UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeitos da suplementação crônica de L- Arginina sobre a expressão de proteínas envolvidas na regulação da síntese proteica muscular em ratos treinados em exercício de alta intensidade

Mariana de Rezende Gomes

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeitos da suplementação crônica de L- Arginina sobre a expressão de proteínas envolvidas na regulação da síntese proteica muscular em ratos treinados em exercício de alta intensidade

Versão corrigida encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF-USP

Mariana de Rezende Gomes

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G633e	<p>Gomes, Mariana de Rezende</p> <p>Efeitos da suplementação crônica de L-arginina sobre a expressão de proteínas envolvidas na regulação da síntese protéica muscular em ratos treinados em exercício de alta intensidade / Mariana de Rezende Gomes. -- São Paulo, 2013. 107p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Tirapegui Toledo, Julio Orlando</p> <p>1. Esporte : Nutrição 2. Proteína : Metabolismo I. T. II. Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.</p> <p>641.1 CDD</p>
-------	---

Mariana de Rezende Gomes

Efeitos da suplementação crônica de L- Arginina sobre a expressão
de proteínas envolvidas na regulação da síntese proteica muscular
em ratos treinados em exercício de alta intensidade

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
1º Examinador

Prof. Dr. José Donato Júnior
2º Examinador

Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca
3º Examinador

Profa. Dra. Lísia de Melo Pires Kiehl
4º Examinador

São Paulo, 12 de abril de 2013.

Dedico esta Tese ao meu amado e saudoso paizinho, que foi nesta vida muito mais que um pai, foi meu amigo, meu exemplo, meu incentivador, meu admirador, meu norte.

"As melhores e mais lindas coisas do mundo não se pode ver, nem tocar. Elas devem ser sentidas com o coração. Não devemos ter medo dos confrontos. Até os planetas se chocam e do caos nascem as estrelas. Não se mede o valor de um homem pelas suas roupas ou pelos bens que possui, o verdadeiro valor do homem é o seu caráter, suas ideias e a nobreza de seus ideais."

Charles Chaplin

Agradecimentos

Tenho muito a agradecer, pois nunca trabalhamos sozinhos, sem a parceria direta ou indireta das pessoas com as quais convivemos não chegamos à lugar algum, não aprendemos, não evoluímos e não preenchemos nossas vidas de momentos felizes.

Agradeço primeiramente à Deus pela oportunidade de mais um ciclo de aprendizado, com toda a sua proteção e generosidade.

Aos queridos amigos espirituais, meus companheiros de jornada que me intuíram, me guiaram, me consolaram nos momentos de abatimento e cansaço extremo e também vibraram junto comigo nos momentos de alegria e sucesso.

Agradeço ainda à Deus por ter colocado no meu caminho tantas pessoas especiais que trouxeram seus sorrisos, seus abraços, suas experiências e também seus problemas para que me dessem a oportunidade de ajudar e crescer.

De todas essas pessoas, quero encabeçar a lista pelo ser humano que mais me toca o coração quando penso em gratidão, meu pai, Almério de Castro Gomes. Neste momento peço licença para quebrar o protocolo nesta parte do trabalho ao me referir à ele.

