



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Barbara Moreira Crisol

**Efeitos da suplementação de Ribosídeo de
Nicotinamida sobre a UPR mitocondrial na
musculatura esquelética e sobre a performance
aeróbia de camundongos.**

Limeira/SP

2018

Barbara Moreira Crisol

**Efeitos da suplementação de Ribosídeo de
Nicotinamida sobre a UPR mitocondrial na
musculatura esquelética e sobre a performance
aeróbia de camundongos.**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e
Metabolismo na Área de Metabolismo e
Biologia Molecular*

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA BARBARA MOREIRA CRISOL, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. EDUARDO ROCHETE
ROPELLE

Limeira/SP

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/05499-1; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

C868e Crisol, Barbara Moreira, 1993-
Efeitos da suplementação de ribosídeo de nicotinamida sobre a UPR mitocondrial na musculatura esquelética e sobre a performance aeróbia de camundongos / Barbara Moreira Crisol. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Exercícios físicos. 2. Músculo esquelético. 3. NAD. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of nicotinamide riboside supplementation on mitochondrial UPR in skeletal muscle and on aerobic performance of mice

Palavras-chave em inglês:

Physical exercises

Skeletal muscle

NAD

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Eduardo Rochete Ropelle [Orientador]

Igor Luchini Baptista

Leonardo dos Reis Silveira

Data de defesa: 26-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autora: Barbara Moreira Crisol

Título: Efeitos da suplementação de Ribosídeo de Nicotinamida sobre a UPR mitocondrial na musculatura esquelética e sobre a performance aeróbia de camundongos.

Natureza: Trabalho de Defesa de Mestardo em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 26/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle (Orientador) – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Igor Luchini Baptista - Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Leonardo Silveira dos Reis – Avaliador
Instituto de Biologia (IB/UNICAMP)

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram com amor no caminho das ciências e do esporte. Às minhas irmãs que me mostraram que nossa vida é mais completa quando se é possível dividir o amor.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Edilaine e Victor, por toda paciência e apoio durante todos esses anos de estudo e trabalho. Obrigada por me mostrarem que devemos trabalhar com aquilo que realmente amamos e obrigada por acreditarem no meu melhor, mesmo que as vezes eu mesma duvidasse disso.

Obrigada às minhas irmãs por sempre me lembrarem quando estamos juntas o quanto a cumplicidade e companheirismo são importantes em nossas vidas. Ninguém é feliz sozinho, obrigada por encherem minha vida de alegria.

Agradeço à minha família por sempre acreditarem em mim e saberem mesmo de olhos fechados que eu estava fazendo o meu melhor, mesmo as vezes sem entender muito bem o que eu faço.

Agradeço aos meus amigos da FCA, que durante principalmente esses dois anos, foram essenciais para me mostrar que a vida é mais que trabalhar. Dentre esses, obrigada especialmente à minha amiga Júlia Passero, que sempre esteve ao meu lado, nos dias bons e ruins e à minha amiga Beatriz Franco, que de braços abertos me recebeu na sua vida. Sou grata por me tornar mais próxima de vocês esses anos, vocês foram essenciais nesse processo.

Obrigada à minha melhor amiga, Helo, que sempre de longe me aconselhava e acalmava meu coração quando aquelas dúvidas sobre o que fazer da vida apareciam.

Agradeço meus companheiros de trabalho e amigos dos laboratórios LABMEX e LABGEN, onde aprendi muito sobre a vida e sobre ciência. Obrigada pela paciência e apoio. Dentre esses, agradeço principalmente à minha grande amiga Camilla, pelos longos dias e noites de conversas científicas, experimentos e amizade.

Agradeço aos meus professores, que durante toda a minha formação deram o apoio e a orientação necessários para que eu me tornasse uma profissional qualificada e ética.

Agradeço à CAPES pelo financiamento inicial desse projeto e à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) que financiou esse projeto, com número 2016/05499-1.

E por fim, agradeço ao meu orientador, Prof^o Dr. Eduardo Ropelle, pela confiança depositada em mim para a realização desse trabalho, pela orientação e principalmente pela oportunidade de fazer ciência e conhecer o quanto a ela é entusiasmante.

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente”

Walt Disney

Resumo

A molécula de Nicotinamida Adenina Nucleotídeo (NAD^+) é de extrema importância para o controle da homeostase metabólica. O aumento dos níveis de NAD^+ resulta em aumento do metabolismo oxidativo através da ativação da Sirtuina 1 (SIRT1), e de outros dois processos relacionados à atividade mitocondrial, a resposta à proteínas mal formadas nas mitocondrias (Unfolded protein response – UPRmt) e o desencadeamento do desequilíbrio mito-nuclear, o qual ocorre quando há um desequilíbrio no conteúdo proteico das proteínas mitocondriais em razão as proteínas nucleares. Estudos demonstram que a suplementação com o precursor de NAD^+ , o Ribosídeo de Nicotinamida (NR), é capaz de promover a melhora da capacidade oxidativa das mitocôndrias e biogênese mitocondrial através do desencadeamento da UPRmt e do desequilíbrio mito-nuclear diversos tecidos. Nesse sentido aventamos a hipótese de que a suplementação com NR poderia estimular UPRmt e o desequilíbrio mito-nuclear na musculatura esquelética e assim aumentar a performance aeróbia. Para isso foram utilizados camundongos C57BL/6J divididos nos seguintes grupos: Controle, Suplementado com NR, Exercício Crônico e Exercício Crônico + NR. Ensaios fisiológicos foram combinados com ensaios bioquímicos e moleculares para a avaliação dos grupos experimentais. Os resultados demonstraram que os animais tratados apenas com NR apresentaram menor acúmulo de gordura, aumento na produção de calor, aumento da força muscular, promoção do desequilíbrio mito-nuclear no músculo esquelético, contudo, a suplementação por si só não promoveu melhora na performance aeróbia dos animais quando comparado com os animais não suplementados. Por outro lado, animais do grupo Exercício Crônico + NR apresentaram maior quantidade de fibras do tipo 1 quando comparado aos animais suplementados apenas com NR ou apenas exercitados. Além disso, os animais treinados e suplementados com NR demonstraram maior performance aeróbia quando comparado aos animais treinados sem a suplementação. No entanto, de forma curiosa, a combinação Exercício Crônico +NR não desencadeou a UPRmt ou o desequilíbrio mito-nuclear na musculatura esquelética. Assim concluímos que a combinação de Exercício Crônico +NR promoveu adaptações importantes no músculo de camundongos e melhora significativa da performance aeróbia, contudo, essa melhora não foi associada à ativação da UPRmt ou do desequilíbrio mito-nuclear.

Abstract

The molecule of Nicotinamide Adenine Nucleotide (NAD⁺) is extremely important for the control of metabolic homeostasis. The increase in NAD⁺ levels results in increased oxidative metabolism through the activation of SIRT1, and in two other processes related to mitochondrial activity, the unfolded protein response in the mitochondria (UPRmt) and the triggering of the mito-nuclear imbalance, which occurs when there is an imbalance in the protein content of mitochondrial proteins due to nuclear proteins. Studies show that supplementation with the NAD⁺ precursor, the Nicotinamide Riboside (NR), is capable to improve mitochondrial oxidative capacity and mitochondrial biogenesis through the activation of the UPRmt and the mito-nuclear imbalance in different tissues. In this sense, we hypothesized that NR supplementation could stimulate UPRmt and mito-nuclear imbalance in the skeletal muscles and thus increase aerobic performance. C57BL/6J mice were divided into the following groups: Control, NR supplementation, Chronic Exercise and Chronic Exercise + NR. Physiological assays were combined with biochemical and molecular assays for the evaluation of experimental groups. The results showed that the animals treated with NR alone, showed lower fat accumulation, increased heat production, increased muscle strength, and activation of the mitonuclear imbalance on the skeletal muscle. However, the supplementation by itself did not improved the animals' aerobic performance when compared to the no supplemented group. On the other hand, the animals from the Chronic exercise + NR group presented higher amount of type 1 fibers when compared to animals supplemented with NR alone or only exercised. In addition, trained and NR supplemented animals showed higher aerobic performance when compared to trained animals without supplementation. However, in a curious way, the combination Chronic Exercise + NR did not trigger the UPRmt or the mitonuclear imbalance in the skeletal muscles. We concluded that the combination of Chronic exercise + NR promoted important adaptations in the mouse skeletal muscle and a significant improvement in aerobic performance, however, this improvement was not associated to the activation of the UPRmt or the mitonuclear imbalance.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema da sinalização da UPRmt em mamíferos.	17
Figura 2	Via de conversão de NAM para NAD⁺.	22
Figura 3	Interação da Suplementação com NR, Treinamento e desencadeamento da UPRmt.	23
Figura 4	Desenho experimental do protocolo de exercício agudo.	27
Figura 5	Desenho experimental do protocolo de exercício crônico	27
Figura 6	Suplementação de 5 semanas com NR promove aumento dos níveis de NAD⁺ intramuscular.	31
Figura 7	Suplementação de 5 semanas com NR promove redução do acúmulo de gordura, sem promover redução do peso corporal.	31
Figura 8	Efeitos da Suplementação de NR sobre a temperatura corporal.	32
Figura 9	Efeitos da Suplementação de NR sobre o VO₂ e atividade locomotora espontânea.	33
Figura 10	Efeitos da Suplementação de NR sobre a produção de força muscular	34
Figura 11	Efeitos da suplementação de NR sobre a indução do desequilíbrio mitonuclear.	34
Figura 12	Suplementação com Ribosídeo de Nicotinamida não altera performance aeróbia durante exercício agudo.	35
Figura 13	Suplementação com NR associada ao treinamento aeróbio promove aumento na performance aeróbia.	36
Figura 14	Treinamento aeróbio promove redução do acúmulo de tecido adiposo e redução do peso corporal.	36
Figura 15	Efeitos do treinamento aeróbio em esteira e da suplementação de NR sobre a capacidade de produção de força com as 4 patas.	37
Figura 16	Efeitos da suplementação de NR e treinamento aeróbio sobre a quantidade de fibras tipo I.	38
Figura 17	Efeitos do treinamento e da suplementação de NR associada, sobre o conteúdo de NAD⁺ e conteúdo proteico de SIRT1 no músculo esquelético de camundongos.	38

Figura 18 **Efeitos do treinamento e da suplementação de NR sobre a 39
ativação da UPRmt.**

Lista de Abreviaturas e Siglas

NAD⁺	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo
SIRT 1	Sirtuína 1
UPRmt	<i>Unfolded Protein Response</i> – Resposta a proteínas malformadas
NR	Ribosídeo de Nicotinamida
DNAm_t	DNA mitocondrial
DNAn	DNA nuclear
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
CLPP	Subunidade Proteolítica de Peptidase da Matriz Mitocondrial Caseinolítica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
MTCO1	Citocromo C Oxidase I Mitocondrialmente Codificado
SDHA	Complexo Succinato Dehidrogenase Subunidade A
AMPK	Adenosina Monofosfato Quinase
PGC1-α	Co-Ativador-1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
PARP-1	Poly ADP Ribose 1
NRKs	Ribosídeo de Nicotinamida Quinase
NMN	Nicotinamida Mononucleotídeo
NMNAT	Nicotinamida Mononucleotídeo Adeniltransferase
RNA_m	RNA Mensageiro
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
NAMPT	Nicotinamida Fosforibosiltransferase
P.Máx	Potência Máxima
VO₂	Consumo de Oxigênio
UCP1	<i>Uncouple Protein 1</i> – Proteína Desacopladora 1

BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i> – Tecido Adiposo Marrom
------------	---

Sumário

1.	Introdução.....	16
1.1.	O desequilíbrio mitonuclear e seu efeitos sobre o metabolismo	16
1.2	Níveis de NAD ⁺ no controle da homeostase metabólica	18
1.3	Ribosídeo de Nicotinamida, um precursor de NAD ⁺ e seus efeitos sobre o metabolismo	19
1.4	Exercício físico e metabolismo oxidativo	20
2.	Hipótese	23
3.	Objetivos	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4.	Materiais e Métodos	25
4.1	Animais	25
4.2	Tratamento com Ribosídeo de Nicotinamida	25
4.3	Protocolo de Exercício Físico	26
4.4	Respirometria indireta	28
4.5	Grip Teste	28
4.6	Fotos Termográficas	29
4.7	Procedimentos de Extração	29
4.8	Análise Proteica por Western Blotting	29
4.9	Quantificação do conteúdo de NAD ⁺ intramuscular	30
4.10	Histoquímica	30
4.11	Análise Estatística	30
5.	Resultados	31
5.1	Suplementação de NR promove aumento dos níveis de NAD ⁺ intramuscular em camundongos C57BL/6J e aumenta o conteúdo proteico de SIRT1.....	31

5.2	Suplementação de Ribosídeo de Nicotinamida evita o acúmulo tecido adiposo, sem promover redução do peso corporal	31
5.3	Suplementação de NR promove aumento da produção de calor	32
5.4	Suplementação de NR promove tendência de aumento do consumo de oxigênio de camundongos C57BL/6J	33
5.5	Suplementação de NR promove aumento da força muscular	33
5.6	Suplementação de NR promove indução do desequilíbrio mitonuclear na musculatura esquelética de camundongos	34
5.7	Suplementação de NR não promove aumento da performance aeróbia em animais submetidos à protocolo de exercício agudo	34
5.8	Treinamento aeróbio associado à suplementação de Ribosídeo de Nicotinamida por 5 semanas promove aumento da performance aeróbia	35
5.9	Suplementação de NR não promove redução do peso corporal em animais treinados	36
5.10	Suplementação com NR associada ao treinamento aeróbio não promove aumento da força muscular de camundongos C57BL/6J	37
5.11	Suplementação de NR associada ao treinamento aeróbio promove aumento no número de fibras do tipo I	37
5.12	Treinamento Aeróbio promove aumento no conteúdo de proteico de SIRT1 e tendência ao aumento dos níveis e NAD ⁺ na musculatura esquelética de camundongos	38
5.13	Treinamento promove ativação da UPRmt, enquanto que a suplementação de NR associada ao treinamento não promove aumento do desequilíbrio mitonuclear	39
6.	Discussão	39
7.	Conclusão	45
	Referências Bibliográficas	46
	Anexo	49

1. Introdução

1.1 O desequilíbrio mitonuclear e seus efeitos sobre o metabolismo.

As mitocôndrias são organelas responsáveis pelo suprimento celular de energia, através da produção de ATP, além de possuírem importante papel na manutenção da homeostase. Essa organelas possuem diversas cópias de seu próprio DNA, sendo este circular, denominado DNA mitocondrial (DNAm), que codifica 13 proteínas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa, 2 RNAs ribossomais mitocondriais e 22 RNAs de transportadores^{1,2}. As demais proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear (DNAn) e importadas para dentro das mitocôndrias^{1,3}. É necessário que exista um equilíbrio entre o genoma mitocondrial e o genoma nuclear, para que ocorra um funcionamento mitocondrial perfeito, uma vez que quatro dos complexos da cadeia transportadora de elétrons são compostos de proteínas codificadas tanto pelo DNAm quanto pelo DNAn⁴.

