THAIS DE CASTRO BARBOSA

**BASES MOLECULARES DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
CRÔNICA COM ARGININA SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA:
Repercussões sobre os Tecidos Muscular Esquelético, Adiposo, Hepático
e sobre a Secreção de Insulina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

THAIS DE CASTRO BARBOSA

**BASES MOLECULARES DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO
CRÔNICA COM ARGININA SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA:
Repercussões sobre os Tecidos Muscular Esquelético, Adiposo, Hepático
e sobre a Secreção de Insulina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

de Castro Barbosa, Thais.

Bases moleculares dos efeitos da suplementação crônica com arginina sobre a sensibilidade à insulina: repercussões sobre os tecidos muscular esquelético, adiposo, hepático e sobre a secreção de insulina / Thais de Castro Barbosa. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Maria Tereza Nunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Bases moleculares da ação de hormônios tireoideanos, substratos metabólicos (Arginina) e íons (iodo e o ferro) no controle da expressão de genes específicos.

Versão do título para o inglês: Molecular basis of the chronic effects of arginine supplementation on insulin sensitivity: repercussion in skeletal muscles, adipose tissue, liver and on insulin secretion..

Descritores: 1. Arginina 2. Hormônio do crescimento 3. Óxido nítrico 4. Resistência à insulina 5. Secreção de insulina 6. Metabolismo de glicose e lipídeos I. Nunes, Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0170/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thais de Castro Barbosa.

Título da Tese: Bases moleculares dos efeitos da suplementação crônica com arginina sobre a sensibilidade à insulina: repercussões sobre os tecidos muscular esquelético, adiposo, hepático e sobre a secreção de insulina .

Orientador(a): Maria Tereza Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

A meus pais, Celina e Antonio,
por terem sempre investido nos meus Estudos,
o que permitiu a realização de mais esta etapa.
Pelos ensinamentos, pelo amor incondicional,
Pelo incentivo e por estarem ao meu lado, sempre!
Sem vocês, esta conquista jamais seria possível.
Muito obrigada! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, em especial à minha irmã e grande amiga Denise pelo suporte, pelo auxílio, pela paciência e especialmente, pela torcida! Obrigada por tudo! Amo muito você, irmãzinha! E à querida Tia Maria, sempre presente, carinhosa e preocupada.

À minha orientadora Professora Maria Tereza Nunes, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo, por ter acreditado no meu potencial, pela paciência ao me orientar, pela amizade, e por contribuir intensamente para o enriquecimento do meu conhecimento e progresso científico. Obrigada por tudo!

À Leonice Lourenço Poyares, pelos ensinamentos na bancada, pela amizade, pela torcida, sempre com uma palavra positiva, o que tornou esta jornada mais amena.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Endócrina e aos que já não estão mais no grupo, mas que fizeram parte desta história: Silvania Teixeira, Caroline Serrano, Jamile Calil, Francemilson Goulart, Érika Brunetto, Paula Bargi, Renata Romano, Rafael Croffi, Frederico Gerlinger, Lucas Guimarães, Carlos Flores, Janaína Sena, Rafael Salgueiro, Marta Verônica e Gisele Giannocco... Pelos bons momentos, científicos ou não, que tivemos juntos ao longo desses anos. Sucesso a todos vocês!

Ao Professor Ubiratan Fabres Machado, à Professora Silvana Bordin, ao Professor Ângelo Rafael Carpinelli do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, por terem contribuído para elaboração deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

À Professora Zuleica Bruno Fortes e à Dra. Maria Aparecida de Oliveira do Departamento de Farmacologia do ICB-USP, pela colaboração na elaboração e execução dos ensaios de microcirculação.

Ao Professor Everardo Magalhães Carneiro e à Dra. Érika Tassi da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio na dosagem de aminoácidos.

Aos demais Professores, especialistas e técnicos de Laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por permitirem livre acesso à infra-estrutura de seus laboratórios.

Aos colegas Dr. Eduardo Rebelato e Dr. José Edgar Nicoletti Carvalho, por terem participado ativamente na execução de parte deste projeto.

À amiga Fernanda Amaral, por me convencer que a Pineal realmente existe e por ter apostado num projeto que ainda vai nos dar bons frutos!

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, em particular, ao Sr. José Maria Rodrigues Junior, pelo excelente e minucioso trabalho, sempre nos auxiliando com toda a documentação necessária para iniciar, e principalmente, concluir a pós-graduação com sucesso.

A todos os funcionários do Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, em especial: Cláudio Lúcio de Castro, Maria Alice Silva Lima, Vilson Rosa Batista e José Miguel do Nascimento, pelos cuidados aos nossos animais de experimentação.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB-USP, pelo auxílio na revisão da dissertação.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela ajuda sempre que necessário.

Aos Laboratórios Baldacci pelo fornecimento do aminoácido Arginina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante toda a minha Iniciação Científica e Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização de doutorado “sanduíche” no Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia.

À Professora Juleen Zierath (Integrative Physiology - Instituto Karolinska - Suécia) por ter me recebido em seu Laboratório e por ter me dado a oportunidade desta experiência muito importante para minha vida pessoal e profissional. E a todos os funcionários e colegas do seu grupo pela ajuda e pelos bons momentos que tivemos juntos, em especial till min lilla gubbe, Håkan Karlsson.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista!

RESUMO

de Castro Barbosa T. Bases moleculares dos efeitos da suplementação crônica com arginina sobre a sensibilidade à insulina: repercussões sobre os tecidos muscular esquelético, adiposo, hepático e sobre a secreção de insulina [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Aminoácidos são componentes da dieta alimentar que podem modular a expressão gênica e/ou protéica, e aspectos específicos da função celular, participando, por conseguinte, do controle do metabolismo, desenvolvimento, crescimento e reprodução de todos os seres vivos. Entre eles, a Arginina (Arg) destaca-se pelas suas propriedades nutricionais e fisiológicas essenciais, regulando a secreção de hormônios, como o hormônio do crescimento (GH) e insulina. Além disso, é o único precursor biológico do óxido nítrico (NO), o qual parece mediar seus efeitos intracelulares. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que animais cronicamente tratados com Arg (35 mg/ dia) desenvolvem resistência à insulina (RI), caracterizada por normoglicemia e hiperinsulinemia. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar as bases moleculares envolvidas nos efeitos crônicos da Arg sobre a sensibilidade à insulina em ratos e células musculares esqueléticas. Observou-se que as bases moleculares da RI observada nesses animais baseiam-se, sobretudo, na redução da fosforilação e/ou expressão de proteínas-chave da via de sinalização da insulina (IRS 1/2 e Akt), e do conteúdo de GLUT4 inserido na membrana plasmática, especialmente no tecido adiposo e no músculo esquelético. Evidenciou-se, ainda, aumento da expressão do mRNA e da proteína do GH, e a ativação de proteínas da sua via de sinalização (JAK2, STAT3 e STAT5), bem como do mRNA do IGF-I hepático e IGF-I sérico, destacando-se um papel crucial do GH na gênese da resistência à insulina previamente demonstrada. Utilizando-se doses mais elevadas do aminoácido (70 mg/dia/30 dias) demonstrou-se que a maior geração de NO pela Arg, e a conseqüente melhora do fluxo sanguíneo, e provavelmente do aporte de glicose e insulina aos tecidos periféricos, melhorou a sensibilidade à insulina comparando-se com os animais que receberam metade da dose de Arg. Em adição, a Arg induz a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas, um mecanismo que, no entanto, parece ser independente do NO. Considerando-se a função do NO como um fator importante para a melhora da sensibilidade à insulina, em experimentos in vitro com células musculares esqueléticas de rato, demonstrou-se que a Arg estimula o metabolismo de glicose e lipídios, e que esses efeitos são mediados pela via NO/c-GMP. Considerando-se que a Arg é o único precursor biológico do NO, nossos achados indicam que a Arg in vitro, pela ativação

da via NO/c-GMP, pode melhorar o perfil metabólico no músculo esquelético, o que poderia ser potencialmente benéfico para o tratamento de doenças metabólicas humanas, tais como obesidade e diabetes tipo 2. Adicionalmente, a Arg pode, em doses adequadas, estimular a secreção de GH, podendo ser eficaz no tratamento de distúrbios da secreção deste hormônio, sem que haja desenvolvimento de resistência à insulina, o que é provavelmente compensado pela maior geração de NO. Contudo, estudos adicionais são necessários para se determinar a melhor dose e os efeitos in vivo da Arg em longo prazo, uma vez que ela estimula a liberação de GH, o qual em excesso apresenta um efeito diabetogênico relevante.

Palavras-chave: Arginina. Hormônio do Crescimento. Óxido Nítrico. Resistência à Insulina. Metabolismo de Glicose e Lipídios. Secreção de Insulina.

ABSTRACT

de Castro Barbosa T. Molecular basis of the chronic effect of arginine supplementation on insulin sensitivity: Repercussion in skeletal muscles, adipose tissue, liver and on insulin secretion. [Ph.D. thesis (Human Physiology)]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Amino acids are compounds of the diet that can modulate gene and/or protein expression, and specific aspects of the cellular function, participating, consequently, of the control of the metabolism, development, growth and reproduction of all life forms. Among them, L-Arginine (Arg) has been extensively studied because it presents a crucial role in nutrition and in physiology, regulating secretion of many hormones, such as growth hormone (GH) and insulin. Moreover, Arg is the exclusive biological precursor of nitric oxide (NO), which mediates many of the intracellular effects of this amino acid. Our group has demonstrated that rats chronically-treated with Arg (35 mg/ day) develop insulin resistance (IR), characterized by normoglycemia and hyperinsulinemia. Therefore, the present study aimed to investigate the molecular basis involved in the chronic effects of Arg on insulin sensitivity in rats and in skeletal muscle cells. It was observed that the molecular basis of the IR rely on the reduction of the phosphorylation and/or expression of key proteins of the insulin signaling pathway (IRS 1/2 and Akt), and on the decrease of GLUT4 plasma membrane content, essentially in the skeletal muscle and adipose tissue. It was also shown an enhancement in the GH mRNA and protein content, and activation of GH signaling proteins (JAK2, STAT3 e STAT5). Taken together an increase in the hepatic IGF-I mRNA expression and IGF-I serum levels, these results indicate a putative role of GH in the genesis of the IR previously shown. Using higher dose of Arg (70 mg/ day/ 30 days) it was observed that the increased generation of NO from Arg, and consequently, the improvement of the blood flow, and possibly, of the glucose and insulin disposal to peripheral tissues, improved the insulin sensitivity compared to the animals that received half of the dose of Arg. It was also demonstrated that Arg induces glucose-stimulated insulin secretion in isolated pancreatic islets, a mechanism that seems to be independent of NO. Taking into account the role of NO improving the insulin sensitivity, in vitro experiments were performed in skeletal muscle cells, and it was shown that Arg stimulates glucose and lipid metabolism, and that its effects are mediated through the activation of the NO/c-GMP pathway. Considering that Arg is the unique biological precursor of NO, our findings suggest that Arg in vitro, by the activation of NO/c-GMP signaling, can improve the metabolic profile of skeletal muscle, which in turn could be potentially beneficial

for the treatment of metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes. Additionally, Arg can, in appropriate doses, stimulate GH secretion, which could be effective for the therapy of patients with GH deficiency, without leading to insulin resistance, which is probably compensated by the higher generation of NO. However, further studies are warranted to determine the best dose and the long-term effects of Arg in vivo, since it increases GH secretion, which in excess has a potent diabetogenic effect.

Key words: Arginine. Growth Hormone. Nitric Oxide. Insulin Resistance. Glucose and Lipid Metabolism. Insulin Secretion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – Acetil-CoA carboxilase

Akt – Proteína quinase B

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

Arg – L-Arginina

c-GMP – 3',5'-Monofosfato de Guanosina Cíclico

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

D-Man – D-Manitol

EDL – Extensor digital longo

FIG – Fígado

GH – Hormônio do Crescimento

GHR – Receptor do GH

GHRH – Hormônio liberador do hormônio do crescimento

GLUT4 – Transportador de glicose isoforma 4

IGF-I – Fator de crescimento-insulina semelhante do tipo I

IR – Receptor de insulina

IRS 1/2 – Substrato do receptor de insulina 1 e 2

ITT – Teste de tolerância à insulina

JAK2 – Janus-activating-kinase 2

kITT – Constante de decaimento de glicose plasmática

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina metil Ester

M – Microsoma

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

NPS – Nitroprussiato de sódio

PI3K – Fosfoinositol quinase 3

MP – Membrana Plasmática

RI – Resistência à insulina

SOL – Soleus

SP – Espermina NONOate

SS – Somatostatina

STAT – Transdutores de sinal e ativadores da transcrição

TAB – Tecido adiposo branco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.1 - Fracionamento subcelular para obtenção de GLUT4 nas frações de microssoma e membrana plasmática.....	34
Quadro 1.2 - Seqüência dos <i>primers</i> para RT-PCR - IGF-I.....	37
Quadro 4.1 - Secreção Estática de Insulina - Condições Experimentais.....	82
Figura 1.1 - <u>Concentração sérica de Arg</u>	39
Figura 1.2 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre a via de sinalização de insulina</u>	40
Figura 1.3 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na membrana plasmática</u>	41
Figura 1.4 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre o eixo GH/ IGF-I</u>	42
Figura 1.5 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre a via de sinalização do GH e insulina</u>	44
Figura 2.1A - <u>Representação fotográfica do sistema de microscopia intravital</u>	48
Figura 2.1B - <u>Representação fotográfica da preparação do leito mesentérico de rato</u>	48
Figura 2.2 - <u>Concentração sérica de Arg</u>	50
Figura 2.3 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a sensibilidade à insulina</u>	51
Figura 2.4 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a via de sinalização de insulina</u>	53
Figura 2.5 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na membrana plasmática</u>	55
Figura 2.6 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre o eixo GH/ IGF-I</u>	56
Figura 2.7 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a via de sinalização do GH e insulina</u>	58
Figura 2.8 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a microcirculação mesentérica</u>	60
Figura 2.9 - <u>Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a sensibilidade à insulina: o papel do NO</u>	61
Figura 3.1 - <u>Efeitos crônicos da Arginina sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas</u>	69
Figura 3.2 - <u>Mecanismos intracelulares envolvidos nos efeitos crônicos da Arginina em células musculares esqueléticas</u>	71
Figura 3.3 - <u>Via de sinalização Óxido nítrico/ c-GMP em células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina</u>	73
Figura 3.4 - <u>O papel do óxido nítrico sobre metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina</u>	75

Figura 3.5 - <u>Mecanismos intracelulares do óxido nítrico sobre células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina</u>	77
Figura 4.1 - <u>Representação esquemática da perfusão de ilhotas pancreáticas isoladas: Secreção dinâmica de insulina</u>	81
Figura 4.2 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre a secreção dinâmica de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas</u>	84
Figura 4.3 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre a secreção estática de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas</u>	86
Figura 4.4 - <u>Efeito crônico da Arginina sobre a secreção estática de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas</u>	87

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	18
1.1	ARGININA E HORMÔNIO DO CRESCIMENTO	19
1.2	ARGININA E SECREÇÃO DE INSULINA	21
1.3	ARGININA E ÓXIDO NÍTRICO	21
1.4	CONSIDERAÇÕES RELEVANTES	23
2	<u>OBJETIVOS</u>	25
2.1	OBJETIVOS GERAIS	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2.2.1	ESTUDO 1: O PAPEL DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO SOBRE A REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO, TECIDO ADIPOSEO E FÍGADO DE RATOS CRONICAMENTE TRATADOS COM ARGININA	25
2.2.2	ESTUDO 2: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM O AMINOÁCIDO ARG EM ALTAS DOSES SOBRE SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS: O PROVÁVEL PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO	25
2.2.3	ESTUDO 3: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM O AMINOÁCIDO ARGININA SOBRE O METABOLISMO DE GLICOSE E LIPÍDIOS EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE RATOS: A ATIVAÇÃO DA VIA NO/ c-GMP E REGULAÇÃO ATIVIDADE DA AKT E AMPK-ALFA	26
2.2.4	ESTUDO 4: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM O AMINOÁCIDO ARGININA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA	26
3	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	27
3.1	ESTUDOS IN VIVO	27
3.1.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.1.2	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS	28
3.2	ESTUDOS IN VITRO	28
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4	<u>ESTUDO 1</u>	30
4.1	OBJETIVOS GERAIS	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4.2.1	VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA	31
4.2.2	EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE ISOFORMA 4 (GLUT4)	31
4.2.3	EIXO GH/IGF-I	31
4.3	MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS	31
4.3.1	QUANTIFICAÇÃO DE ARGININA SÉRICA	31
4.3.2	PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA E DO GH	32
4.3.3	AVALIAÇÃO DE GLUT4 BASAL: CONTEÚDO TOTAL E NAS FRAÇÕES DE MICROSSOMA (M) E DE MEMBRANA PLASMÁTICA (MP)	33
4.3.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO	35
4.3.4.1	<i>EXPRESSÃO GÊNICA</i>	35
4.3.4.1.1	<i>Extração do RNA total</i>	35
4.3.4.1.2	<i>Pré - hibridação e hibridação</i>	35
4.3.4.2	<i>EXPRESSÃO PROTÉICA</i>	36
4.3.5	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE MRNA DO IGF-I HEPÁTICO E IGF-I SÉRICO	37
4.3.5.1	<i>EXPRESSÃO DO MRNA DO IGF-I HEPÁTICO</i>	37
4.3.5.2	<i>QUANTIFICAÇÃO DO IGF-I SÉRICO</i>	38
4.4	RESULTADOS	39
4.4.1	AVALIAÇÃO DA ARG SÉRICA	39
4.4.2	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA	39

4.4.3	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG SOBRE O CONTEÚDO DE GLUT4 BASAL	41
4.4.4	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG SOBRE O EIXO GH/ IGF-I	42
4.4.5	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG SOBRE O CONTEÚDO TOTAL E/OU FOSFORILADO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO GH E DA INSULINA	43
5	ESTUDO 2	45
5.1	OBJETIVOS GERAIS	45
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
5.2.1	VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA	46
5.2.2	EXPRESSÃO DO GLUT4	46
5.2.3	EIXO GH/IGF-I.....	46
5.2.4	O PAPEL DO NO.....	46
5.2.4.1	<i>O FLUXO SANGÜÍNEO VASCULAR</i>	46
5.2.4.2	<i>A SENSIBILIDADE À INSULINA (ITT)</i>	46
5.3	MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS	47
5.3.1	MICROCIRCULAÇÃO: ANÁLISE DO DIÂMETRO, FLUXO, VELOCIDADE DE FLUXO EM ARTERÍOLAS E VÊNULAS DO LEITO MESENTÉRICO DE RATOS.....	47
5.3.2	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)	49
5.4	RESULTADOS	50
5.4.1	AVALIAÇÃO DA ARG SÉRICA.....	50
5.4.2	EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA	51
5.4.3	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA	52
5.4.4	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE O CONTEÚDO DE GLUT4.....	55
5.4.5	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE O EIXO GH/ IGF-I.....	56
5.4.6	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE O CONTEÚDO TOTAL E/OU FOSFORILADO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO GH E DA INSULINA	57
5.4.7	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE A MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA	59
5.4.8	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ARG EM ALTAS DOSES SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA: O PAPEL DO NO	61
6	ESTUDO 3	62
6.1	OBJETIVOS GERAIS	62
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
6.2.1	METABOLISMO DE GLICOSE E LIPÍDIOS	63
6.2.2	MECANISMOS INTRACELULARES.....	63
6.2.3	O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DOS EFEITOS DA ARG.....	63
6.3	MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS	63
6.3.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	63
6.3.2	DIFERENCIAÇÃO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	64
6.3.3	ENSAIOS METABÓLICOS	64
6.3.3.1	<i>SÍNTESE DE GLICOGÊNIO</i>	64
6.3.3.2	<i>CAPTAÇÃO DE GLICOSE</i>	65
6.3.3.3	<i>OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (OXIDAÇÃO DE PALMITATO)</i>	65
6.3.4	ENSAIO DE IMUNOBLOTTING (WESTERN BLOTTING)	66
6.3.5	DOSAGEM DE C-GMP	66
6.3.6	DOSAGEM DE NITRITO.....	67
6.4	RESULTADOS	68
6.4.1	EFEITOS CRÔNICOS DE ARGININA SOBRE METABOLISMO DE GLICOSE E LIPÍDIOS.....	68
6.4.2	EXPRESSÃO PROTÉICA E MECANISMOS INTRACELULARES.....	70
6.4.3	ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ÓXIDO NÍTRICO/ c-GMP.....	72
6.4.4	O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO	74

6.4.5	MECANISMOS DE INTRACELULARES DO ÓXIDO NÍTRICO	76
7	<u>ESTUDO 4</u>	79
7.1	OBJETIVOS GERAIS	79
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
7.2.1	A SECREÇÃO DINÂMICA DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE.....	79
7.2.2	A SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE	79
7.3	MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS	80
7.3.1	SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS	80
7.3.1.1	<i><u>ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS</u></i>	80
7.3.1.2	<i><u>SECREÇÃO DINÂMICA DE INSULINA</u></i>	80
7.3.1.3	<i><u>SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA</u></i>	81
7.3.1.4	<i><u>DOSAGEM DE INSULINA (RIE)</u></i>	82
7.4	RESULTADOS	83
7.4.1	SECREÇÃO DINÂMICA DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE	83
7.4.2	SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA ESTIMULADA POR GLICOSE.....	85
8	<u>DISCUSSÃO</u>	88
9	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO</u>	100
	<u>REFERÊNCIAS</u>	101

1 INTRODUÇÃO

Os aminoácidos são biomoléculas essenciais para o desenvolvimento, crescimento, metabolismo e reprodução de todos os seres vivos. Desempenham um papel central como constituintes de polipeptídeos e proteínas, além de contribuírem com o fornecimento de energia para as células através de sua oxidação. São importantes detoxicantes, uma vez que promovem a conversão de produtos do catabolismo protéico, como a amônia, a produtos menos tóxicos, como a uréia, que podem ser excretados ou reaproveitados (Appleton et al., 2002; Murracy et al., 1994; Wu e Morris, 1998). Mais recentemente, os aminoácidos têm sido descritos como moléculas envolvidas na sinalização celular, além de regularem a expressão de genes e proteínas da cascata de fosforilação (Morris, 2007; Wu, 2009).