Meu pai, não sei se conseguirei achar palavras para defini-lo ou mesmo demonstrar quão profundo é o meu amor por ele e minha gratidão, mas posso tentar começar dizendo que sou hoje o fruto de tudo o que ele me ensinou. Moço pobre, vindo do Piauí para estudar no Rio de Janeiro, se formou em Farmácia e começou sua vida firmando uma sociedade de um laboratório de Análises Clínicas em Londrina – PR, onde nasci, mas se apaixonou pela vida acadêmica e logo veio se aventurar na dura e competitiva São Paulo da década de setenta/oitenta (porém ainda menos do que hoje...). Às custas de muita luta, venceu todos os preconceitos, as adversidades e se impôs pela sua competência e seu brilhantismo. Trilhou com fervor e idealismo a difícil vida acadêmica e chegou ao patamar maior que um professor universitário almeja em sua carreira. Tornou-se Professor Titular da área de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, teve um mosquito batizado com seu nome, foi referência em doenças tropicais no Brasil, disputado e homenageado por centenas de vezes. Contudo, nada disso adiantaria se ele não carregasse consigo a simplicidade e a alegria que lhe eram tão notáveis e encantadoras. A vida para ele era simples como fazer tapioca (que ele fazia incomparavelmente) e pura alegria como um bom arrasta pé no chão do Piauí. Como pai, foi perfeito, presente mesmo distante devido às muitas viagens, incentivador, apoiador incondicional, digo que comprava todas as minhas idéias (mesmo as mais malucas... sem reclamar um só instante). Vibrava com a nossa alegria, era um porto seguro, uma fortaleza, um pai que eu sempre soube que poderia contar à despeito de qualquer distância ou entrave. De poucas palavras, muitas vezes, mas de muitos ensinamentos, pois não dizem

que aprendemos com os exemplos e não com os conselhos? Ele foi sem dúvida o meu exemplo, o homem que me ensinou a ser forte e lutar pelo que desejo. Trago na veia a sua paixão pela vida acadêmica, e a lembrança do brilho em seus olhos pelo orgulho de eu ter seguido os seus passos. Apesar de, por muito pouco, não tê-lo fisicamente aqui neste momento, sei que está em espírito vibrando com mais essa conquista da minha vida, cujo sabor era bastante conhecido para ele. Hoje ele vive no meu coração e nas minhas doces lembranças até que um dia possamos nos encontrar novamente na verdadeira Pátria do nosso espírito, de onde faremos novos planos para outras jornadas em vestes diferentes, mas sempre juntos. Obrigada meu pai por tudo, eu amo você sempre!

À minha mãe que sempre esteve na torcida, me ajudando e me apoiando no que eu precisasse e não se continha em contar com orgulho a quem passasse o que eu fazia, mesmo que a todo instante me perguntasse: “Qual é mesmo o tema da sua tese filha? Ai que coisa difícil, essas proteínas precisam ter esses nomes tão complicados? Você jura que entende isso???”

Ao meu filho Lucas, que sempre me recompensou com seu amor espontâneo, me aguardava com sua alegria pura e incansável de criança a despeito das minhas ausências, fazendo com isso, o recarregar de minhas baterias. Fazia-me rir com suas histórias, aquecia meu coração com seus desenhos e me fazia sentir a pessoa mais importante do mundo. O amor entre mãe e filho é algo sublime e divino que faz valer cada segundo da vida.

À minha outra filhinha, amada Andreinha! Uma filha que chegou para mim com 18 anos (pulando as etapas mais árduas da maternidade... ufa!) e que mais cuidou de mim do que eu cuidei dela, foi meu braço direito e esquerdo no laboratório. Alegre, engraçada, espirituosa, determinada, interessada, inteligente, madura, e muito, mas muito eficiente, meu Deus como ela pode ser tão competente com tão pouca idade ?!?!?!?! Não tinha “tempo quente” com nada, agüentou minhas confusões, minha bagunça e meus lapsos com extremo bom humor e carinho, e digo com certeza, ela me salvou de um curto circuito!!!!!!!!!!!! Faltam palavras para definir o quanto ela é especial para mim e quão imenso é meu amor por ela! Você foi um presente na minha vida filhinha!

Ao meu irmão e à Carolzinha por fazerem parte da minha vida de forma tão alegre e companheira.

Ao professor Julio que sempre acreditou e confiou em mim, me conhece desde que eu tinha 23 anos, inexperiente brincando de fazer pesquisa... tudo que aprendi aqui, devo à ele e jamais esquecerei suas lições, seus conselhos e também suas brincadeiras. Obrigada professor por me aceitar mais uma vez em seu laboratório, me orientar e acreditar em mim.