Para que esse sistema seja mantido, a proteostase mitocondrial é assegurada por um mecanismo de controle de qualidade das proteínas⁵ composto por chaperonas e proteases^{6,7}. Chaperonas são proteínas que dobram e agrupam as proteínas importadas para as mitocôndrias e redobram proteínas danificadas, com as proteínas da família das proteínas ativadas por choque térmico (*Heat shock proteins, HSP*) mtHSP70, HSP60 e HSP10⁵, enquanto que, as proteases degradam as proteínas restantes que não foram dobradas pelas chaperonas⁵, como a proteína ClpP (Subunidade Proteolítica de Peptidase da Matriz Mitocondrial Caseinolítica) na matriz mitocondrial.

Quando há um acúmulo de proteínas malformadas, este é sinalizado para o núcleo que por sua vez irá transcrever genes afim de combater esse estresse proteotóxico, promovendo a sobrevivência celular e sincronizando a atividade do genoma mitocondrial e nuclear, afim de garantir a qualidade das proteínas mitocondriais, esse mecanismo é conhecido como resposta à proteínas malformadas (*unfolded protein response – UPR*)^{5,8}

Já é descrito na literatura que diferentes condições são capazes de ativar a UPR mitocondrial (UPRmt), principalmente quando há a interferência na proteostase mitocondrial. Tanto o tratamento com substâncias geradora de espécies reativas de oxigênio (EROS) quanto bactérias patogênicas que produzem toxinas são conhecidas por promoverem a ativação da UPRmt em *C.elegans*, devido ao aumento da quantidade de proteínas danificadas⁹⁻¹¹.

A ativação da UPRmt também é possível através da inibição ou regulação de proteínas que compõe a cadeia transportadora de elétrons (CTE), transcritas tanto pelo DNAm quanto pelo DNAn, resultando em um desequilíbrio entre as proteínas codificadas por esses dois DNAs, conhecido como desequilíbrio mitonuclear¹². Houtkooper e colaboradores demonstraram que a utilização de antibióticos que afetavam a tradução de proteínas mitocondriais e de brometo de etídio (que afeta a transcrição do DNAm) foram capazes de promover o desequilíbrio mitonuclear em *C.elegans*, através do aumento do conteúdo proteico de proteínas nucleares em razão das proteínas mitocondriais¹². A inibição da tradução de proteínas mitocôndrias através da administração de doxyciclina, resultou em redução do consumo de oxigênio e aumento da longevidade em *C.elegans*¹². Entretanto quando utilizou-se rapamicina e resveratrol, apesar a indução do desequilíbrio mitonuclear da mesma forma que ocorreu quando utilizou-se a antibióticos e o brometo de etídio, o aumento da longevidade apresentou-se associado com o aumento do consumo de oxigênio. Dessa forma, esses resultados apresentam uma correlação direta da ativação da UPRmt com o aumento da longevidade¹². Ao mesmo tempo, estudo realizado por Mouchiroud et al. demonstraram que suplementação com o precursor de NAD⁺, Ribosídeo de Nicotinamida, também é capaz de promover o desequilíbrio mitonuclear, aumentando a expressão das proteínas mitocondriais em razão das proteínas nucleares em *c.elegans*¹³. A suplementação com NR, foi capaz assim como resveratrol, de promover aumento da atividade respiratória associado com aumento da longevidade¹³.

Figura 1.

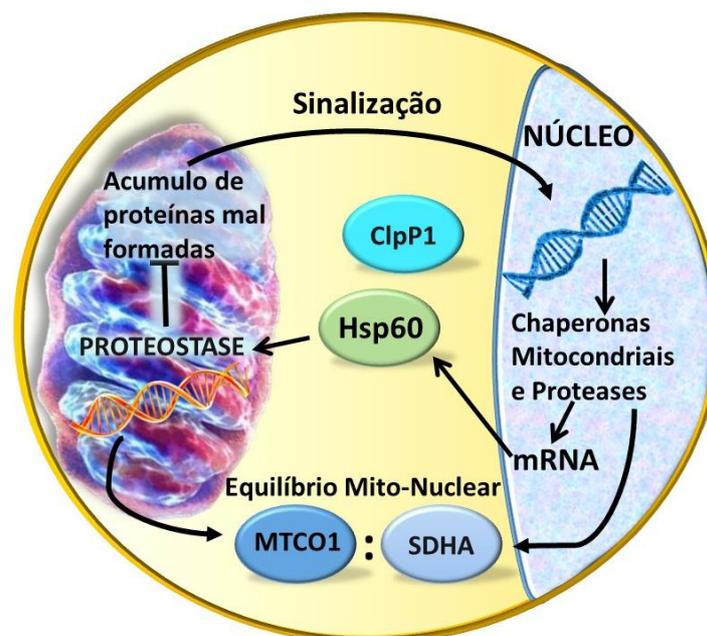


Figura 1: Esquema da sinalização da UPRmt em mamíferos. O acúmulo de proteínas mal formadas sinaliza fatores de transcrição no núcleo da célula, aumentando a transcrição de chaperonas mitocondriais e proteases. Além disso, alterações na razão entre Citocromo C Oxidase I Mitocondrialmente Codificado (MTCO1) (codificada

no DNAm_t) e Complexo Succinato Dehidrogenase Subunidade A (SDHA) (codificada no DNAn) alteram o equilíbrio proteostático mito-nuclear, tendo efeitos na proteostase mitocondrial e consequentemente desencadeando a UPR_{mt}

O aumento da UPR_{mt} pode ser tanto benéfico quanto maléfico, dependendo de sua magnitude, sendo plausível que ele seja não só a causa como também um potencial tratamento para diversas doenças. Ainda que não existam estudos que mostrem diretamente o papel da UPR_{mt} na doença, diversos artigos sugerem que a UPR_{mt} possa estar relacionada a alguns típicos específicos de doenças.

Os níveis de NAD⁺ e a atividade de SIRT1 estão relacionados ao desencadeamento da UPR_{mt} e biogênese mitocondrial na musculatura esquelética¹⁹. Além disso, a utilização de compostos que aumentam os níveis de NAD⁺, são capazes de ativar a UPR_{mt}¹³ e melhorar a capacidade de endurance¹⁵.

Seguindo esse pensamento, tendo em vista que o exercício físico é capaz de alterar o funcionamento das mitocôndrias, promovendo a ativação de proteínas que estimulam a biogênese mitocondrial^{20,21} tendo diversos efeitos benéficos bem estabelecidos, pode-se pensar que a utilização de tal ferramenta na compreensão das respostas mitocondriais por trás de adaptações fisiológicas positivas, bem como na regulação da UPR_{mt} e de processos de desequilíbrio mito-nuclear, seja importante para a compreensão dos mecanismos por trás de tal resposta benéfica estimulada pelo exercício físico, uma vez que este promove a ativação da Sirt1, relacionada também à ocorrência da UPR_{mt}.

1.2 Níveis de NAD⁺ no controle da homeostase metabólica.

O cofator Nicotinamida Adenina Nucleotídeo (NAD⁺) é essencial para a ativação do metabolismo, ativação de Sirtuinas (SIRTs) e manutenção através da capacidade mitocondrial através do mecanismo conhecido como resposta à proteínas mal formadas especificamente nas mitocôndrias (Unfolded protein response – UPR_{mt})²².

Estudo realizado por Ryall et al. (2015), demonstrou que a redução nos níveis de NAD⁺ em células musculares resulta em uma alteração metabólica mediada por SIRT1 que induz diferenciação prematura e perda da capacidade de regeneração dessas células, gerando um fenótipo de musculatura envelhecida²³. Além do envelhecimento como redutor dos níveis de NAD⁺, estudos demonstraram que dietas hiperlipídicas também são responsáveis por esse quadro^{14,15,24}.

Proteínas como AMPK, PGC-1 α e SIRT1 são conhecidas por serem reguladoras da biogênese mitocondrial e conseqüentemente do metabolismo oxidativo²⁵ e estudos demonstram que tais efeitos são desencadeados pelo aumento nos níveis de NAD⁺²⁶. É conhecido que NAD⁺ é capaz de induzir um desequilíbrio proteico mito-nuclear que pode ser a chave entre os níveis de NAD⁺ e a funcionalidade mitocondrial²². Um exemplo, é a utilização de inibidores de PARP-1, que aumentam a disponibilidade de NAD⁺ e a atividade de SIRT1 na musculatura esquelética¹⁹. A inibição da PARP-1 foi comprovada como sendo capaz de aumentar não só a função mitocondrial, como também a tradução de proteínas mitocondriais, ativa a UPRmt, e ainda melhora a capacidade de *endurance* de camundongos, a sensibilidade à insulina e a quantidade de fibras musculares do tipo I¹⁵. Dessa forma, a suplementação com precursores de NAD⁺ pode ser uma importante estratégia no desencadeamento da UPR e conseqüentemente biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa.

1.3 Ribosídeo de Nicotinamida, um precursor de NAD⁺, e seus efeitos no metabolismo.

A síntese de NAD⁺ ocorre a partir da reciclagem de metabólitos ou a partir de precursores de NAD⁺ consumidos via dieta²⁷. Um desses precursores de NAD⁺ que pode ser utilizado como suplemento é a Ribosídeo de Nicotinamida (NR). O NR é uma molécula composta por 11 átomos de carbono, 15 de hidrogênio, 2 de nitrogênio e 5 de oxigênio²⁸, transportado para as células por transportadores de nucleosídeos²⁹, onde é fosforilado pela NR quinase 1 e 2 (NRKs)³⁰ gerando Nicotinamida Mononucleotídeo (NMN). A partir de NMN, será sintetizado NAD⁺ pela ação das enzimas Nicotinamida Mononucleotídeo Adeniltransferase (NMNAT)²².

Em estudo realizado por Cantó e colaboradores (2012), camundongos que consumiam dieta hiperlipídica e foram tratados com NR, apresentaram uma maior quantidade intracelular de NAD⁺ e ao mesmo tempo uma maior atividade de SIRT1 e desacetilação da PGC-1 α no músculo esquelético, fígado e tecido marrom desses animais. A suplementação de NR só induziu aumento na atividade da SIRT1 nos tecidos nos quais houve aumento do acúmulo de NAD⁺¹⁴. Além do aumento da biogênese mitocondrial na musculatura esquelética demonstrado pelo estudo, houve também um aumento do conteúdo de DNA mitocondrial nesse tecido, sugerindo que a melhora das funções mitocondriais só ocorreu em tecidos nos quais houve aumento da biodisponibilidade de NAD⁺¹⁴. Por fim, o estudo demonstrou que um maior conteúdo mitocondrial combinado com um diferente perfil morfológico dessas organelas nos

animais suplementados com NR, contribuiu para explicar um maior perfil oxidativo e proteção contra danos metabólicos nesses animais¹⁴. Além disso, nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a suplementação de NR foi capaz de promover o aumento do consumo de oxigênio (VO_2) desses animais, sem promover alterações na atividade locomotora, o que em conjunto indica que a suplementação de NR é capaz de reduzir o ganho de peso promovido pelo consumo de dieta rica em gordura, devido ao fato de promover aumento do gasto energético¹⁴.