Dentre os vários aminoácidos estudados, a L-arginina (Arg) tem se destacado pelo seu papel fisiológico e nutricional fundamental para o organismo (Chromiak e Antonio, 2002; Wu e Meininger, 2000). A Arg é classificada como um aminoácido semi-essencial ou condicionalmente essencial em humanos, uma vez que pode ser sintetizada endogenamente numa magnitude suficiente para atender as necessidades, não sendo, portanto, essencial na dieta de adultos saudáveis (Morris, 2006). Todavia, a síntese endógena de Arg não é suficiente em situações específicas, como por exemplo: para bebês e crianças em fase de crescimento; para o balanço de nitrogênio em pássaros, carnívoros e jovens mamíferos; além de ser importante para adultos em situações de distúrbios fisiopatológicos, estresse catabólico ou disfunções no intestino delgado e rim, que são os sítios de síntese endógena deste aminoácido (Appleton et al., 2002; Morris, 2006; Wu e Morris, 1998).

As fontes de Arg livre no organismo são proteínas da dieta, síntese endógena e o *turnover* de proteínas. Aproximadamente 40% da Arg obtida pela dieta são metabolizados no intestino antes de entrar na circulação, e durante o estado de jejum, aproximadamente 85% da Arg circulante são derivados do *turnover* protéico, sendo o restante originado da síntese de novo deste aminoácido (Morris, 2006; Windmueller e Spaeth, 1976; Wu e Morris, 1998).

A Arg é o precursor para a síntese de uréia, creatina, glutamato, poliaminas, prolina, entre outros, e um potente secretagogo de vários hormônios, como: GH, insulina, glucagon e prolactina (Alba-Roth et al. 1988; Ghigo et al., 1990; Mérimée et al., 1965; Wu e Morris, 1998). Adicionalmente, a Arg é o único substrato natural para a síntese de óxido nítrico (NO), fator importante para regulação vascular e hemodinâmica (Ceccatelli, 1997; Palmer et al.,

1988).

1.1 ARGININA E HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

Nas últimas décadas, uma série de estudos vem sendo propostos com o intuito de se identificar compostos capazes de induzir a secreção do hormônio do crescimento (GH), bem como os mecanismos pelos quais estes exercem seus efeitos. Dentre os vários compostos estudados, alguns aminoácidos como lisina, ornitina e, sobretudo, a arginina, passaram a ser mais intensamente pesquisados. A Arg tem se destacado como o mais potente aminoácido secretagogo de GH, sendo, inclusive utilizada na clínica para avaliação da reserva hipofisária deste hormônio (Marcell et al., 1999; Chromiak e Antonio, 2002).

O mecanismo através do qual a Arg estimula a secreção de GH envolve, primariamente, a inibição da liberação hipotalâmica de somatostatina (SS), o que aumenta o tônus excitatório exercido pelo hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) sobre o somatotrofo, levando assim a um aumento da liberação e síntese de GH (Alba-Roth et al., 1988; Ghigo et al., 1990; Ghigo et al., 1994). Conquanto haja evidências consistentes nesse sentido, estudos in vitro demonstraram que a Arg promove a despolarização da membrana do somatotrofo, e ainda que esse estudo não tenha avaliado a secreção de GH, é bastante provável que ela possa estar sendo estimulada, já que com a despolarização há abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem presentes na membrana, e conseqüente influxo deste íon; um processo fundamental para a secreção hormonal (Lussier et al., 1991; Villalobos et al., 1997). Sugere-se também, que a conversão de Arg a NO possa estar associada a este efeito, uma vez que o NO ativa a guanilato ciclase citoplasmática elevando os níveis de GMP cíclico (3',5'-Monofosfato de Guanosina Cíclico: c-GMP), considerado seu segundo mensageiro, o que pode implicar no desencadeamento de reações (ativação de enzimas quinases específicas) que levam à secreção hormonal (Ceccatelli, 1997). Embora a óxido nítrico sintase (NOS) não tenha sido detectada nos somatotrofos, ela é expressa em células folículo-estelares e gonadotrofos, de modo que o NO aí produzido pode se difundir aos somatotrofos, onde pode exercer os efeitos anteriormente descritos (Allaerts et al., 1990; Ceccatelli et al., 1993).

O GH é um hormônio protéico, com peso molecular em torno de 22 KDa, sintetizado, armazenado e liberado pelos somatotrofos, células localizadas nas porções laterais do lobo

anterior da hipófise (adeno-hipófise), que constituem cerca de 40 a 50% das células desta glândula (Kovacs e Horvath, 1986).

O GH, por meio da interação com o seu receptor de membrana, desencadeia efeitos biológicos diretamente nos tecidos alvo, ou indiretamente, por meio de estímulo à síntese de fatores de crescimento-insulina símile do tipo I (IGF-I), os quais são os mediadores de seus efeitos sobre a multiplicação celular e crescimento em diferentes tecidos. O receptor do GH (GHR) pertence à superfamília dos receptores de citocinas e os mecanismos intracelulares dos seus efeitos envolvem a fosforilação em tirosina de múltiplas proteínas. Constitutivamente, o GHR se associa à proteína quinase *Janus-activating-kinase 2* (JAK2), e o início da sinalização deste hormônio envolve, primariamente, a ligação deste a um dímero de GHR, levando à ativação da JAK2 por autofosforilação (Cunningham et al., 1991; Herrington e Carter-Su, 2001). A JAK2, por sua vez, fosforila vários resíduos tirosina intracelulares do GHR (Tanasijevic et al., 1993), os quais formam sítios de ancoragem para diferentes mediadores da transdução, incluindo os membros da família dos transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs: 1, 3 e 5) e também, os substratos para o receptor de insulina (IRS1 e 2), desencadeando, portanto, os efeitos do hormônio (Dominici e Turyn, 2002; Herrington et al., 2000; Herrington e Carter-Su, 2001).

Além da sua conhecida ação sobre o crescimento, o GH exerce efeitos metabólicos importantes, pois promove o aumento da síntese protéica em todas as células do organismo, bem como favorece a maior mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo e maior utilização destes, para a obtenção de energia. Age ainda, na redução da velocidade de utilização de glicose pelos tecidos, por aumentar a oferta de ácidos graxos como fonte energética, e também por antagonizar alguns dos efeitos da insulina, atuando como um hormônio hiperglicemiante (Kovacs e Horvath, 1986). Mais recentemente, ações importantes do GH sobre o sistema cardiovascular vêm sendo relatadas, especialmente em condições de insuficiência cardíaca, onde foram evidenciados inúmeros benefícios sobre a contratilidade e vascularização cardíacas, por meio de sua utilização tanto a curto quanto em longo prazo (Colao et al., 2001; Ross, 1999).

Embora os estudos que reportam a Arg como um importante secretagogo de GH estejam bem estabelecidos, os que avaliam se tal aminoácido exerce algum efeito na síntese deste hormônio são praticamente inexistentes (Collier et al., 2005). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que após 60 minutos da infusão endovenosa de Arg ocorre elevação do conteúdo do RNA mensageiro (mRNA) do GH na hipófise de ratos, dado

indicativo de que, não só a secreção, mas também a síntese de GH é estimulada pelo aminoácido (Adrião et al., 2004). Experimentos *in vitro* realizados com hemi-hipófises e células GH3 também demonstraram indução da expressão gênica do GH pela Arg, evidenciando que, em paralelo ao seu efeito *in vivo* inibitório sobre a secreção de SS, ocorre uma ação direta deste aminoácido na hipófise/células GH3 (Adrião et al., 2004). O conjunto dessas informações nos leva a identificar no aminoácido Arg propriedades que poderiam ser benéficas para o crescimento, e não raramente, este vem sendo empregado, em crianças, como um estímulo para esse processo. No entanto, há poucos relatos na literatura acerca do efeito crônico da administração de Arg sobre a síntese e secreção de GH, e suas conseqüências, em longo prazo, sobre o organismo.

1.2 ARGININA E SECREÇÃO DE INSULINA

Além de serem importantes secretagogos de GH, muitos aminoácidos são conhecidos por regularem aguda e cronicamente a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, *in vivo* e *in vitro* (Floyd et al., 1966; Newsholme et al., 2005), e a Arg tem sido descrita como um potente estimulador da secreção de insulina, agindo diretamente nessas células (Thams e Capito, 1999). Particularmente, a Arg não serve como combustível e também não acelera o metabolismo de glicose e de nutrientes endógenos, e, portanto, não aumenta o estado energérgico das células β pancreáticas (Ishiyama et al., 2005). Dessa forma, a liberação de insulina estimulada por Arg parece envolver o transporte deste aminoácido catiônico para dentro da célula, o que leva à despolarização da membrana (Henquim et al., 1981; Hercules et al., 1984; Smith et al., 1997). Sener et al. (2000) demonstraram que a despolarização da membrana ocasionada por arginina leva à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e, conseqüentemente, à elevação na concentração deste íon e subseqüente estimulação da secreção de insulina.

1.3 ARGININA E ÓXIDO NÍTRICO

A Arg é um exclusivo substrato biológico da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, conseqüentemente, o principal precursor natural do óxido nítrico (NO) (Palmer et al., 1988), o qual exerce um papel chave na hemodinâmica vascular, além de atuar como molécula endógena mensageira envolvida na regulação do metabolismo celular, sinalização da insulina e secreção de neurotransmissores, e de ter importante função sobre o sistema imunológico (Newsholme et al., 2010).

A síntese de NO, in vivo, ocorre pela conversão do aminoácido L-Arginina a L-citrulina, sendo a disponibilidade de Arg intracelular um fator limitante na produção de NO (Moncada e Higgs, 1993; Mori e Gotoh, 2004). Três isoformas da NOS foram identificadas por catalisar a oxidação de Arg a citrulina e NO, sendo classificadas em: iNOS (óxido nítrico sintase induzível), que é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos e está presente no endotélio e na musculatura lisa vascular; eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), presente no endotélio vascular, e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), presente em neurônios, células epiteliais e em células β pancreáticas (Forstermann et al., 1994; Iyengar et al., 1987; Förstermann et al., 1994).

O NO exerce seus efeitos por meio da ativação da guanilato ciclase solúvel, que, conseqüentemente, aumenta os níveis de 3',5'-Monofosfato de Guanosina Cíclico (c-GMP), levando a repercussões fisiológicas nos tecidos onde ele é formado (Arnold et al., 1977); e o NO gerado a partir da Arg é um importante mediador das ações deste aminoácido. De fato, a Arg foi descrita por reverter a disfunção endotelial, comumente associada aos principais fatores de risco cardiovascular, como hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes e obesidade (Blum et al., 2000a,b; Clarkson et al., 1996; Creager et al., 1992; Drexler et al., 1991), e a via NO/ c-GMP parece intermediar os efeitos da Arg. Tessari et al. (2010) demonstraram que em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), a síntese de NO a partir de Arg está diminuída nos estados basal e hiperinsulinêmico, relacionando, dessa forma, o conceito de resistência à insulina ao metabolismo do NO.

Além disso, tem sido demonstrado na literatura que doadores de NO, como nitroprussiato de sódio (NPS), aumentam o transporte de glicose independente da insulina no músculo esquelético isolado de rato (Balon e Nadler, 1997; Higaki et al., 2001), assim como o tratamento farmacológico de músculo esquelético humano isolado com espermina nonoato (SP) também eleva o transporte de glicose neste tecido, em paralelo ao aumento dos níveis intracelulares de c-GMP e da atividade da AMPK- α 1 (Deshmukh et al., 2010). Pieper et al. (1996) determinaram que o diabetes está associado a níveis plasmáticos reduzidos de Arg, e

evidências sugerem que a suplementação com este aminoácido pode ser uma maneira eficaz para melhorar a função endotelial nesses pacientes (Pieper et al., 1996). De fato, a suplementação com Arg melhora a sensibilidade à insulina em pacientes obesos e com DM2, bem como em indivíduos saudáveis (Wascher et al., 1997), embora o mecanismo exato pelo qual a Arg exerce os seus efeitos, ainda esteja desconhecido.

1.4 CONSIDERAÇÕES RELEVANTES

A Arginina é um aminoácido envolvido em uma série de processos fisiológicos, dentre os quais se destacam: a secreção de hormônios como o GH e a insulina, e a síntese de óxido nítrico. São amplamente relatados na literatura os efeitos agudos benéficos deste aminoácido no que se refere, por exemplo, à secreção de GH em crianças portadoras da deficiência deste hormônio, e ao uso de Arg por atletas e praticantes de atividade física regular com a finalidade de estimular a secreção de GH e, conseqüentemente, de adquirir maior massa e força musculares (Chromiak e Antonio, 2002; Wu e Morris, 1998). Além disso, a Arg tem sido descrita por melhorar o metabolismo de glicose, sobretudo, no músculo esquelético, sendo a sua participação na geração de NO é um dos principais fenômenos implicados nesses efeitos.

Em contrapartida, em estudo preliminar desenvolvido pelo nosso grupo, no qual ratos Wistar foram suplementados com a Arg na dose de 35 mg/ dia por 30 dias, foi observado aumento significativo da expressão gênica do GH (de Castro Barbosa et al., 2006), fator que reforça dados anteriormente descritos de que a Arg possa representar uma estratégia nutricional potencialmente benéfica para prevenção e tratamento de distúrbios da secreção do deste hormônio. Todavia, este estudo também demonstrou que os animais suplementados cronicamente com Arg desenvolveram resistência à insulina, fenômeno que pode estar associado ao aumento da secreção de insulina provocada pelo próprio aminoácido nas células β pancreáticas (Thams e Capito, 1999). Adicionalmente, o aumento da secreção do GH, o qual apresenta conhecido efeito diabetogênico, também pode estar envolvido neste fenômeno. Entretanto, os mecanismos moleculares através dos quais a Arg exerce esses efeitos não haviam sido estudados até então.

Dessa forma, levando-se em consideração dados da literatura relatando os efeitos da Arg sobre a melhora do metabolismo de glicose, sobretudo em pacientes obesos e portadores

de diabetes tipo 2, e nosso resultado anterior, no qual foi demonstrado que ratos tratados cronicamente com este aminoácido desenvolvem resistência à insulina, estudos para se pesquisar a dose mais adequada deste aminoácido a ser utilizada como estratégia nutricional, assim como os mecanismos moleculares intracelulares implicados nos efeitos crônicos da Arg devem ser melhor explorados tanto em modelos in vivo como in vitro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como finalidade avaliar as bases moleculares envolvidas nos efeitos crônicos da suplementação com o aminoácido Arginina (Arg) em ratos e células musculares esqueléticas. Dessa forma, este trabalho foi dividido em quatro etapas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Estudo 1: O papel do hormônio do crescimento sobre a redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado de ratos cronicamente tratados com Arginina

O Estudo 1 teve como objetivo específico investigar os mecanismos moleculares envolvidos na redução da sensibilidade à insulina observada em ratos tratados cronicamente por via oral com o aminoácido Arginina na dose de 35 mg/ dia (grupo A35) por 30 dias. Nesta etapa foram analisados os efeitos da Arg sobre a expressão e atividade de proteínas da via de sinalização da insulina em músculo esquelético, tecido adiposo branco e fígado. Adicionalmente, estudaram-se os efeitos da Arg sobre a expressão e translocação do GLUT4, bem como sobre o eixo GH/IGF-I, e o envolvimento deste na redução da sensibilidade à insulina observada em nosso trabalho anterior (de Castro Barbosa et al., 2006).

2.2.2 Estudo 2: Efeitos da suplementação crônica com o aminoácido Arg em altas doses sobre sensibilidade à insulina em ratos: o provável papel do óxido nítrico

No Estudo 2 teve-se como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com Arg em dose elevada (70 mg/ dia/ 30 dias) sobre a sensibilidade à insulina. Nesta etapa, também foram investigados os efeitos do aminoácido sobre proteínas da via de sinalização da insulina

e do GH, bem como sobre a síntese e secreção deste hormônio. Além disso, teve-se como foco principal, investigar o envolvimento do óxido nítrico intermediando os efeitos da Arg sobre a sensibilidade à insulina e sobre a microcirculação mesentérica de animais tratados com o dobro da dose do aminoácido.

2.2.3 Estudo 3: Efeitos da suplementação com o aminoácido Arginina sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas de ratos: a ativação da via NO/ c-GMP e regulação atividade da Akt e AMPK- α

No Estudo 3 objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação crônica com Arg sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas de ratos, os mecanismos intracelulares implicados nesses efeitos e, sobretudo, o envolvimento da via NO/ c-GMP sobre os mesmos. A realização de experimentos *in vitro* teve como finalidade considerar os efeitos diretos da suplementação com este aminoácido, excluindo-se os efeitos sistêmicos indiretos do hormônio do crescimento, o qual tem provável envolvimento na indução da resistência à insulina observada no Estudo 1.

2.2.4 Estudo 4: Efeitos da suplementação crônica com o aminoácido Arginina sobre a secreção de insulina

Nesta última etapa teve-se como objetivo investigar os efeitos do tratamento crônico com Arg nas doses de 35 e 70 mg/ dia por 30 dias sobre a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.

3 **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados ratos machos adultos, da cepa Wistar, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), onde foram mantidos sob condições constantes de temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12 h/12 h). Água e alimentação foram fornecidas ad libitum e todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEEa) do ICB-USP (Protocolo: #132, folha 23, livro 2, 2005).

3.1 ESTUDOS IN VIVO

Ratos Wistar adultos (2-3 meses) pesando aproximadamente 200 g foram mantidos com dieta padrão para rato contendo 22% de proteína (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil). A suplementação com Arg foi realizada por meio da adição do aminoácido à água de beber, por 30 dias. Em estudos preliminares realizados pelo nosso grupo os animais foram mantidos em gaiolas isoladas ou coletivas para avaliação da ingestão de água e ração. Uma vez que nenhuma alteração nesses parâmetros foi observada, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas nos experimentos subsequentes (de Castro Barbosa, 2006).

3.1.1 Grupos experimentais

- **Controle (C)**: recebeu água pura;
- **Arginina**: recebeu Arginina na água de beber por 30 dias.
 - (A35): 35 mg/ dia/ animal (200 g de peso corpóreo);
 - (A70): 70 mg/ dia/ animal (200 g de peso corpóreo).

A dose de 35 mg de Arg por dia foi escolhida baseada em nossos estudos prévios (de Castro Barbosa et al., 2006) e em estudos descritos na literatura (Blum et. al., 2000a,b; Collier et al., 2005). Esta dose é aproximadamente 7 vezes menor do que a dose usada na clínica para induzir a secreção de GH em humanos (500 mg/ Kg de peso corpóreo) e é considerada uma dose segura para o tratamento de ratos, uma vez que estes podem tolerar a administração oral deste aminoácido entre 2.14 a 5.70 g/ Kg de peso corpóreo por dia (Wu et al., 2007). Vale ressaltar que aproximadamente 50% da Arg ingerida permanecem na circulação sistêmica, enquanto que a outra metade é degradada durante a absorção (Windmueller e Spaeth, 1976).

3.1.2 Sacrifício dos animais e armazenamento dos tecidos

Ao final do tratamento os animais foram anestesiados (100 mg de ketamina e 10 mg de xilazina/ kg de peso corpóreo) e sacrificados por decapitação. Os tecidos foram dissecados, processados imediatamente e/ ou armazenados a -80 °C para futuros procedimentos. O sangue do tronco também foi coletado e armazenado a -20 °C para determinações posteriores.

3.2 ESTUDOS IN VITRO

Foram utilizadas células musculares esqueléticas de rato (células L6) fornecidas pelo Laboratório da Dra. Amira Klip (The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canadá). Os detalhes experimentais estão descritos nas sessões seguintes.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, e o nível de significância estatística foi estabelecido a 5% ($p < 0.05$). A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* Prism Graph Pad - Versão: 5.0, sendo aplicados os seguintes testes, quando apropriado:

- Análise de variância *One-way ANOVA*, seguida pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*;
- Análise de variância *Two-way ANOVA*, seguida pelo pós-teste *Bonferroni*;
- *Student's t test*.

Os detalhes da análise estatística estão descritos na seção dos resultados.

4 ESTUDO 1

O papel do hormônio do crescimento sobre a redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado de ratos cronicamente tratados com Arginina.

Colaboração: Etapa desenvolvida em colaboração com os grupos do Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado e da Prof. Dr. Silvana Bordin – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB-USP).

Publicação: de Castro Barbosa T, de Carvalho Nicoletti JE, Poyares LL, Bordin S, Machado UF, Nunes MT. Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. *Endocrinology*. 2009; 150(5):2080-2086.