À minha querida amiga Ivanir que me auxilia desde o mestrado com dedicação, parceria e lealdade. Amiga, confidente, verdadeira, um coração e um colo de mãe que jamais esquecerei.

Ao meu amado amigo Marcelo Rogero, que além de dividir comigo inúmeras histórias desde o mestrado, me ajudou no delineamento deste estudo. Rapaz inteligente, dedicado, generoso, brilhante e simples. Tenho muita admiração por ele e me sinto imensamente feliz de ter sua amizade sincera e desprendida.

Ao querido amigo Jonas que se desprendeu para me ajudar no início do trato com os animais, foi o treinador dos primeiros animais, me ajudou a confeccionar os pesos e criar uma rotina, a relembrar tudo... e ainda me proporcionou muitos momentos alegres e ternos.

Ao amigo Léo do Piauí que me recebeu com alegria no laboratório, me deu a letra do treino de saltos dos animais que alguns malucos faziam em Rio Claro... e me dava muito carinho a cada vez que nos encontrávamos.

Ao amigo Rodrigo Dalla, doutorando da Escola de Educação Física da UNESP de Rio Claro e à professora Eliete que me receberam em sua Universidade e me ensinaram a lidar com este protocolo de treinamento tão inusitado e delicado...

À Silvânia e Flávia, bioteristas da FCF-USP cuja participação foi essencial para aquisição e atenção aos animais durante o experimento.

À profa. Carla do ICB que dispôs do seu tempo apertado para me ajudar na análise da IRS-1.

Ao amigo Mário Filho, aluno de doutorado da profa. Carla do ICB que me ajudou com sua experiência em western blot e a via da insulina.

À amiga Gabi que me auxiliou com a elaboração das rações, me lembrando o jeito como fazíamos no laboratório e também em muitas outras etapas na lida com os animais.

Ao amigo Emídio por ter me ajudado muito em todas as etapas do trabalho e ainda ter proporcionado muitos momentos divertidos.

Ao amigo Lucas Pantaleão que me auxiliou nos procedimentos de infusão de insulina, coleta de tecidos e nos primeiros passos do western blot.

Ao amigo Johnny por ter me socorrido nas análises estatísticas e ter sido um bom amigo nos momentos que estávamos fazendo aqueles inúmeros intervalos obrigatórios do western blot...

Ao meu amigo Fernando por me auxiliar nas análises de uréia e creatinina e pelas sugestões valiosas quanto à minha metodologia.

As minhas amigas de laboratório, Tati Mieko, Moniquinha, Marina, Pati (as "marceletes"), Tati de Paula, Michele, Mari e Lu japa pelas parcerias e momentos divertidos.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, Jana, Rafa, Bárbara, Alê e Chuca, pela alegre convivência!

Aos meus queridos mestres, os professores que conduziram brilhantemente as disciplinas tão importantes para minha formação.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela concessão dos laboratórios e equipamentos.

À Ajinomoto Ltda. pela doação fundamental dos aminoácidos utilizados aqui.

À FAPESP pela concessão do financiamento com Auxílio Pesquisa nº 2009/53353 fundamentais à realização deste projeto.

Aos outros meus colegas de trabalho nas Faculdades particulares que dividiram comigo esse período difícil me ajudando, me cobrindo, me dirigindo palavras de incentivo e também rindo comigo em muitos momentos descontraídos. Desses, destaco aqueles que levo no coração: Pri Chasseraux, Tati Alvarez, Katya, Bia, Vera, Aline, Narja, Adriano, Amadeu, Suzy, Rê Mendes, Henrique, Lili, Fê, Marlene, Karina, Julia e Ju Shibao.

Aos meus alunos queridos, pelos momentos divertidos nas aulas, pelo carinho e por compreenderem meu estado deplorável lá pelas tantas horas da noite...

À Nice pela amizade e o cuidado carinhoso com meu filho Lucas nos meus momentos de ausência.

À Lurdinha pelo delicioso café e momentos de conversa e descontração.