O aumento dos níveis de NAD^+ promovido pela suplementação de NR ativam a sinalização das Sirtuinas e as funções mitocondriais, sugerindo que esse suplemento possa ser usado para prevenir e tratar disfunções mitocondriais, marcadores de diversas patologias associadas ao envelhecimento¹⁴. Adicionalmente a esses fatos, estudo realizado por Mouchiroud et al. (2013) demonstrou que a suplementação de NR aumentou o tempo de vida de *C.elegans* através da ativação da UPRmt via *Sir 2-1* (ortólogos de SIRT1)¹³.

Desta forma, sugere-se que o NR é o primeiro metabólito a ser transportado para células afim de ser metabolizado em NAD^{31+} . Podendo dessa forma ser uma opção mais eficiente de suplemento precursor de NAD^+ , uma vez que por ser o primeiro a ser transportado para as células para conversão, seu consumo e eficácia pode ser mais rápido que os demais precursores de NAD^+ .

1.4 Exercício físico e o metabolismo oxidativo.

O exercício físico é considerado uma forma de tratamento não farmacológica e de prevenção de doenças metabólicas³², isso devido as suas diversas adaptações biomoleculares e fisiológicas. Porém, além dessa função, o treinamento físico permite que os atletas sejam cada vez mais eficientes, uma vez que o exercício físico “*é um processo complexo que envolve a ativação sincronizada e integrada de diversos órgãos e tecidos nos níveis celulares e sistêmicos*”³³. Segundo Hawley e colaboradores em estudo de revisão publicado em 2014, o exercício físico é um dos maiores desafios que envolve toda a homeostase metabólicas e para enfrentar esse desafio, diversas adaptações ocorrem de forma integrada afim de “*neutralizar as ameaças à homeostase*”, geradas pelo aumento da demanda de energia e oxigênio³³.

O exercício aeróbio vem sendo estudando ao longo dos anos e um dos primeiros relatos da análise desse tipo de exercício foi feito em 1925 pelo ganhador do prêmio Nobel, A.V. Hill³⁴. Segundo o estudo de revisão de Hawley (2014), A.V. Hill foi o primeiro a definir o conceito de VO_2 máximo, como o máximo consumo de oxigênio por um indivíduo durante um exercício

no qual a energia requerida para execução do mesmo está sendo produzida de forma aeróbia³³, sendo um fator determinante para performance e manutenção da atividade e da intensidade.

O treinamento aeróbio promove adaptações fisiológica, como aumento da oxidação de lipídios, consumo de O₂ e aumento do metabolismo mitocondrial, e biomoleculares, como transcrição de genes reguladores do metabolismo oxidativo. Para a manutenção do exercício físico durante um período de tempo prolongado, ocorre a mobilização de substratos extramusculares³³. O fígado aumenta liberação de glicose para circulação e os adipócitos aumentam a quebra dos estoques de triglicerídeos em ácidos graxos que seguem para corrente sanguínea³³. A utilização de carboidratos ou lipídios como substrato energético ocorre de acordo com a intensidade e duração do exercício³⁵. Assim, durante um exercício prolongado de intensidade moderada, os níveis de oxidação de carboidratos diminuem e a lipólise e oxidação de ácidos graxos aumentam³³.

Esse tipo de treinamento também promove alterações metabólicas nas fibras musculares, conferindo um perfil oxidativo para as fibras treinadas³⁶. Ao mesmo tempo, o treinamento aeróbio quando realizado de forma prolongada promove aumento do conteúdo proteico mitocondrial e da capacidade respiratória das fibras musculares³³. Essas adaptações fisiológicas são em virtude de adaptações biomoleculares, uma vez que o treinamento aumenta o conteúdo de proteínas de transcrição mitocondriais, em virtude do acúmulo do aumento transitório do mRNA dessas proteínas³⁷. Nessa linha, é bem definido na literatura que o exercício físico promove o aumento da biogênese mitocondrial³⁸. Em estudo de revisão, Egan e Zierath (2012) definem a biogênese mitocondrial um processo *“complexo e altamente regulado, que requer coordenação e coexpressão dos genomas mitocondrial e nuclear para a montagem e expansão do retículo e a geração de uma rede mitocondrial dinâmica”*³⁹. Dessa forma, diversos mecanismos e vias são responsáveis pela biogênese mitocondrial promovida pelo treinamento aeróbio. Por exemplo, a PGC-1 α , é um fator de transcrição responsável por diversas adaptações do musculo esquelético à atividade física, uma delas é a biogênese mitocondrial. Uma única sessão de exercício até a exaustão é capaz de aumentar na musculatura esquelética, os níveis proteicos e gene da PGC1- α ⁴⁰. Ademais, o exercício ao promover o aumento dos níveis de Adenosina monofosfato (AMP) a partir da quebra de Adenosina Trifosfato (ATP), conseqüentemente aumentando atividade da Adenosina Monofosfato Quinase (AMPK), capaz de fosforilar e ativar a PGC-1 α . Estudos com a superexpressão de PGC-1 α na musculatura esquelética demonstraram um aumento na função mitocondrial⁴¹, melhora na performance aeróbia em teste em submáximo em esteira e aumento do VO₂ máximo⁴². Estudo de Calvo e colaboradores (2008), a partir da análise do quociente respiratório

(VCO_2/VO_2), sugeriu-se que camundongos que superexpressam PGC-1 α no músculo esquelético foram capazes de utilizar ácidos graxos como substrato energético por mais tempo durante o teste em esteira, sugerindo assim maior capacidade oxidativa da musculatura esquelética desses animais⁴².

Em estudo realizado por Costford et. al (2010), demonstrou-se que o treinamento físico aeróbio aumentou o conteúdo proteico da enzima Nicotinamida Fosforibosiltransferase (NAMPT) na musculatura esquelética de humanos, submetidos ao protocolo de exercício aeróbio em bicicleta ergométrica, consistindo em 13 sessões de exercício em um intervalo de 3 semanas⁴⁴. NAMPT é responsável por converter a Nicotinamida (NAM) presente no organismo em Nicotinamida Mononucleotideo (NMN) que por sua vez será convertido à NAD⁺ pelas enzimas Nicotinamida Mononucleotideo Adenilatotransferase (NMNAT) (Figura 2).

Figura 2.

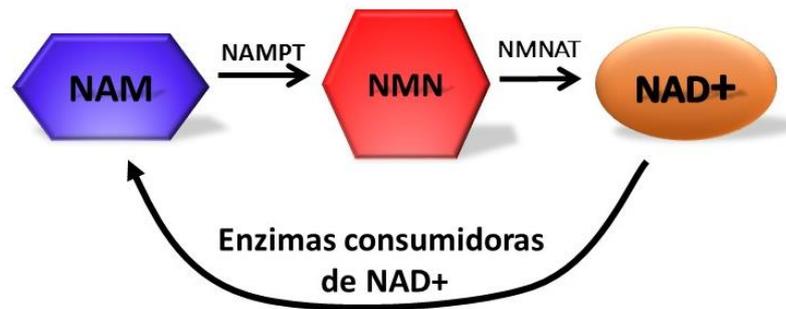


Figura 2: Via de conversão de NAM para NAD⁺. Nicotinamina (NAM) é convertido em Nicotinamida Mononucleotideo (NMN) pelas enzimas NAMPT. Essa reação ocorre tanto no compartimento extracelular pelas moléculas de NAMPT localizadas nesse meio, quanto no citosol pelas moléculas de NAMPT intracelular. Em seguida, NMN é convertido em NAD⁺ pelas enzimas NMNAT no núcleo celular, citosol e mitocôndrias. As moléculas de NAD⁺ por sua vez, são convertidas em NAM pelas enzimas consumidoras de NAD⁺, como SIRT1 no núcleo e SIRT3 na mitocondrial.

Concomitantemente a isso, estudo realizado por Cantó e colaboradores (2009), sugere que AMPK regula a expressão de genes mitocondriais e do metabolismo lipídico através da modulação da atividade da PGC-1- α pela SIRT. Além disso, demonstrou-se aumento significativo dos níveis de NAD⁺ no músculo esquelético de camundongos 3 horas após exercício aeróbio, sustentando a ideia de que alterações nos níveis de NAD⁺ traduzem os efeitos da AMPK na atividade de SIRT⁴⁵.

2. Hipótese

Sabe-se que o exercício promove o aumento da capacidade respiratória (VO_2) dos indivíduos e é um dos responsáveis pelo desencadeamento da biogênese mitocondrial. Ao mesmo tempo é conhecido que a Ribosídeo de Nicotinamida também é responsável pelo desencadeamento da biogênese mitocondrial, aumento do VO_2 máximo e aumento da performance em teste de endurance em animais obesos¹⁴. Dessa forma, a suplementação com NR em animais submetidos à treinamento aeróbio aumentaria a performance aeróbia desses animais, uma vez que promoveria o aumento do conteúdo mitocondrial e do perfil oxidativo dessa organela, já que tanto o exercício quanto o NR são conhecidos por esses efeitos.

Mediante ao exposto, aventamos a hipótese de que o aumento da performance e da biogênese mitocondrial seria desencadeado pela ativação da UPRmt, pelo aumento da atividade da SIRT promovido pela combinação dos efeitos do exercício com os efeitos da suplementação de NR via dieta (Figura 3).

Figura 3.

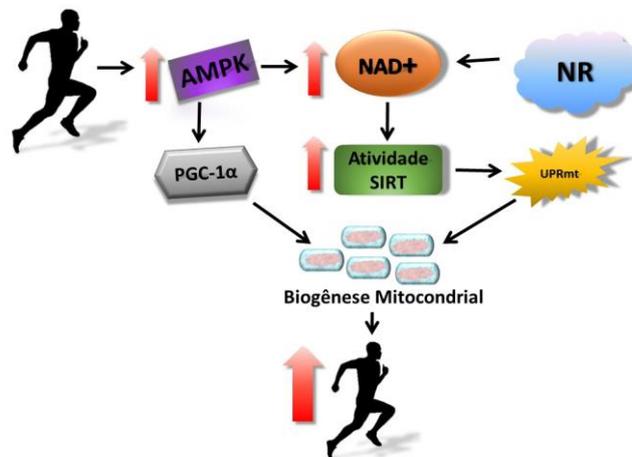


Figura 3: Interação da Suplementação com NR, Treinamento e desencadeamento da UPRmt. Esquema dos efeitos da suplementação de NR associado com o treinamento aeróbio no aumento da função e volume mitocondrial e consequentemente na melhora da performance aeróbia.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos do tratamento com Ribosídeo de Nicotinamida sobre UPR mitocondrial na musculatura esquelética e performance aeróbia de camundongos C57BL/6J.

3.2 Objetivos específicos:

- Etapa 1: Efeitos da Suplementação de NR de 5 semanas sobre o metabolismo de camundongos C57BL/6J magros.

- Avaliar os efeitos da suplementação de NR sobre o conteúdo de NAD⁺ intramuscular
- Avaliar os efeitos da suplementação de NR sobre o acúmulo de gordura corporal e peso corporal.
- Avaliar os efeitos da suplementação de NR sobre a produção de calor e VO₂
- Avaliar os efeitos da suplementação de NR sobre a capacidade de produção de força muscular
- Avaliar o conteúdo proteico de proteínas da via de fosforilação oxidativa (OXPHOS), MTCO1, SDHA e SIRT1, e determinar o equilíbrio mito-nuclear através da razão MTCO1/SDHA no gastrocnêmio de camundongos C57BL/6J após 5 semanas de suplementação com NR.

- Etapa 2: Protocolo experimental de exercício agudo.

- Avaliar os efeitos da suplementação de NR na performance aeróbia de camundongos C57BL/6J em apenas uma sessão de exercício.

- Etapa 3: Protocolo experimental de treinamento crônico.

- Avaliar os efeitos da suplementação de NR na performance aeróbia de camundongos C57BL/6J exercitados, após 5 semanas de treinamento físico em esteira;
- Avaliar os efeitos da suplementação de NR associada ao treinamento físico sobre o acúmulo de gordura corporal e peso corporal

- Avaliar os efeitos da suplementação de NR associada ao treinamento físico sobre a capacidade de produção de força muscular
- Avaliar os efeitos da suplementação de NR e do treinamento físico de 5 semanas sobre o conteúdo intramuscular de NAD⁺.
- Avaliar os efeitos da suplementação de NR e treinamento físico sobre o conteúdo de fibras oxidativas (Fibras do tipo I) no gastrocnêmio de camundongos.
- Avaliar o conteúdo proteico de OXPHOS, MTCO1, Hsp60, SDHA e SIRT1, e determinar o equilíbrio mito-nuclear através da razão MTCO1/SDHA no gastrocnêmio de camundongos C57BL/6J após 5 semanas de treinamento físico em esteira associado a suplementação de NR.

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, com 2 meses de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram previamente pesados e alocados em gaiolas com 5 animais, expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com temperatura entre 20°C e 22°C, onde receberam água e ração adaptada da dieta AIN -93M⁴⁶ com suporte proteico (conteúdo proteico proveniente da dieta AIN-93G) preparada na Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp, *ad libitum*. O projeto teve aprovação do comitê de ética da UNICAMP (registro 4188-1).

Os animais foram distribuídos nos grupos Controle, suplementado com Ribosídeo de Nicotinamida (NR), Exercício Crônico, Exercício Crônico + Ribosídeo de Nicotinamida (Exercício Crônico + NR), Exercício Agudo e Exercício Agudo + Ribosídeo de Nicotinamida (Exercício Agudo + NR).