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares envolvidos na redução da sensibilidade à insulina observada em ratos tratados cronicamente com o aminoácido Arginina na dose de 35 mg/ dia (grupo A35).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram avaliados:

4.2.1 Via de sinalização da insulina

A expressão total e fosforilação basal e estimulada por insulina de proteínas da via de sinalização de insulina, como por exemplo: o receptor de insulina (IR), os substratos do receptor de insulina (IRS 1/2) e a Akt nos músculos esqueléticos soleus (SOL) e extensor digital longo (EDL), no tecido adiposo branco periepídídimo (TAB) e no fígado (FIG).

4.2.2 Expressão do transportador de glicose isoforma 4 (GLUT4)

A expressão total do GLUT4, bem como o conteúdo de GLUT4 no microsoma (M) e inserido na membrana plasmática (MP), nos músculos soleus e EDL, e no TAB.

4.2.3 Eixo GH/ IGF-I

A expressão hipofisária do mRNA e da proteína do GH; o conteúdo de mRNA de IGF-I hepático e IGF-I sérico; bem como a expressão e/ou fosforilação de proteínas da via de sinalização do GH, como JAK2, STAT1, STAT3 e STAT5; além da expressão das subunidades regulatórias da PI3K (P85- α e P55- α), no músculo esquelético, TAB e fígado, com o intuito de se investigar o papel do GH na gênese dos efeitos da Arg sobre a sensibilidade à insulina.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS

4.3.1 Quantificação de arginina sérica

O aminoácido Arg foi quantificado em 200 μ l de soro extraído do tronco dos animais controle (C: receberam água pura) ou tratados com Arg por 30 dias (A35). Foi utilizado o Analisador Automático de Aminoácidos Livres (Biochrom 20 Plus - Amersham Pharmacia Biotech), cujo princípio baseia-se em sistema de troca iônica. Os procedimentos foram realizados conforme instruções do fabricante.

Em resumo, o soro foi primeiramente desproteinizado em solução orgânica composta por metanol, tricloroacetato e acetonitrila na proporção 2:1 e posteriormente, incubado à

temperatura ambiente (25 °C) por 15 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3800 g por 3 minutos e em seguida, adicionou-se tampão de amostra (tampão lítio – pH 2.2 - Amersham Pharmacia Biotech) na proporção 1:2.

A análise dos aminoácidos foi realizada em sistema de derivação por coluna de troca iônica, usando-se reagente de ninhidrina (hidrato de triceto-hidrindeno), a qual atua como agente oxidante poderoso gerando a descarboxilação oxidativa dos aminoácidos produzindo CO₂, NH₃ e um aldeído com um átomo de carbono a menos. A ninhidrina reduzida reage com a amônia liberada formando um complexo de cor violeta e emitindo uma fluorescência que é captada por um *software* (a leitura máxima ocorre em 570 nm de absorbância).

4.3.2 Avaliação do conteúdo total e fosforilado de proteínas da via de sinalização da insulina e do GH

Após 30 dias de tratamento, os animais foram anestesiados e, em seguida, extraiu-se: uma fração do fígado, do tecido adiposo branco periepídimal (TAB) e os músculos soleus (SOL) e EDL de um dos lados. Posteriormente, administrou-se sobrecarga de insulina regular (1U, via veia jugular), e após 30 segundos retirou-se nova fração do fígado e, após 1 minuto e 30 segundos da injeção de insulina extraiu-se o tecido adiposo branco periepídimal e os músculos soleus e EDL do lado oposto.

Os tecidos foram homogeneizados em tampão aquecido (100 mM Tris Base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS, 100 mM Fluoreto de Na⁺, 10 mM Pirofosfato de Na⁺, 10 mM Ortovanato de Na⁺), as amostras colocadas em banho fervente (96 °C) por 10 minutos e em seguida, centrifugadas por 40 minutos a 4 °C, a 13.400 g. O sobrenadante foi separado e utilizado para avaliar-se o conteúdo protéico total pela metodologia de Bradford, conforme descrição do fabricante (Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate - Hercules, CA).

Cem microgramas (100 µg) de proteínas foram tratados em tampão de amostra (50% glicerol, 0.1% azul de bromofenol, SDS 10%, fosfato de sódio pH 7.0 e 0.1% DTT). As amostras foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e submetidas à eletroforese (SDS-PAGE) em géis 6.5, 8.0 ou 10% de acordo com o peso molecular das proteínas a serem avaliadas. Seguiu-se a transferência para membrana de nitrocelulose, por *electroblotting*, e a incubação da mesma em solução bloqueadora (5% leite desnatado em solução basal -10 mM

Trizma-Base; 150 mM NaCl; 0.02% Tween²⁰).

As membranas foram incubadas com os anticorpos específicos: anti-fosfotirosina (anti- p-Tyr - 1:200), anti- p-Akt (1:500), anti-IR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-IRS2 (1:500) (Imuny Biotechnology Ltda, Campinas, São Paulo, Brazil); anti-IRS1 (1:2000); anti-Akt2 (1:1000) e anti-P85 α (1:2000) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); anti-STAT1 (1:500), anti-STAT3 (1:500), anti-STAT5 (1:500), anti-pSTAT3 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-JAK2 (1:1000), anti-pJAK2 (1:2000), anti-pSTAT1 (1:2000), anti-pSTAT5 A/B (1:1000) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Os anticorpos foram preparados em solução basal 3% BSA, e as membranas incubadas *overnight* a 4 °C e lavadas por 3 vezes de 10 minutos em solução basal. Posteriormente, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário apropriado (1:10000 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), por 1 hora à temperatura ambiente. A detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência (Enhanced Chemiluminescence - ECL) e os blots obtidos foram analisados por densitometria e quantificados utilizando-se o *software* Scion Image (ScionCorp, Frederick, MD, USA). Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA).

4.3.3 Avaliação de GLUT4 basal: conteúdo total e nas frações de microssoma (M) e de membrana plasmática (MP)

Os músculos soleus e EDL e o tecido adiposo foram removidos, homogeneizados (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 250 mM sacarose, pH 7.4) e submetidos ao fracionamento subcelular (Quadro 1.1) para obtenção das frações de microssoma (M) e membrana plasmática (MP), de acordo com o método descrito por Yonemitsu et al. (1991), com modificações especificadas em Mitsumoto e Klip (1992) e Mori et al. (2008).

Trinta microgramas (30 μ g) de proteínas totais foram dissolvidos em tampão de amostra (0.05 M Tris, 15% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 9% SDS, 6% de mercapto-etanol). As amostras foram aquecidas em banho fervente por 5 minutos, submetidas à eletroforese (SDS-PAGE: 10%), transferidas à membrana de nitrocelulose, por *electroblotting*, e esta incubada em solução bloqueadora 23% leite desnatado/ PBS 1X, por pelo menos duas 2 horas, à temperatura ambiente. A incubação com anticorpo anti-GLUT4 (1:3000 em solução 8% BSA/ PBS) (Polyclonal Rabbit Raised Anti-GLUT4, AB1346,

Chemicon International, Temecula, CA) foi realizada a 37 °C por 4 horas, seguida pela incubação com anticorpo secundário apropriado, por 1 hora, à temperatura ambiente. A detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência (Enhanced Chemiluminescence - ECL) e os blots obtidos foram analisados por densitometria e quantificados utilizando-se o *software* Scion Image (ScionCorp, Frederick, MD, USA). Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA).

Considerando-se o conteúdo protéico total o obtido nas frações de microssoma e membrana plasmática (M+MP) e levando-se em conta o respectivo peso do tecido, o conteúdo de GLUT4/ g de tecido foi calculado na fração de microssoma e membrana plasmática (AU/ g tecido). A soma desses resultados refere-se ao conteúdo de GLUT4 total/ g de tecido. A porcentagem de GLUT4 total presente na membrana plasmática foi calculada, como indicado: $[(100 \times \text{MP GLUT4}) / (\text{MP GLUT4} + \text{M GLUT4})]$.

Quadro 1.1 - Fracionamento subcelular para obtenção de GLUT4 nas frações de microssoma e membrana plasmática.

<u>Tecidos</u>	<u>Etapa 1</u>	<u>Etapa 2</u>	<u>Etapa 3</u>	<u>Etapa 4</u>
SOLEUS e EDL	Homogeneizado: <u>760 g, 4 °C, 5 min (2X)</u> Descartado material nuclear do precipitado e sobrenadante submetido à centrifugação 2.	Sobrenadante: <u>31000 g, 4 °C, 60 min (1X)</u> Precipitado foi ressuspenso em 300 µl de tampão de homogeneização, constituindo a fração de membrana plasmática (MP).	Sobrenadante: <u>190000 g, 4 °C, 60 min (1X)</u> Precipitado foi ressuspenso em 200 µl de tampão de homogeneização, constituindo a fração de microssoma (M).	-
TAB	Homogeneizado: <u>1000 g, 4 °C, 15 min (1X)</u> Descartada fração de gordura sobrenadante	Intranadante (fat free extract – FFE): <u>1200 g, 4 °C, 15 min (1X)</u> Precipitado foi ressuspenso em 300 µl de tampão de homogeneização, constituindo a fração de MP.	Sobrenadante: <u>28000 g, 4 °C, 15 min (1X)</u> Descartado precipitado.	Sobrenadante: <u>146000 g, 4 °C, 75 min (1X)</u> Precipitado foi ressuspenso em 300 µl de tampão de homogeneização, constituindo a fração M.

4.3.4 Avaliação da expressão gênica e protéica do hormônio do crescimento

Após o tratamento, os animais foram anestesiados, sacrificados por decapitação e as hipófises removidas. Em parte dos animais as hipófises foram utilizadas para análise da expressão gênica (mRNA) e em outra parte para avaliação da expressão protéica do GH.

4.3.4.1 *Expressão gênica*

4.3.4.1.1 *Extração do RNA total*

A extração do RNA total foi baseada na metodologia da guanidina-fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol (Maniatis et al., 1989). Cinco microgramas (5 µg) de RNA total foram submetidos à desnaturação com solução contendo formaldeído, formamida deionizada, MOPS 10X (ácido morfolinopropanosulfônico 40 mM, pH 7.0) e água DEPC, em banho-maria a 65 °C, e posteriormente, corados com solução de azul de bromofenol (1 mM EDTA, 0.4% azul de bromofenol) e brometo de etídeo. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%/ formaldeído) em tampão de corrida contendo: MOPS 1X, 10 mM acetato de sódio e 1 mM EDTA.

A transferência do RNA do gel de agarose para uma membrana de nylon foi realizada por capilaridade - Northern Blot (Maniatis et al., 1989).

4.3.4.1.2 *Pré - hibridação e hibridação*

A membrana contendo o RNA fixado foi submetida à pré - hibridação (50% formamida, 100 µg/ ml de DNA de salmão; 2% SDS, reagente de Denhardt's e SSC 6 X) por aproximadamente 4 horas, a 42 °C, sob rotação constante (*Hybridization Oven/Shaker* - Amersham Life Science). Seguiu-se pela hibridação, *overnight*, com sonda específica para GH, marcada radioativamente, a 42 °C, também sob rotação constante.

Ao final desta etapa, a membrana foi submetida a lavagens de alta e/ou baixa estringência e colocada em um chassi contendo um filme auto-radiográfico, por tempo variado. A abundância do mRNA do GH foi estimada pela análise densitométrica das bandas obtidas. O conteúdo de mRNA de GH foi normalizado pela hidridação da mesma membrana com sonda para o rRNA da 18S, para corrigir-se eventual variabilidade no carregamento de RNA nos géis. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM da razão mRNA GH/ rRNA 18S.

4.3.4.2 *Expressão protéica*

As hipófises foram removidas e submetidas à homogeneização em tampão específico (250 mM de sacarose, 2 mM MgCl₂ e 20 mM de Tris – HCl). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 100 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi submetido à centrifugação a 800 g, por 10 minutos a 4 °C.

Trinta microgramas (30 µg) de proteínas totais foram solubilizados em tampão de amostra (62.5 mM Tris - HCl, pH 6.8, 20% de glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 4% SDS, 0.08% azul de bromofenol) e as amostras aquecidas em banho fervente por 10 minutos. Em seguida, foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE: 15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. O gel foi corado (0.5 g Coomassie Brilliant Blue, 500 ml Etanol, 100 ml ácido acético, 400 ml água deionizada) para a análise comparativa das quantidades de proteínas aplicadas no mesmo.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo específico anti-GH de rato (1:5000) (anti-rGH - National Hormone and Pituitary Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Torrance, CA), seguindo-se por incubação com anticorpo secundário apropriado. A detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência (Enhanced Chemiluminescence - ECL) e os blots obtidos foram analisados por densitometria e quantificados utilizando-se o *software* Scion Image (ScionCorp, Frederick, MD, USA). Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA).

4.3.5 Avaliação do conteúdo de mRNA do IGF-I hepático e IGF-I sérico

4.3.5.1 *Expressão do mRNA do IGF-I hepático*

Após o sacrifício dos animais foi extraída uma fração do fígado (~ 50 mg), a qual foi submetida à extração do RNA total pela metodologia da guanidina-fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol (Maniatis et al., 1989). As amostras de RNA foram tratadas com DNase livre de RNases (RNase free DNase I - Invitrogen NZ Ltd, Auckland, New Zealand) para se eliminar qualquer resíduo de DNA genômico, e em seguida foram submetidas à reação de transcrição reversa, utilizando-se: 2 µg de RNA total, 100 µg/ ml de oligo dT, 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5X First-Strand buffer e 200 U/ µl da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada em um ciclo de: 70 °C por 10 minutos, 37 °C por 60 minutos e 95 °C por 10 minutos.

O produto da reação de RT foi submetido à reação de PCR em tempo real (RT-PCR), sendo a abundância de mRNA do IGF-I avaliada por fluorescência (ABI Prism 7300 - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amplificações do RT-PCR foram executadas com 2 µl do produto da reação de transcrição reversa diluídos em tampão de reação contendo: 5 µl *SYBR® Green PCR master mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 900 nM primers (sense e anti-sense para IGF-I ou Ciclofilina, que foi utilizado como controle interno da reação) (Quadro 1.2). A reação foi realizada em duas fases a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguidas por 45 ciclos de três etapas (20 segundos de desnaturação a 95 °C, e 60 segundos de anelamento a 58 °C e 20 segundos a 72 °C).

Quadro 1.2 - Sequência dos *primers* para RT-PCR – IGF-I.

Primers	Sequência
IGF-I (Sense)	5'- AGGCCTACAAAGTCAGCTCG - 3'
IGF-I (Anti-sense)	5'- GGTCTTGTTTCCTGCACTTC - 3'
Ciclofilina (Sense)	5'- GGATTCATGTGCCAGGGTGG - 3'
Ciclofilina (Anti-sense)	5'- CACATGCTTGCCATCCAGCC - 3'

4.3.5.2 Quantificação do IGF-I sérico

A concentração de IGF-I sérico foi avaliada por imunoensaio de quimioluminescência utilizando-se a tecnologia de LUMINEX xMAP (LINCOplex kit - Luminex Corporation, Austin, Texas, USA), de acordo com as especificações descritas por Elshal e McCoy (2006).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Avaliação da Arg sérica

O tratamento com Arg na dose de 35 mg/ dia aumentou a concentração deste aminoácido no soro em relação ao grupo controle (C) que recebeu água pura (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Concentração sérica de Arg. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Analisou-se a concentração de Arg sérica ao final do tratamento por sistema de derivação por coluna de troca iônica. (1.1) Representação gráfica do conteúdo de Arg sérica (µmol/ ml). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). Student's t test: * $p < 0.01$ (A35 vs C) - $n = 3$ animais por grupo.

4.4.2 Efeitos da suplementação com Arg sobre a via de sinalização da insulina: a expressão e/ ou fosforilação do IR, IRS1/ 2 e Akt, no soleus, EDL, tecido adiposo (TAB) e fígado

Observou-se que o estímulo com insulina aumentou a fosforilação do IR, IRS 1/ 2 e da Akt no músculo esquelético, TAB e fígado dos animais controles (C) e tratados com Arg (Figura 1.2). Em todos os tecidos estudados, o tratamento com Arg não alterou a fosforilação do IR quando comparado com o grupo C (Figura 1.2A). Todavia, foi observado que a Arg reduziu a fosforilação estimulada por insulina do resíduo de tirosina do IRS 1/2 (Figura 1.2B) e de serina da Akt (Figura 1.2C). A Arg também não alterou o conteúdo total de IR e Akt2 nos tecidos estudados, embora tenha sido observado aumento do conteúdo de IRS1 total no

TAB. Adicionalmente, os animais do grupo A35 apresentaram aumento da expressão de IRS2 nos músculos soleus e EDL, e redução no fígado, como mostrado na Figura 1.2D.

Figura 1.2 - Efeito crônico da Arginina sobre a via de sinalização de insulina. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se a fosforilação e/ou expressão de proteínas da via de sinalização da insulina por Western Blot no soleus (SOL), extensor digital longo (EDL), tecido adiposo branco (TAB) e fígado (FIG), estimulados (+) ou não (-) com insulina (1U). As figuras ilustram a imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo protéico, seguida pela representação gráfica do mesmo. **(1.2A)** p-Tyr IR (fosforilação em tirosina do receptor de insulina); **(1.2B)** p-Tyr IRS1/2 (fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina 1/ 2); **(1.2C)** p-Akt (Ser⁴⁷³) e **(1.2D)** Conteúdo protéico total do substrato do receptor de insulina 2 (IRS2). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). Two-way ANOVA, seguido por Bonferroni pós-teste: ⁺p<0.05 (Ins vs Basal); *p<0.05 (A35 vs C) - n=8-12 animais por grupo.

4.4.3 Efeitos da suplementação com Arg sobre o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na membrana plasmática no músculo esquelético e tecido adiposo

Na figura 1.3 estão representados o conteúdo total (M+MP), somadas as frações de microssoma (M) e membrana plasmática (PM) de GLUT4 e o conteúdo de GLUT4 inserido na MP, no soleus, EDL e TAB. Foi observado que a suplementação com Arg reduziu significativamente o conteúdo total de GLUT4 no soleus e TAB (Figura 1.3A). No músculo EDL também foi observada uma redução moderada do conteúdo total de GLUT4 no grupo A35 vs C (Figura 1.3A), embora não significativa estatisticamente ($p=0.09$). O conteúdo de GLUT4 na fração microssomal não sofreu alteração pelo tratamento com Arg (Figura 1.3A). Entretanto, foi observada diminuição do conteúdo de GLUT4 na MP em todos os tecidos estudados, nos animais do grupo A35 vs C (Figura 1.3B).

Figura 1.3 - Efeito crônico da Arginina sobre o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na membrana plasmática. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35) ou não (controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se conteúdo de GLUT4 basal total [microssoma (M) + membrana plasmática (MP)] e o conteúdo de GLUT4 inserido na MP no soleus (SOL), extensor digital longo (EDL) e tecido adiposo branco (TAB) por Western Blot. **(1.3A)** Imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo protéico de GLUT4 na fração M e MP, seguida pela representação gráfica da soma do conteúdo de GLUT4 das frações M+MP; **(1.3B)** Representação gráfica do conteúdo (%) de GLUT4 inserido na MP. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). *Student's t test*: * $p<0.05$ (A35 vs C) - $n=8-12$ animais por grupo.

4.4.4 Efeitos da suplementação com Arg sobre o eixo GH/ IGF-I

A figura 1.4 ilustra os efeitos da administração oral crônica de Arg sobre a expressão do mRNA e da proteína GH, bem como sobre a expressão do mRNA de IGF-I hepático e IGF-I sérico. Foi observado que conteúdo do mRNA e proteína de GH foram significativamente aumentados no grupo A35 quando comparado com o grupo C. Além disso, foi observado aumento no conteúdo do mRNA de IGF-I hepático no grupo A35 (Figura 1.4B). O IGF-I sérico, apresentou-se aumentado em aproximadamente 25% no grupo A35 vs C (Figura 1.4C), embora este aumento não seja significativo estatisticamente.

Figura 1.4 - Efeito crônico da Arginina sobre o eixo GH/ IGF-I. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se o conteúdo de mRNA e proteína do GH hipofisário, e a abundância do mRNA de IGF-I hepático e IGF-I sérico. **(1.4A)** Imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo de mRNA do GH, normalizado pela densitometria das bandas de rRNA 18S (Northern Blot). Abaixo, imagem das bandas referentes ao conteúdo protéico de GH (Western Blot), seguida pela representação gráfica (n=11-17 animais por grupo). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA); **(1.4B)** Representação gráfica do conteúdo de mRNA do IGF-I hepático em UA (Real-time PCR) (n=10-12 animais por grupo); **(1.4C)** Representação gráfica do conteúdo de IGF-I sérico (ng/ml) (n=3-5 animais por grupo). *Student's t test*: * $p < 0.05$ (A35 vs C).

4.4.5 Efeitos da suplementação com Arg sobre o conteúdo total e/ou fosforilado de proteínas da via de sinalização do GH e da insulina

Foi observado aumento da fosforilação da JAK2 em tirosina apenas no músculo EDL, e da expressão de JAK2 total somente no TAB, sem alteração da fosforilação, nos animais suplementados com Arg na dose de 35 mg/dia quando comparados com o grupo C (Figura 1.5A). A fosforilação da proteína STAT3 em serina apresentou-se elevada no TAB e fígado nos animais do grupo A35 vs C (Figura 1.5B), porém nenhuma alteração foi observada em relação ao conteúdo total da mesma. A Figura 1.4C mostra que o tratamento com Arg induziu aumento da fosforilação em tirosina da STAT5 nos músculos soleus e EDL, e redução no TAB (Figura 1.5C). Nenhuma alteração foi observada no conteúdo total de STAT5, bem como na fosforilação e expressão da STAT1 em nenhum dos tecidos estudados (dados não mostrados). Adicionalmente, os animais do grupo A35 apresentaram elevação da expressão da subunidade regulatória P85- α da PI3-K no soleus e redução no TAB e fígado (Figura 1.5D). Já a subunidade regulatória P55- α da PI3K apresentou-se aumentada no soleus, EDL, TAB e fígado dos animais do grupo A35 vs C (Figura 1.5E).