Aos amigos das secretarias: Edilson, Monica, Cléo, Roberta, Miriam, Irineu, Jorge e Elaine pela prestatividade e auxílio no que precisei.

Aos membros da minha Banca Examinadora Profa. Dra. Silvia Cozzolino, Profa. Dra. Lísia Kiehl, Prof. Dr. José Donato Júnior e Prof. Dr. Fernando Fonseca pelas valiosas considerações e discussões.

Aos ratinhos brancos, tão lindos... que treinaram fortemente ou dormiram demasiadamente... mas no fim doaram (contra vontade, vamos deixar claro) suas vidas para minha pesquisa...

E por último, mas não menos importante, Ao meu amor, Marcelo Pais, que chegou em meio à toda a turbulência da fase final do doutorado para alegrar meu coração e dividir os meus anseios, os meus dilemas (com a paciência de um Buda) e também as minhas conquistas. De companheiro de corridas passou a ser meu companheiro na vida, um homem generoso, leal e amoroso com quem quero compartilhar todos os meus planos futuros (e olha que ainda são muitos...)

A todos o meu mais sincero **OBRIGADA** do fundo do meu coração!

Resumo

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA DE L- ARGININA SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA MUSCULAR EM RATOS TREINADOS EM EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE.

A arginina é um aminoácido condicionalmente essencial que participa de inúmeras reações metabólicas no organismo como, por exemplo, o ciclo da uréia, a síntese de creatina e a geração de óxido nítrico (NO). Além dessas funções a arginina é associada, com a sensibilidade à insulina, a secreção de GH e mais recentemente com a síntese protéica muscular. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da suplementação via oral crônica de L-arginina sobre a síntese protéica muscular, pela via da mTOR, a fim de contribuir com as novas discussões científicas acerca deste aminoácido de ampla atuação. Métodos: Foram utilizados ratos wistar machos adultos com cerca de 200g de peso corporal divididos em quatro grupos de quatorze animais denominados na seguinte forma: Arginina Treinado (AT), Arginina Sedentário (AS), Dieta-Controle Treinado (CT) e Dieta-Controle Sedentário (CS). Ambas as dietas foram elaboradas com base das recomendações da AIN-93, sendo que a dieta enriquecida com arginina recebeu acréscimo de 2% deste aminoácido e a dieta controle recebeu um mix de aminoácidos não essenciais para garantir que ambas fossem isonitrogenadas e isocalóricas e as proporções de aminoácidos presente nas rações foi conferida por aminograma. O treinamento dos animais consistiu em exercício anaeróbio com sessões que eram compostas de 4 séries de 10 saltos com um minuto de descanso entre estas em tanque de água. Os saltos eram desempenhados com carga de 50% do peso corporal acoplado ao tórax dos animais na frequência de 5 dias por semana por 6 semanas. A evolução da massa corporal dos animais bem como o consumo de ração foram avaliadas três vezes por semana e estimada uma média semanal. Foram realizados testes de tolerância oral à glicose (OGTT) e tolerância à insulina (ITT) no início e ao final do experimento em todos os animais para avaliar alterações na sensibilidade à insulina. Após 72hs da última sessão de treinamento os animais foram anestesiados para infusão de insulina, coleta dos músculos gastrocnêmio e plantar, fígado, sangue e eutanasiados conforme protocolo aprovado pelo CEA-USP. As análises bioquímicas foram determinações séricas de insulina, GH, IGF-1 e a proteína transportadora de IGF-1 (IGFBP-3), glicose plasmática, uréia e creatinina séricas, IGF-1 muscular e hepático por kits comerciais de tecnologia multiplex Luminex e aminograma sérico por cromatografia. As análises moleculares foram realizadas para as proteínas chaves envolvidas na via de síntese protéica muscular em sua forma total e fosforilada, sendo estas: IRS-1, Akt, mTOR, 4E-BP1 e p70S6K determinadas por método de western blotting. Resultados: Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados com exceção da creatinina que se mostrou mais elevada nos grupos suplementados com arginina. A suplementação de arginina, nas concentrações administradas, bem como o exercício de alta intensidade pelo período determinado não foram capazes de alterar a expressão das proteínas envolvidas na regulação de síntese protéica muscular de ratos nem a sensibilidade celular à insulina. Conclusão: não houve aumento da síntese protéica muscular com a suplementação de arginina, nestas condições experimentais.