4.2 Tratamento com Ribosídeo de Nicotinamida

Os grupos NR, EXE + NR e Exercício Agudo + NR foram tratados com Ribosídeo de Nicotinamida (Niagen, da marca Life Cell Research), sendo o grupo NR utilizado como controle positivo. A forma de suplementação ocorreu via dieta, adaptado de estudo realizado

por Cantó e colaboradores (2012)¹⁴. O Ribosídeo de Nicotinamida atua como precursor de NAD⁺, que por sua vez influencia na função mitocondrial da musculatura esquelética dos animais tratados.

Tabela 1:

Ingredientes	g/kg de dieta	
	Controle	NR
Amido de Milho	428,7	426,3
Caseína (≥85% de proteína)	200,0	200,0
Amido Dextrinizado (90% a 94% tetrassacarídeos)	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de Soja (sem aditivos)	40,0	40,0
Fibra (celulose microfina)	50,0	50,0
Mix de Vitaminas	10,0	10,0
Mix de Minerais	35,0	35,0
L-Cistina	1,8	1,8
Bitartarato de Colina (4,1% colina)	2,5	2,5
Ribosídeo de Nicotinamida (Niagen®- Life Cell Research)	-	2,4

Tabela 1: Descrição das dietas utilizadas. Tabela com as quantidades de cada ingrediente para elaboração de 1 quilo de dieta controle e de dieta controle acrescida com NR.

4.3 Protocolo de Exercício Físico

Para o protocolo de exercício agudo (Figura 4), os animais foram distribuídos nos grupos Exercício Agudo e Exercício Agudo + NR. Os animais do grupo suplementado com NR receberam dieta AIN-93 acrescida de 400 mg/kg/dia de Ribosídeo de Nicotinamida durante 8 semanas. Nas semanas número 4 e número 8 os animais foram avaliados no teste de potência máxima⁴⁷, afim de avaliar os efeitos da suplementação com Ribosídeo de Nicotinamida na performance aeróbia. Previamente as semanas 4 e 8 os animais foram adaptados ao ergômetro durante 5 dias, afim de reduzir o estresse provocado pelo mesmo.

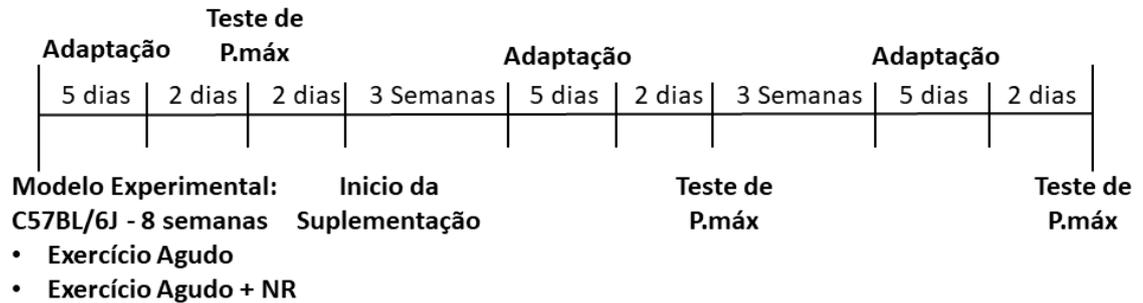
Figura 4:

Figura 4: Desenho experimental do protocolo de exercício agudo. Os animais foram suplementados durante 8 semanas, sendo realizado o teste para determinar a potência máxima dos animais em três momentos (antes do início da suplementação, após 4 semanas e após 8 semanas).

À respeito do protocolo de exercício crônico (Figura 5), os camundongos dos grupos Exercício Crônico e Exercício Crônico + NR foram submetidos a cinco semanas de treinamento em esteira ergométrica, exercitados em intensidade correspondente à máxima fase estável de lactato, conforme proposto por Ferreira e colaboradores⁴⁷. Previamente, os camundongos foram adaptados ao ergômetro, visando minimizar o possível estresse induzido pelo equipamento. Durante o período de treinamento os camundongos do grupo Exercício Crônico + NR receberam a dieta AIN-93⁴⁶ suplementada com 400 mg/kg/dia¹⁴ de Ribosídeo de Nicotinamida.

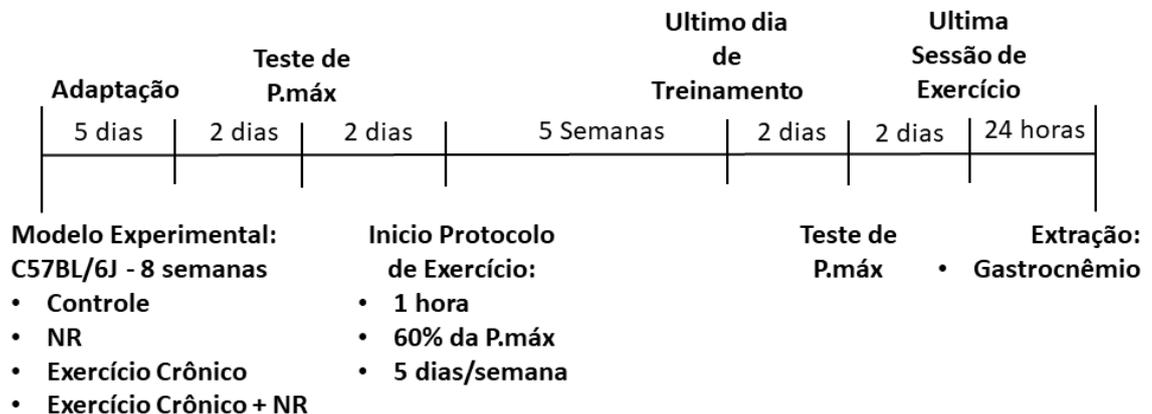
Figura 5:

Figura 5: Desenho experimental do protocolo de exercício crônico. Os animais foram adaptados durante 5 dias ao ergômetro e em seguida submetidos ao teste de potência máxima e exercitados durante 5 semanas à 60% da potência máxima determinada no teste. Ao final das 5 semanas foram re-submetidos ao teste afim de verificar os efeitos do exercício e da suplementação sobre a performance aeróbia. 24 horas à última sessão de exercício pós teste foi feita a extração do músculo gastrocnêmio.

Segundo Ferreira e colaboradores⁴⁷, a Máxima fase estável de lactato corresponde a concentração máxima de lactato sanguíneo e de carga de trabalho que pode ser mantida ao longo

do tempo sem o acúmulo contínuo de lactato sanguíneo e é considerada um importante marcador da capacidade de exercício aeróbico. Dessa forma para a determinação da máxima fase estável de lactato, utilizamos o protocolo descrito por Ferreira et al. (2007), no qual é realizado um teste incremental de corrida em ergômetro. A intensidade inicial do teste será de 6 m/min, consistindo em aumentos de 3 m/min a cada 3 minutos, até que o animal entre em exaustão. Com isto, obtemos dados da distância total percorrida e da carga de trabalho pico no fim do teste. Baseando-se nestes resultados, determinamos as cargas de treinamento, correspondentes a 60% das cargas de trabalho individuais dos camundongos submetidos ao teste incremental. Essa intensidade, segundo Ferreira et al. (2007), corresponde à máxima fase estável de lactato, ou seja, é a máxima intensidade na qual o exercício é realizado de forma aeróbia.

4.4 Respirimetria Indireta

Para determinação da produção de calor e consumo de oxigênio (VO_2), os animais foram alocados no aparelho Oxymax-CLAMS - Columbus Instruments®, que possibilita, por meio de calorimetria, a determinação do gasto energético. Os animais passaram por um período de 24 horas de adaptação ao equipamento. Posterior ao período de adaptação, os animais passaram por mais 23 horas de monitoramento. Todos os animais foram retirados do equipamento no momento em que os grupos Exercício Crônico e Exercício Crônico + NR eram submetidos à sessão de treinamento e retornaram imediatamente após o término da sessão. Como as sessões de exercício eram realizadas diariamente às 14:00, os animais eram retirados nesse horário e retornavam para análise aproximadamente às 15:00. Dessa forma, obtivemos 23 horas de análise, sendo a primeira hora da análise considerada do momento em que os animais entravam no ciclo claro às 06:00.

4.5 Grip teste

Após as cinco semanas de treinamento aeróbio em esteira e suplementação de NR, os animais dos grupos Controle, NR, Exercício Crônico e Exercício Crônico + NR foram submetidos ao teste de força, *Grip teste*, baseado no protocolo descrito por Rocha e colaboradores⁴⁸. Os animais foram segurados gentilmente pela cauda enquanto se agarravam com as quatro patas à barra de metal do equipamento posicionada de forma inclinada. Cada animal realizou três tentativas de adaptação. Após um período de descanso de cerca de 5 minutos cada animal realizou cinco tentativas para medida, sendo desconsideradas das análises

as tentativas com o melhor e pior resultado. O resultado da força máxima desses animais é representado pela média das três tentativas consideradas após o teste.

4.6 Fotos Termográficas

Após 5 semanas de suplementação com NR, fotos termográficas foram realizadas em todos os grupos experimentais. A temperatura interescapular do tecido adiposo marrom em torno do ambiente foi registrada com câmera de imagem térmica FLIR T335® e analisada usando o software FLIR tools®⁴⁹.

4.7 Procedimentos de extração

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico, seguido de deslocamento cervical. Foram extraídas amostras do músculo gastrocnêmio e do tecido adiposo marrom (*Brown adipose tissue* – BAT), em seguida homogeneizadas em tampão de extração (contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris - pH 7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C, reagentes da marca Sigma-Aldrich). O homogenato foi centrifugado a 11.000 RPM por 30 minutos. Foi determinada a concentração de proteína na porção sobrenadante da amostra, utilizando o método de Ácido Bicinoninico. Em seguida, foi acrescido o tampão de Laemmli a cada uma das amostras e armazenadas a -80° C para as análises de Western blotting.

4.8 Análise proteica por Western blotting.

Os reagentes e os aparelhos utilizados para o gel Sódio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE) foram provenientes da Bio-Rad (Richmond, CA). Os compostos Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditioneitol (DTT) provenientes da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) usada foi proveniente da empresa Biorad. Foram utilizados os anticorpos anti-OXPHOS (coquetel de subunidades mitocondriais) e anti-SDHA, provenientes da empresa ABCAM, anti-SIRT1 proveniente da empresa Cell signalling e anti-Hsp60 e anti-UCP1 proveniente da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

As amostras homogeneizadas em tampão de extração foram tratadas com tampão de Laemmli⁵⁰ contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich). Em seguida, foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no aparelho para minigel (Mini-Protean®). Foi utilizado como

padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad por aproximadamente 90 minutos, a 104 volts. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%, reagentes da marca Sigma Aldrich) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas em solução de anticorpo primário específico por 12 horas. As membranas foram posteriormente incubadas com 2 μ L de anticorpo secundário e em seguida incubadas com 2 ml de solução de quimioluminescência (da marca Cell Signaling). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada e visualizada com o uso de autorradiografias e/ou fotodocumentador. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan[®].

4.9 Quantificação do conteúdo de NAD⁺ intramuscular

Para quantificação dos níveis de NAD⁺ intramuscular, foi utilizado o kit Enzychrom NAD/NADH assay Kit da marca Bioassay Systems. Seguimos o protocolo proposto no kit, utilizando 20 mg do músculo gastrocnêmio de cada animal.

4.10 Histoquímica

Após a extração do músculo gastrocnêmio, o mesmo foi preservado com Isopentano (da marca Synth) e armazenado a -80°C. Foram feitos cortes transversais de 10 μ M utilizando um criostato (Leica). Em seguida, as laminas foram submetidas ao protocolo de ATPase conforme descrito por Baptista e colaboradores (2010)⁵¹. Foram utilizados os seguintes pHs: 4.3 (ácido) para marcar as fibras do tipo I e 10.4 (alcalino) para marcar as fibras do tipo 2. As lâminas foram analisadas em um microscópio equipado com uma câmera digital e um software de imagens). A contagem do tipo de fibra foi feita utilizando o software ImageJ.

4.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados no Software GraphPad Prism 6 por meio de teste “t” de Student (entre dois grupos) para a comparação dos grupos “experimental” e “controle” e “Anova” para comparação das diferentes intervenções e o grupo “controle”. O nível de significância estatística estabelecido foi de $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Suplementação com NR promove aumento dos níveis de NAD⁺ intramuscular em camundongos C57BL/6J e aumento do conteúdo proteico de Sirt1.

A suplementação via dieta com o precursor de NAD⁺, Ribosídeo de Nicotinamida, durante cinco semanas promoveu aumento do conteúdo de NAD⁺ no músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6J (Figura 6A). Em seguida avaliamos pela técnica de Western Blotting o conteúdo proteico da proteína Sirt1, uma vez que esta é uma proteína NAD⁺ dependente e uma das responsáveis por ativar o mecanismo de UPRmt. Observamos que os animais suplementados com NR durante 5 semanas apresentaram uma tendência no aumento do conteúdo proteico de Sirt1, apesar da não diferença estatística ($p=0,1342$).