Figura 1.5 - Efeito crônico da Arginina sobre a via de sinalização do GH e da insulina. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se a fosforilação e/ou expressão de proteínas da via de sinalização do GH e insulina por Western Blot no soleus (SOL), extensor digital longo (EDL), tecido adiposo branco (TAB) e fígado (FIG). As figuras ilustram a imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo protéico, seguida pela representação gráfica do mesmo. **(1.5A)** p-JAK2 no EDL e JAK2 total no TAB; **(1.5B)** p-STAT3 no TAB e FIG; **(1.5C)** p-STAT5 no SOL, EDL e TAB; **(1.5D)** Expressão da P85-α no SOL, TAB e FIG; **(1.5E)** Expressão da P55-α no SOL, EDL, TAB e FIG. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). *Student's t test*: * $p < 0.05$ (A35 vs C) - $n = 5-10$ animais por grupo.

5 **ESTUDO 2**

Efeitos da suplementação crônica com o aminoácido Arg em altas doses sobre sensibilidade à insulina em ratos: o provável papel do óxido nítrico.

Colaboração: Etapa desenvolvida em colaboração com o grupo da Prof. Dr. Zuleica Bruno Fortes – Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB-USP).

5.1 OBJETIVOS GERAIS

Sabe-se que a Arg é o único precursor biológico do óxido nítrico (NO), e que a via NO/ c-GMP é responsável por mediar muitos dos efeitos deste aminoácido. Recentemente foi demonstrado que em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) a redução da síntese de NO está relacionada ao desenvolvimento de resistência à insulina (Tessari et al., 2010). Além disso, outros estudos têm sugerido que a suplementação com Arg aminoácido melhorar a sensibilidade à insulina em pacientes obesos e diabéticos (Pieper et al., 1996). Todavia, no Estudo 1 foi demonstrado que a suplementação crônica de ratos com Arg na dose de 35 mg/ dia por 30 dias leva ao desenvolvimento de resistência à insulina, fator que está relacionado ao aumento da síntese e secreção do GH (de Castro Barbosa et al., 2006). Dessa forma, nossa hipótese é que o tratamento com o dobro da dose de Arg (70 mg/ dia – A70) possa reverter o quadro de resistência à insulina observado no grupo A35, uma vez que haveria maior formação de NO, levando à melhora do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, do aporte de glicose e insulina aos tecidos periféricos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram avaliados:

5.2.1 Via de sinalização da insulina

A expressão total e fosforilação basal e estimulada por insulina de proteínas da via de sinalização de insulina, entre elas: o receptor de insulina (IR), os substratos do receptor de insulina (IRS 1/2) e a Akt nos músculos esqueléticos soleus (SOL) e extensor digital longo (EDL), no tecido adiposo branco periepididimal (TAB) e no fígado (FIG).

5.2.2 Expressão do GLUT4

A expressão total do GLUT4, bem como o conteúdo de GLUT4 no microssoma (M) e inserido na membrana plasmática (MP), nos músculos soleus e EDL, e no TAB.

5.2.3 Eixo GH/IGF-I

A expressão hipofisária do mRNA e da proteína do GH; o conteúdo de mRNA de IGF-I hepático e IGF-I sérico; bem como a expressão e/ou fosforilação de proteínas da via de sinalização do GH, como: JAK2, STAT1, STAT3 e STAT5; além da expressão das subunidades regulatórias da PIK-3 (P85- α e P55- α) no músculo esquelético, TAB e fígado.

5.2.4 O papel do NO

Buscando-se investigar se a maior formação de NO, gerada em razão do tratamento com o dobro da dose de Arg (70 mg/ dia/ 30 dias), poderia reverter e/ou impedir o desenvolvimento do quadro de resistência à insulina nos animais do grupo A70, foram avaliados:

5.2.4.1 O fluxo sanguíneo vascular

Utilizando-se como modelo a circulação mesentérica, segundo metodologia descrita por Fortes et. al. (1983).

5.2.4.2 A sensibilidade à insulina por meio do teste de tolerância à insulina (ITT)

O teste de tolerância à insulina foi realizado associando-se L-NAME à suplementação crônica com Arg. O L-NAME, por sua vez, inibe a atividade da enzima óxido nítrico sintase e, conseqüentemente, a síntese de NO, o que poderia levar ao desenvolvimento de resistência à insulina também nos animais do grupo A70, evidenciando a importância do NO como mediador dos efeitos da arginina sobre o metabolismo da glicose.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS

- Quantificação de arginina sérica;
- Avaliação do conteúdo total e fosforilado de proteínas da via de sinalização da insulina e do GH;
- Avaliação de GLUT4 basal: conteúdo total e nas frações de microssoma (M) e de membrana plasmática (MP);
- Avaliação da expressão gênica e protéica do hormônio do crescimento;
- Avaliação do conteúdo do mRNA do IGF-I hepático e IGF-I sérico;

As metodologias descritas acima estão detalhadas no Estudo 1.

5.3.1 Microcirculação: análise do diâmetro, fluxo, velocidade de fluxo em arteríolas e vênulas do leito mesentérico de ratos

Após o tratamento de 30 dias, animais Controle, A35 e A70, foram anestesiados e submetidos à análise da microcirculação no leito mesentérico, em sistema de microscopia intravital. Os animais sofreram uma incisão abdominal e o mesentério foi exposto e preparado para observação em microscopia (Figura 2.1A) de acordo com Zweifach (1948) e modificações descritas em Fortes, et al. (1983). Os ratos foram mantidos em uma base aquecida a 37 °C, composta por uma placa transparente na qual o tecido foi preparado para ser transiluminado. A preparação do mesentério foi mantida aquecida e perfundida com solução de Ringer-Locke (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2 mM CaCl₂ · 2H₂O, 6 mM NaHCO₃, 5.5 mM

de glicose - pH 7.2- 7.4, 37 °C) durante todo o experimento. Uma câmara de vídeo (Sony, Brasil) foi acoplada a um microscópio tri-ocular (Reichert, USA) para permitir a observação da imagem aumentada (3400 X) em projetor de vídeo (Sony, Brasil). A projeção da imagem, por sua vez, permite a observação dos vasos e, conseqüentemente, a análise do diâmetro vascular (Figura 2.1B). Para cada animal, pelo menos 5 arteríolas e 5 vênulas de primeira ordem foram selecionadas para o estudo do diâmetro basal, fluxo e velocidade de fluxo. Ao longo de todo o experimento a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) diretas foram monitoradas, através de uma cânula inserida na carótida dos animais e acoplada a esfigmomanômetro (dados não apresentados).

O estudo da microcirculação no leito mesentérico, utilizando-se microscopia intravital é um modelo extremamente efetivo para a análise do fluxo sanguíneo in vivo em vários modelos animais, uma vez que a monitoração de diversos parâmetros neste tecido é facilmente acessada e pode refletir variações apresentadas em outros territórios (Galanzha et al., 2007).

Figura 2.1A - Representação fotográfica do sistema de microscopia intravital.

Figura 2.1B - Representação fotográfica da preparação do leito mesentérico de rato.

Onde: (a) tecido conjuntivo, (b) adipócitos, (c) arteríola de primeira ordem, (d) vênula de primeira ordem.

5.3.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para a realização do primeiro teste de tolerância à insulina os animais foram tratados por 30 dias com Arg na água de beber nas doses de 35 mg ou 70 mg/ dia, ou receberam água pura (C). No dia do teste os animais foram submetidos à privação alimentar por pelo menos 2 horas e após serem anestesiados receberam uma sobrecarga intravenosa de insulina regular (0.75 U/ Kg de peso corpóreo). Os níveis de glicose foram avaliados em amostras obtidas da veia caudal, nos tempos: T0 (basal), T4 (4min), T8 (8min), T12 (12min) e T16 (16min) após a sobrecarga insulínica, usando-se glicosímetro (Accu-Check Active - Roche[®], MA, USA). Os valores obtidos foram usados para calcular a taxa (%) de decaimento de glicose plasmática/min (kITT), fazendo-se a regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de glicose obtidos entre os tempos 0 a 16 minutos.

Para o segundo ITT os animais C, A35 e A70 foram tratados por 30 dias conforme descrito anteriormente. Todavia, nos últimos 7 dias de tratamento os animais receberam concomitantemente 20 mg/ Kg de peso corpóreo/ dia de L-NAME, na água de beber. O ITT foi realizado conforme os procedimentos descritos acima.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Avaliação da Arg sérica

Foi observado que o aumento dose de Arg para 70 mg/ dia não elevou a concentração do aminoácido no soro em relação ao grupo A35. Embora não haja diferença estatística significativa os animais do grupo A70 apresentaram aumento de aproximadamente 35% na concentração de Arg sérica quando comparados com os do grupo controle (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Concentração sérica de Arg. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Analisou-se a concentração de Arg sérica ao final do tratamento por sistema de derivação por coluna de troca iônica. **(2.1)** Representação gráfica do conteúdo de Arg sérica (µmol/ ml). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*: * $p < 0.01$ (A35 vs C) - $n = 3$ animais por grupo.

5.4.2 Efeito da suplementação com Arg em altas doses sobre a sensibilidade à insulina

Como já demonstrado anteriormente pelo nosso grupo, a suplementação de ratos com Arg na dose de 35 mg/ dia (A35) por 30 dias levou ao desenvolvimento de resistência à insulina quando comparados com animais controle. Buscando-se avaliar se a suplementação com o dobro da dose de Arg (A70) reverteria o resultado observado nos animais do grupo A35, foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT). De fato, observou-se que os animais do grupo A70 apresentaram elevação da sensibilidade à insulina quando comparados com os animais do grupo A35, sendo que a % de decaimento de glicose plasmática/ min retornou ao nível do grupo controle (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a sensibilidade à insulina. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Realizou-se o teste de tolerância à insulina (ITT). (2.2) Representação gráfica da % de decaimento da glicose plasmática por min (%/ min) (kITT). *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*: * $p < 0.05$ (A35 vs C), # $p < 0.05$ (A70 vs A35) - $n = 13$ animais por grupo.

5.4.3 Efeitos da suplementação com Arg em altas doses sobre a via de sinalização da insulina: a expressão e/ ou fosforilação do IR, IRS1/ 2 e Akt, no soleus, EDL, tecido adiposo e fígado

Observou-se que o estímulo com insulina aumentou a fosforilação do IR, IRS 1/ 2 e da Akt no músculo esquelético, TAB e fígado dos animais C e tratados com Arg em ambas as doses (Figura 2.4). Em todos os tecidos estudados, o tratamento com Arg, nas duas doses, não alterou a atividade do IR quando comparado com o grupo C (Figura 2.4A), sugerindo que qualquer possível alteração na sensibilidade à insulina nos animais A35 e A70 deve-se a alterações ao nível pós-receptor. Em relação à fosforilação do IRS 1/2 (p-IRS 1/2) o tratamento com o dobro da dose de Arg (A70) reverteu à redução observada no grupo A35, restabelecendo, portanto, a fosforilação aos níveis do grupo C no soleus e no TAB (Figura 2.4B). Já no músculo EDL e fígado não houve diferença entre os animais do grupo A35 e A70, todavia, em ambos os grupos, o p-IRS 1/ 2 apresentou-se reduzido em relação ao grupo C (Figura 2.4B). Resultado similar foi observado em relação à fosforilação da Akt em serina, havendo restabelecimento da sua fosforilação, aos níveis do grupo C, nos animais do grupo A70 vs A35 no soleus, EDL e TAB (Figura 2.4C). Nenhuma diferença foi observada quanto à expressão total do IRS1 e Akt2, entretanto, nos animais do grupo A70 a expressão total do IRS2 no soleus, EDL e TAB retornou ao nível dos animais do grupo C (Figura 2.4D).

2.4A.

2.4B.

2.4C.

2.4D.

Figura 2.4 – Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a via de sinalização de insulina. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se a fosforilação e/ou expressão de proteínas da via de sinalização da insulina por Western Blot no soleus (SOL), extensor digital longo (EDL), no tecido adiposo branco (TAB) e fígado (FIG), estimulados (+) ou não (-) com insulina (1U). As figuras ilustram a imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo protéico, seguida pela representação gráfica do mesmo. **(2.4A)** p-Tyr IR (fosforilação em tirosina do receptor de insulina): ⁺p<0.05 (Ins vs Basal) - n=4-12 animais por grupo; **(2.4B)** p- Tyr IRS1/2 (fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina 1 e 2), **(2.4C)** p-Akt (Ser⁴⁷³): ⁺p<0.05 (Ins vs Basal); *p<0.05 (A35 vs C e A70); [#]p<0.05 (A35 e A70 vs C) - n=8-14 animais por grupo, e **(2.4D)** Conteúdo protéico total do substrato do receptor de insulina 2 (IRS2): *p<0.05 (A35 vs C e A70) - n=4 animais por grupo. Os dados estão expressos pela média ± SEM, em unidades arbitrárias (UA). *Two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*, ou *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*.

5.4.4 Efeitos da suplementação com Arg em altas doses sobre o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na membrana plasmática no músculo esquelético e tecido adiposo

Na figura 2.5 estão representados o conteúdo total (M+MP) de GLUT4 (Figura 2.5A) e o conteúdo de GLUT4 inserido na membrana plasmática (Figura 2.5B), no soleus, EDL e TAB de ratos tratados cronicamente com Arg. Foi observado que a suplementação com o aminoácido na dose de 70 mg/ dia restabeleceu a expressão total do GLUT4 aproximadamente ao nível do grupo C, quando comparado com o grupo A35, no músculo esquelético (Figura 2.5A). Resultado semelhante foi observado em relação ao conteúdo de GLUT4 inserido na MP, o qual apresentou aumento no grupo A70 vs A35 no soleus, EDL e TAB (Figura 2.5B). Nenhuma alteração significativa foi observada no conteúdo de GLUT4 na fração microssomal em nenhum dos tecidos e condições estudadas (Figura 2.5A). Conforme já descrito no Estudo 1, o conteúdo total de GLUT4 e inserido na MP apresentou-se reduzido no grupo A35 vs C no soleus, EDL ($p=0.09$) e TAB (Figuras 2.5A e 2.5B).

Figura 2.5 - Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na membrana plasmática. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se o conteúdo de GLUT4 basal total [microssomal (M) + membrana plasmática (MP)] e o conteúdo de GLUT4 inserido na MP no soleus (SOL), extensor digital longo (EDL) e tecido adiposo branco (TAB) por Western Blot. **(2.5A)** Imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo protéico de GLUT4 na fração M (barra preta) e MP (barra branca), seguida pela representação gráfica da soma do conteúdo de GLUT4 das frações M+MP; **(2.5B)** Representação gráfica do conteúdo (%) de GLUT4 inserido na MP. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls: * $p < 0.05$ (A35 vs C e/ou A70) - $n=8-11$ animais por grupo.

5.4.5 Efeitos da suplementação com Arg em altas doses sobre o eixo GH/ IGF-I

A figura 2.6 ilustra os efeitos da administração oral crônica de Arg sobre a expressão do mRNA e proteína GH, bem como sobre a expressão do mRNA de IGF-I hepático e IGF-I sérico. Foi observado que a expressão do mRNA do GH (Figura 2.6A), do mRNA de IGF-I hepático (Figura 2.6B) e IGF-I sérico (Figura 2.6C) apresentou-se mais elevada no grupo tratado com a dose mais alta de Arg (A70) quando comparado com os grupos A35 e C. Além disso, houve aumento do conteúdo protéico de GH nos grupos A35 e A70 vs C, mas não houve diferença estatística significativa entre as duas doses do aminoácido (Figura 2.6A).

Figura 2.6 - Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre o eixo GH/ IGF-I. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se o conteúdo de mRNA e proteína do GH hipofisário, e o conteúdo do mRNA de IGF-I hepático e do IGF-I sérico. **(2.6A)** Imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes à abundância de mRNA do GH, normalizado pela densitometria das bandas de rRNA 18S (Northern Blot). Logo abaixo, imagem das bandas que representam o conteúdo protéico de GH (Western Blot), seguida pela representação gráfica - n=11-17 animais por grupo; **(2.6B)** Representação gráfica do conteúdo de mRNA de IGF-I hepático (Real-time PCR) - n=10-12 animais por grupo; **(2.6C)** Representação gráfica do conteúdo de IGF-I sérico (ng/ ml) (n=3-5 animais por grupo). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*: *p<0.05 (A35 vs C); #p<0.05 (A70 vs A35 e C).

5.4.6 Efeitos da suplementação com Arg em altas doses sobre o conteúdo total e/ou fosforilado de proteínas da via de sinalização do GH e da insulina

Os animais suplementados com o dobro da dose de Arg (A70) apresentaram redução do conteúdo de p-JAK2 no soleus, EDL e TAB quando comparados com os do grupo A35, retornando para níveis semelhantes ao do grupo C (Figura 2.7A). O conteúdo total de JAK2 apresentou-se reduzido nos animais do grupo A70 quando comparados com os do grupo A35, apenas no FIG. Já no TAB, o grupo A35 apresentou aumento do JAK2 em relação ao grupo C (Figura 2.7B). Em relação a p-STAT3, no grupo A70 a sua expressão retornou ao nível do grupo C, apresentando redução quando comparado com o grupo A35, somente no TAB e fígado (Figura 2.7C). Resultado similar foi observado em relação a p-STAT5, a qual apresentou redução no soleus e EDL, e aumento no TAB, nos animais do grupo A70 *vs* A35, sendo que seus valores (A70) são semelhantes ao do grupo C (Figura 2.7D). Nenhuma alteração foi observada na expressão ou fosforilação da STAT1 (resultados não mostrados). A expressão total da P85- α também se apresentou elevada no TAB e fígado dos animais do grupo A70 *vs* A35 (Figura 2.7E). Já expressão da P55- α apresentou-se reduzida no TAB no grupo A70 *vs* A35, e elevada no fígado quando comparado com o grupo C (Figura 2.6F).

Figura 2.7 - Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a via de sinalização do GH e da insulina.

Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Avaliou-se a fosforilação e/ou expressão de proteínas da via de sinalização do GH e insulina por Western Blot no soleus (SOL), extensor digital longo (EDL), tecido adiposo branco (TAB) e fígado (FIG). As figuras ilustram a imagem representativa da auto-radiografia das bandas referentes ao conteúdo protéico, seguida pela representação gráfica do mesmo. **(2.7A)** p-JAK2 no soleus, EDL, TAB e fígado: $p=0.08$ (A35 vs C e A70); $*p<0.05$ (A35 vs C e A70); $p=0.07$ (A35 vs A70); **(2.7B)** JAK2 total no TAB e FIG: $*p<0.05$ (A35 vs C e A70); $#p<0.05$ (A70 vs A35 e C); **(2.7C)** p-STAT3 no TAB e FIG: $*p<0.05$ (A35 vs C e A70); **(2.7D)** p-STAT5 no SOL, EDL e TAB: $*p<0.05$ (A35 vs C e A70); $#p<0.05$ (A35 vs C); **(2.7E)** Expressão da P85- α no TAB e FIG: $*p<0.05$ (A35 vs C e A70); **(2.7F)** Expressão da P55- α no TAB e FIG: $*p<0.05$ (A35 vs C e A70); $#p<0.05$ (A70 vs C). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls* - $n=5$ animais por grupo.

5.4.7 Efeitos da suplementação com Arg em altas doses sobre a microcirculação mesentérica: repercussões sobre o diâmetro de vasos e fluxo sanguíneo

Considerando-se os resultados obtidos anteriormente, nos quais foi observado desenvolvimento de resistência à insulina em ratos tratados cronicamente com o aminoácido Arg na dose de 35 mg/ dia, e a reversão deste quadro em animais que receberam o dobro da dose de Arg (70 mg/dia), foi hipotetizado que a maior dose do aminoácido, levaria a maior produção de NO, o qual atua como um potente vasodilatador. Dessa forma, uma possível melhora do fluxo sanguíneo e o aumento do aporte de glicose aos tecidos periféricos levariam à reversão do quadro de resistência à insulina ou impediriam seu desenvolvimento.

Com o intuito de confirmar esta hipótese, foram avaliados o diâmetro basal e a velocidade de fluxo em vênulas e arteríolas do leito mesentérico de ratos tratados cronicamente com Arg nas doses de 35 e 70 mg/ dia, ou que receberam água pura (grupo C). Não foi observada diferença significativa no diâmetro de vênulas e arteríolas do leito mesentérico (Figura 2.8A), bem como no fluxo e na velocidade de fluxo em vênulas (Figuras 2.8B e 2.8C). Todavia, o fluxo e a velocidade de fluxo em arteríolas apresentaram-se reduzidos no grupo A35 vs C (Figuras 2.8B e 2.8C). E no grupo A70 houve reversão da redução observada no grupo A35, atingindo-se os níveis dos animais controle (Figuras 2.8B e 2.8C).

2.8A.

2.8B.

2.8C.

Figura 2.8 - Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a microcirculação mesentérica. Ratos Wistar adultos receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. (2.8A) Representação gráfica do diâmetro (μm) de vênulas e arteríolas; (2.8B) Fluxo sanguíneo (nL/ seg) em vênulas e arteríolas e (2.8C) Velocidade de fluxo sanguíneo (mm/ seg) em vênulas e arteríolas. *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*: * $p < 0.001$ (A35 vs C); # $p < 0.0001$ (A70 vs A35) - $n = 7-10$ animais por grupo.