Palavras –chave: Arginina, síntese protéica, exercício, GH, IGF-1, mTOR.

Abstract

EFFECTS OF CHRONIC SUPPLEMENTATION OF L-ARGININE ON THE EXPRESSION OF PROTEINS INVOLVED IN THE REGULATION OF MUSCLE PROTEIN SYNTHESIS IN MUSCLE OF TRAINED RATS IN HIGH-INTENSE EXERCISE.

The arginine is an amino acid conditionally essential that participates in innumerable metabolic reactions in the body like, for instance, the urea cycle, the synthesis of creatine and production of nitric oxide (NO). Besides those functions the arginine is associated, with the insulin sensitivity, GH secretion and most recently with muscle protein synthesis. The aim of this work was to investigate the effect of L-arginine chronic oral supplementation on the muscle protein synthesis, through mTOR pathway, in order to contribute with new scientific discussions about this broad action amino acid. Methods: Wistar male adult rats were used with about 200g body weight distribute into four groups of fourteen animals named this way: Trained Arginine (TA), sedentary Arginine (SA), Trained Diet-Control (TC) and Sedentary Diet-control (SC). Both diets were elaborated based on the AIN-93 recommendations, considering that the enriched diet with arginine was added 2% of this amino acid and the control diet received a mix of non-essential amino acid in order to ensure that both were isonitrogenous and isocaloric and the proportions of present amino acids in the rations have been checked through aminogram. The animals training consisted of anaerobic exercise with sections composed by four jump series, with one minute rest among these in a PVC cube water. The jumps were performed with a load of 50% of their body weight attached in the animal's trunk, five days a week over six weeks. The animals' body weight evolution as well as the food intake were evaluated three times a week in order to figure a weekly average. Oral glucose test tolerance (OGTT) and insulin test tolerance (ITT) have been done in the beginning and in the end of the experiment in all animals to evaluate insulin sensitive changes. The animals were anesthetized to insulin infusion, gastrocnemius and plantaris muscles, liver and blood collects 72 hrs after the last training section and afterwards sacrificed according to CEA-USP approved protocol. The biochemical analysis were blood determination of insulin, GH, IGF-1 and its binding protein 3 (IGFBP-3), glucose, urea and creatinine, and muscle and liver IGF-1 through commercial kits of multiplex Luminex technology and seric aminogram through chromatography. The molecular analysis were performed for the key proteins of the muscle protein synthesis pathway in its total and phosphorylated form: IRS-1, Akt-1, mTOR, 4E-BP1 and p70S6K determined by western blotting method. Results: Significant statistical differences were not found to all evaluated biomarkers in this experiment except for creatinine which was more elevated in groups supplemented with arginine. The arginine supplementation, in these given doses, as well as the high-intense exercise, failed in stimulate both the expression of the proteins involved in the muscle protein synthesis regulation and the insulin sensitivity in the rats in this condition. Conclusion: There hasn't been any increase in the muscle protein synthesis with arginine supplementation, in these experimental conditions.

Key words: Arginine, protein synthesis, exercise, GH, IGF-1, mTOR.