Figura 6

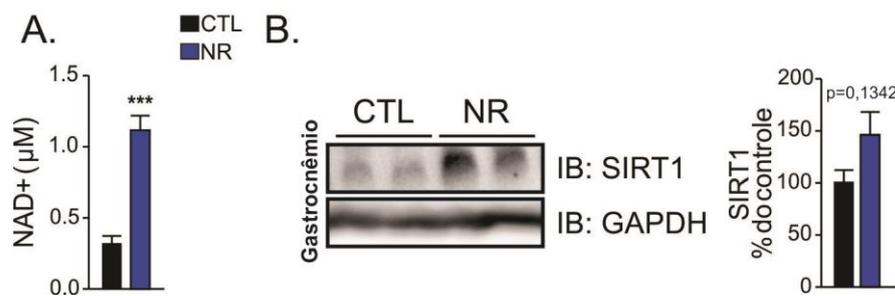


Figura 6: Suplementação de 5 semanas com NR promove aumento dos níveis de NAD⁺ intramuscular. (A) Níveis de NAD⁺ na musculatura esquelética de camundongos C57BL/6J

após 5 semanas de suplementação NR. $n=5$. $p<0,001$ (B) Conteúdo proteico de SIRT1 no músculo gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas de suplementação com NR. CTL $n=4$. NR $n=5$.

5.2 Suplementação de Ribosídeo de Nicotinamida evita o acúmulo de tecido adiposo, sem promover redução do peso corporal.

Os animais do grupo NR suplementados durante 5 semanas apresentaram menor acúmulo das gorduras Epididimal, Mesentérica e Retroperitoneal quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7A, 7B e 7C), porém não apresentaram diferença no peso corporal (Figura 7D).

Figura 7

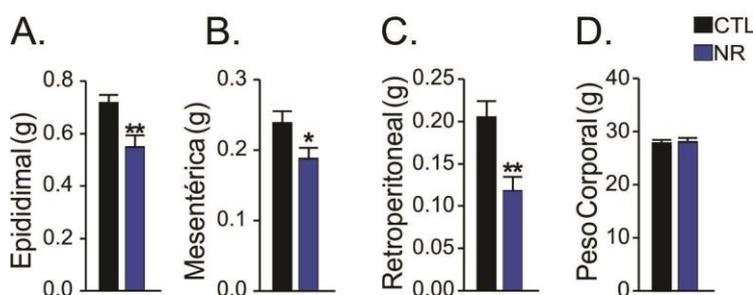


Figura 7: Suplementação de 5 semanas com NR promove redução do acúmulo de gordura, sem promover redução do peso corporal. (A) Peso da gordura Epididimal após 5 semanas de suplementação com NR. (B) Peso da gordura Mesentérica após 5 semanas de suplementação com NR. (C) Peso da

gordura retroperitoneal após 5 semanas de suplementação com NR. (D) Peso corporal após 5 semanas de suplementação com NR. CTL n=10. NR n=9. * $p<0,05$. ** $p<0,01$.

5.3 Suplementação de NR promove aumento na produção de calor.

A suplementação de NR durante 5 semanas promoveu aumento da produção de calor durante 24 horas, principalmente na hora 1 e 3 de análise, que corresponde as 06:00 e 08:00 (Figura 8A e 8B). Esse aumento da produção de calor também pode ser observado a partir de fotos termográficas, nas quais os animais suplementados com NR apresentaram um aumento de 5,5% na temperatura da região Inter escapular (Figuras 8C e 8D), onde localiza-se o Tecido adiposo marrom, um dos tecidos responsáveis pela termogênese. A partir desses dados, avaliamos o conteúdo proteico da Proteína Desacopladora 1 (*Uncouple Protein 1* – UCP1) responsável pela produção de calor no tecido adiposo marrom. Observamos que os animais suplementados apresentaram um maior conteúdo proteico de UCP1 no tecido adiposo marrom (Figura 8E), podendo assim explicar uma maior temperatura corporal e produção de calor por esses animais.

Figura 8

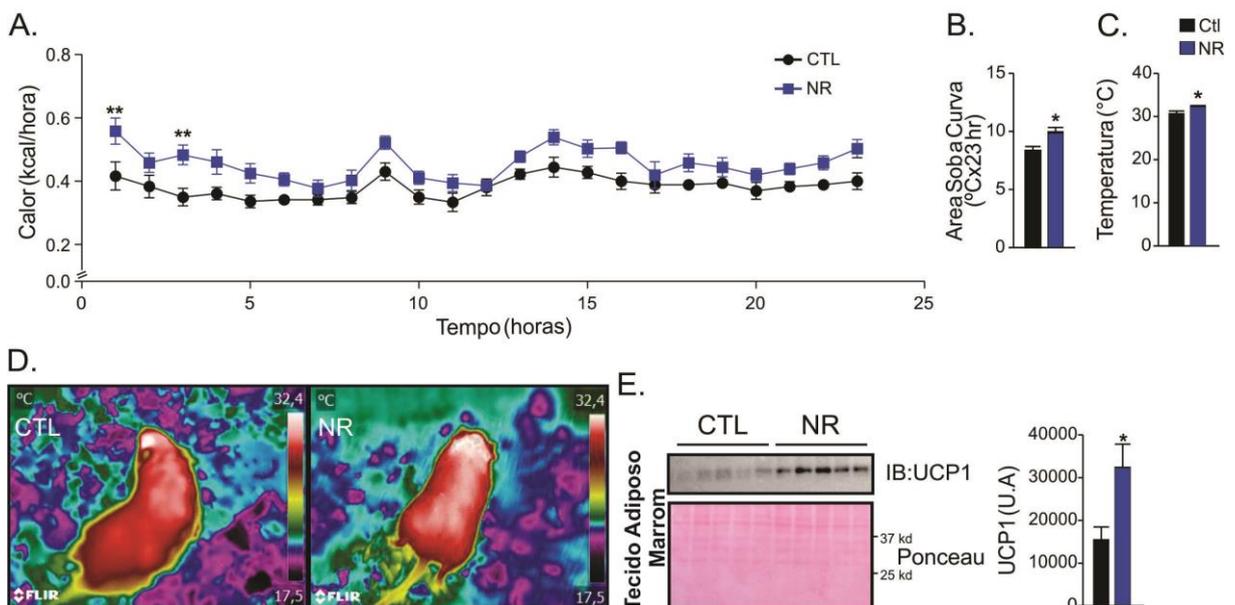


Figura 8: Efeitos da Suplementação de NR sobre a temperatura corporal. (A) Produção de calor durante 23 horas de análise por respirometria indireta após 5 semanas de suplementação com NR. n=6. **= $p<0,01$. (B) Área sob a curva referente a produção de calor durante 23 horas de análise por respirometria indireta após 5 semanas de suplementação no NR. n=6. $p<0,05$. (C) Temperatura da região interescapular após 5 semanas de suplementação com NR. CTL n=3, NR n=4. $p<0,05$. (D) Foto termográfica para mensurar produção de calor após 5 semanas de suplementação com NR. (E) Conteúdo proteico de UCP1 no tecido adiposo marrom após 5 semanas de suplementação com NR. n=5. $p<0,05$.

5.4 Suplementação de NR promove tendência no aumento do consumo de oxigênio de camundongos C57BL/6J

A suplementação de NR promoveu uma tendência de aumento do VO₂ durante 23 horas de análise por respirometria indireta, principalmente durante a primeira hora de análise das 06:00 as 07:00 (Figura 9A e 9B). Esse aumento do VO₂ não está relacionado com o aumento da atividade locomotora espontânea, uma vez que houve diferença entre os grupos na atividade locomotora espontânea no eixo X e no eixo Y (Figura 9C e 9D).

Figura 9

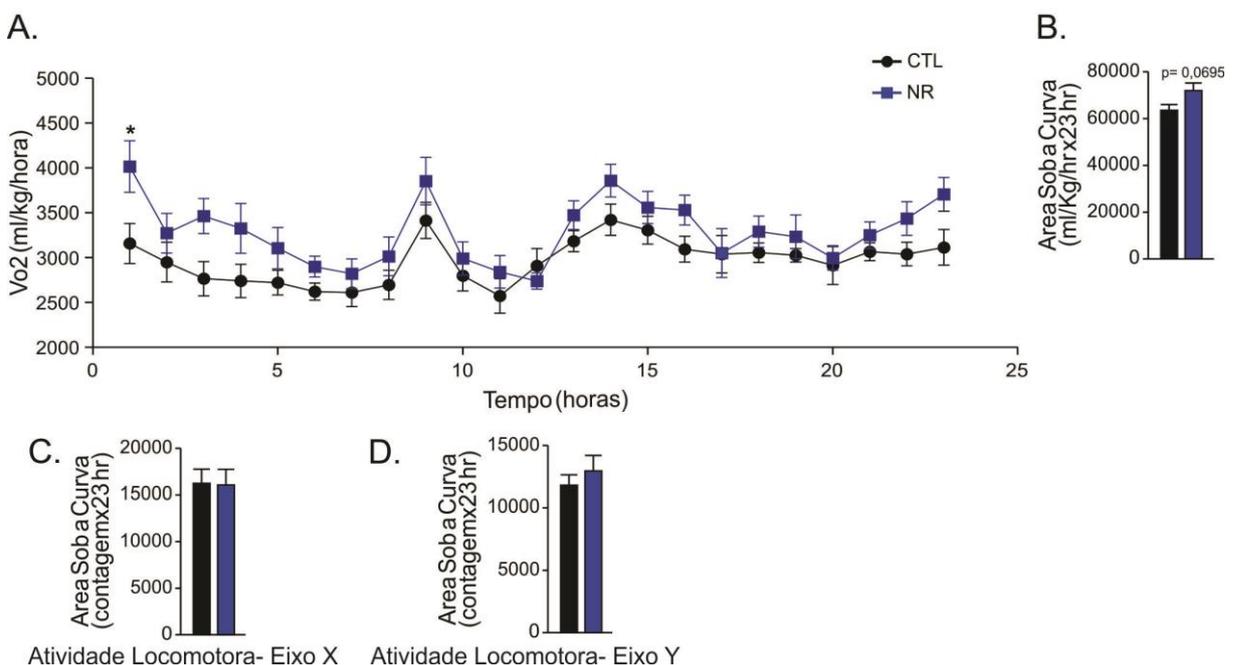


Figura 9: Efeitos da Suplementação de NR sobre o VO₂ e atividade locomotora espontânea. (A) Consumo de Oxigênio (VO₂) durante 23 horas de análise por respirometria indireta após 5 semanas de suplementação com NR. *=p<0,05. (B) Área sob a curva referente ao consumo de oxigênio durante 23 horas de análise por respirometria indireta após 5 semanas de suplementação no NR. (C) Área sob a curva referente à atividade locomotora espontânea no eixo X durante 23 horas de análise por respirometria indireta após 5 semanas de suplementação no NR. (D) Área sob a curva referente à atividade locomotora espontânea no eixo Y durante 23 horas de análise por respirometria indireta após 5 semanas de suplementação no NR. n=6

5.5 Suplementação de NR promove aumento da força muscular.

Os animais do grupo NR apresentaram melhor desempenho no teste de produção de força com as quatro patas, *Grip* Teste, quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 9A).

Figura 10

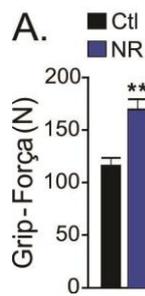


Figura 10: Efeitos da Suplementação de NR sobre a produção de força das quatro patas. (A)

Produção de força no Grip teste após 5 semanas de suplementação de NR. Ctl n = 10. NR n=9. **= $p < 0,01$.

5.6 Suplementação de NR promove indução do desequilíbrio mitonuclear na musculatura esquelética de camundongos.

A suplementação de NR durante 5 semanas em camundongos C57BL/6J promoveu aumento do conteúdo de proteínas produzidas pelo DNA nuclear, como ATP5A (Fig 11A) e SDHA (Fig 11C), aumentando a razão entre as proteínas mitocondriais e proteínas nucleares (Fig 11B e Fig 11D), um dos marcadores de ativação do mecanismo de UPRmt.

Figura 11

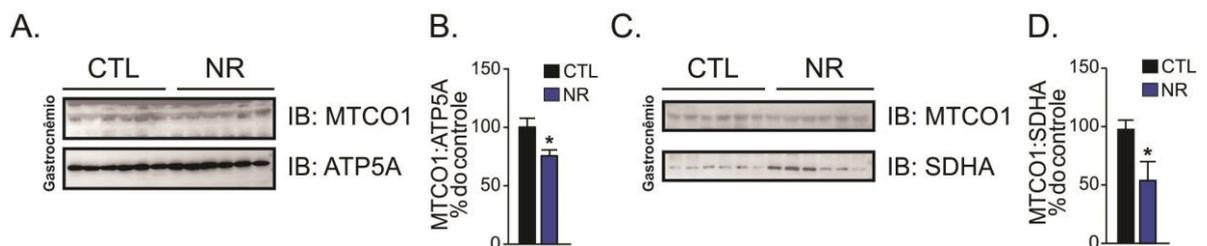


Figura 11: Efeitos da suplementação de NR sobre a indução do desequilíbrio mitonuclear. (A) Conteúdo proteico de das proteínas MTCO1 e ATP5A no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas de suplementação com NR. **(B)** Razão MTCO1/ATP5A no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas de suplementação com NR. n=6. **(C)** Conteúdo proteico de das proteínas MTCO1 e SDHA no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas de suplementação com NR. **(D)** Razão MTCO1/SDHA no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas de suplementação com NR. n=6. *= $p < 0,05$.

