior disponibilidade dos mesmos, podendo deste modo considerar-se uma resposta adaptativa por parte destes organelos face à referida condição de hiperglicémia severa e prolongada. Por outro lado, foi igualmente observado um aumento significativo do potencial de despolarização após adição de ADP, quando utilizado succinato com substrato energético, nas mitocôndrias de ratos diabéticos (STZ). Aparentemente o complexo II da CTE não foi tão sensível ao efeito deletério provocado por este estado patológico.

As adaptações musculares após o estímulo de treino de endurance incluem o aumento da capacidade oxidativa muscular, principalmente originada por um aumento da densidade mitocondrial. É reconhecida a indução de inúmeras adaptações fisiológicas provocadas pelo treino de endurance, que resultam no aumento da performance (Hoppeler e Fluck 2003). De entre essas alterações incluem-se as relacionadas com a função respiratória mitocondrial (Tonkonogi et al. 2000b). Neste sentido, e como referido anteriormente, a análise dos índices respiratórios, estado 3, estado 4, RCR e ADP/O, usando substratos

para o complexo I e II teve por objectivo analisar a funcionalidade e a capacidade fosforilativa mitocondrial. Adicionalmente, como forma de confirmar que o treino de endurance traduz melhorias na função mitocondrial, determinámos a actividade respiratória associada ao potencial de membrana mitocondrial e a um ciclo fosforilativo induzido pela adição de ADP do músculo *gastrocnemius*.

Os resultados obtidos sugerem, de uma maneira geral, que o treino de endurance induziu efeitos benéficos nos parâmetros funcionais relacionados com a CTE mitocondrial, como observado pelo aumento do RCR e como evidenciado pelo aumento da taxa respiratória em estado 3 (significativo para o complexo II) (tabela 4 e 5). O aumento do estado 3 contribui em parte para o aumento do RCR, podendo ser interpretado como um sinal de melhoria na resposta funcional da cadeia respiratória mitocondrial, derivado de um maior acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação do ADP. Venditti et. al (1999) não encontraram diferenças no estado 3, 4 e RCR após um programa de treino de endurance (10 semanas de natação), sugerindo não existirem melhorias da função respiratória das mitocôndrias do músculo *gastrocnemius*. Os resultados divergem dos encontrados no presente trabalho, facto que pode ser justificado pelas diferenças no tipo e duração do programa de treino aplicado. Contudo, recentemente Daussin et. al (2008) observaram aumentos nas taxas máximas respiratórias mitocondriais de sujeitos treinados, comparando-os com sedentários, obtidas a partir de fibras permeabilizadas do *vastus lateralis* usando substratos para os complexos I, II e III. Porém, no mesmo estudo são reportados incrementos superiores da taxa respiratória em estado 3 para o complexo I quando comparados com os incrementos

verificados nos complexos II e IV da CTE. Com base nos resultados obtidos os autores atribuem a melhoria da função mitocondrial em atletas ao incremento da actividade do complexo I da cadeia respiratória. Os resultados obtidos no presente estudo não corroboram o incremento desproporcional da capacidade funcional do complexo I obtido no estudo supracitado, sendo que as melhorias respiratórias se verificam essencialmente no estado 3 usando succinato, como substrato para o complexo II. Relativamente ao estado 4, não se verificam diferenças entre os grupos estudados corroborando estudos realizados previamente com mitocôndrias isoladas, que referem que a taxa respiratória em estado 4 não sofre alterações (Tonkonogi et al. 2000a). As melhorias reportadas do estado 3 foram acompanhadas por uma redução da lag phase, utilizando ambos os substratos (malato + piruvato e, succinato). A redução da lag phase observada nos resultados do nosso estudo parece indicar uma diminuição no tempo necessário para restabelecer o potencial de membrana dissipado após a adição, e consequentemente, fosforilação do ADP nas mitocôndrias do músculo *gastrocnemius* do grupo treinado, em comparação com o grupo sedentário, para ambos os complexos I e II.

O estudo complementar do $\Delta\psi$ parece ser imprescindível para uma análise integrada da função mitocondrial, uma vez que reflecte as relações energéticas básicas na manutenção da homeostasia celular. O gradiente electroquímico decorrente do bombeamento de protões através da membrana interna (Murphy e Brand 1988) é indispensável, entre outros aspectos, para a fosforilação do ADP (Stock et al. 1999). Neste sentido a avaliação do $\Delta\psi$ nas mitocôndrias do músculo esquelético parece ser revestido de uma importância decisiva para a

compreensão integrada da funcionalidade mitocondrial e do seu impacto na homeostasia celular.