5.4.8 Efeitos da suplementação com Arg em altas doses sobre a sensibilidade à insulina: o papel do NO

Buscando-se, ainda, comprovar a hipótese de que a maior formação de NO é o fator responsável pela reversão do quadro de resistência à insulina no grupo A70 em comparação com grupo A35, foi realizado um novo teste de tolerância à insulina (ITT). Entretanto, nesta segunda etapa, os animais foram tratados com Arg nas doses de 35 e 70 mg/ dia por 30 dias, e nos últimos 7 dias de tratamento receberam concomitantemente na água de beber L-NAME, um importante inibidor da atividade da óxido nítrico sintase (NOS).

Os animais do grupo A35 apresentaram redução da % de decaimento de glicose plasmática/ min (kITT) quando comparados com o grupo C (Figura 2.3), e este quadro foi revertido nos animais que receberam o dobro da dose de aminoácido (A70) (Figura 2.9). Quando acrescentado L-NAME aos tratamentos, a % de decaimento de glicose plasmática/ min apresentou redução em todos os grupos estudados quando comparados com seus respectivos controles sem L-NAME (Figura 2.9).

Figura 2.9 - Efeito crônico da Arginina em altas doses sobre a sensibilidade à insulina: o papel do NO. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias, com adição ou não de L-NAME (20 mg/ Kg de peso corpóreo/ dia) nos últimos 7 dias de tratamento. (2.9) Representação gráfica da % de decaimento de glicose plasmática/ min (kITT). *Two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*: +*p*<0.05 (+ L-NAME vs - L-NAME); **p*<0.05 (A35 vs C); #*p*<0.05 (A70 vs A35) - n=6-14 animais por grupo.

6 **ESTUDO 3**

Efeitos da suplementação com Arginina sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas de ratos: ativação da via NO/ c-GMP e regulação da atividade da Akt e AMPK- α .

Manuscrito submetido ao periódico Endocrinology Journal (08/10/2010): de Castro Barbosa T, Jiang LQ, Zierath JR, Nunes MT. L-Arginine improves glucose and lipid metabolism in skeletal muscle cells by activating the NO/ c-GMP pathway.

Colaboração: Trabalho desenvolvido em colaboração com o grupo da Prof. Dr. Juleen R. Zierath, Integrative Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

6.1 OBJETIVOS GERAIS

Teve-se como objetivo avaliar os efeitos da suplementação crônica com Arg sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas de ratos, eliminando-se os efeitos sistêmicos do GH, o qual tem provável envolvimento na indução de resistência à insulina observada em animais tratados cronicamente com Arg na dose de 35 mg/ dia.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Células musculares esqueléticas de rato (células L6) foram incubadas cronicamente com aminoácido Arg e avaliaram-se:

6.2.1 Metabolismo de glicose e lipídios

O efeito do tratamento crônico com Arg na dose de 7 mM por 6 dias sobre a síntese de glicogênio, captação de glicose e oxidação de ácidos graxos.

6.2.2 Mecanismos intracelulares

Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos da Arg sobre a via de sinalização intracelular da insulina e AMPK. Para tanto, avaliou-se a fosforilação e/ ou expressão total de algumas proteínas dessas vias, tais como: Akt, GLUT4, AMPK- α , Acetil-CoA Carboxilase (ACC).

6.2.3 O papel do óxido nítrico como mediador dos efeitos da Arg sobre o metabolismo de glicose e lipídios e, os mecanismos intracelulares envolvidos

Para tanto, foram avaliados a síntese de glicogênio, captação de glicose, oxidação de ácidos graxos, bem como a fosforilação e/ ou expressão de proteínas da via de sinalização da insulina e AMPK, em células L6 tratadas com Arg, SP- NONOate (doador de NO) ou L-NAME (inibidor da síntese de NO). Adicionalmente, avaliou-se a concentração de nitrito e c-GMP total e intracelular.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS

6.3.1 Cultura de células

Células L6 foram cultivadas em meio α -MEM (Modified Eagle's Medium - alpha-MEM: Gibco - Invitrogen, Stockholm, Sweden) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - Invitrogen, Stockholm, Sweden), 1% penicilina/ estreptomicina (100 U/ ml de penicilina e 100 μ g/ ml de estreptomicina) e 1% fungizona em 5% CO₂/ 95% O₂ a 37 °C. Os mioblastos foram diferenciados em miotúbulos em α -MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB). Os miotúbulos foram privados de soro antes dos experimentos de acordo com cada protocolo, especificamente descrito mais adiante. Foram realizados os ensaios de síntese de glicogênio (incoporação de glicose em glicogênio), captação de glicose e oxidação

de ácido graxos, além da avaliação da expressão total de GLUT4 e de proteínas da via de sinalização da insulina e AMPK por Western Blot. Para se estabelecer as condições estimuladas por insulina, foi utilizado em todos os ensaios 120 nM do hormônio (insulina humana – Actrapid - Novo Nordisk AS, Copenhagen, Denmark).

6.3.2 Diferenciação e tratamento das células

As células L6 foram tratadas por 6 dias durante o período de diferenciação em α -MEM/ 2% soro fetal bovino. Para o tratamento o meio foi suplementado com 7 mM de Arginina (Sigma-Aldrich - St Louis, MO) e as diferenças osmóticas foram ajustadas pela adição de 7 mM de D-Manitol (Sigma-Aldrich - St Louis, MO) no grupo controle. A dose e o tempo de tratamento foram definidos após os resultados obtidos nos ensaios de dose- e tempo-resposta apresentados na seção de resultados. Com o intuito de se avaliar o papel do óxido nítrico nos efeitos da Arg, 10 μ M espermina nonoato (Calbiochem, San Diego, CA, USA) e 100 μ M de L-NAME (NG-Nitro-L-arginine methyl ester) foram utilizados. O meio de tratamento das células foi trocado todos os dias por 6 dias e as células foram analisadas por microscopia para verificar se o tempo de tratamento e/ou as condições experimentais estudadas estavam afetando negativamente as culturas.

6.3.3 Ensaios metabólicos

6.3.3.1 Síntese de glicogênio

A síntese de glicogênio foi avaliada em células L6 através da incorporação de glicose marcada com [14 C] em glicogênio, como descrito por Al-Khalili et al. (2003). Em resumo, os miotúbulos foram privados de soro *overnight* e incubados na presença ou na ausência de 120 nM de insulina por 2 horas a 37 °C. Durante os 90 minutos finais, as células foram incubadas a 37 °C com α -MEM suplementado com 1 μ Ci/ ml de D-[U- 14 C]-glicose (D-[U- 14 C]glucose - 310 mCi/mmol - GE Healthcare, UK). A incorporação de glicose em glicogênio foi determinada em mmol de glicose/ mg de proteína/ hora.

6.3.3.2 Captação de glicose

Os miotúbulos foram privados de soro 3 horas antes do experimento e, em seguida, incubados com ou sem 120 nM de insulina por 20 minutos a 37 °C. As células foram lavadas com tampão Hepes/Salina (140 mM NaCl; 20 mM Hepes-Na, pH 7.4; 5 mM KCl; 2.5 mM MgSO₄; 1.0 mM CaCl₂) em temperatura ambiente. Subseqüentemente, as células foram incubadas em solução de transporte (Hepes Buffer, 10 µM 2-Deoxy-Glucose, 2.0 µCi/ml 3H 2-Deoxy-Glucose) por 10 minutos a 37 °C e, posteriormente, lavadas novamente em solução contendo 0.9% NaCl e 25 mM glicose e aspiradas até secar. Finalmente, foram lisadas em solução 0.03% SDS e a captação de 2-deoxy-glicose foi determinada em pmol/ µg de protein/ min.

6.3.3.3 Oxidação de ácidos graxos (oxidação de palmitato)

A avaliação da oxidação de ácidos graxos foi realizada expondo-se os miotúbulos a ácido-palmítico-[³H] e, em seguida, avaliando-se a produção de água tritiada, como descrito por Rune et al. (2009). Resumidamente, as células foram tratadas por 6 dias em placas de 12-wells e foram privadas de soro *overnight*. No dia do experimento as células foram lavadas uma vez com tampão PBS e expostas a 1 ml α-MEM suplementado com 2% de albumina de soro bovino livre de ácidos graxos e 0.5 µCi de ácido palmítico [9-10(n)-³H], na ausência ou na presença de 120 nM de insulina, por 4 horas a 37 °C. Para absorver-se o palmitato não metabolizado, 0.2 ml do meio sobrenadante das células foi misturado com 0.8 ml de suspensão de carvão (0.1 g de carvão em pó em 1 ml de tampão 0.02 M Tris-HCl, pH 7.5) e agitados por 30 minutos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 12.000 g. Em seguida, 0.2 ml do sobrenadante contendo água marcada com [³H] foi utilizado para a determinação da radioatividade em líquido de cintilação (Win- Spectral 1414, Wallac, Turku, Finland).

6.3.4 Ensaio de imunoblotting (Western Blotting)

As células L6 foram tratadas por 6 dias conforme descrito acima. No dia do experimento os miotúbulos foram privados de soro fetal bovino por 3 horas e em seguida incubados ou não com 120 nM de insulina por 20 minutos a 37 °C. Os miotúbulos foram então, lisados e homogeneizados em tampão gelado contendo: 20 mM Tris (pH 7.8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaF, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM Na₃VO₄, 0.2 mM Fluoreto de Fenilmetilsulfonil, 1 mM EDTA, 5 mM pirofosfato de sódio, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 µg/ml leupeptina. Os lisados foram homogeneizados por inversão a 4 °C por 60 minutos. O sobrenadante foi armazenado em -80 °C até o uso. A concentração de proteínas totais foi aferida utilizando-se o kit para dosagem de proteínas disponível comercialmente (Pierce, Rockford, IL, USA). Quantidades iguais de proteínas (30 µg) foram diluídas em tampão Laemmli e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas à membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (p-AMPK-α Thr¹⁷²), da acetil-CoA carboxilase (p-ACC Ser⁷⁹), Akt (p-Akt Ser⁴⁷³) (Cell Signaling), e o conteúdo total de GLUT4 (Chemicon-Millipore) e da nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) (Cell Signaling) foram avaliados por imunoblotting usando-se os anticorpos específicos. Todas as membranas foram normalizadas com GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) ou com suas respectivas proteínas totais. As proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences) e quantificadas por densitometria.

6.3.5 Dosagem de c-GMP

As células L6 foram cultivadas, diferenciadas e tratadas por 6 dias em placas de 96-wells. Os conteúdos de c-GMP intracelular e total foram analisados utilizando-se o kit de imuno-ensaio Amersham c-GMP BioTRAK (RPN226). Os procedimentos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, UK) e os níveis de c-GMP foram expressos em fmol/ well.

6.3.6 Dosagem de nitrito

O conteúdo total de nitrito foi determinado usando-se o kit para Reagente de Griess (Griess Reagent System Kit G2930 - Promega Corporation, Madison, USA). As células foram cultivadas, diferenciadas e tratadas em placas de 12-well por 6 dias. Cem microlitros (100 μ L) de meio de cultivo foram utilizados para o ensaio (Chae et al., 2004), conforme instruções do fabricante. Os níveis totais de nitrito foram expressos em μ M/well.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Efeitos crônicos de Arginina sobre metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas

Células L6 foram incubadas com ou sem Arg, na presença ou na ausência de 120 nM de insulina, e foram realizados experimentos de dose- (Figura 3.1A) e tempo- (Figura 3.1B) resposta dos efeitos da Arg sobre a síntese de glicogênio. Além disso, foram avaliados os efeitos da Arg sobre a captação de glicose (Figura 3.1C) e sobre a oxidação de ácidos graxos (Figura 3.1D). Foi demonstrado que as células tratadas com 7 mM de Arg apresentaram aumento na síntese de glicogênio basal ($p<0.05$) e estimulada com insulina ($p<0.01$) quando comparadas com as células não tratadas com o aminoácido (Figura 3.1A). Este efeito também foi demonstrado com a Arg na dose de 3.5 mM, entretanto, apenas após estímulo insulínico ($p<0.01$). Na figura 3.1B está demonstrado que 7 mM de Arg aumentou a síntese de glicogênio após 6 dias de tratamento, antes e após estímulo com insulina ($p<0.05$). Adicionalmente, a Arg aumentou a captação de glicose estimulada por insulina ($p<0.05$) quando comparado com o grupo controle (D-Man: 7 mM) (Figura 3.1C). A insulina aumentou a síntese de glicogênio e a captação de glicose em todas as condições estudadas ($p<0.001$, Figuras 3.1A, 3.1B e 3.1C). Em relação à oxidação de ácidos graxos, o estímulo com insulina reduziu a oxidação de palmitato quando comparado com os respectivos grupos basais ($p<0.001$). Entretanto, a oxidação de palmitato apresentou-se elevada nas condições basal e estimulada com insulina nas células musculares tratadas com Arg vs D-Man ($p<0.01$) (Figura 3.1D).

Figura 3.1- Efeitos crônicos da Arginina sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas. Células L6 foram tratadas com Arg durante a diferenciação em α -MEM suplementado com 2% SFB, na ausência ou na presença de insulina (120 nM). Os efeitos da Arg sobre a síntese de glicogênio foram avaliados: **(3.1A)** Dose-resposta (n=8-12): * $p < 0.05$ vs 0 mM basal, ** $p < 0.01$ vs 0 mM ins, *** $p < 0.001$ vs respectivo basal; **(3.1B)** Tempo-resposta (n=4) * $p < 0.05$ vs 0 h, *** $p < 0.001$ vs respectivo basal. Células L6 foram tratadas com 7 mM de D-Manitol (D-Man: controle) ou 7 mM de Arg por 6 dias: **(3.1C)** Captação de glicose (n=6-8): * $p < 0.05$ vs D-Man; *** $p < 0.001$ vs Arg basal; **(3.1D)** Oxidação de palmitato (n=7-8): ** $p < 0.01$ vs D-Man Ins; *** $p < 0.001$ vs D-Man basal e Arg basal. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. *Two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*.

6.4.2 Expressão protéica e mecanismos intracelulares implicados nos efeitos crônicos da Arg sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas

Buscando-se determinar os mecanismos intracelulares pelo quais a Arg aumenta a síntese de glicogênio, a captação de glicose e oxidação de palmitato em células musculares esqueléticas, células L6 foram tratadas com 7 mM de Arg ou não (7 mM de D-Man) por 6 dias, na presença e na ausência de 120 nM de insulina, e a expressão e/ou fosforilação da Akt, GLUT4, AMPK e ACC foram avaliadas. Foi observado que Arg, por si só, aumentou a fosforilação da Akt (Ser⁴⁷³) (Figura 3.2A) nas células L6 quando comparadas com o grupo controle ($p < 0.05$), e que este efeito persistiu após estímulo com insulina ($p < 0.05$). A Arg também aumentou a expressão total de GLUT4 (Figura 3.2B, $p < 0.01$) e da AMPK- α (Figura 3.2C, $p < 0.05$), além da p-AMPK- α (Thr¹⁷²) (Figura 3.2D, $p < 0.05$) e da acetil-CoA carboxylase (p-ACC- Ser⁷⁹) (Figura 3.2E, $p < 0.05$).

Figura 3.2 - Mecanismos intracelulares envolvidos nos efeitos crônicos da Arginina em células musculares esqueléticas. Células L6 foram tratadas por 6 dias em α -MEM/ 2% SFB suplementado com 7 mM de D-Manitol (D-Man: controle) ou 7 mM de Arginina (Arg), na ausência ou na presença de insulina (120 nM). (3.2A) p-Akt (Ser⁴⁷³) (n=4): *p<0.05 vs D-Man; ***p<0.001 vs respectivo basal; (3.2B) GLUT4 total (n=4): **p<0.01 vs D-Man; (3.2C) AMPK- α total (n=4-6): *p<0.05 vs D-Man; (3.2D) p-AMPK (Thr¹⁷²) (n=4-6): *p<0.05 vs D-Man e (3.2E) p-ACC (Ser⁷⁹) (n=5-8): *p<0.05 vs D-Man. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). Student's *t* test ou Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni.

6.4.3 Envolvimento da via de sinalização óxido nítrico/ c-GMP nas células musculares esqueléticas tratadas cronicamente com Arginina

O aminoácido Arg é o único precursor natural de NO, o qual é responsável por mediar muitos dos efeitos deste aminoácido (Newsholme et al., 2010; Palmer et al., 1988), por meio da ativação da via do c-GMP (Arnold et al., 1977). Com o intuito de avaliar se a via de sinalização NO/ c-GMP está envolvida nos efeitos da Arg demonstrados acima, células L6 foram tratadas por 6 dias com 7 mM de D-Man, 7 mM de Arg ou 10 μ M de espermina nonoato (SP: controle positivo, doador de NO), na presença ou na ausência de 100 μ M de L-NAME (inibidor da NOS), e, os níveis de nitrito e as concentrações total e intracelular de c-GMP foram avaliadas. Foi observado que os níveis de nitrito aumentaram nas células tratadas com Arg quando comparadas com o grupo D-Man ($p < 0.01$ – Figura 3.3A). Nas células tratadas com SP, o NO liberado levou ao aumento dos níveis de nitrito quando comparadas com as células dos grupos D-Man e Arg ($p < 0.001$ – Figura 3.3A). A associação com L-NAME reduziu os níveis de nitrito nas células tratadas com a Arg ($p < 0.05$), mas não nas células tratadas com SP (Figura 3.3A), conforme esperado. Também foi demonstrado que o tratamento com Arg aumentou a concentração total de c-GMP nas células L6 quando comparado com os grupos D-Man e SP ($p < 0.01$ – Figura 3.3B). O conteúdo total de c-GMP, embora não significativo estatisticamente ($p = 0.08$), apresentou-se reduzido em aproximadamente 33% nas células tratadas com Arg associada ao L-NAME (Figura 3.3B), e nenhuma alteração foi observada nas células tratadas com D-Man e SP associados ao L-NAME (Figura 3.3B). O conteúdo intracelular de c-GMP também se apresentou aumentado nas células tratadas com Arg vs D-Man e SP ($p < 0.05$), e o tratamento com L-NAME reduziu os níveis de c-GMP em todas as condições quando comparadas com seus respectivos controles sem L-NAME (Figura 3.3C).

Figura 3.3 - Via de sinalização óxido nítrico/ c-GMP em células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina. Células L6 foram tratadas por 6 dias em α -MEM/ 2% SFB suplementado com 7 mM de D-Manitol (D-Man), 7 mM de Arginina (Arg) ou 10 μ M de espermina nonoato (SP) na ausência ou na presença de 100 μ M de L-NAME. **(3.3A)** Concentração de nitrito (n=14-17): * $p < 0.05$ vs Arg - L-NAME, ** $p < 0.01$ vs D-Man - L-NAME, *** $p < 0.001$ vs D-Man ou Arg; **(3.3B)** GMP cíclico total (c-GMP) (n=9-12): ** $p < 0.01$ vs D-Man - L-NAME ou SP - L-NAME; **(3.3C)** c-GMP intracelular (n=4-6): * $p < 0.05$ vs D-Man - L-NAME, ** $p < 0.01$ vs D-Man - L-NAME, vs Arg - L-NAME ou vs SP -L-NAME. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni.

6.4.4 O papel do óxido nítrico no metabolismo de glicose e lipídios nas células musculares esqueléticas tratadas cronicamente com Arg

Já foi previamente descrito que doadores de NO como o nitroprussiato de sódio (NPS) e espermina aumentam o transporte de glicose em músculo esquelético (Balon e Nadler, 1997; Higaki et al., 2001; Deshmukh et al., 2010). Todavia, ainda não foi demonstrado na literatura, que o NO gerado a partir do tratamento com o aminoácido Arg pode melhorar o metabolismo de glicose e/ou lipídios. Portanto, para determinar se o NO está intermediando os efeitos da Arg observados neste estudo; a síntese de glicogênio, a captação de glicose e a oxidação de lipídios foram reavaliadas na presença ou na ausência de 100 μ M de L-NAME ou 10 μ M de espermina (SP), associado ou não à insulina (120 nM). Observou-se que o aumento na síntese de glicogênio demonstrado nas células tratadas com Arg (Figura 4.1) foi abolido pelo tratamento com L-NAME (Figura 3.4A), tanto na ausência ($p < 0.01$), quanto na presença ($p < 0.05$) de insulina. Também foi observado que a SP, per se, aumentou a síntese de glicogênio quando comparado com o grupo D-Man ($p < 0.05$), e que este efeito foi inibido pelo tratamento com L-NAME ($p < 0.05$ – Figura 3.4A). O tratamento concomitante com L-NAME suprimiu o aumento na captação de glicose induzido pela Arg nas células L6 ($p < 0.001$ - Figura 3.4B), mas a oxidação de palmitato nos grupos D-Man e SP, na ausência de insulina apresentou-se aumentada (Figura 3.4C).

Figura 3.4 - O papel do óxido nítrico sobre metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina. Células L6 foram tratadas por 6 dias em α -MEM/ 2% SFB suplementado com 7 mM de D-Manitol (D-Man), 7 mM de Arginina (Arg) ou 10 μ M de espermina nonoato (SP) na ausência ou na presença de 100 μ M de L-NAME; com ou sem insulina (120 nM). **(3.4A)** Síntese de Glicogênio (n=5-12): #p<0.05 vs D-Man basal; *p<0.05 vs Arg basal; +p<0.05 vs SP ins, **p<0.01 vs Arg ins; ***p<0.001 vs D-Man ins e SP ins; **(3.4B)** Captação de glicose (n=6-8): *p<0.05 vs D-Man ins; ***p<0.001 vs Arg ins; **(3.4C)** (n=7-8): *p<0.05 vs D-Man basal ou vs SP basal; **p<0.01 vs D-Man basal; ***p<0.001 vs D-Man basal, +p<0.05 vs SP ins, ++p<0.01 vs D-Man ins, +++p<0.001 vs D-Man ins. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. *Two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*.