Lista de Figuras

Figura 1.	Estrutura química da Arginina.	24
Figura 2.	Síntese endógena de Arginina.	26
Figura 3.	Principais rotas metabólicas da Arginina.	26
Figura 4.	Estímulo ao complexo mTORC1 pela via PI3-K-PKB-mTOR.	36
Figura 5.	Estímulo à síntese protéica e à proliferação celular pelos fatores de crescimento.	37
Figura 6.	Demonstração da mochila para acoplar a carga ao corpo do animal para o treinamento de saltos em tanque de água.	44
Figura 7.	Modelo de cuba de água em PVC para natação de ratos.	45
Figura 8.	Esquema da divisão dos grupos no momento da eutanásia para coleta dos tecidos e sangue	46
Figura 9.	Valores de massa corporal por semana.	58
Figura 10.	Consumo de ração médio.	59
Figura 11.	Área sobre a curva (ASC) de glicemia após administração de glicose via gavagem antes do início do experimento (OGTT inicial)	60
Figura 12.	Área sobre a curva (ASC) de glicemia após administração de glicose via gavagem antes do início do experimento (OGTT final)	61
Figura 13.	Taxa de decaimento da glicemia em % ^{min-1} após administração de insulina antes do início do experimento (Kitt inicial)	62
Figura 14.	Taxa de decaimento da glicemia em % ^{min-1} após administração de insulina ao final do experimento (Kitt final).	62
Figura 15.	Valores de IRS-1 (substrato do receptor de insulina – 1) totais	67
Figura 16.	Valores de IRS-1 (substrato do receptor de insulina – 1) fosforilado em resíduos de Tyr ⁶¹²	68
Figura 17.	Valores da proteína Akt totais.	69
Figura 18.	Valores de Akt fosforilada em resíduos de Tre ³⁰⁸	70
Figura 19.	Valores Akt fosforilada em resíduos de Ser ⁴⁷³	71
Figura 20.	Valores da mTOR totais.....	72
Figura 21.	Valores da mTOR fosforilada em resíduos de Ser ²⁴⁴⁸	73

Figura 22.	Valores de 4E-BP1 totais	74
Figura 23.	Valores de 4E-BP1 fosforilados em resíduos de Thr ⁷⁰	75
Figura 24.	Valores de p70S6K (proteína-70 ribossomal S6 quinase) totais.....	76
Figura 25.	Valores de p70S6K (proteína-70 ribossomal S6 quinase) fosforilada em resíduos de Thr ³⁸⁹	77

Lista de quadros

Quadro 1.	Protocolo de treinamento adaptado de Rogatto (2001)	44
-----------	---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Composição das dietas Controle e Arginina para o experimento.	42
Tabela 2.	Composição do mix de aminoácidos não essenciais utilizados na ração controle do experimento.	42
Tabela 3.	Componentes dos tampões frio e quente utilizados para extração de proteínas da amostra.	52
Tabela 4.	Quantidades médias consumidas de proteína e energia proporcionais ao consumo médio de ração em g por 100g de peso dos animais.	59
Tabela 5.	Aminograma das rações experimentais.	64
Tabela 6.	Concentrações sérica de arginina e dos aminoácidos utilizados no mix de aminoácidos essenciais na ração dos animais.	65
Tabela 7.	Perfil hormonal sérico e tecidual dos grupos experimentais.	66
Tabela 8.	Concentrações de Glicose, Uréia e Creatinina encontrados nos grupos experimentais.	66

Lista de Abreviaturas

4E-BP1	proteína ligadora do fator 4E
ADC	arginina descarboxilase
AGAT	arginina:glicina amidinotransferase
Akt-1	idem PKB
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	adenosina monofosfato quinase
ARG	Arginase
AS	grupo arginina sedentário
ASL	argininosuccinato liase
ASS	argininosuccinato sintetase
AT	grupo arginina treinado
CAT	cation amino transporters
CHO	Carboidrato
CS	grupo controle sedentário
CT	grupo controle treinado
EAA	aminoácidos essenciais
eIF-2B	fator de iniciação eucariótico 2B
eIF-4A	fator de iniciação eucariótico 4 ^a
eIF-4E	fator de iniciação eucariótico 4E
eIF-4F	fator de iniciação eucariótico 4F
eIF-4G	fator de iniciação eucariótico 4G
ERK	“extracelular signal-regulated kinase”
GAMT	guanidinoacetato n-metil transferase
GDP	guanosina difosfato
GH	hormônio do crescimento