Segundo os resultados obtidos, as 14 semanas de treino de endurance não afectaram o $\Delta\psi$ máximo usando succinato e o malato+piruvato, nem as flutuações associadas ao ciclo fosforilativo. Venditti et. al (1999) determinaram o $\Delta\psi$ basal de mitocôndrias do músculo *gastrocnemius*, após 10 semanas de treino de natação, usando a sonda rodamina 123. Contudo, contrariamente aos resultados obtidos, este estudo reporta uma redução do $\Delta\psi$ das mitocôndrias musculares esqueléticas. No presente estudo observámos também, no grupo treinado, um aumento significativo do $\Delta\psi$ sem adição de substratos exógenos, na presença e ausência de rotenona no meio de reacção (Tabelas 8 e 9). Deste modo, o aumento da disponibilidade de substratos endógenos providencia a formação de equivalentes reduzidos e consequentemente, aumento do fornecimento de electrões para a CTE mitocondrial.

Vários são os estudos que implicam o treino de endurance na melhoria dos efeitos deletérios induzidos por diversas condições patológicas (para refs ver Starnes et al. 2007; Kavazis et al. 2008). Da mesma forma, o nosso estudo teve por objectivo avaliar o efeito de um programa de treino de endurance realizado em tapete rolante na funcionalidade mitocondrial de ratos com hiperglicémia severa e prolongada induzida pela administração de STZ. Nos animais diabéticos o treino de endurance resultou num incremento do estado 3, diminuição do estado 4 e aumento do RCR, comparativamente ao grupo STZ, quando utilizados malato e piruvato como substratos energéticos (tabela 6). De facto, estes resultados parecem demonstrar que a disfunção mitocondrial

expressa pela diminuição do RCR no grupo STZ foi atenuada ou completamente revertida pelo treino (TSTZ vs. STZ). Os resultados obtidos nos parâmetros respiratórios utilizando o substrato succinato (tabela 7) não mimetizaram por completo os anteriormente referidos para o complexo I. Apesar de se ter verificado um aumento significativo da taxa respiratória em estado 3, constatou-se também um aumento surpreendente do estado 4 sem existirem, por sua vez, alterações significativas no RCR (STZ vs. TSTZ).

Como foi anteriormente referido as alterações aparentemente positivas nos parâmetros respiratórios, nomeadamente, dos associados à capacidade do sistema fosforilativo (estado 3 e RCR), observados após o treino, poderão ser explicados por alguns dos seguintes factores: 1) fornecimento de equivalentes reduzidos; 2) funcionalidade dos componentes da CTE; 3) actividade da ATP sintetase; 4) conteúdo e funcionalidade dos translocadores de nucleótidos de adenina. Deste modo, isolada ou coordenadamente, estes mecanismos poderão contribuir para justificar a atenuação e/ou reversão completa da disfunção mitocondrial associada à condição em estudo nos ratos sedentários (STZ vs. TSTZ). De facto, vários estudos sobre o efeito do treino de endurance na funcionalidade mitocondrial de animais em diversas condições fisiopatológicas, demonstram que o estímulo crónico referido pode atenuar ou mesmo reverter o dano observado. Ascensão et al (2005a) demonstraram que o treino de endurance limitou as disfunções mitocondriais induzidas pelo tratamento com doxorubicina, nomeadamente as diminuições significativas da taxa respiratória em estado 3 e do RCR. Os mesmos autores (Ascensao et al. 2006b) estudaram os efeitos do treino de endurance nas mitocôndrias cardíacas de ratos submetidos a anoxia-reoxigenação *in vitro* e observaram

que as alterações funcionais (aumento do estado 4 e diminuição do RCR) foram significativamente atenuadas pelo treino aplicado. Adicionalmente, Mokhtar et al (1993) efectuaram um estudo, com particular relevância, sobre o efeito do treino de endurance na funcionalidade das mitocôndrias musculares cardíacas de ratos sujeitos a um tratamento com STZ, reportando a reversão completa das alterações (diminuição do estado 3 e RCR) induzidas por esta condição de hiperglicémia severa e prolongada. Deste modo, os resultados obtidos pelo estudo supracitado corroboram em parte os nossos resultados, sugerindo uma sensibilidade semelhante das mitocôndrias cardíacas diabéticas e esqueléticas, ao efeito do treino de endurance, comparativamente às isoladas do tecido muscular esquelético. El Midaoui et al (1996) demonstraram que o treino de endurance melhora a taxa de síntese de ATP mas não modifica significativamente a ligeira alteração dos parâmetros respiratórios mitocondriais do músculo esquelético (estado 3, estado 4 e RCR), induzida pelo tratamento com STZ. Curiosamente, neste estudo não houve diferenças significativas no que diz respeito aos referidos parâmetros respiratórios entre o grupo de ratos diabéticos sedentários e o grupo de ratos não diabéticos sedentários, o mesmo acontecendo após o estímulo de treino de endurance. Estes resultados estão em discordância com os obtidos pelo nosso estudo, podendo ser explicados por diferenças no tempo de tratamento com STZ (11 semanas vs. 18 semanas) e na duração do protocolo de treino (10 semanas vs 14 semanas). Os resultados do presente estudo poderão sugerir que o complexo I é particularmente sensível ao dano causado pela condição diabética severa e prolongada como também o mais influenciado/modulado pelo efeito do treino.