5.7 Suplementação com NR não promove aumento da performance aeróbia em animais submetidos a protocolo de exercício agudo.

A partir da observação de que os animais suplementados com NR durante 5 semanas apresentaram-se fisiologicamente melhores e com aumento dos níveis de NAD^+ intramuscular, aventamos a hipótese se a suplementação com NR seria capaz de aumentar a performance aeróbia de forma aguda. Assim avaliamos a performance desses animais após 4 e 8 semanas de suplementação de NR via dieta.

Os animais dos grupos Exercício Agudo e Exercício Agudo + NR foram submetidas ao protocolo descrito na figura 5, sendo assim após 4 semanas de suplementação com NR do grupo Exercício Agudo + NR os animais de ambos os grupos realizaram um teste de potência máxima e não apresentaram diferença na performance aeróbia (Figura 12A). Dessa forma, mantivemos a suplementação por mais 4 semanas, totalizando 8 semanas de suplementação com NR. Ao final da oitava semana, os animais de ambos os grupos realizaram novamente o teste de potência máxima e novamente os animais do grupo Exercício Agudo + NR não apresentaram diferença na performance aeróbia quando comparados com animais do grupo Exercício Agudo (Figura 12B). Além disso, tanto os animais do grupo Exercício agudo (Figura 12C), quanto os animais do grupo Exercício Agudo + NR (Figura 12D) não apresentaram alterações quando comparados com eles mesmos no decorrer das 8 semanas de experimento.

Figura 12

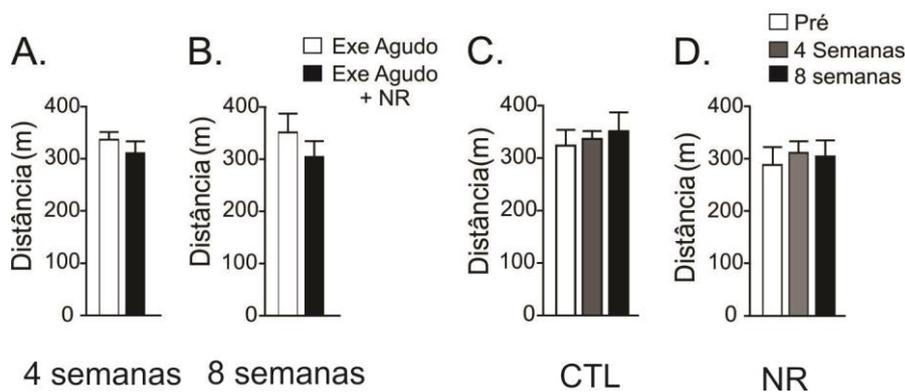


Figura 12: Suplementação com Ribosídeo de Nicotinamida não altera performance aeróbia durante exercício agudo.

(A) Distância percorrida durante teste de Potência máxima após 4 semanas de suplementação. (B)

Distância percorrida

durante teste de Potência máxima após 8 semanas de suplementação. (C) Distância percorrida pelo grupo Exercício Agudo pré, após 4 semanas e após 8 semanas de intervenção. (D) Distância percorrida pelo grupo Exercício Agudo + NR pré, após 4 semanas e 8 semanas de suplementação com NR. n=10 animais por grupo.

5.8 Treinamento aeróbio associado à suplementação de Ribosídeo de Nicotinamida por 5 semanas promove aumento da performance aeróbia.

Uma vez que a suplementação de NR por si só não promoveu alterações na performance aeróbia de camundongos, realizamos a associação do treinamento aeróbio com a suplementação de NR, afim de verificar se essa estratégia poderia promover o aumento da performance aeróbia. Assim os animais dos grupos Exercício crônico e Exercício Crônico + NR foram submetidos ao protocolo de exercício descrito na figura 4. Após as 5 semanas de treinamento e suplementação via dieta de NR, os animais do grupo Exercício Crônico + NR apresentaram aumento de 32,79% da distância percorrida, 164,63% do delta da distância percorrida (Figuras 13A e 13B), 14,50 % da potência máxima total e 110% do delta da potência máxima (Figura

13C e 13D), quando comparados com o grupo Exercício Crônico, mostrando que diferente da suplementação por si só de NR, a associação da mesma com o treinamento aeróbio foi eficiente em promover o aumento da performance.

Figura 13

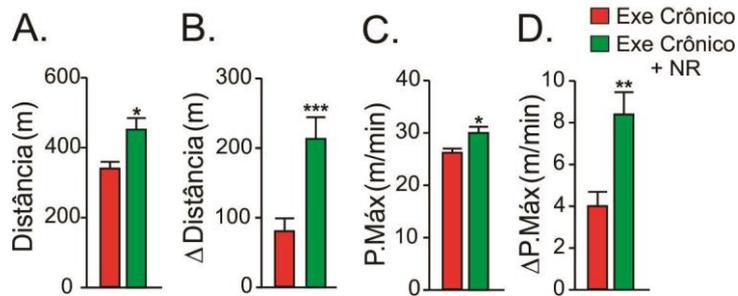


Figura 13: Suplementação com NR associada ao treinamento aeróbio promove aumento na performance aeróbia. (A) Distância percorrida após 5 semanas de treinamento aeróbio. (B) Delta da distância percorrida após 5 semanas de treinamento aeróbio. (C) Potência Máxima após 5 semanas de treinamento aeróbio.

(D) Delta da Potência Máxima após 5 semanas de treinamento aeróbio. n=15. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

5.9 Suplementação com NR não promove redução do peso corporal em animais treinados.

Os animais do grupo Exercício crônico + NR não apresentaram redução do peso corporal quando comparados com os animais do grupo Exercício Crônico (Figura 14A). Porém, o treinamento foi eficiente em reduzir o peso corporal (Figura 14A), o acúmulo das gorduras epididimal e mesentérica (Figura 14B e 14C) e apresentou tendência de redução da gordura retroperitoneal (Figura 14D) de ambos os grupos treinados quando comparado com os animais do grupo controle.

Figura 14

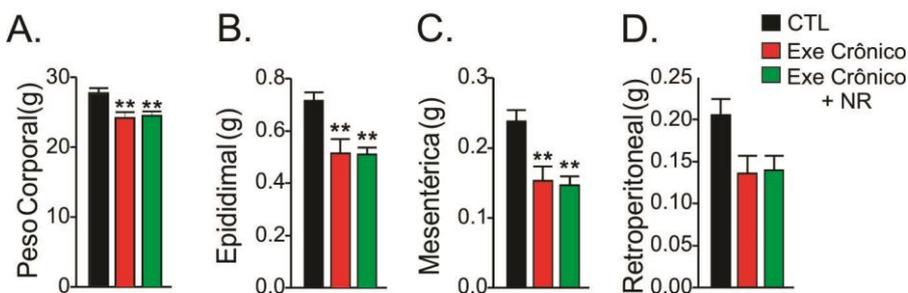


Figura 14: Treinamento aeróbio promove redução do acúmulo de tecido adiposo e redução do peso corporal. (A) Peso corporal após 5 semanas de treinamento e suplementação com NR.

(B) Peso da gordura Epididimal após 5 semanas de treinamento e suplementação com NR. (C) Peso da gordura Mesentérica após 5 semanas de treinamento e suplementação com NR. (D) Peso da gordura Retroperitoneal após 5 semanas de treinamento e suplementação com NR. Ctl n=10. Exe Crônico n=8. Exe + NR n=9. **p<0,01 vs. CTL.

5.10 Suplementação com NR associada ao treinamento aeróbio não promove aumento da força muscular de camundongos C57BL/6J

O treinamento aeróbio em esteira por 5 semanas promoveu uma tendência no aumento da força muscular dos camundongos quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 15A). A suplementação com NR associada ao treinamento não promoveu alteração na produção de força desses animais quando comparado com os animais do grupo apenas treinado (Figura 15B). Curiosamente, os animais apenas suplementados com NR não apresentaram diferença na produção de força quando comparado com os animais suplementados e treinados (Figura 15C).

Figura 15

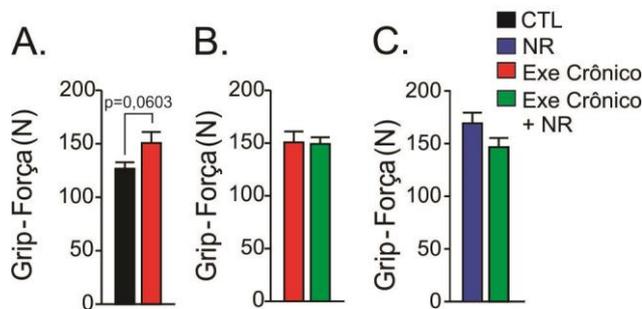


Figura 15: Efeitos do treinamento aeróbio em esteira e da suplementação de NR sobre a capacidade de produção de força com as 4 patas.

(A) Comparação da produção de força com as 4 patas após 5 semanas de treinamento aeróbio em esteira e animais sedentários. (B) Comparação da produção de força com as 4 patas após 5 semanas de treinamento aeróbio em esteira e de suplementação associada ao treinamento aeróbio em esteira. (C) Comparação da produção de força com as 4 patas após 5 semanas de suplementação e 5 semanas de treinamento aeróbio em esteira e suplementação. CTL n=10; Exercício Crônico n=10; Exercício Crônico + NR n=10; NR n=9

5.11 Suplementação de NR associado ao treinamento aeróbio promove aumento no número de fibras tipo I.

A associação do treinamento aeróbio com a suplementação de 5 semanas de NR promoveu aumento do número de fibras tipo I nesses animais quando comparados com animais do grupo controle e do grupo NR (Figura 16A). O treinamento apresentou uma tendência de aumento do número de fibras do tipo I quando comparado aos animais sedentários ($p=0,1104$), enquanto que a suplementação de NR isoladamente não promoveu alterações significativas (Figura 16A).

Figura 16

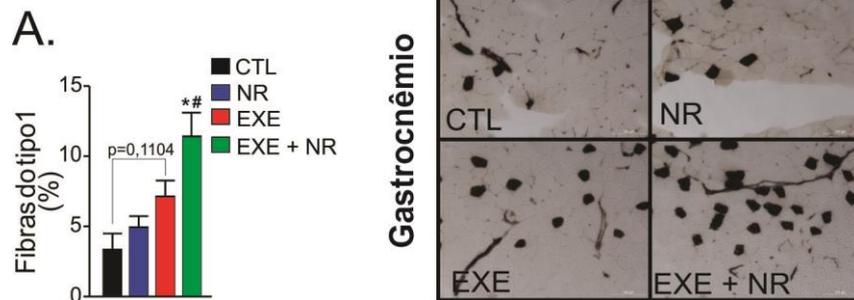


Figura 16: Efeitos da suplementação de NR e treinamento aeróbio sobre a quantidade de fibras tipo I. (A) Quantificação da porcentagem de fibras do tipo I na área total do músculo. (B) Imagens representando a porcentagem de fibras do tipo I

quantificadas no gráfico A. CTL n=2; NR n=3; Exercício Crônico n=3; Exercício Crônico + NR n=3. *= p,0,05 vs. NR. # = p<0,05 vs. Exercício Crônico.

5.12 Treinamento aeróbio promove aumento do conteúdo proteico de Sirt1 e tendência ao aumento dos níveis de NAD⁺ na musculatura esquelética de camundongos

O treinamento aeróbio em esteira promoveu uma tendência de aumento nos níveis de NAD⁺ no músculo gastrocnêmio (Figura 17A). A suplementação de NR associada ao treinamento não aumentou os níveis de NAD⁺ além do que foi aumentado apenas pelo treinamento (Figura 17A). Conseqüentemente, o treinamento promoveu aumento do conteúdo proteico de SIRT1 no músculo gastrocnêmio de camundongos quando comparado com o grupo controle (Figura 17B). A suplementação associada ao treinamento apesar de apresentar um conteúdo proteico de SIRT1 maior que o grupo controle, não apresentou diferença quando comparado com o grupo Exercício Crônico (Figura 17B)

Figura 17

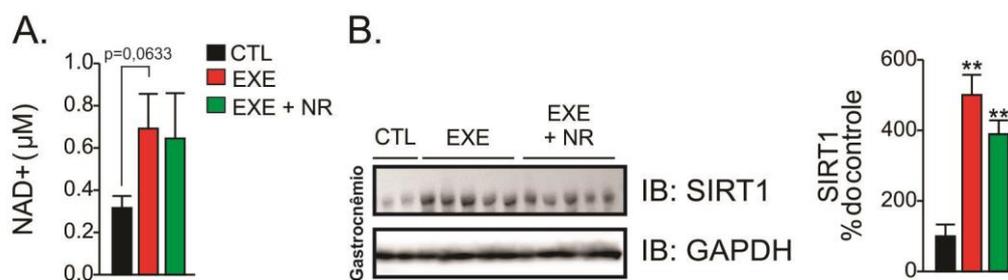


Figura 17: Efeitos do treinamento e da

suplementação de NR associada, sobre o conteúdo de NAD⁺ e conteúdo proteico de SIRT1 no gastrocnêmio de camundongos. (A) Quantificação do conteúdo de NAD⁺ no gastrocnêmio de camundongos treinados e treinados e suplementados durante 5 semanas. n=5 (B) Conteúdo proteico de SIRT1 no gastrocnêmio de camundongos treinados e treinados suplementados durante 5 semanas. CTL n=4; Exercício Crônico n=5; Exercício Crônico + NR n=5. **=p<0,01 VS. CTL.