GHR	receptor do hormônio do crescimento
GS	glicogênio sintase
GSK-3 β	glicogênio sintase quinase -3 β
GTP	guanosina trifosfato
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP-1	proteína transportadora do fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IGFBP-2	proteína transportadora do fator de crescimento semelhante à insulina - 2
IGFBP-3	proteína transportadora do fator de crescimento semelhante à insulina - 3
IGFBPs	proteínas transportadoras do fator de crescimento semelhante à insulina
IRS-1	substrato do receptor de insulina – 1
IRS-2	substrato do receptor de insulina – 2
ITT	teste de tolerância à insulina
JAK-2	janus quinase-2
MEK	ERK quinase ativada por mitogênio
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	complexo do alvo da rapamicina em mamíferos 1
mTORC2	complexo do alvo da rapamicina em mamíferos 2
NF-AT	fator nuclear para célula T ativada
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
OAT	ornitina aminotransferase
ODC	ornitina descarboxilase
OGTT	teste de tolerância oral à glicose
OTC	ornitina transcarbamoilase
p-4E-BP1	proteína ligadora do fator 4E fosforilada
P5C	pirrolina-5-carboxilato
p70S6K	proteína ribossomal S6 quinase 70kDa

p-Akt	Idem p-PKB
PDK-1	“phosphoinositide-dependent protein kinase – 1”
PHAS-1	“phosphorylated heat and acid stable protein”
PI3-K	fosfatidilinositol-3-fosfato quinase
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PIP ₃	fosfatidilinositol 3, 4,5 trifosfato
p-IRS-1	substrato do receptor de insulina – 1 fosforilado
PKB	proteína quinase B
p-PKB	proteína quinase B fosforilada
p-mTOR	alvo da rapamicina em mamíferos fosforilado
p-P70S6k	proteína ribossomal S6 quinase 70kDa fosforilada
PRAS40	“protein-rich akt substrate 40kda”
Ser	Serina
SOS	“son-of-sevenless”
STATs	transdutores de sinais e ativadores de transcrição
Thr	Treonina
TKR	receptor tirosina quinase
TSC1	“tuberous sclerosis complex 1”
TSC2	“tuberous sclerosis complex 2”
Tyr	Tirosina
Tyr-P	resíduo de tirosina fosfato

Sumário

1.	Introdução	21
2.	Objetivos	23
2.1.	Objetivo Geral	23
2.2.	Objetivos Específicos	23
3.	Revisão Bibliográfica	24
3.1.	Arginina	24
3.2.	Suplementação da arginina no exercício físico	27
3.3.	Eixo GH/IGF-1 e exercício	29
3.4.	Vias de sinalização envolvidas na via de síntese protéica muscular.....	33
3.5.	Eixo GH/IGF-1 e Arginina	37
4.	Materiais e Métodos	40
4.1.	Condições Experimentais	40
4.1.1.	Animais	40
4.1.2.	Dieta	41
4.1.3.	Treinamento	42
4.2.	Coleta de Material e Eutanásia	45
4.3.	Análises	47
4.3.1.	Avaliação do consumo de ração e evolução do peso corporal dos animais	47
4.3.2.	Aminograma	47
4.3.3.	O Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)	48
4.3.4.	Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina (TTlip)	48
4.3.5.	Parâmetros Bioquímicos	49
4.3.5.1.	Insulina	49
4.3.5.2.	GH (Hormônio do Crescimento).....	50
4.3.5.3.	IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina – 1) sérico, hepático e muscular	50
4.3.5.4.	IGFBP-3 (Proteína transportadora do fator de crescimento semelhante à insulina – 3)	51
4.3.5.5.	Uréia	51
4.3.5.6.	Creatinina	51
4.3.6.	Western Blotting	52
4.4.	Análise Estatística	57