Adicionalmente, foram também observados incrementos do potencial de energização e uma diminuição do tempo da lag phase, utilizando substratos para o complexo I, quando se comparam os grupos TSTZ e STZ. Um resultado surpreendente foi a diminuição do potencial de membrana observado após a adição de ADP nas mitocôndrias dos ratos diabéticos treinados, sugerindo a existência de um possível dano na capacidade mitocondrial em responder ao decréscimo do potencial induzido pelo ADP.

As mitocôndrias são os locais primários de produção de ERO_N e também os alvos primários do dano oxidativo quando a produção de tais espécies reactivas excede a capacidade de actuação do sistema antioxidante (Ji 1999). Desta maneira, várias sub-unidades do complexo respiratório mitocondrial (I - V) são susceptíveis ao dano oxidativo (Di Meo e Venditti 2001). Por outro lado, estudos indicam que existe uma relação entre a elevação prolongada dos níveis de glucose e a disfunção mitocondrial causada pelo aumento da produção de ERO_N (Laaksonen et al. 1996).

O tratamento de ratos com STZ é um modelo de hiperglicémia no qual o stress oxidativo é um dos factores associados às alterações funcionais e estruturais das mitocôndrias (Bonnard et al. 2008). De facto, Bonnard et al (2008) sugerem que as alterações mitocondriais resultam do aumento da produção de ERO_N no músculo esquelético de ratos diabéticos, não constituindo por isso uma causa desta condição patológica mas sim uma consequência.

De modo a estudar o efeito da condição de hiperglicémia severa e prolongada, bem como, o efeito do treino em ratos diabéticos e não diabéticos na

capacidade antioxidante foram determinadas no presente estudo as actividades de algumas enzimas e o status antioxidante total. Contudo, por impossibilidade associada à escassez de amostra da fracção mitocondrial, a avaliação da capacidade antioxidante foi efectuada no homogeneizado muscular total.

Os resultados obtidos relativamente às actividades aumentadas da SOD e GPx no homogenizado do músculo esquelético de ratos diabéticos sedentários (Sed vs STZ) poderá estar em concordância com o reportado stress oxidativo, característico deste modelo severo e prolongado, podendo deste modo estar associado ao aumento na actividade de algumas enzimas antioxidantes. Allen et al (2000) observaram que existe uma relação positiva entre o stress oxidativo e a expressão de enzimas. Por outro lado, outros estudos sobre o efeito do tratamento com STZ na actividade antioxidante da SOD e da GPx no músculo esquelético reportam diminuições (De Angelis et al. 2000; Koksoy et al. 2007; Brocca et al. 2008) ou mesmo inalterações (Lammi-Keefe et al. 1984) induzidas por esta condição hiperglicémica severa. De facto, da extensa pesquisa encontrámos apenas um estudo (Py et al. 2001) que reporta um aumento da actividade da GPx no músculo *gastrocnemius* de rato tratado com STZ. Aparentemente, as alterações na actividade antioxidante induzidas pelo tratamento com STZ, depende do tipo de tecido estudado, do tempo entre a indução da diabetes e o sacrifício dos animais e poderão estar relacionadas com a diferente capacidade de adaptação dos mesmos ao stress oxidativo.

O aumento da actividade da SOD no músculo esquelético de ratos não diabéticos após o estímulo de treino (T) foi também significativo e espectável uma vez que existem vários estudos que corroboram este resultado (Higuchi et al. 1985; Criswell et al. 1993; Leeuwenburgh et al. 1994; Leeuwenburgh et al.

1997). Este incremento poderá ser justificado pela acção da actividade contráctil na sinalização celular, dependente de ERON, conducente à subexpressão de genes que codificam para a expressão desta proteína (para refs. ver Ji 2007). De facto, como referido anteriormente (ver revisão da literatura) as ERON produzidas durante o estímulo de contracção apresentam um papel importante na adaptação muscular ao stress oxidativo, via activação da transdução de sinais para a síntese de enzimas antioxidantes. De entre esses mecanismos transdutores de sinais encontram-se o factor nuclear kB (NFkB) e a MAPK. Por outro lado, a existência de inúmeros locais de ligação aos genes antioxidantes sugerem uma enorme interacção entre os mecanismos de sinalização e a expressão génética (para refs. ver Ji 2007). Estes mecanismos reguladores garantem a correcta expressão dos genes, mesmo em condições onde a homeostase celular está comprometida, como é o caso do stress oxidativo.