6.4.5 Mecanismos intracelulares do óxido nítrico sobre células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina

Foram avaliadas a expressão da p-Akt, do GLUT4 total, da AMPK- α , da ACC e da nNOS. O tratamento com L-NAME inibiu os efeitos basais da Arg sobre a fosforilação da Akt (Ser⁴⁷³) ($p < 0.05$) e também suprimiu a fosforilação da Akt após estímulo insulínico em todas as outras condições: D-Man *vs* D-Man + L-NAME ($p < 0.05$), Arg *vs* Arg + L-NAME ($p < 0.001$), SP *vs* SP + L-NAME ($p < 0.001$) (Figura 3.5A). É importante ressaltar que a Arg aumentou a fosforilação da Akt antes e após estímulo insulínico *vs* D-Man (Figura 3.2A). A expressão total de GLUT4 que se mostrou aumentada nos grupos Arg e SP *vs* D-Man ($p < 0.01$) não sofreu alteração quando o tratamento foi combinado com L-NAME (Figura 3.5B). Já em relação à expressão total de AMPK- α , a combinação com L-NAME suprimiu os efeitos da Arg e SP anteriormente observados ($p < 0.05$) (Figura 3.5C). Na figura 3.5D está demonstrado que a Arg também aumentou a fosforilação da AMPK- α (p-AMPK- α) *vs* os grupos D-Man e SP ($p < 0.05$), e quando associado ao L-NAME, este suprimiu os efeitos do aminoácido ($p < 0.05$). A expressão total da ACC não se apresentou alterada estatisticamente nos grupos Arg e SP, entretanto, em combinação com L-NAME a expressão da ACC foi inibida em aproximadamente 50% no grupo Arg ($p = 0.09$) e 66% no grupo SP ($p < 0.01$) (Figura 3.5E). A expressão da p-ACC foi aumentada no grupo Arg *vs* D-Man ($p < 0.05$) e o L-NAME foi capaz de inibir a fosforilação desta proteína em todas as condições: D-Man *vs* D-Man + L-NAME ($p < 0.05$), Arg *vs* Arg + L-NAME and SP *vs* SP + L-NAME ($p < 0.01$) (Figura 3.5F). Buscando-se confirmar que o NO está sendo gerado a partir de Arg, a expressão da nNOS também foi avaliada. Como mostrado na Figura 3.5G, a expressão da nNOS aumentou após o tratamento com Arg e SP *vs* D-man ($p < 0.05$), e o L-NAME suprimiu significativamente a expressão desta enzima em ambos os grupos ($p < 0.001$).

3.5A.

3.5B.

3.5C.

3.5D.

3.5E.

3.5F.

3.5G.

Figura 3.5 - Mecanismos intracelulares do óxido nítrico sobre células musculares esqueléticas cronicamente tratadas com Arginina. Células L6 foram tratadas por 6 dias em α -MEM/ 2% SFB suplementado com 7 mM de D-Mannitol (D-Man), 7 mM de Arginina (Arg) ou 10 μ M de espermina nonoato (SP) na ausência ou na presença de 100 μ M de L-NAME; com ou sem insulina (120 nM). **(4.5A)** p-Akt (Ser⁴⁷³) (n=4-6): *p<0.05 vs D-Man, #p<0.05 vs Arg, ***p<0.001 vs Arg ins ou vs SP ins; **(3.5B)** GLUT4: **p<0.01 vs D-Man; **(3.5C)** AMPK- α (n=4-8): *p<0.05 vs D-Man - L-NAME, #p<0.05 vs Arg - L-NAME ou vs SP - L-NAME; **(3.5D)** p-AMPK (Thr¹⁷²) (n=4-8): *p<0.05 vs Arg - L-NAME, #p<0.05 vs D-Man e SP; **(3.5E)** Total ACC (n=4-8): *p<0.05 vs SP - L-NAME; **(3.5F)** p-ACC (Ser⁷⁹) (n=4-8): *p<0.05 vs D-Man - L-NAME, #p<0.05 vs D-Man, **p<0.001 vs Arg - L-NAME ou vs SP - L-NAME; **(3.5G)** nNOS (n=5-10): *p<0.05 vs D-Man - L-NAME, ***p<0.001 vs Arg - L-NAME ou vs SP - L-NAME. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, em unidades arbitrárias (UA). *Two-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*.

7 ESTUDO 4

Efeitos da suplementação crônica com o aminoácido Arginina sobre a secreção de insulina.

Colaboração: Etapa desenvolvida em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB-USP).

7.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento crônico com Arg nas doses de 35 e 70 mg/ dia por 30 dias sobre a secreção de insulina estimulada por glicose, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram avaliadas:

7.2.1 A secreção dinâmica de insulina estimulada por glicose

7.2.2 A secreção estática de insulina estimulada por glicose

7.3 MATERIAL E MÉTODOS ESPECÍFICOS

7.3.1 Secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas

7.3.1.1 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Após o tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação e submetidos à incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto pancreático. Posteriormente, foi inserida uma cânula de polietileno através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) do ducto, através da qual foi injetada solução de Hanks enriquecida com 2.8 mM de glicose e colagenase (0.7 mg/ pâncreas) para promover a divulsão do tecido acinoso. Em cada experimento (n=1) foi utilizado um *pool* de dois pâncreas por grupo experimental.

O pâncreas foi removido e dissecado, retirando-se gorduras, tecido vascular e gânglios linfáticos. Em seguida, o pâncreas foi picotado, sendo os fragmentos transferidos para um tubo cônico contendo tampão Hanks, e incubados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 25 minutos. Posteriormente, o tubo foi agitado manualmente por cerca de 1 minuto ou até a obtenção de uma mistura homogênea. O conteúdo foi transferido para um recipiente de vidro e lavado por 4 vezes com solução de Hanks. As ilhotas separadas do tecido acinoso foram coletadas uma a uma, por aspiração, com o auxílio de lupa. Para cada grupo foi coletado um total de 100 ilhotas por experimento.

7.3.1.2 Secreção dinâmica de insulina

Cem (100) ilhotas pancreáticas foram transferidas para câmaras de perfusão contendo um filtro especial de membrana de éster de celulose, com poros de 8 µm e 13 mm de diâmetro. As ilhotas foram mantidas em banho-maria a 37 °C e perfundidas por soluções de Krebs-Henseleit (115 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂.6H₂O, 1 mM CaCl₂.2 H₂O) enriquecida com glicose (5.6 mM ou 16.7 mM), com auxílio de uma bomba peristáltica, numa razão constante de 1 ml/ min. As soluções foram suplementadas com 0.5% albumina bovina e gaseificadas com carbogênio. As ilhotas foram perfundidas com solução de

glicose 5.6 mM por 40 minutos, sendo os primeiros 30 minutos para estabilização do experimento. Posteriormente, as ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs enriquecida com glicose 16.7 mM por 20 minutos. Finalmente, foi restaurada a perfusão com solução de glicose 5.6 mM por mais 10 minutos (Figura 4.1). O perfusato foi coletado em intervalos de 1 minuto, a partir do tempo 0 ao 40º minuto, com o auxílio de um coletor (ULTRORAC II. LKB. BROMA 2070). Alíquotas de todos os experimentos foram congeladas e armazenadas a -20 °C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (Carpinelli et al., 2002).

Figura 4.1 - Representação esquemática da perfusão de ilhotas pancreáticas isoladas: Secreção dinâmica de insulina.

7.3.1.3 Secreção estática de insulina

As ilhotas foram isoladas como descrito acima e separadas em grupos de 5 em câmara de incubação. Posteriormente, as ilhotas foram incubadas a 37 °C, por 1 hora, em 500 µl de tampão Krebs com diferentes compostos, sendo divididas em diversos grupos experimentais (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 - Secreção Estática de Insulina – Condições Experimentais

<u>Glicose 5.6 mM</u>	<u>Glicose 16.7 mM</u>
+ Arg (5 mM)	+ Arg (5 mM)
+ Arg (5 mM) + L-NAME (5 mM)	+ Arg (5 mM)+ L-NAME (5 mM)
+ L-NAME (5 mM)	+ L-NAME (5 mM)
+ NPS (100 µM)	+ NPS (100 µM)

Onde: L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil ester, NPS: nitroprussiato de sódio

7.3.1.4 Dosagem de insulina (RIE)

A quantificação de insulina presente no perfusato (secreção dinâmica) ou no meio de incubação das ilhotas (secreção estática) foi realizada por radioimunoensaio (RIE), de acordo com o seguinte protocolo: Adicionou-se à 50 µl da amostra: albumina (0.25% BSA), 50 µl (1: 50) de anticorpo anti-insulina e de insulina marcada (I-125*) (1: 300). Agitou-se em vórtex e incubou-se a 4 °C por 48 horas.

Após o período de incubação, foram acrescentados às amostras: 100 µl de soro carreador (soro de rato) e 1 ml de PEG 15% (polietilenoglicol em tampão borato, pH 8.0). Os tubos foram agitados e centrifugados a 2000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e a quantidade de insulina marcada foi avaliada em contador gama (γ).

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Secreção dinâmica de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas de ratos cronicamente tratados com Arginina

Conforme ilustrado na figura 4.2, a secreção de dinâmica insulina estimulada por glicose, ao longo do tempo, apresentou-se aumentada em ambos os grupos experimentais (A35 e A70) quando comparados com o grupo C, apenas na concentração de glicose 16.7 mM (Figuras 4.2A e 4.2B). Notou-se um pico na secreção de insulina, no 44º minuto de perfusão, ao aumentar-se a concentração de glicose de 5.6 para 16.7 mM e, restabelecimento da secreção basal de insulina, no 64º minuto da perfusão, quando a concentração de glicose foi retornada aos níveis basais (5.6 mM) (Figura 4.2A). Na figura 4.2B está ilustrada a área sob a curva da secreção de insulina estimulada por glicose em todos os grupos estudados. Observou-se que esta se apresenta aumentada nos grupos A35 e A70 quando comparados com o grupo C (Figura 4.2B).

4.2A.

4.2B.

Figura 4.2 - Efeito crônico da Arginina sobre a secreção dinâmica de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. **(4.2A)** Representação gráfica da secreção dinâmica de insulina ($\text{ng/ilhota}/\text{min}^{-1}$): 30 minutos de estabilização com solução de Krebs suplementada com 5.6 mM de glicose, seguidos por 10 minutos (31° - 40° minuto) de perfusão com solução a 5.6 mM de glicose e por 20 minutos (41° - 60° minutos) de perfusão com solução a 16.7 mM de glicose, e finalmente mais 10 minutos (61°-70° minutos) com 5.6 mM de glicose; **(4.2B)** Representação gráfica da área sob curva, ilustrando a concentração de insulina (ng/ml) após estímulo por glicose (5.6 mM ou 16.7 mM). *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*: * $p<0.05$ (A35 vs C), ** $p<0.01$ (A70 vs C) - $n=6$ experimentos.

7.4.2 Secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas de ratos cronicamente tratados com Arginina

Buscando-se avaliar o mecanismo pelo qual a suplementação crônica com Arg induziu aumento na secreção dinâmica de insulina estimulada por glicose, foi avaliado a secreção estática (acumulativa) de insulina, na qual as ilhotas foram incubadas em solução de glicose suplementada com diferentes compostos, entre eles: a própria Arg (5 mM), L-NAME (5 mM) ou nitroprussiato de sódio (NPS - 100 μ M). Quando as ilhotas pancreáticas isoladas foram incubadas em solução de glicose 5.6 mM, foi observado que nos animais tratados com Arg na dose de 70 mg/ dia (A70) houve aumento da resposta secretória de insulina estimulada por glicose quando comparados com animais dos grupos C e A35 (Figura 4.3A). Quando a Arg (5 mM) foi adicionada à solução glicose 5.6 mM houve redução da secreção de insulina no grupo previamente tratado com Arg na dose de 35 mg/ dia (A35) quando comparado com os grupos C e A70, e redução no grupo A70 em relação ao C (Figura 4.3A). Já quando as ilhotas foram incubadas em solução de glicose 16.7 mM foi observado aumento da resposta secretória de insulina em ambos os grupos tratados com Arg (A35 e A70) *vs* C (Figura 4.3B). Resultado semelhante foi observado ao incubar-se as ilhotas em solução de glicose 16.7 mM suplementada com Arg (5 mM) ou com Arg+L-NAME (5 mM cada), ou seja, houve aumento da secreção de insulina estimulada por glicose nos grupos A35 e A70 *vs* C (Figura 4.3B). Esses últimos resultados corroboram os resultados obtidos anteriormente na secreção dinâmica de insulina, onde também foi demonstrado aumento da secreção deste hormônio nos animais tratados cronicamente com o aminoácido em ambas as doses (Figura 4.2).

4.3A.

4.3B.

Figura 4.3 - Efeito crônico da Arginina sobre a secreção estática de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Ilhotas pancreáticas foram incubadas em solução de glicose 5.6 mM (Figura 4.2A) ou 16.7 mM (Figura 4.2B), associadas ou não a Arg (5 mM), Arg + L-NAME (5 mM cada), L-NAME (5 mM) ou nitroprussiato de sódio (NPS - 100 µM). **(4.3A)** Representação gráfica da secreção estática de insulina (ng/ilhota) em solução de glicose 5.6 mM: * $p < 0.05$ (A70 vs C e A35); + $p < 0.05$ (A35 vs C e A70); **(4.3B)** Representação gráfica da secreção estática de insulina (ng/ilhota) em solução de glicose 16.7 mM: # $p < 0.05$ (A35 e A70 vs C); + $p < 0.05$ (A35 vs C e A70). One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls: - n=12-16 repetições por grupo.

A figura 4.4 ilustra o efeito das diferentes condições experimentais estudadas sobre a

secreção estática de insulina estimulada por glicose, tendo-se como foco principal comparar o efeito dos diferentes compostos (Arg, Arg+L-NAME, L-NAME e NPS) em cada grupo específico.

Nas ilhotas em solução de glicose 5.6 mM incubadas com Arg (5 mM) foi observado que no grupo controle, ao adicionar-se Arg à incubação houve aumento da secreção de insulina, quando comparado com as demais condições (Figura 4.4). O mesmo não foi observado nos animais previamente tratados com Arg (A35 e A70). No entanto, nas ilhotas em solução de glicose 16.7 mM houve redução da resposta secretória de insulina quando adicionado à solução NPS, em todos os grupos estudados (C, A35 e A70) (Figura 4.4B).

Figura 4.4 - Efeito crônico da Arginina sobre a secreção estática de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas. Ratos Wistar receberam Arg (35 mg/ dia: A35 ou 70 mg/ dia: A70) ou não (Controle: C) na água de beber por 30 dias. Ilhotas pancreáticas foram incubadas em solução de glicose 5.6 mM (Figura 4.4A) ou 16.7 mM (Figura 4.4B), associadas ou não a Arg (5 mM), Arg + L-NAME (5 mM cada), L-NAME (5 mM), ou nitroprussiato de sódio (NPS - 100 μ M). **(4.4A)** Representação gráfica da secreção estática de insulina (ng/ilhota) em solução de glicose 5.6 mM: * $p < 0.05$ (Arg vs todas as condições no grupo C); **(4.4B)** Representação gráfica da secreção estática de insulina (ng/ilhota) em solução de glicose 16.7 mM: # $p < 0.05$ (NPS vs todas as condições em todos os grupos). *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas *Student-Newman-Keuls*: $n = 12-16$ repetições por grupo.

8 DISCUSSÃO

O aminoácido Arginina (Arg) desempenha uma importante função na síntese protéica, além de ser o precursor biológico do óxido nítrico, uréia, creatinina, glutamato e poliaminas (Wu e Meininger, 2000; Wu e Morris, 1998). Adicionalmente, a Arg modula a função endócrina, particularmente na hipófise e nas células β -pancreáticas, onde estimula a secreção de GH e insulina, respectivamente. Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que a Arg é uma biomolécula capaz de promover, aguda e cronicamente, a expressão gênica do GH (Adrião et al., 2004; de Castro Barbosa et al., 2006), e ainda quando administrada cronicamente em ratos, na dose de 35 mg/ dia por 30 dias (A35), induz resistência à insulina, caracterizada por normoglicemia, hiperinsulinemia e redução da taxa de decaimento de glicose plasmática/ min (de Castro Barbosa et al., 2006).

O presente estudo teve como finalidade investigar as bases moleculares envolvidas nos efeitos crônicos da suplementação com Arg em ratos e células musculares esqueléticas. Para tanto, este trabalho foi dividido em quatro grandes etapas, nas quais os objetivos específicos foram avaliar: **(Estudo 1)**: os mecanismos moleculares através dos quais a Arg reduz a sensibilidade à insulina nos animais tratados com o aminoácido na dose de 35 mg/ dia por 30, buscando-se caracterizar o envolvimento do GH nesse processo; **(Estudo 2)**: os efeitos da suplementação crônica com Arg em altas doses sobre sensibilidade à insulina em ratos, avaliando-se o papel do óxido nítrico; **(Estudo 3)**: os efeitos da Arg sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas de ratos, com destaque para o papel do NO, e **(Estudo 4)**: os efeitos da Arg sobre a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.

Na primeira etapa deste projeto foram investigados os efeitos da Arg sobre a expressão e atividade de proteínas da via de sinalização da insulina em músculo esquelético, tecido adiposo branco e fígado. Adicionalmente, estudaram-se os efeitos do aminoácido sobre a expressão e translocação do GLUT4, bem como sobre o eixo GH/IGF-I e o envolvimento deste na redução da sensibilidade à insulina observada em nosso trabalho anterior, quando ratos foram tratados com 35 mg/ dia de Arg por 30 dias (de Castro Barbosa et al., 2006).

Ao investigar-se a expressão e a fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, observou-se que, enquanto a fosforilação basal e induzida por insulina do IR permaneceu inalterada, a fosforilação do IRS 1/ 2 e da Akt apresentou-se reduzida no

músculo esquelético, tecido adiposo (TAB) e fígado dos animais tratados com Arg, indicando que o tratamento com este aminoácido prejudicou a via de sinalização da insulina apenas ao nível pós-receptor. Nenhuma alteração foi observada em relação ao conteúdo total do IRS, do IRS1 e da Akt, embora o conteúdo do IRS2 apresentou-se aumentado no músculo esquelético e reduzido no fígado dos animais do grupo A35. Estes resultados estão de acordo com a maioria dos estudos que apontam que o mecanismo molecular responsável pela resistência à insulina nos seus tecidos-alvo encontra-se em uma etapa ao nível pós-receptor (White, 1997). Vale notar que já se observa no fígado dos animais A35 redução da fosforilação basal da Akt (p-Akt Ser⁴⁷³). E após estímulo insulínico a p-Akt apresentou-se cerca de 20-30% reduzida no músculo e TAB no grupo A35 em relação ao controle, e cerca de 50% reduzida no fígado, o que indica que este órgão desempenha um papel importante no desencadeamento da resistência à insulina observada. Este dado também é reforçado pela redução da expressão do IRS2 no fígado dos animais do A35, uma vez que esta é uma proteína-chave para a sinalização da insulina neste tecido (Cho et al., 2006).

Outro fator a ser considerado para o estabelecimento da resistência à insulina neste caso, é que os animais tratados cronicamente com Arg apresentam hiperinsulinemia (de Castro Barbosa et al., 2006), fenômeno que está associado à diminuição da atividade do IRS1 e ao aumento da sua degradação em adipócitos, por exemplo (Zhende et al., 2002). Além disso, a exposição prolongada à insulina tem sido relatada por exacerbar o estado de resistência a este hormônio, uma vez que leva à redução da fosforilação em tirosina do IRS-1, e conseqüentemente, ao aumento da sua fosforilação em serina, o que leva à inibição da atividade da PI3K (Paz et al., 1997). Essas proteínas são essenciais para as sinalizações intracelulares implicadas em várias respostas biológicas da insulina, uma vez que elas estão envolvidas na fosforilação da Akt, na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (MP) e na captação de glicose, principalmente no músculo esquelético e no TAB, bem como na inibição da liberação da glicose hepática (Paz et al., 1997; Zhende et al., 2002).

Como a depuração de glicose na circulação depende principalmente da translocação induzida por insulina de GLUT4 para a MP no músculo e tecido adiposo, onde esta proteína é o principal transportador de glicose (Herman e Kahn, 2006), o próximo passo deste estudo foi avaliar o conteúdo de GLUT4 basal total e inserido na MP, no soleus, EDL e TAB. Como já descrito, no grupo A35 houve redução significativa do conteúdo de GLUT4 inserido na MP, o que sugere um prejuízo na captação de glicose nesses tecidos. Em paralelo, o conteúdo total de GLUT4 também se apresentou reduzido, sobretudo no soleus e TAB, contribuindo para a

diminuição da disponibilidade de GLUT4 na MP, o que parece ser um fator determinante da capacidade dos tecidos-alvo responderem à insulina (Herman e Kahn, 2006; Kern et al., 1990).