5.13 Treinamento promove ativação da UPRmt, enquanto suplementação de NR associada ao treinamento não promove aumento do desequilíbrio mito-nuclear.

O treinamento físico foi capaz de ativar a via da UPRmt, tanto a partir do desbalanço mitonuclear (Fig18A e 18B) quanto a partir da ativação da chaperona HSP60 (Figura 18E e 18F) quando comparado com os animais do grupo controle. Ao mesmo tempo a suplementação de NR associada à 5 semanas de treinamento aeróbio realizado em esteira ergométrica à 60% da potência máxima não promoveu o aumento do desequilíbrio mitonuclear quando comparado com os animais exercitados (18C e 18D), e consequentemente promoveu alterações no conteúdo proteico do marcador de UPRmt, HSP60 (Figura 18E e 18F).

Figura 18

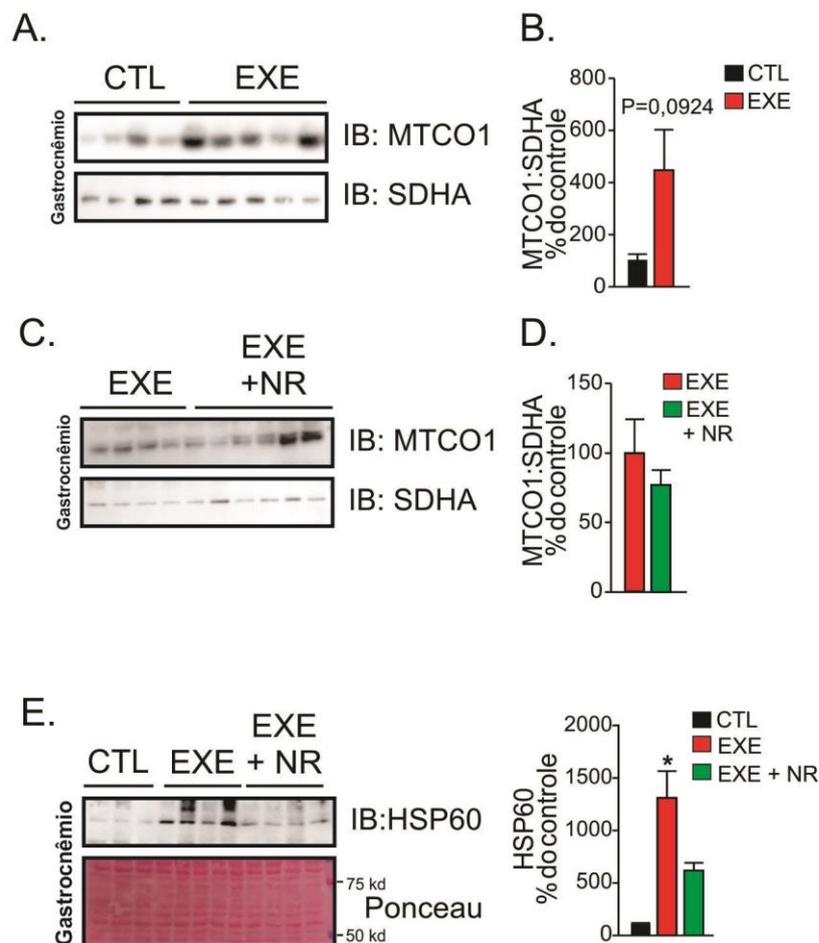


Figura 18: Efeitos do treinamento e da suplementação de NR sobre a ativação da UPRmt. (A) Conteúdo proteico de MTCO1 e SDHA no gastrocnêmio de camundongos C57BL/6J após 5 semanas de treinamento aeróbio em esteira. (B) Razão MTCO1/SDHA no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas treinamento aeróbio em esteira. n=5. (C) Conteúdo proteico de MTCO1 e SDHA no gastrocnêmio de camundongos C57BL/6J após 5 semanas de treinamento aeróbio em esteira e suplementação de NR via dieta. (D) Razão MTCO1/SDHA no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas treinamento aeróbio em esteira e suplementação com NR via dieta. n=5. (E) Conteúdo proteico de

HSP60 no gastrocnêmio de camundongos após 5 semanas de treinamento aeróbio em esteira e suplementação de NR via dieta. CTL n=3. EXE e EXE + NR n=4. *=p<0,05 vs CTL.

6. Discussão

A suplementação com o precursor de NAD⁺, Ribosídeo de Nicotinamida já é bem elucidada na literatura em casos de obesidade, esteatose hepática e modelos de distrofia

muscular^{14,52,53}, porém nada é descrito sobre a suplementação de NR em modelos saudáveis. A partir disso, nosso estudo demonstrou que a suplementação de NR via dieta durante 5 semanas, na dose de 400 mg/kg/dia, promoveu aumento dos níveis de NAD⁺ no músculo gastrocnêmico de camundongos C57BL/6J magros (Figura 6A), acompanhado do aumento do conteúdo proteico de SIRT1 (Figura 6B). Esses resultados corroboram com dados da literatura que demonstram que a suplementação de NR é capaz de aumentar o conteúdo de NAD⁺ no quadríceps de camundongos suplementados durante 1 semana¹⁴, com uma dose de 400 mg/kg/dia. Diferente do que foi demonstrado por Cantó e colaboradores, no qual eles demonstram que os efeitos do NAD⁺ via SIRT1 correspondem ao aumento da atividade dessa proteína e não aumento do conteúdo proteico da mesma¹⁴, nossas análises demonstraram uma tendência no aumento do conteúdo proteico dessa proteína.

A suplementação com NR foi eficaz em reduzir o acúmulo dos diferentes tipos de tecido adiposo branco (Epididimal, mesentérico e retroperitoneal), sem promover a redução do peso corporal (Figura 7). Estudos demonstram que a suplementação de NR durante 6 e 8 semanas não alterou o peso corporal dos animais suplementados^{14,54}, porém diferente do nosso estudo Cantó et al. demonstraram que não houve alteração no conteúdo massa gorda nos animais magros suplementados, porém os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram menor conteúdo de massa gorda após 8 semanas de suplementação com NR¹⁴. Essa redução do conteúdo do tecido adiposo branco pode ser devido ao fato de que os animais suplementados com NR apresentaram uma maior capacidade na produção de calor durante 23 horas de análise (Figura 8A e B), maior temperatura interescapular, onde localiza-se o BAT (Figura 8C) e maior conteúdo proteico de UCP1 no tecido adiposo marrom (Figura 8E), proteína responsável pela termogênese⁵⁵. Assim a suplementação de NR pode ser um importante aliado no processo de desencadear a termogênese e aumentar o gasto energético, reduzindo assim o acúmulo de gordura corporal. No estudo base do nosso trabalho, foi demonstrado que a suplementação de NR durante 8 semanas promoveu uma melhor resposta de manutenção da temperatura corporal durante teste de exposição ao frio tanto para animais magros, quanto para animais obesos que consumiam dieta hiperlipídica.¹⁴

A suplementação de NR também pode ser eficiente no aumento do gasto energético, uma vez que esta apresentou uma tendência no aumento do consumo de oxigênio (VO₂) durante as 23 horas de análise por respirometria indireta (Figura 9A e 9B), apesar de não promover alterações na atividade locomotora espontânea no eixo X (Figura 9C) e no eixo Y (Figura 9D). Mais uma vez, nossos dados vão de acordo com dados já publicados anteriormente, na qual a

suplementação de NR por 10 semanas promoveu uma tendência de aumento do VO_2 ($p=0,055$) em animais magros e um aumento do VO_2 nos animais suplementados e alimentados com dieta hiperlipídica¹⁴. Vale ressaltar que a forma de análise utilizada no estudo em questão foi a mesma utilizada em nosso trabalho, a respirometria indireta.

Os animais suplementados com NR por 5 semanas apresentaram melhor desempenho no teste de produção de força com as 4 patas, *Grip* teste (Figura 10). Artigo publicado por Zhang e colaboradores (2016) avaliaram a produção de força dos animais suplementados com NR durante 6 semanas via dieta, numa dose de 400 mg/kg/dia através do *Grip* teste e diferente do nosso trabalho, não encontraram diferença quando comparado com os animais controle⁵⁴.

A ativação da UPRmt já é fortemente descrita como um mecanismo de proteção e reparação celular frente a estresses físicos e químicos que atingem o organismo e pode ser ativada por diferentes estímulos, dentre eles a suplementação com NR^{52,53}. Dessa forma nossos resultados demonstram que a suplementação com NR é capaz de promover o desequilíbrio mitonuclear, devido ao fato de aumentar o conteúdo de proteínas codificadas pelo DNAn (Fig 11A e 11C). Esses resultados vão de encontro com os estudos previamente realizados com a suplementação de NR em modelo animais, que demonstram um aumento das proteínas mitocondriais, uma vez que nesses estudos utilizaram-se animais obesos, idosos ou modelo para distrofia muscular, não estando esses em seu estado basal, uma vez que esses modelos apresentam diferentes características de quebra da homeostase metabólica. Assim, nosso trabalho demonstra a promoção do desequilíbrio mitonuclear, um dos fatores responsáveis pela ativação da via da UPRmt, em indivíduos em homeostase quando suplementados com NR, devido ao aumento da quantidade de proteínas nucleares em razão das proteínas mitocondriais. Ainda não é bem elucidado na literatura, se a diferença na ativação da UPRmt pelo desequilíbrio mitonuclear (aumento das proteínas nucleares ou aumento das proteínas mitocondriais) tem diferentes efeitos sobre o metabolismo, uma vez que a suplementação de resveratrol (conhecido por aumentar os níveis de NAD^+) promove o desequilíbrio através do aumento das proteínas nucleares em razão das proteínas mitocondriais em hepatócitos de camundongos¹², enquanto que a suplementação com o precursor de NAD^+ , NR, promove no fígado de camundongos obesos e no músculo de camundongos MDX o desequilíbrio a partir do aumento das proteínas mitocondriais em razão das proteínas nucleares^{52,53}. Apesar da contradição dos dados, os animais suplementados com NR apresentaram-se fisiologicamente melhores que os animais controles, uma vez que tiveram um menor acúmulo de gordura corporal (Figura 7), aumento da termogênese (Figura 8) e aumento da força muscular (Figura 10).

O exercício físico vem sendo altamente estudado tanto como estratégia não farmacológicas na prevenção de distúrbios metabólicos quanto para performance de atletas. Cada vez mais, buscam-se estratégias para que os atletas se tornem mais eficientes em seus esforços, resultando assim em melhores resultados. A melhora do metabolismo oxidativo está diretamente relacionada com o aumento de performance, uma vez que a mobilização de substratos extra musculares para produção de energia é essencial para manutenção do exercício por tempo prolongado. Dessa forma, o aumento da qualidade e quantidade mitocondrial é essencial para um melhor rendimento dos atletas, uma vez que essa organela está diretamente relacionada com a oxidação de substratos para produção energética.

A partir desses dados, aventamos a hipótese de que a suplementação de NR poderia ser uma importante estratégia no aumento da performance aeróbia em exercício em esteira, uma vez que os aumentos nos níveis de NAD^+ intramuscular poderiam contribuir para melhora do metabolismo oxidativo e aumento da biogênese mitocondrial.

Primeiramente, avaliamos os efeitos da suplementação de NR na performance aeróbia de camundongos durante exercício agudo. Os camundongos foram submetidos ao protocolo de exercício agudo (Figura 4) e observamos que os animais suplementados com NR não apresentaram diferença na performance após 4 e 8 semanas de suplementação quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 12A e 12B). Esses dados diferem dos dados apresentados no estudo de Kourtzidis e colaboradores, no qual ratos Wistar foram suplementados durante 21 dias com 300 mg/kg de peso/dia de NR via gavagem e então foram submetidos a um teste de natação com carga incremental⁵⁶. Ao contrário do que foi demonstrado em nosso trabalho, Kourtzidis et al. demonstraram que esse protocolo de administração de NR apresentou uma tendência de redução da performance dos animais durante o teste incremental⁵⁶. Essa diferença de resultados pode ser atribuída a diferenças nas doses, sendo em nosso trabalho 400 mg/kg/dia via dieta como estabelecido em estudos anteriores^{14,52}, e a diferença no tipo de exercício.

Uma vez que a suplementação por si só não foi eficiente e aumentar a performance dos camundongos em teste incremental em esteira, decidimos avaliar se a associação do treinamento aeróbio com a suplementação de NR poderia promover aumento da performance aeróbia de camundongos. A associação das duas intervenções promoveu aumento tanto da distância percorrida quanto o aumento da potência máxima ao final das 5 semanas de treinamento em esteira ergométrica e suplementação com NR via dieta (figura 13). Essa

melhora da performance de 32,79% da distância percorrida e 14,50 % da potência máxima total, faz com que o NR possa ser uma importante e eficiente estratégia para a melhora da performance em atletas que estão em busca de resultados melhores a cada dia.