Um facto supreendente e inesperado foi a diminuição da actividade das enzimas SOD e GPx em ratos do grupo TSTZ quando comparados com o grupo STZ que pressupõe que o protocolo de treino não teve um efeito adicional na modelação da actividade destas enzimas. Laaksonen et al. (1996) demonstraram que o treino de endurance pode proteger os pacientes diabéticos dos efeitos do stress oxidativo. Como demonstrado por outro grupo (Atalay et al. 2004), o músculo esquelético de ratos diabéticos treinado apresenta uma capacidade de reverter o aumento da susceptibilidade ao dano oxidativo, através do incremento da expressão de proteínas de choque térmico diminuindo assim os sinais de stress oxidativo. Estas proteínas são parte integrante do sistema de defesa endógeno e actuam como *chaperones*

moleculares, permitindo a manutenção da integridade estrutural proteica (Benjamin e McMillan 1998). Desta forma, a diminuição dos sinais de stress oxidativo poderá de certa maneira, modelar negativamente a actividade das enzimas antioxidantes. Contrariamente aos resultados obtidos pelo nosso estudo Gul, Laaksonen et al (2002) reportaram que um protocolo de treino de endurance de 8 semanas aumentou a actividade da GPx no músculo *gastrocnemius* de ratos tratados com STZ. As diferenças na duração do tratamento com STZ bem como no protocolo de treino poderão estar na base das discrepâncias encontradas. De facto, o tratamento de 18 semanas com STZ associado ao protocolo de treino de endurance aplicado pelo nosso estudo, mostrou não possuir um efeito cumulativo na modelação positiva destas enzimas. Por outro lado, este dado não invalida a possibilidade de existir uma modelação positiva noutros sistemas antioxidantes bem como, uma diminuição do níveis de stress oxidativo no músculo *gastrocnemius*, este último podendo ser avaliado, através da determinação do conteúdo em carbonilos e TBARS.

7. Conclusões

O presente trabalho mostrou que o treino de endurance atenuou ou reverteu completamente as alterações nos parâmetros respiratórios e os associados ao potencial transmembranar em mitocôndrias isoladas de músculo *gastrocnemius* de ratos em condição de hiperglicémia severa e prolongada induzida pela administração de STZ. Adicionalmente, os dois estímulos combinados ou isoladamente, apresentaram um efeito modelador na actividade de algumas enzimas antioxidantes analisadas no homogeneizado muscular.

Deste modo foi possível observar:

- O tratamento com STZ induziu hiperglicémia severa e prolongada nos animais.
- A condição diabética resultou em perturbações na funcionalidade das mitocôndrias isoladas do músculo *gastrocnemius* expressas por alterações na capacidade do sistema fosforilativo.
- O treino de endurance atenuou ou reverteu as modificações da funcionalidade mitocondrial resultantes da condição hiperglicémica.
- Quer o tratamento com STZ quer o treino de endurance modularam positivamente as actividades antioxidantes da SOD e GPX. Contudo, não foi observado efeito cumulativo positivo sobre a condição hiperglicémica na modelação antioxidante da SOD e GPx.

8. Referências bibliográficas

1. Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubcic V, Hood DA (2003) Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol* 88: 99-107
2. Adhihetty PJ, Ljubcic V, Menzies KJ, Hood DA (2005) Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C994-C1001
3. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A (2005) Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84: 1-7
4. Alessio HM, Goldfarb AH (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 64: 1333-1336
5. Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499
6. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70: 200-214
7. Ascensao A, Ferreira R, Magalhaes J (2007) Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 117: 16-30
8. Ascensao A, Magalhaes J (2006) Exercise and mitochondrial function in striated muscle. AJ Moreno, PJ Oliveira, MC Palmeira (eds) *Mitochondrial Pharmacology and Toxicology*. Transworld Research Network, Kerala, 237-270
9. Ascensao A, Magalhaes J, Soares J, Ferreira R, Neuparth M, Marques F, Oliveira J, Duarte J (2005a) Endurance training attenuates doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. *Int J Cardiol* 100: 451-460
10. Ascensao A, Magalhaes J, Soares J, Ferreira R, Neuparth MJ, Appell HJ, Duarte J (2005b) Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. *Int J Sports Med* 26: 258-267
11. Ascensao A, Magalhaes J, Soares J, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Duarte J (2006a) Endurance exercise training attenuates morphological signs of cardiac muscle damage induced by doxorubicin in mice. *Basic Appl Myol* 16: 27-35
12. Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ, Duarte JA (2006b) Endurance training limits the functional