Adicionalmente, considerando-se que a insulina exerce um controle direto na tradução, por meio da ativação de fatores eucarióticos de iniciação (eIFs) e alongamento (eEFs) da cadeia peptídica, principalmente, eIF2B, eIF4E e eEF2, espera-se que a instalação da resistência à insulina possa levar à diminuição da síntese protéica, o que explicaria a redução do conteúdo total de GLUT4 observada no músculo soleus e TAB, tecidos onde esta proteína é altamente expressa (Kimball et al., 2002). Esta também pode ter a razão pela qual o efeito da Arg foi menos proeminente no EDL, uma vez que a expressão de GLUT4 é menos acentuada em músculos glicolíticos/rápidos quando comparados com os músculos oxidativos/lentos (Kern et al., 1990).

Até o momento foi demonstrado que o desencadeamento da resistência à insulina nos animais tratados com 35 mg de Arg/ dia por 30 dias baseia-se em alterações na atividade e/ou expressão de proteínas envolvidas na sinalização intracelular da insulina, evidenciando-se, portanto, as bases moleculares desta resistência. O passo final do estudo 1 foi avaliar qual seria o agente determinante deste fenômeno. Um potencial candidato para a resistência à insulina induzida pela suplementação crônica com Arg é o GH, o qual possui sua secreção estimulada por este aminoácido, e o qual apresenta efeitos diabetogênicos amplamente relatados na literatura (Davidson, 1987; Smith et al., 1997). Dessa forma, foi avaliado o efeito do tratamento crônico com Arg sobre a atividade do eixo GH/IGF-I.

Os resultados obtidos mostram aumento da expressão do mRNA do GH, confirmando nossos estudos anteriores (Adrião et al., 2004; de Castro Barbosa et al., 2006), e também aumento do conteúdo de GH hipofisário. Sabe-se que a Arg inibe a liberação de somatostatina pelos neurônios do núcleo periventricular do hipotálamo (Alba-Roth et al., 1988; Ghigo et al., 1994), levando ao aumento dos níveis de AMP cíclico no somatotrofo, o qual ativa a proteína quinase A (PKA), que conseqüentemente, induz a fosforilação de fatores transcricionais específicos da hipófise (como o PIT-1), resultando em alterações na transcrição do gene do GH (Chung et al., 1998). A inibição da secreção de somatostatina mediada pela Arg também pode levar ao aumento do tônus excitatório do GHRH no somatotrofo, o que levaria a maior secreção do GH (Sugihara et al., 1993). Além disso, a Arg pode exercer efeitos diretos sobre a hipófise e induzir a expressão do gene do GH, como demonstrado em estudos in vitro também realizados pelo nosso grupo (Adrião et al., 2004).

Buscando-se confirmar que o GH está realmente sendo secretado nos animais tratados com Arg, foi avaliada a expressão do mRNA do IGF-I hepático, visto que o GH é o mais importante regulador da síntese IGF-I no fígado. Como esperado, foi observado aumento do conteúdo do mRNA do IGF-I hepático no grupo A35, o que confirma os efeitos do aminoácido sobre a secreção de GH. Esses resultados também nos levam a sugerir que os animais tratados com Arg estão expostos a níveis elevados do hormônio e que, portanto, seus efeitos estão sendo pronunciados nos tecidos periféricos, o que poderia estar contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina nos mesmos.

De fato, a ativação da via de sinalização do GH nos tecidos-alvo da insulina foi demonstrada pelo aumento da fosforilação em tirosina da JAK2 no EDL, da STAT3 no TAB e no fígado, e da STAT5 nos músculos esqueléticos, além do aumento do conteúdo da P85- α no soleus. Muitos dos efeitos exercidos pelo GH são mediados pela fosforilação de proteínas ao nível pós-receptor, como JAK2/STATs, sendo que esta via é a mediadora mais importante dos efeitos do hormônio. A P85- α , subunidade regulatória da PI3K, é conhecidamente regulada pelo GH, e seu aumento pode contribuir para o estabelecimento da resistência à insulina. Normalmente, o excesso da P85 livre leva à competição deste monômero com heterodímero P85/P110 aos sítios de fosforilação do IRS, atuando, assim, como um importante regulador negativo da atividade da PI3K (Barbour et al., 2005; del Rincon et al., 2007). O mesmo ocorre com a P55, que embora não tenha sido relada por estar sob o controle do GH, também se apresentou elevada no músculo, TAB e fígado dos animais A35, atuando como mais um fator inibitório da atividade da PI3K (Chen et al., 2004).

A associação do GH ao estabelecimento da resistência à insulina nos animais do grupo A35 é reforçada por outros estudos na literatura que descrevem o desencadeamento deste fenômeno, por exemplo, em animais tratados cronicamente com este hormônio, em camundongos transgênicos que super expressam o GH, e também em pacientes portadores de acromegalia (Cho et al., 2006; Hansen et al., 1986; Smith et al., 1997). Nesses modelos e/ou pacientes com excesso de GH foi demonstrado diminuição da fosforilação em tirosina do IRS1 e de sua associação à PI3K no músculo esquelético, TAB e fígado, tornando esses tecidos resistentes à ação da insulina exógena (Dominici et al., 1999; Nielsen et al., 2008; Smith et al., 1997), o que levaria ao desenvolvimento de resistência a este hormônio.

No entanto, existem evidências marcantes na literatura de que administração enteral ou parenteral de Arg reverte à disfunção endotelial associada a fatores de risco cardiovasculares, como diabetes, obesidade, resistência à insulina, hipertensão, hipercolesterolemia, fumo e

senescência. Esses efeitos parecem decorrer da geração de NO a partir da Arg, o qual promove vasodilatação, melhorando o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o aporte de nutrientes e hormônios aos tecidos periféricos. Perante a essas considerações, formulamos a hipótese de que a suplementação de animais com o dobro da dose de Arg (70 mg/ dia/ 30 dias: grupo A70) poderia reverter o quadro de resistência à insulina observado nos animais suplementados com 35 mg de Arg/ dia, uma vez que levaria a maior formação de NO (Estudo 2).

De fato, os animais do grupo A70 apresentaram melhora da sensibilidade à insulina quando comparados com animais do grupo A35, considerando-se os resultados obtidos na maioria dos parâmetros analisados neste estudo. A % de decaimento de glicose plasmática/min apresentou-se aumentada no grupo A70 vs A35, voltando aos níveis do grupo controle. Adicionalmente, o p-IRS 1/ 2 apresentou-se elevado no soleus e no TAB, embora no EDL e no fígado sua fosforilação não tenha sido superior ao grupo A35. Em relação a p-Akt, esta também se apresentou aumentada no soleus, EDL e TAB dos animais do grupo A70 vs A35, mas no fígado seus níveis permaneceram semelhantes nos dois grupos. O conteúdo do IRS2 também retornou aos níveis dos animais controles no soleus e EDL, onde houve redução, e no fígado, onde houve aumento no grupo A70 vs A35. Finalmente, o conteúdo de GLUT4 total e inserido na MP apresentou-se elevado no grupo tratado com o dobro da dose de Arg atingindo os níveis do grupo controle.

Diante desses resultados, pode-se sugerir que a melhora na atividade de algumas proteínas da via de sinalização da insulina, sobretudo no músculo esquelético e TAB, a maior inserção de GLUT4 na MP, o que conseqüentemente levaria ao aumento da captação de glicose nos tecidos periféricos, foram importantes para restabelecer a sensibilidade à insulina nos animais que receberam a dose mais alta de Arg.

Nos animais do grupo A35 foi demonstrado aumento da atividade do eixo GH/IGF-I, bem como de proteínas da via de sinalização do GH, fenômenos que foram associados ao desencadeamento de resistência à insulina neste grupo. Todavia, os animais do grupo A70 também apresentaram aumento na expressão gênica e protéica do GH, assim como no conteúdo do mRNA do IGF-I hepático e do IGF-I sérico, no entanto, a sensibilidade à insulina neste grupo apresentou-se melhorada em relação ao grupo A35. Embora a secreção de GH esteja ainda mais elevada no grupo A70, as proteínas envolvidas na via de sinalização deste hormônio não estão sendo ativadas a níveis superiores aos do grupo controle. A fosforilação da JAK2 retornou ao nível do grupo controle, apresentando-se reduzida no

soleus, EDL e TAB, e com uma leve tendência à redução no fígado, onde a expressão JAK2 total apresentou-se diminuída em relação ao grupo A35. No caso da expressão das STAT3 e STAT5 foi observado resultado oposto ao do grupo A35; dados que nos levam a sugerir que a manutenção da atividade basal de proteínas via da sinalização do GH está contribuindo para a melhora da sensibilidade à insulina no grupo A70. Além disso, o conteúdo da P85- α também foi restabelecido ao nível do grupo controle; mais um indicativo de que o GH, embora aumentado, não esteja exercendo seus efeitos no sentido de aumentar a expressão desta subunidade regulatória da PI3K, o que está diretamente relacionado com a diminuição da atividade desta proteína e da resposta à insulina nos tecidos periféricos, conforme já elucidado anteriormente.

Paralelamente, outros mecanismos intracelulares, como, por exemplo, a maior geração de NO e, a conseqüente melhora do fluxo sangüíneo, é outro fator que pode estar contribuindo para a melhora da sensibilidade ou o não desenvolvimento de resistência à insulina nos animais suplementados com Arg em dose elevada. Deste modo, foram investigadas alterações sobre o diâmetro e fluxo sangüíneo de vênulas e arteríolas do leito mesentérico. Embora, não tenham sido observadas alterações no diâmetro dos vasos estudados, foi demonstrado aumento do fluxo e da velocidade de fluxo nas arteríolas dos animais do grupo A70, quando comparados com os do grupo A35. O aumento do fluxo sangüíneo nos animais do grupo A70 não foi superior ao do grupo controle, conforme esperado, uma vez que a maior oferta de Arg poderia gerar mais NO, o que favoreceria o aumento do fluxo (Settergren et al., 2008; Pernow et al., 2003). Todavia, é provável que mais NO esteja sendo gerado neste grupo (A70), já que o fluxo e a velocidade de fluxo retornaram ao mesmo padrão do grupo controle quando comparado com o grupo A35.

Ainda buscando-se avaliar o provável papel do NO na melhora da sensibilidade à insulina no grupo A70, foi realizado um teste de tolerância à insulina, no qual os animais receberam, na água de beber, Arg por 30 dias, associada ao L-NAME nos últimos 7 dias de tratamento. Dessa forma, com a inibição da NOS pelo tratamento com L-NAME, esperava-se menor geração de NO a partir da Arg, o que levaria à redução do fluxo sangüíneo, da vasodilatação e, por conseguinte, do aporte de nutrientes, especialmente glicose e insulina, aos tecidos periféricos. Realmente, o tratamento com Arg combinada a L-NAME reduziu % de decaimento de glicose plasmática/ min também nos animais controle e A70, assim como no grupo A35. É importante salientar, que em nosso estudo anterior já havia sido demonstrado redução da taxa de decaimento de glicose plasmática nos animais do grupo A35 vs C e A70

(de Castro Barbosa et al., 2006). Deste modo, esses resultados indicam que o NO é um fator importante para a manutenção do fluxo sanguíneo e do metabolismo de glicose, e que a maior formação de NO a partir de Arg no grupo A70 é um fator que está contribuindo para a melhora da sensibilidade à insulina nos animais deste grupo. Não se pode excluir a possibilidade de que o excesso de NO intracelular gerado no grupo A70, independentemente de alterações relacionadas ao fluxo sanguíneo, possa atuar em vias diferentes das utilizadas pela insulina para promover o aumento da expressão e translocação do GLUT4 nos músculos esqueléticos e TAB (Kaddai et al., 2008; Lira et al., 2007); o que também contribuiria para melhora da sensibilidade à insulina nos animais deste grupo.

É importante destacar que embora não tenha sido observada melhora da sensibilidade à insulina nos animais do grupo A70 em relação ao grupo controle, esta dose de aminoácido parece ser segura e eficiente na indução da secreção do GH, o que faz da Arg um aminoácido potencialmente útil para o tratamento, por exemplo, de crianças portadoras de deficiência na secreção deste hormônio, sem que haja desencadeamento de resistência à insulina, o que provavelmente está sendo compensado pela maior formação de NO. Ainda com o intuito de se investigar o papel do NO na melhora da sensibilidade à insulina, foi elaborado o Estudo 3, no qual avaliou-se o efeito da suplementação crônica, *in vitro*, com Arg sobre o metabolismo de glicose e lipídios em células musculares esqueléticas de rato, o que permitiria a exclusão dos efeitos sistêmicos do GH, e permitiria a confirmação de que o desencadeamento da resistência à insulina observada nos animais tratados cronicamente com Arg na dose de 35 mg/ dia (Estudo 1), foi em razão de um efeito indireto do GH, e não de um efeito direto da Arg.

Nesta etapa foi evidenciado que o metabolismo de glicose e lipídios apresentou-se regulado positivamente nas células musculares esqueléticas submetidas à suplementação crônica com 7 mM de Arg por 6 dias. Ou seja, a Arg induziu ao aumento da captação de glicose e síntese de glicogênio, bem como da oxidação de ácidos graxos quando comparado com o grupo controle (D-Man). Para determinar os mecanismos intracelulares através dos quais a Arg melhorou o metabolismo basal e estimulado por insulina de glicose e lipídios, foram analisados componentes da via de sinalização da insulina e da AMPK. Verificou-se que a Arg promoveu a fosforilação da Akt e a expressão do GLUT4, eventos que poderiam levar ao aumento da inserção de GLUT4 na MP e, conseqüentemente, à captação de glicose e síntese de glicogênio no músculo esquelético (Cheatham e Kahn, 1995; Shepherd, et al., 1998). Além disso, demonstrou-se aumento da fosforilação e expressão da AMPK- α , bem como da fosforilação ACC nas células suplementadas com Arg.

A proteína AMPK é uma quinase serina/treonina que atua como um sensor energético celular e regula uma grande variedade de genes e vias metabólicas, incluindo a captação de glicose e a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético (Mandanno et al., 1987). A ativação da AMPK leva a uma sequência de eventos intracelulares que culminam com a captação e oxidação de substratos importantes para a síntese de ATP e para a diminuição do seu consumo (Long e Zierath, 2006). A ativação da AMPK, induzida por AICAR, por exemplo, aumenta a absorção de glicose (Merrill et al., 1997), em paralelo ao aumento da fusão de GLUT4 na membrana plasmática (Kurth-Kraczek et al., 1999). Além disso, a via da AMPK tem sido implicada na regulação do metabolismo lipídico, por induzir a fosforilação e conseqüente inativação da ACC, o seu alvo a jusante (Long e Zierath, 2006).

Portanto, de acordo com nossos resultados, o aumento da captação de glicose, síntese de glicogênio e oxidação de ácidos graxos induzida pela Arg parece ser mediada pela combinação da ativação da via de sinalização da insulina e da AMPK. Todavia, tem-se relatado amplamente na literatura que muitos dos efeitos da Arg estão associados à formação de NO e, por conseguinte, à ativação do c-GMP (Arnold et al., 1977; Newsholme et al., 2010; Palmer et al., 1988). Além disso, o NO parece regular a expressão do GLUT4 e AMPK em músculo esquelético de rato (Lira et al., 2007), assim como a atividade da AMPK e transporte de glicose no músculo esquelético humano (Deshmukh et al., 2010). A fim de investigar se a via NO/GMP-c estaria implicada nos efeitos da Arg observados neste estudo, as células musculares foram incubadas com L-NAME, e avaliaram-se a formação de nitrito, os níveis de c-GMP e novamente os parâmetros metabólicos. A Arg aumentou os níveis de nitrito e o conteúdo intracelular e total de c-GMP, e a inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) pelo L-NAME suprimiu esses efeitos.

O NO é convertido a nitrito e nitrato em fluidos biológicos e tecidos, e avaliação de seus metabólitos tem sido freqüentemente utilizada como um marcador potencial da sua produção (Kleinbongard et al., 2002). Deste modo, pode-se afirmar, que nesse estudo, o NO foi efetivamente gerado a partir de Arg, uma vez que os níveis de nitrito apresentaram-se elevados no meio de cultivo das células suplementadas com o aminoácido. No entanto, quando o L-NAME foi utilizado, a concentração de nitrito foi significativamente reduzida nas células tratadas com Arg, sugerindo que o NO gerado a partir de Arg foi dependente da atividade NOS. Como esperado, os níveis de nitrito não foram alterados pelo L-NAME nas células tratadas com D-Man e espermina nonoato (SP), o qual é um doador que se dissocia em NO independentemente de processos enzimáticos (Maragos et al., 1991). Nossos resultados

também estão de acordo com estudos anteriores que apontam que o NO exerce seus efeitos aumentando os níveis de c-GMP, o que parece ser em razão da melhora da atividade da guanilato ciclase (Arnold et al., 1977). De fato, nós demonstramos que o tratamento com L-NAME inibiu o aumento da concentração de c-GMP total e intracelular induzido pela Arg. É propício destacar que o L-NAME reduziu os níveis de c-GMP também nas células tratadas com D-Man e SP, o que pode indicar que a produção de NO basal é necessária para garantir a atividade basal da guanilato ciclase. Além disso, demonstramos que o tratamento com L-NAME inibiu a síntese de glicogênio e transporte de glicose induzidos por Arg, confirmando que os efeitos da Arg sobre o metabolismo de glicose são mediados pelo NO/c-GMP.

Outros doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio (NPS), foram descritos por aumentar o transporte de glicose em cultura primária de músculo esquelético humano proveniente de voluntários saudáveis ou portadores de DM2, ressaltando que NO pode ter um efeito terapêutico importante, por aumentar a captação de glicose (Henstridge et al., 2009). Deshmukh et al. (2010) também demonstraram recentemente que a SP melhora o transporte de glicose, aumentando os níveis de c-GMP e a atividade da AMPK- α no músculo esquelético humano, e que agudamente aumenta a síntese de glicogênio e a captação de glicose em células L6. Lira et al. (2007) demonstraram que doadores de NO aumentam o conteúdo do mRNA e proteína GLUT4, através de um mecanismo dependente de c-GMP e AMPK no músculo esquelético, evidenciando que doses baixas de NO aumentam a fosforilação da AMPK e ACC, e a translocação da AMPK para o núcleo, o que levaria a melhora da sensibilidade à insulina. Em contraste, inibidores de NO impedem a ativação da AMPK e expressão do mRNA do GLUT4 (Lira et al., 2007).

Finalmente, nós também demonstramos que a expressão da proteína nNOS estava aumentada em células tratadas com Arg, e que este efeito foi inibido pelo L-NAME. Este resultado indica que o NO pode estimular a expressão da enzima responsável pela sua própria geração, o que para o nosso conhecimento, também foi demonstrado pela primeira vez neste estudo. Sabe-se que a nNOS é a principal isoforma envolvida na ativação da AMPK e na expressão de GLUT4 no músculo esquelético; e que a inibição da NOS interfere com a ativação da sinalização da AMPK (Lira et al., 2007). Adicionalmente, o próprio NO pode estar envolvido na regulação da AMPK e/ou inibição de fosfatases responsáveis pela sua desfosforilação (Lira et al., 2007).

Em resumo, nós demonstramos pela primeira vez que células musculares esqueléticas suplementadas cronicamente com Arg apresentam aumento da captação de glicose, síntese de

glicogênio e oxidação de ácidos graxos, em paralelo ao aumento dos níveis de NO/c-GMP, e da atividade da Akt e AMPK. Entretanto, os efeitos da Arg sobre o metabolismo da glicose e componentes das vias de sinalização da insulina e AMPK foram abolidos após a inibição da NOS pelo L-NAME. Estes dados confirmam nossa hipótese inicial de que a Arg melhora o perfil metabólico no músculo esquelético e que seus efeitos são mediados pela via NO/ c-GMP, e que a resistência à insulina observada no estudo 1, é realmente em razão de um efeito indireto do GH, e não da arginina.

Por fim, no Estudo 4 foi avaliado o efeito do tratamento crônico com Arg sobre a resposta secretória de insulina induzida por glicose, em ilhotas pancreáticas isoladas. Para tanto, os animais foram tratados por 30 dias com 35 ou 70 mg/ dia de Arg (grupos A35 e A70, respectivamente), ou receberam água pura (grupo controle). Foi observado aumento da secreção de insulina estimulado por 16.7 mM de glicose em ilhotas pancreáticas em ambos os grupos tratados com Arg quando comparados com o grupo C. Esses achados são apoiados por dados da literatura que indicam que, em condições adequadas, vários aminoácidos são capazes de promover a secreção de insulina induzida por glicose em células β -pancreáticas (Floyd et al., 1966; Newsholme et al., 2005), e que este efeito é dose-dependente, ou seja, a Arg potencializa a secreção de insulina de acordo com o aumento da dose de glicose (Ishiyama et al., 2005), já que na concentração basal de glicose, a Arg não foi capaz de induzir a secreção insulina. Dentre os vários aminoácidos descritos por estimular a secreção de insulina, a Arg é particularmente destacada por aumentar a atividade elétrica das células β -pancreáticas, uma vez que é carregada positivamente em pH fisiológico, o que diretamente leva à despolarização da membrana plasmática (Henquin e Meissener, 1981; Herchuelz et al., 1984; Smith et al., 1997). Esta despolarização da membrana gerada pela a Arg resulta na ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes e no aumento da concentração intracelular deste íon, levando, portanto, à estimulação da secreção de insulina (Newsholme et al., 2005). A Arg é gradualmente metabolizada nas células β pancreáticas e nenhum dos compostos gerados pelo seu metabolismo, incluindo o NO, parecem exercer um papel positivo na estimulação da secreção de insulina (Ishiyama et al., 2005).