Nosso protocolo de treinamento foi capaz de reduzir o peso corporal e reduzir o conteúdo de gordura epididimal e mesentérica (Figura 14). Esses dados estão de acordo com a literatura, em que o exercício físico é uma estratégia consolidada em promover a redução do peso corporal e redução do acúmulo de gorduras viscerais⁵⁷⁻⁵⁹. Como nosso estudo é o primeiro que demonstra os efeitos da suplementação de NR com o treinamento aeróbio, foi observado que a associação dos dois não promoveu uma redução maior que o exercício do peso corporal e das gorduras viscerais (Figura 14) quando comparado com os animais controle.

O treinamento em esteira foi capaz de promover uma tendência no aumento da produção de força com as 4 patas (Figura 15A) quando compara com os animais controle, porém não encontramos diferença na produção de força com as 4 patas quando associamos o treinamento aeróbio em esteira com a suplementação de NR (Figura 15B). Interessantemente, os animais apenas suplementados apresentaram o mesmo desempenho que os animais treinados e suplementados no Grip teste (Figura 15C).

Assim como já foi demonstrado na literatura que o treinamento é capaz de aumentar o níveis de $NAD^{+43,44}$, nosso trabalho demonstra que o treinamento aeróbio em esteira de 5 semanas, promove uma tendência de aumento dos níveis de NAD^{+} intramuscular ($p=0,0633$) (Figura 18A). A suplementação de NR associada ao treinamento não foi capaz de aumentar os níveis de NAD^{+} comparado apenas com o grupo treinado, apesar de apresentar uma tendência de conteúdo de NAD^{+} maior que o grupo controle. Mesmo associando as duas estratégias de aumento dos níveis de NAD^{+} o grupo Exercício Crônico + NR não apresentou maior níveis de NAD^{+} que os grupo Exercício Crônico e o grupo NR.

Para avaliar os efeitos da suplementação de NR e do treinamento sobre o metabolismo oxidativo, avaliamos o conteúdo de fibras do tipo I no músculo gastrocnêmio de camundongos dos grupos Controle, NR, Exercício Crônico e Exercício Crônico + NR. A partir do protocolo de ATPase, no qual marcamos as fibras do Tipo I em tampão ácido de PH 3.4 e em análises por microscopia óptica, observamos que a suplementação por si só não promoveu aumento do número de fibras do tipo I, enquanto que o treinamento apresentou uma tendência ($p=0,1104$) quando comparado com os animais controle. O treinamento aeróbio já é conhecido como um promotor da transformação das fibras musculares treinadas que passam a ter um perfil mais

oxidativo, ou seja, tornam-se mais parecidas com as fibras do tipo I³⁶. E a associação do treinamento aeróbio em esteira e a suplementação de NR mostrou-se eficiente em promover o aumento de fibras com perfil mais oxidativo, ou seja, promoveu o aumento no número de fibras do tipo I no gastrocnêmio de camundongos quando comparado com os animais dos grupos Controle e NR (Figura 16).

O treinamento em esteira foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de SIRT1 no músculo gastrocnêmio quando comparado com os animais controle, porém, a associação do treinamento com a suplementação de NR não aumentou esse conteúdo proteico mais que o grupo treinado (Figura 17B). Huang et al. (2016) demonstram que o treinamento de natação durante 9 semanas promoveu aumento do conteúdo proteico de SIRT1 no gastrocnêmio e sóleo de camundongos Swiss⁶⁰.

Após avaliação dos parâmetros anteriores, partimos para avaliação molecular, afim de verificar a capacidade o exercício físico ativar a via da UPRmt, uma vez a ativação desse mecanismo, como descrito anteriormente, está associada com os aumentos dos níveis de NAD⁺ e SIRT1 e tem como consequência o aumento da biogênese mitocondrial. Demonstramos que o treinamento aeróbio promove aumento das proteínas mitocondriais (MTCO1) no músculo gastrocnêmio, conforme a figura 18A e apresenta uma tendência em promover o desequilíbrio mito-nuclear quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 18B). Esse desequilíbrio mitonuclear promovido pelo Exercício ocorre de forma diferente da suplementação de NR, uma vez que demonstramos que a suplementação de NR promoveu o aumento do conteúdo proteico de proteínas nucleares (Figura 11A), enquanto que o exercício promoveu o aumento dos níveis das proteínas mitocondriais (Figura 18A). Dessa forma, explica-se o fato de que não observamos um desequilíbrio mitonuclear na musculatura esquelética dos animais dos grupos Exercício crônico + NR quando comparado com os animais do grupo Exercício Crônico (Figura 18C e 18D), uma vez que a suplementação de NR foi capaz de aumentar os níveis de proteínas nucleares enquanto que o treinamento é capaz de aumentar as proteínas mitocôndrias, não provocando assim um desequilíbrio entre ambas. Além disso o exercício foi capaz de aumentar o conteúdo proteico da chaperona HSP60, outro marcador de UPRmt, enquanto que não houveram alterações quando foi suplementado NR associado ao treinamento (figura 18E). Dessa forma, postulamos que a associação do treinamento aeróbio com a suplementação de NR pode ter promovido o desencadeamento da UPRmt previamente as 5 semanas, diferentemente de quando utilizamos apenas a intervenção do treinamento aeróbio.

7. Conclusão

A suplementação com o precursor de NAD^+ , Ribosídeo de Nicotinamida, em animais jovens saudáveis, promove redução da gordura corporal, aumento da termogênese e aumento da força, além de promover o desequilíbrio mito-nuclear, através do aumento da quantidade de proteínas nucleares, ativando o mecanismo de UPRmt. Por outro lado, a suplementação de NR associado ao treinamento físico não promoveu ativação do mecanismo de UPRmt, apesar de promover aumento da performance aeróbia desses animais e aumentar o número de fibras oxidativas.

Referências Bibliográficas

1. Pagliarini, D. J. *et al.* A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell* **134**, 112–123 (2008).
2. Mercer, T. R. *et al.* The Human Mitochondrial Transcriptome. *Cell* **146**, 645–658 (2011).
3. Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749 (2007).
4. Lane, N. Mitonuclear match: Optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *BioEssays* **33**, 860–869 (2011).
5. Jovaisaite, V. & Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response - synchronizing genomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **33**, 74–81 (2015).
6. Baker, B. M. & Haynes, C. M. Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 254–261 (2011).
7. Tatsuta, T. & Langer, T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* **27**, 306–314 (2008).
8. Cao, S. S. & Kaufman, R. J. Unfolded protein response. *Curr. Biol.* **22**, R622-6 (2012).
9. Yoneda, T. *et al.* Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J. Cell Sci.* **117**, 4055–4066 (2004).
10. Liu, Y., Samuel, B. S., Breen, P. C. & Ruvkun, G. Caenorhabditis elegans pathways that surveil and defend mitochondria. *Nature* **508**, 406–410 (2014).
11. Pellegrino, M. W. *et al.* Mitochondrial UPR-regulated innate immunity provides resistance to pathogen infection. *Nature* **516**, 414–417 (2014).
12. Houtkooper, R. H. *et al.* Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* **497**, 451–7 (2013).
13. Mouchiroud, L. *et al.* The NAD⁺/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell* **154**, (2013).
14. Cantó, C. *et al.* The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* **15**, 838–847 (2012).
15. Pirinen, E. *et al.* Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases improves fitness and mitochondrial function in skeletal muscle. *Cell Metab.* **19**, 1034–1041 (2014).
16. Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M. & Haynes, C. M. Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science (80-.)*. **337**, 587–590 (2012).
17. Meex, R. C. R. *et al.* Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity. *Diabetes* **59**, 572–579 (2010).
18. Heilbronn, L. K. *et al.* Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* **295**, 1539–1548 (2006).
19. Bai, P. *et al.* *Cell Metab.* **13**, 461–468 (2011).
20. Vainshtein, A., Tryon, L. D., Pauly, M. & Hood, D. A. The role of PGC-1 α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* ajpcell.00380.2014 (2015). doi:10.1152/ajpcell.00380.2014
21. Oliveira, N. R. C. *et al.* Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 ?? protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner. *Mediators Inflamm.* **2014**, (2014).
22. Cantó, C., Menzies, K. J. & Auwerx, J. NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism* **22**, 31–53 (2015).
23. Ryall, J. G. *et al.* The NAD⁺-dependent sirt1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 171–183 (2015).

24. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. & Imai, S. I. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* **14**, 528–536 (2011).
25. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. & Auwerx, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 225–238 (2012).
26. Peek, C. B. *et al.* Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* **342**, 1243417–1-1243417–8 (2013).
27. Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J. & Auwerx, J. The secret life of NAD⁺: An old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine Reviews* **31**, 194–223 (2010).
28. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. Nicotinamide Riboside. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nicotinamide_ribose#section=Top. (Accessed: 1st January 2016)
29. Nikiforov, A., Dölle, C., Niere, M. & Ziegler, M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: From entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J. Biol. Chem.* **286**, 21767–21778 (2011).
30. Bieganski, P. & Brenner, C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a preiss-handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* **117**, 495–502 (2004).
31. Lu, S. P., Kato, M. & Lin, S. J. Assimilation of endogenous nicotinamide riboside is essential for calorie restriction-mediated life span extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 17110–17119 (2009).
32. Organisation, W. H. Media centre Noncommunicable diseases prematurely take 16 million lives annually , WHO urges more action. 1–5 (2015). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/noncommunicable-diseases/en/>.
33. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J. & Zierath, J. R. Integrative biology of exercise. *Cell* **159**, 738–749 (2014).
34. Joyner, M. J. & Coyle, E. F. Endurance exercise performance: the physiology of champions. *J. Physiol.* **586**, 35–44 (2008).
35. Romijn, J. a, Gastaldelli, a, Horowitz, J. F., Endert, E. & Wolfe, R. R. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol.* **265**, 380–391 (1993).
36. Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E., Andersen, P. & Jansson, E. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **301**, 3–29 (1977).
37. Perry, C. G. R. *et al.* Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J. Physiol.* **588**, 4795–4810 (2010).
38. Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O. & Straub, R. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **403**, 369–376 (1985).
39. Egan, B. & Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism* **17**, 162–184 (2013).
40. Mathai, A. S., Bonen, A., Benton, C. R., Robinson, D. L. & Graham, T. E. Rapid exercise-induced changes in PGC-1 α mRNA and protein in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **105**, 1098–1105 (2008).
41. Lin, J. *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797–801 (2002).
42. Calvo, J. a *et al.* Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.* **104**, 1304–1312 (2008).
43. Cantó, C. *et al.* Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **11**, 213–219 (2010).
44. Costford, S. R. *et al.* Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E117–26 (2010).
45. Cantó, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060 (2009).
46. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of

- Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
47. Ferreira, J. C. *et al.* Maximal Lactate Steady State in Running Mice: Effect of Exercise Training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 760–765 (2007).
 48. Rocha, A. L. da *et al.* Downhill Running-Based Overtraining Protocol Improves Hepatic Insulin Signaling Pathway without Concomitant Decrease of Inflammatory Proteins. *PLoS One* **10**, e0140020 (2015).
 49. Sugimoto, S. *et al.* Miglitol increases energy expenditure by upregulating uncoupling protein 1 of brown adipose tissue and reduces obesity in dietary-induced obese mice. *Nutr. Metab. (Lond)*. **11**, 14 (2014).
 50. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 51. Baptista, I. L. *et al.* Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve* **41**, 800–808 (2010).
 52. Gariani, K. *et al.* Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice. *Hepatology* **63**, 1190–1204 (2016).
 53. Ryu, D. *et al.* NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. *Sci. Transl. Med.* **8**, 361ra139 LP-361ra139 (2016).
 54. Zhang, H. *et al.* NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science (80-.)*. **352**, 1436–1443 (2016).
 55. CANNON, B. & NEDERGAARD, J. A. N. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
 56. Kourtzidis, I. A. *et al.* The NAD(+) precursor nicotinamide riboside decreases exercise performance in rats. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **13**, 32 (2016).
 57. Lynch, N. A., Nicklas, B. J., Berman, D. M., Dennis, K. E. & Goldberg, A. P. Reductions in visceral fat during weight loss and walking are associated with improvements in V_o 2 max. *J. Appl. Physiol.* **90**, 99–104 (2001).
 58. Levin, B. E. & Dunn-Meynell, A. A. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R771–R778 (2004).
 59. Thong, F. S. L., Hudson, R., Ross, R., Janssen, I. & Graham, T. E. Plasma leptin in moderately obese men: independent effects of weight loss and aerobic exercise. *Am. J. Physiol. Metab.* **279**, E307–E313 (2000).
 60. Huang, C.-C., Wang, T., Tung, Y.-T. & Lin, W.-T. Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1 α Expression Levels in Rats of Different Age. *Int. J. Med. Sci.* **13**, 260–270 (2016).

Anexo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeitos da suplementação de Nicotinamida Ribosoide sobre a UPR mitocondrial na musculatura esquelética e sobre a performance aeróbia de camundongos**, registrada com o nº **4188-1**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle e Barbara Moreira Crisol**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **26 de abril de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2016-01/12/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	A PARTIR DE 26/04//2016
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	80
Peso / Idade:	08 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 26 de abril de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.