- alterations of heart rat mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. *Int J Cardiol* 109: 169-178
13. Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hanninen O, Sen CK (2004) Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 97: 605-611
 14. Benard G, Rossignol R (2008) Ultrastructure of the mitochondrial and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxidantes & redox signaling* 10: 1313-1342
 15. Bengtsson J, Gustafsson T, Widegren U, Jansson E, Sundberg CJ (2001) Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflugers Arch* 443: 61-66
 16. Benjamin IJ, McMillan DR (1998) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83: 117-132
 17. Berthon P, Freyssenet D, Chatard JC, Castells J, Mujika I, Geyssant A, Guezennec CY, Denis C (1995) Mitochondrial ATP production rate in 55 to 73-year-old men: effect of endurance training. *Acta Physiol Scand* 154: 269-274
 18. Bogoyevitch MA (2000) Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 45: 826-842
 19. Bonen A, Luiken JJ, Liu S, Dyck DJ, Kiens B, Kristiansen S, Turcotte LP, Van Der Vusse GJ, Glatz JF (1998) Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am J Physiol* 275: E471-478
 20. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 118: 789-800
 21. Bota DA, Davies KJ (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion* 1: 33-49
 22. Bowles DK, Torgan CE, Ebner S, Kehrer JP, Ivy JL, Starnes JW (1991) Effects of acute, submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. *Free Radic Res Commun* 14: 139-143
 23. Brocca L, D'Antona G, Bachi A, Pellegrino MA (2008) Amino acid supplements improve native antioxidant enzyme expression in the skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Cardiol* 101: 57E-62E
 24. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-833

25. Brooks GA, Fahey TD, White TP, Baldwin KM (2000) Exercise Physiology: human bioenergetics and its applications. Mayfield Publishing Company, Mountain View, California
26. Cadenas E (2004) Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* 25: 17-26
27. Chao TT, Ianuzzo CD, Armstrong RB, Albright JT, Anapolle SE (1976) Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tissue Res* 168: 239-246
28. Chen V, Ianuzzo CD (1982) Metabolic alterations in skeletal muscle of chronically streptozotocin-diabetic rats. *Arch Biochem Biophys* 217: 131-138
29. Clarkson PM (1995) Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 131-141
30. Cohen PT (1993) Important roles for novel protein phosphatases dephosphorylating serine and threonine residues. *Biochem Soc Trans* 21: 884-888
31. Constable SH, Favier RJ, McLane JA, Fell RD, Chen M, Holloszy JO (1987) Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training. *Am. J. Physiol* 253: C316-C322
32. Crimi S, Cipolli D, Infantone E, Infantone L, Lunetta M (1995) Microalbuminuria and severity of diabetic retinopathy in type 1 diabetic patients: association and relationship with some risk factors. *Diabete Metab* 21: 440-445
33. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S (1993) High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 25: 1135-1140
34. Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2): 233-249
35. Crompton M, Virji S, Ward JM (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258: 729-735
36. Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, Ventura-Clapier R, Mettauer B, Piquard F, Geny B, Richard R (2008) Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 104: 1436-1441
37. De Angelis KL, Cestari IA, Barp J, Dall'Ago P, Fernandes TG, de Bittencourt PI, Bello-Klein A, Bello AA, Llesuy S, Irigoyen MC (2000) Oxidative stress in

- the latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 33: 1363-1368
38. Di Meo S, Venditti P (2001) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10: 125-140
 39. Duchen MR (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529 Pt 1: 57-68
 40. Dudley GA, Tullson PC, Terjung RL (1987) Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J Biol Chem* 262: 9109-9114
 41. el Midaoui A, Tancrede G, Nadeau A (1996) Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism* 45: 810-816
 42. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordóñez-Llanos J, Marrugat J (2003) Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 167: 327-334
 43. Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 5: 94-111
 44. Felber JP, Ferrannini E, Golay A, Meyer HU, Theibaud D, Curchod B, Maeder E, Jequier E, DeFronzo RA (1987) Role of lipid oxidation in pathogenesis of insulin resistance of obesity and type II diabetes. *Diabetes* 36: 1341-1350
 45. Fernstrom M, Tonkonogi M, Sahlin K (2004) Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. *J Physiol* 554: 755-763
 46. Finaud J, Lac G, Filaire E (2006) Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med* 36: 327-358
 47. Fluck M, Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 159-216
 48. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 273: 12662-12668
 49. Frankiewicz-Jozko A, Faff J, Sieradzan-Gabelska B (1996) Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post-exercise period in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74: 470-474

50. Fritz T, Kramer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, Krook A (2006) Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 492-498
51. Garlick PJ, Fern M, Preedy VR (1983) The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in postabsorptive rats. *Biochem J* 210: 669-676
52. Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauer B, Lampert E, Veksler V, Ventura-Clapier R (2005) Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *Faseb J* 19: 43-52
53. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G (2001) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 433-442
54. Gohil K, Packer L, de Lumen B, Brooks GA, Terblanche SE (1986) Vitamin E deficiency and vitamin C supplements: exercise and mitochondrial oxidation. *J Appl Physiol* 60: 1986-1991
55. Goodpaster BH, Wolf D (2004) Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes* 5: 219-226
56. Gordon JW, Rungi AA, Inagaki H, Hood DA (2001) Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 389-396
57. Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629
58. Grzelkowska K, Dardevet D, Balage M, Grizard J (1999) Involvement of the rapamycin-sensitive pathway in the insulin regulation of muscle protein synthesis in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol* 160: 137-145
59. Gul M, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hanninen O (2002) Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports* 12: 163-170
60. Guo Z (2007) Intramyocellular lipid kinetics and insulin resistance. *Lipids in Health and Disease* 6: 18
61. Guyton KZ, Xu Q, Holbrook NJ (1996) Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem J* 314 (Pt 2): 547-554
62. Hammeren J, Powers S, Lawler J, Criswell D, Martin D, Lowenthal D, Pollock M (1992) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle

- oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. *Int J Sports Med* 13: 412-416
63. Han X, Karpakka J, Kainulainen H, Takala TE (1995) Effects of streptozotocin-induced diabetes, physical training and their combination on collagen biosynthesis in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 155: 9-16
 64. Hansford RG (1994) Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J Bioenerg Biomembr* 26: 495-508
 65. Hellsten Y, Apple FS, Sjodin B (1996) Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81: 1484-1487
 66. Henriksen EJ (2002) Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol* 93: 788-796
 67. Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO (1985) Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol* 40: 281-286
 68. Holloszy JO (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 242: 2278-2282
 69. Holloszy JO, Coyle EF (1984) Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol* 56: 831-839
 70. Holman GD, Kasuga M (1997) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40: 991-1003
 71. Hood D, Rungi A, Colavecchia M, Gordon J, Schneider J (2002) Stress proteins and mitochondria. M Locke, E Noble (eds) *Exercise and stress response - The role of stress proteins*. CRC Press, Boca Raton - Florida, 151-162
 72. Hood DA (2001) Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle: Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1137-1157
 73. Hood DA, Adhihetty PJ, Colavecchia M, Gordon JW, Irrcher I, Joseph AM, Lowe ST, Rungi AA (2003) Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med Sci Sports Exerc* 35: 86-94
 74. Hood DA, Joseph AM (2004) Mitochondrial assembly: protein import. *Proc Nutr Soc* 63: 293-300
 75. Hoppeler H (1986) Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7: 187-204

76. Hoppeler H, Fluck M (2002) Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 205: 2143-2152
77. Hoppeler H, Fluck M (2003) Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 35: 95-104
78. Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindsted SL, Claassen H, Vock P, Weibel ER (1985) Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 59: 320-327
79. Horowitz JF, Klein S (2000) Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr* 72: 558S-563S
80. Houten SM, Auwerx J (2004) PGC-1alpha: turbocharging mitochondria. *Cell* 119: 5-7
81. Ianuzzo CD, Lesser M, Battista F (1974) Metabolic adaptations in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic rats following exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* 58: 107-111
82. Jacobson J, Duchon MR (2002) Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes -- requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci* 115: 1175-1188
83. Ji LL (1999) Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 283-292
84. Ji LL (2007) Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 42: 582-593
85. Kahn CR (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084
86. Kavazis AN, McClung JM, Hood DA, Powers SK (2008) Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H928-935
87. Kayali R, Cakatay U, Telci A, Akcay T, Sivas A, Altug T (2004) Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* 20: 315-321
88. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2944-2950
89. King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431
90. Koksoy C, Ozis E, Cakmak A, Yazgan U, Okcu-Heper A, Koksoy A, Demirpence E, Deniz Dincer U (2007) Simvastatin pretreatment reduces

- the severity of limb ischemia in an experimental diabetes model. *J Vasc Surg* 45: 590-596
91. Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhausl W, Roden M (2002) Mechanism of Amino Acid-Induced Skeletal Muscle Insulin Resistance in Humans. *Diabetes* 51: 599-605
 92. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK (1996) Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care* 19: 569-574
 93. Lammi-Keefe CJ, Swan PB, Hegarty PV (1984) Evidence for increased peroxidative activity in muscles from streptozotocin-diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 176: 27-31
 94. Lancaster JR, Jr., Laster SM, Gooding LR (1989) Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 248: 169-174
 95. Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ (1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337-2343
 96. Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL (1994) Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 267: R439-445
 97. Leeuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW (1999) Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med* 27: 186-192
 98. Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, Ji LL (1997) Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* 272: R363-369
 99. Lehti TM, Silvennoinen M, Kivela R, Kainulainen H, Komulainen J (2006) Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E900-907
 100. Lehti TM, Silvennoinen M, Kivela R, Kainulainen H, Komulainen J (2007) Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E533-542
 101. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hoppel CL (2001) Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2770-2778