Sabe-se que NO endógeno gerado a partir de Arg parece exercer um papel fundamental numa série de eventos fisiológicos, inclusive sobre a função endócrina. As células β -pancreáticas são capazes de expressar duas isoformas da enzima que converte Arg a NO, a iNOS e a nNOS; e o NO gerado nessas células é um potente modulador negativo da liberação de insulina induzida por glicose. Alguns estudos têm reportado resultados

contraditórios em relação ao aumento da atividade da NOS e, por conseguinte, aumento do NO, sobre a secreção da insulina. Alguns autores observaram que a inativação da NOS inibe a secreção de insulina (Ding e Rana, 1998; Laychock et al., 1991; Schmidt et al., 1992; Spinass et al., 1998), enquanto outros demonstram estimulação (Gross et al., 1995; Panagiotidis et al., 1995; Tsuura et al., 1998) ou nenhum efeito (Jones et al., 1992; Pueyo et al., 1994) sobre a secreção deste hormônio.

Buscando-se investigar o mecanismo pelo qual a Arg estimula a resposta secretória de insulina induzida por glicose, novos estudos foram realizados para se avaliar o envolvimento do NO como mediador dos efeitos da Arg nessas células. As ilhotas dos animais tratados ou não com Arg foram isoladas e incubadas com diferentes compostos (Arg, L-NAME e nitroprussiato de sódio), em solução de glicose 5.6 ou 16.7 mM. Na concentração basal de glicose foi observado aumento da resposta secretória de insulina induzida por Arg apenas no grupo controle, evidenciando o papel potencializador da Arg sobre a secreção de insulina estimulada por glicose (Floyd et al., 1966; Newsholme et al., 2005). Todavia, nos animais previamente tratados com Arg não houve efeito aditivo deste aminoácido sobre a secreção do hormônio quando a Arg foi adicionada às ilhotas incubadas em solução de glicose basal.

Já nas ilhotas incubadas com NPS em solução de glicose 16.7 mM foi observado, em todos os grupos (C, A35 e A70), diminuição da secreção de insulina em relação a todas as outras condições experimentais. Embora o papel fisiológico do NO sobre a secreção de insulina não esteja totalmente esclarecido, e ainda que haja resultados controversos na literatura em relação ao mecanismo pelo qual o NO atua na secreção deste hormônio, alguns estudos demonstram que o bloqueio da NOS com 5 mM de L-NAME eleva a secreção de insulina em resposta à glicose, o que não foi observado em nossos modelos experimentais. O aumento da secreção de insulina induzida por inibição da NOS deve-se à supressão do padrão secretório bifásico de insulina, a qual, neste caso, é aumentada num padrão monofásico. Todavia, na presença de Arg o padrão bifásico é restabelecido, e a secreção de insulina ocorre nos padrões normais (Salehi et al., 1996); e em nossos estudos, quando o L-NAME é associado à Arg, a secreção de insulina segue o padrão da incubação apenas com glicose. Há também evidências na literatura, de que o NO intracelular gerado nas ilhotas a partir de doadores como o NPS suprime a secreção de insulina em resposta à glicose (Salehi et al., 1996), fator claramente observado em nossos experimentos.

Em suma, nesta etapa foi demonstrado aumento da secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de animais tratados previamente com Arg por 30 dias.

O mecanismo pelo qual a Arg induz a secreção de insulina independe da geração de NO, o qual, em excesso, inibe a secreção deste hormônio. Mais estudos referentes aos mecanismos através dos quais aminoácidos como a Arg regulam a secreção de insulina in vivo são extremamente necessários, pois podem revelar novos alvos para avaliação da função das células β pancreáticas (Ozbek et al., 2009), bem como para terapia do DM2 no futuro (Newsholme et al., 2005).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

No presente estudo foram investigadas as bases moleculares envolvidas nos efeitos crônicos da suplementação com o aminoácido Arginina (Arg) em ratos e células musculares esqueléticas. Resumidamente, foi observado que animais tratados cronicamente por via oral com Arg na dose de 35 mg/ dia por 30 desenvolveram resistência à insulina, caracterizada, sobretudo, pela redução da atividade e expressão de proteínas-chave da via de sinalização de insulina, e redução do conteúdo de GLUT4 inserido na membrana plasmática, principalmente no tecido adiposo e no músculo esquelético. Ainda foi evidenciado que o hormônio do crescimento apresenta um papel determinante na gênese desses efeitos. Utilizando-se doses mais elevadas (70 mg de Arg/ dia por 30 dias) do aminoácido, foi demonstrado que a maior geração de NO pela Arg, e a conseqüente melhora do fluxo sanguíneo e do aporte de glicose e insulina aos tecidos periféricos, promoveu a reversão do quadro de resistência à insulina observado quando os animais receberam metade da dose do aminoácido. Além disso, nossos achados ressaltam no grupo A70 a importante função secretagoga da Arg sobre o GH. Ainda reafirmando-se a função do NO, em experimentos *in vitro* com células musculares esqueléticas de rato, foi demonstrado que a Arg estimula o metabolismo de glicose e lipídios, e que seus efeitos são mediados pela via NO/ c-GMP. Finalmente, evidenciou-se que *in vivo* a Arg induz a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas, um mecanismo independente do NO.

Considerando-se estudos anteriores da literatura, que apontam que o NO pode melhorar o metabolismo da glicose em músculo esquelético de ratos e humanos, e que a Arginina é o único precursor biológico do NO, nossos achados *in vitro* indicam que o aminoácido Arg é capaz de melhorar o perfil metabólico no músculo esquelético, o que poderia ser potencialmente benéfico para a terapia de distúrbios metabólicos humanos, tais como obesidade e diabetes tipo 2. Adicionalmente, a Arg potencializa a resposta secretória de insulina induzida por glicose, e a compreensão dos mecanismos pelos quais ela atua, pode levar ao desenvolvimento de um possível alvo para a terapia do DM2. Finalmente, a Arg estimula a secreção de GH, e em dose adequada, pode ser potencialmente eficaz para o tratamento de distúrbios relacionados à deficiência na secreção deste hormônio, sem que haja desenvolvimento de RI, compensando, pela maior formação de NO, o efeito hiperglicemiante negativo gerado pelo próprio GH. Contudo, estudos adicionais são necessários para se determinar a dose adequada para utilização deste aminoácido, bem como seus efeitos *in vivo* em longo prazo, já que ao estimular a secreção de GH pode ocorrer o desencadeamento de resistência à insulina.

REFERÊNCIAS*

- Adrião M, Chrisman CJS, Bielasvsky M, Olinto SCF, Shiraishi EM, Nunes MT. Arginine increases Growth Hormone Gene Expression in Rat Pituitary and GH3 cells. *Neuroendocrinology*. 2004;79:26-33.
- Alba-Roth J, Müller OA, Schopohl J, von Werder K. Arginine stimulates growth hormone secretion by supressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67:1186-9.
- Al-Khalili L, Chibalin AV, Kannisto K, Zhang BB, Permet J, Holman GD, Ehrenborg E, Ding VD, Zierath JR, Krook A. Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: Assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:991-8.
- Allaerts W, Carmeliet P, Denef C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell. Endocrinol*. 1990;7:73-81.
- Appleton J. Arginine: clinical potential of semi- essencial amino. *Altern Med Rev*. 2002;7(6):512-22.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'- cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(8):3203-7.
- Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1997;82:359-63.
- Barbour LA, Mizanoor Rahman S, Gurevich I, Leitner JW, Fischer SJ, Roper MD, Knotts TA, Vo Y, McCurdy CE, Yakar S, Leroith D, Kahn CR, Cantley LC, Friedman JE, Draznin B. Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37489-94.
- Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, Schenke WH, Kirby M, Csako G, Wacławiw MA, Panza JA, Cannon RO. Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation*. 2000a;101(18):2160-4.
- Blum A, Cannon RO, Costello R, Cannon RO, Csako G. Endocrine and lipid effects of oral L-arginine treatment in healthy postmenopausal women. *J Lab Clin Med*. 2000b;135:231-7.
- Carpinelli AR, Picinato MC, Stevanato E, Oliveira HR, Curi R. Insulin secretion induced by palmitate- a process fully dependent on glucose concentration. *Diabetes Metab*. 2002;28:3S37-3S44.
- Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hokfelt T. Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:11292-6.
- Ceccatelli S. Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrinology system. *Brain Res Bull*. 1997;44:533-8.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004;25(5):843-50.

Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995;16(2):117-42.

Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, Fisher SJ, Jozsi A, Goodyear LJ, Ueki K, Kahn CR. p50 α /P55 α phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol*. 2004;24:320-9.

Cho Y, Ariga M, Uchijima Y, Kimura K, Rho JY, Furuhata Y, Hakuno F, Yamanouchi K, Nishihara M, Takahashi S. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology*. 2006;147(11):5374-84.

Chromiak JA, Aantonio J. Use of amino acids as growth hormone-releasing agents by athletes. *Nutrition*. 2002;18(7-8):657-61.

Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE, McCredie R, Robinson J, McCarthy SN. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hipercholesterolemic young adults. *J Clin Invest*. 1996;97:1989-94.

Colao A, Marzullo P, Di-Somma C, Lombardi G. Growth Hormone and the heart. *Clin Endocrinol*. 2001; 54(2):137-54.

Collier SR, Casey DP, Kanaley JA. Growth hormone responses to varying doses of oral arginine. *Growth Hormone e IGF Research*. 2005;15(2):136-9.

Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1992;90:1248-53.

Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*. 1991;254:821-5.

Davidson MB. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev*. 1987;8(2):115-31.

de Castro Barbosa T, Lourenço-Poyares L, Fabres-Machado U, Nunes MT. Chronic oral administration of arginine induces GH gene expression and insulin resistance. *Life Sciences*. 2006;79:1444-9.

de Castro Barbosa T, de Carvalho Nicoletti JE, Poyares LL, Bordin S, Machado UF, Nunes MT. Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. *Endocrinology*. 2009;150(5):2080-6.

Deshmukh AS, Long YC, de Castro Barbosa T, Karlsson HK, Glund S, Zavadski WJ, Gibbs EM, Koistinen HA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 2010;53(6):1142-50.

Ding Y, Rana RS. Nitric oxide does not initiate but potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251:699-703.

Dominici FP, Cifone D, Bartke A, Turyn D. Alterations in the early steps of the insulin signaling system in skeletal muscle of GH transgenic mice. *Am J Physiol*. 1999;277(3 Pt 1):E447-54.

Dominici FP, Turyn D. Growth hormone-induced alterations in the insulin-signaling system. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(3):149-57.

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet*. 1991;338:1546-50.

Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38(4):317-23.

Floyd JC Jr, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J: Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*. 1966;45:1487-502.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakame M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*. 1994;23:1121-31.

Galanzha EI, Tuchin VV, Zharov VP. Advances in small animal mesentery models for in vivo flow cytometry, dynamic microscopy, and drug screening. *World J Gastroenterol*. 2007;13(2):192-218.

Ghigo E, Bellone J, Mazza E, Imperiale E, Procopio M, Valente F, Lala R, De Sanctis C, Camanni F. Arginine potentiates the GHRH- but not the pyridostigmine-induced GH secretion in normal short children. Further evidence for a somatostatin suppressing effect of arginine. *Clin Endocrinol*. 1990;32:763-7.

Ghigo E, Ceda GP, Valcavi R, Goffi S, Zini M, Mucci M, Valeni G, Cocchi D, Muller EE, Camani E. Low doses of either intravenously or orally administered arginine are able to enhance growth hormone response to growth hormone releasing hormone in elderly subjects. *J Endocrinol Invest*. 1994;17:113-7.

Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Ribes G: Alterations of insulin response to different beta cell secretagogues and pancreatic vascular resistance induced by N omega-nitro-L-arginine methyl ester. *Br J Pharmacol*. 1995;116:1965-72.

Hansen I, Tsalikian E, Beaufrere B, Gerich J, Haymond M, Rizza R. Insulin resistance in acromegaly: defects in both hepatic and extrahepatic insulin action. *Am J Physiol*. 1986;250(3 Pt1): E269-73.

Henquin JC, Meissner HP. Effects of amino acids on membrane potential and $^{86}\text{Rb}^{+}$ fluxes in pancreatic β -cells. *Am J Physiol*. 1981;240:E245-52.

Henstridge DC, Drew BG, Formosa MF, Natoli AK, Cameron-Smith D, Duffy SJ, Kingwell BA. The effect of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on glucose uptake in human primary skeletal muscle cells. *Nitric Oxide*. 2009;21:126-31.

Herchuelz A, Lebrun P, Boschero AC, Malaisse W J. Mechanism of arginine-stimulated Ca^{2+} influx into pancreatic β cell. *Am J Physiol*. 1984;246:E38-E43.

Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest*. 2006;116:1767-75.

Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:252-7.

Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes*. 2001;50:241-7.

Ishiyama N, Ravier MA, Henquin JC. Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E540-9.

Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1987; 84:6369-73.

Jones PM, Persaud SJ, Bjaaland T, Pearson JD, Howell SL. Nitric oxide is not involved in the initiation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1992; 35:1020-7.

Kaddai V, Gonzalez T, Bolla M, Le Marchand-Brustel Y, Cormont M. The nitric oxide-donating derivative of acetylsalicylic acid, NCX 4016, stimulates glucose transport and glucose transporters translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(1):E162-9.

Kern M, Wells JA, Stephens JM, Elton CW, Friedman JE, Tapscott EB, Pekala PH, Dohm GL. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (GLUT4) protein level. *Biochem J*. 1990;270:397-400.

Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol*. 2002;93(3):1168-80.

Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein-containing samples. *Methods Enzymol*. 2002;359:158-168.

Kovacs K, Horvath E. Tumors of the pituitary gland: atlas of tumor pathology. 2nd ed. Washington: Armed Forces Institute of pathology; 1986.

Kurth-Kraczek E, Hirshman M, Goodyear L, Winder W. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*. 1999;48:1667-71.

Laychock SG, Modica ME, Cavanaugh CT. L-arginine stimulates cyclic guanosine 3,5-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology*. 1991;129:3043-52.

Lira VA, Soltow QA, Long JH, Betters JL, Sellman JE, Criswell DS. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):E1062-8.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 2006;116:1776-83.

Lussier BT, French MB, Moor BC, Kraicer J. Free intracellular Ca^{2+} concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology.* 1991;128:592-603.

Mandanno LJ, Wright KS, Verity LS, Nichols J, Bell JM, Kolterman OG, Beck-Nielsen H. Effects of insulin infusion on human skeletal muscle pyruvate dehydrogenase, phosphofructokinase, and glycogen synthase: Evidence for their role in oxidative and nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Invest.* 1987;80(3):655-63.

Maniats T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Maragos CM, Morley D, Wink DA, Dunams TM, Saavedra JE, Hoffman A, Bove AA, Isaac L, Hrabie JA, Keefer LK. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem.* 1991;34(11):3242-7.

Marcell TJ, Taaffe DR, Hawkins SA, Tarpenning KM, Pyka G, Kohlmeier L, Wiswell RA, Marcus R. Oral arginine does not stimulate basal or augment exercise-induced GH secretion in either young or old adults. *J Gerontol A Biol Sci Med.* 1999;54(8):395-9.

McKnight JR, Satterfield MC, Jobgen WS, Smith SB, Spencer TE, Meininger CJ, McNeal CJ, Wu G. Beneficial effects of L-Arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids.* 2010;39:349-57.

Merimee TJ, Lillicrap DA, Rabinowitz D. Effect of arginine on serum levels of human growth hormone. *Lancet.* 1965;2:668-70.

Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1997;273:E1107-12.

Mitumoto Y; Klip A. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT 1 e GLUT 4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscles cells. *J Biol Chem.* 1992;267:4957-62.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine–nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.

Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr.* 2004;134(10):2820S-25S.

Mori RC, Hirabara SM, Hirata AE, Okamoto MM, Machado UF. Glimepiride as insulin sensitizer: increased liver and muscle responses to insulin. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10(7):596-600.

- Morris SM Jr. Arginine Metabolism: Boundaries of our knowledge. *J Nutr.* 2007;137(6):1602S-9S.
- Morris SM Jr. Arginine: beyond protein. *Am J of Clin Nutr.* 2006;83:508S-512S.
- Murracy RK, Mayer PA, Rodwell VW. Harper - Bioquímica. 7th ed. Cap. 4. São Paulo: Ateneu; 1994.
- Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2005;108(3):185-94.
- Newsholme P, Homem De Bittencourt PI, O' Hagan C, De Vito G, Murphy C, Krause MS. Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide. *Clin Sci (Lond).* 2010;118(5):341-9.
- Nielsen C, Gormsen LC, Jessen N, Pedersen SB, Møller N, Lund S, Jørgensen JO. Growth hormone signaling in vivo in human muscle and adipose tissue: impact of insulin, substrate background, and growth hormone receptor blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2842-50.
- Ozbek M, Erdogan M, Karadeniz M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Yilmaz C, Tuzun M. Evaluation of beta cell dysfunction by mixed meal tolerance test and oral L-arginine in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009;117(10):573-6.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
- Panagiotidis G, Akesson B, Rydell EL, Lundquist I. Influence of nitric oxide synthase inhibition, nitric oxide and hydroperoxide on insulin release induced by various secretagogues. *Br J Pharmacol.* 1995;114(2):289-96.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997;272: 29911-8.
- Pernow J, Bohm F, Beltran E, Gonon A. L-arginine protects from ischemia-reperfusion-induced endothelial dysfunction in humans in vivo. *J Appl Physiol.* 2003;95(6):2218-22.
- Pieper GM, Siebeneich W, Dondlinger LA. Short-term oral administration of L-arginine reverses defective endothelium-dependent relaxation and c-GMP generation in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 1996;317:317-20.
- Pueyo ME, Gonzalez W, Pussard E, Arnal JF: Insulin secretion in rats with chronic nitric oxide synthase blockade. *Diabetologia.* 1994;37:879-84.
- Ross JJ. Growth Hormone, Cardiomyocyte Contractile and Heart Failure. *Circulation.* 1999;99:15-17.
- Rune A, Salehzadeh F, Szekeres F, Kuhn I, Osler ME, Al-Khalili L 2009 Evidence against a sexual dimorphism in glucose and fatty acid metabolism in skeletal muscle cultures from age-matched men and post-menopausal women. *Acta Physiol.* 2009;197:207-15.

Schmidt HH, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F: Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science*. 1992;255:721-3.

Sener A, Best LC, Yates AP, Kadiata MM, Olivares E, Louchami K, Jikli H, Ladrière L, Malaisse WJ. Stimulus–secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison between the cationic amino acid and its methyl ester. *Endocrine*. 2000;13:329-40.

Settergren M, Böhm F, Malmström RE, Channon KM, Pernow J. L-Arginine and tetrahydrobiopterin protects against ischemia/reperfusion-induced endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2008;204(1):73-8.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3–L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J*. 1995;305:25-8.

Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, Ashcroft FM. Electrogenic arginine transport mediates stimulus–secretion coupling in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol*. 1997;499:625-35.

Smith TR, Elmendorf JS, David TS, Turinsky J. Growth hormone induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1 and GLUT-4. *Am J Physiol*. 1997;272(6 Pt1):E1071-9.

Spinass GA, Laffranchi R, Francoys I, David I, Richter C, Reinecke M. The early phase of glucose-stimulated insulin secretion requires nitric oxide. *Diabetologia*. 1998;41:292-9.

Sugihara H, Minami S, Okada K, Kamegai J, Hasegawa O, Wakabayashi I. Somatostatin reduces transcription of the growth hormone gene in rats. *Endocrinology*. 1993;132:1225-9.

Tanasijevic MJ, Myers MG Jr., Thomas RS, Crimmins DL, White MF, Sacks DB. Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II, *J Biol Chem*. 1993;268:18157-66.

Tessari P, Cecchet D, Cosma A, Vettore M, Coracina A, Million R, Iori E, Puricelli L, Avogaro A, Vedovato M. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with Type 2 Diabetes and nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(9):2152-9.

Thams P, Capito K. L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide. *Eur J Endocrinol*. 1999;140:87-93.

Tsuura Y, Ishida H, Shinomura T, Nishimura M, Seino Y: Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252:34-8.

Villalobos C, Núñez L, Garcia-Sancho J. Mechanisms for stimulation of rat anterior pituitary cells by arginine and other amino acids. *J Physiol (Lond)*. 1997;502:421-31.

Wascher TC, Graier WF, Dittrich P, Hussain MA, Bahadori B, Wallner S, Toplak H. Effects of low-dose L-arginine on insulin-mediated vasodilatation and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest*. 1997;27:690-5.

White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*. 1997;40(2):S2-S17.

Windmuller HG, Spaeth AE. Metabolism of absorbed aspartate, asparagines, and arginine by rat small intestine in vivo. *Arch Biochem Biophysics*. 1976;175(2):670-6.

Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009;37(1):1-17.

Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Jobgen WS, Kim SW, Lassala A, Li P, Matis JH, Meininger CJ, Spencer TE. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J Nutr*. 2007;137(6 Suppl 2):1673S-80S.

Wu G, Meininger CJ. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutri*. 2000;130(11):2626-9.

Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998;336:1-17.

Yonemitsu S, Nishimura H, Shintani M, Inoue R, Yamamoto Y, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Hayashi T, Nakao K. Troglitazone induces GLUT 4 translocation in L6 myotubes. *Diabetes*. 2001;50:1093-101.

Zandhe R, Mitchell JJ, Wu J, Sun XJ. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol*. 2002;22:1016-26.

Zweifach BW. Indirect methods for regional blood flow. Microscopic observation of circulation in rat mesoappendix and dog omentum. Use in study of vasotropic substances. *Methods Med Res*. 1948; 1:131-8.