102. Li C (1990) [Morphometric analysis of myocardial cells in experimental diabetic rats]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 19: 271-274
103. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 275: 25665-25671
104. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489
105. Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H, Yki-Jarvinen H, Taskinen MR (1999) A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 276: E1083-1091
106. Ljubcic V, Adihetty PJ, Hood DA (2004) Role of UCP3 in state 4 respiration during contractile activity-induced mitochondrial biogenesis. *J Appl Physiol* 97: 976-983
107. Lumini JA, Magalhaes J, Oliveira PJ, Ascensao A (2008) Beneficial effects of exercise on muscle mitochondrial function in diabetes mellitus. *Sports Med* 38: 735-750
108. Mandieau V, Martin I, Ruysschaert JM (1995) Interaction between cardiolipin and the mitochondrial presequence of cytochrome c oxidase subunit IV favours lipid mixing without destabilizing the bilayer structure. *FEBS Lett* 368: 15-18
109. Margaritis I, Tessier F, Richard MJ, Marconnet P (1997) No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 18: 186-190
110. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG (2001) Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 31: 911-922
111. McCarty MF (2005) Up-regulation of PPARgamma coactivator-1alpha as a strategy for preventing and reversing insulin resistance and obesity. *Med Hypotheses* 64: 399-407
112. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H (2001) Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 84: 1-6
113. Mokhtar N, Lavoie JP, Rousseau-Migneron S, Nadeau A (1993) Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. *Diabetes* 42: 682-687
114. Monteiro P, Oliveira PJ, Goncalves L, Providencia LA (2003) Mitochondria: role in ischemia, reperfusion and cell death. *Rev Port Cardiol* 22: 233-254

115. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI (2005) Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115: 3587-3593
116. Murphy MP, Brand MD (1988) Membrane-potential-dependent changes in the stoichiometry of charge translocation by the mitochondrial electron transport chain. *Eur J Biochem* 173: 637-644
117. Napier I, Ponka P, Richardson DR (2005) Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* 105: 1867-1874
118. Nemirovskaia TL, Shenkman BS, Nekrasov AN, Kuznetsov AV, Saks VA (1993) [Effect of training on the structural-metabolic indicators in athletes' skeletal muscles]. *Biokhimiia* 58: 471-479
119. Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T (2000) Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20: 7311-7318
120. Nicholls DG (2004) Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3: 35-40
121. Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ (2006) Insulin Resistance and Atherosclerosis. *Endocr Rev* 27: 242-259
122. Noble EG, Ianuzzo CD (1985) Influence of training on skeletal muscle enzymatic adaptations in normal and diabetic rats. *Am J Physiol* 249: E360-365
123. Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, Ohno H (1997) Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1579-1585
124. Ornatsky OI, Connor MK, Hood DA (1995) Expression of stress proteins and mitochondrial chaperonins in chronically stimulated skeletal muscle. *Biochem J* 311 (Pt 1): 119-123
125. Oyanagui Y (1984) Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 142: 290-296
126. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD (2003) Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 89: 100-107
127. Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E (1998) Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. *FEBS Lett* 424: 155-158

128. Patti M-E (1999) Nutrient Modulation of Cellular Insulin Action. *Ann NY Acad Sci* 892: 187-203
129. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8466-8471
130. Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP (2003) Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* 31: 1312-1315
131. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G (2004) Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J Biol Chem* 279: 53103-53108
132. Phaneuf S, Leeuwenburgh C (2001) Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33: 393-396
133. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R (2001) The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* 20: 2690-2701
134. Pinton P, Leo S, Wieckowski MR, Di Benedetto G, Rizzuto R (2004) Long-term modulation of mitochondrial Ca²⁺ signals by protein kinase C isozymes. *J Cell Biol* 165: 223-232
135. Plant DR, Gregorevic P, Warmington SA, Williams DA, Lynch GS (2003) Endurance training adaptations modulate the redox-force relationship of rat isolated slow-twitch skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 77-81
136. Powers S, Sen CK (2000) Physiological antioxidants and exercise training. CK Sen, L Packer, O Hanninen (eds) *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Elsevier science B.V., Basel, 221-242
137. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 266: R375-380
138. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN (2008) Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44: 193-201
139. Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65: 563-607

140. Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA (2002) Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 27: 349-395
141. Puntschart A, Claassen H, Jostarndt K, Hoppeler H, Billeter R (1995) mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. *Am J Physiol* 269: C619-625
142. Putman CT, Kiricsi M, Pearcey J, MacLean IM, Bamford JA, Murdoch GK, Dixon WT, Pette D (2003) AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions. *J Physiol* 551: 169-178
143. Py G, Eydoux N, Perez-Martin A, Raynaud E, Brun JF, Prefaut C, Mercier J (2001) Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport. *Metabolism* 50: 418-424
144. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999) The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27: 69-74
145. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789
146. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3: 839-843
147. Reaven GM, Chang F (1981) Effect of exercise-training on the metabolic manifestations of streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Diabetologia* 21: 415-417
148. Reichmann H, Hoppeler H, Mathieu-Costello O, von Bergen F, Pette D (1985) Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflugers Arch* 404: 1-9
149. Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T (2000) Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 Pt 1: 37-47
150. Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiol. Rev.* 86: 369-408
151. Roberts CK, Won D, Pruthi S, Lin SS, Barnard RJ (2006) Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. *Diabetes Res Clin Pract* 73: 249-259
152. Rolfe DF, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731-758

153. Rossmeisl M, Barbatelli G, Flachs P, Brauner P, Zingaretti MC, Marelli M, Janovska P, Horakova M, Syrový I, Cinti S, Kopecky J (2002) Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo. *Eur J Biochem* 269: 19-28
154. Roussel D, Lhenry F, Ecochard L, Sempore B, Rouanet JL, Favier R (2000) Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem J* 350 Pt 2: 547-553
155. Rouyer O, Zoll J, Daussin F, Damge C, Helms P, Talha S, Rasseneur L, Piquard F, Geny B (2007) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Physiol* 92: 1047-1056
156. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2: 476-483
157. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806
158. Saltin B (1986) Physiological adaptation to physical conditioning. Old problems revisited. *Acta Med Scand Suppl* 711: 11-24
159. Scarpulla RC (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576: 1-14
160. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267: 5317-5323
161. Searls YM, Smirnova IV, Fegley BR, Stehno-Bittel L (2004) Exercise attenuates diabetes-induced ultrastructural changes in rat cardiac tissue. *Med Sci Sports Exerc* 36: 1863-1870
162. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7834-7838
163. Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, Nair KS (2003) Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes* 52: 1888-1896
164. Simoneau JA, Kelley DE (1997) Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 83: 166-171

165. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE (2004) Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *Faseb J* 18: 1150-1152
166. Siu PM, Bryner RW, Murlasits Z, Alway SE (2005) Response of XIAP, ARC, and FLIP apoptotic suppressors to 8 wk of treadmill running in rat heart and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99: 204-209
167. Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ (2003) Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res* 36: 183-190
168. Smith OL, Wong CY, Gelfand RA (1989) Skeletal muscle proteolysis in rats with acute streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 38: 1117-1122
169. Starnes JW, Barnes BD, Olsen ME (2007) Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. *J Appl Physiol* 102: 1793-1798
170. Starnes JW, Cantu G, Farrar RP, Kehrer JP (1989) Skeletal muscle lipid peroxidation in exercised and food-restricted rats during aging. *J Appl Physiol* 67: 69-75
171. Starritt EC, Angus D, Hargreaves M (1999) Effect of short-term training on mitochondrial ATP production rate in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 86: 450-454
172. Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286: 1700-1705
173. Stucki JW (1980) The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem* 109: 269-283
174. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446
175. Takahashi M, Chesley A, Freyssenet D, Hood DA (1998) Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system. *Am J Physiol* 274: C1380-1387
176. Takahashi M, Hood DA (1993) Chronic stimulation-induced changes in mitochondria and performance in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 74: 934-941
177. Takahashi M, Hood DA (1996) Protein import into subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria. Differential import regulation in distinct subcellular regions. *J Biol Chem* 271: 27285-27291

178. Tancrede G, Rousseau-Mignerón S, Nadeau A (1982) Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 406-409
179. Terjung RL (1979) The turnover of cytochrome c in different skeletal-muscle fibre types of the rat. *Biochem J* 178: 569-574
180. Tiidus PM, Houston ME (1993) Vitamin E status does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats. *J Nutr* 123: 834-840
181. Tiidus PM, Pushkarenko J, Houston ME (1996) Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *Am J Physiol* 271: R832-836
182. Toledo FG, Menshikova EV, Ritov VB, Azuma K, Radikova Z, DeLany J, Kelley DE (2007) Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes* 56: 2142-2147
183. Toledo FG, Watkins S, Kelley DE (2006) Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3224-3227
184. Tonkonogi M, Krook A, Walsh B, Sahlin K (2000a) Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect? *Biochem J* 351 Pt 3: 805-810
185. Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, Sahlin K (2000b) Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *J Physiol* 528: 379-388
186. Turner DL, Hoppeler H, Claassen H, Vock P, Kayser B, Schena F, Ferretti G (1997) Effects of endurance training on oxidative capacity and structural composition of human arm and leg muscles. *Acta Physiol Scand* 161: 459-464
187. van Loon LJ, Goodpaster BH (2006) Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 451: 606-616
188. van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH, Wagenmakers AJ (2001) The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol* 536: 295-304
189. Venditti P, Di Meo S (1997) Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 18: 497-502

190. Venditti P, Masullo P, Di Meo S (1999) Effect of training on H₂O₂ release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 372: 315-320
191. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer K, Kairane C, Landor A, Karu T, Zilmer M (2001) Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology* 7: 263-270
192. Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, Kroemer G (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 7: 1146-1154
193. Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488
194. Walsh B, Tonkonogi M, Sahlin K (2001) Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres. *Pflugers Arch* 442: 420-425
195. Wibom R, Hultman E, Johansson M, Matherei K, Constantin-Teodosiu D, Schantz PG (1992) Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73: 2004-2010
196. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124
197. Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, Poinasamy D, Pickersgill L, Halse R (2001) Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 537-541
198. Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, Mettauer B (2002) Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 191-200