5.	Resultados	58
5.1.	Evolução da massa corporal dos animais	58
5.2.	Consumo médio de ração	59
5.3.	Teste de Tolerância à Glicose (OGTT)	60
5.4.	Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	61
5.5.	Aminograma	63
5.6.	Parâmetros bioquímicos séricos e teciduais	65
5.7.	Expressão de proteínas da via da IRS-1 e mTOR (Western blotting)	67
5.7.1.	IRS-1 Total	67
5.7.2.	Phospho-IRS-1 (Tyr ⁶¹²)	68
5.7.3.	Akt-1 Total	69
5.7.4.	Phospho-Akt-1 (Thr ³⁰⁸ e Ser ⁴⁷³)	70
5.7.5.	mTOR Total	71
5.7.6.	Phospho-mTOR (Ser ²⁴⁴⁸)	72
5.7.7.	4E-BP1 Total	73
5.7.8.	Phospho-4E-BP1 (Thr ⁷⁰)	74
5.7.9.	p70S6K Total	75
5.7.10.	Phospho-p70S6K (Thr ³⁸⁹)	76
6.	Discussão	78
7.	Conclusões	92
8.	Referências Bibliográficas	93
Anexos		104

1. Introdução

Diversos estudos tem investigado o papel dos nutrientes na estimulação da síntese proteica, no intuito de favorecer a recuperação ou o ganho de massa muscular em atletas ou indivíduos fisicamente ativos. Dentre esses nutrientes, destacam-se alguns aminoácidos específicos, como a arginina, a glutamina e os aminoácidos de cadeia ramificada, que podem atuar direta ou indiretamente na promoção da síntese proteica muscular.

No que concerne à arginina, as evidências científicas têm relacionado este aminoácido com a maior secreção do hormônio de crescimento (GH), que por sua vez representa o principal estímulo para liberação do fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF-1). Um dos papéis do IGF-1 seria de ativar a via de síntese proteica e favorecer a hipertrofia muscular. Contudo, algumas evidências vem demonstrando que a arginina poderia atuar diretamente nesta via bioquímica ativando proteínas-chave e fatores de iniciação da tradução independente dos estímulos hormonais. Esses pontos ainda são obscuros na literatura, será que a arginina promoveria uma maior síntese proteica muscular por estimular o eixo GH/IGF ou diretamente as proteínas envolvidas nesta via de sinalização que levam à maior tradução?

Além disso, a arginina, por ser um dos aminoácidos mais versáteis no metabolismo, também participa de mecanismos importantes como, por exemplo, a síntese de óxido nítrico (NO) que promove vasodilatação e maior fluxo sanguíneo para o músculo durante o exercício aumentando a capacidade aeróbia do atleta. O estímulo à síntese proteica atribuído à arginina parece ser independente do NO, mas este por sua vez pode ser um intermediário importante nos processos de aumento à sensibilidade à insulina visto em alguns estudo com suplementação de arginina. Ainda de forma controversa, a arginina também tem sido correlacionada com o desenvolvimento da resistência periférica à insulina. Todos esses efeitos parecem ser dose-dependente e ainda são necessários mais estudos para se estabelecer essas relações de forma clara.

Diante disto, há muito o que explorar em relação à arginina e aos fatores promotores de um melhor desempenho físico. Este trabalho pretendeu contribuir com mais informações acerca dos efeitos da suplementação crônica de arginina sobre a expressão de algumas proteínas-chave da via de síntese proteica muscular de ratos submetidos à treinamento de alta intensidade com o intuito de melhorar a recuperação muscular de atletas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação crônica de arginina sobre a expressão de proteínas-chave da via da mTOR em ratos submetidos à treinamento de alta intensidade.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a evolução do peso corporal semanal dos animais dos grupos suplementados e não suplementados;
- Avaliar o consumo de ração suplementada e controle semanalmente;
- Avaliar os efeitos da suplementação de arginina sobre:
 - ✓ A sensibilidade à insulina a partir dos testes de tolerância oral à glicose (OGTT) e tolerância à insulina (ITT).
 - ✓ A concentração plasmática de GH, IGF-1, IGFBP-3, insulina, glicose e aminoácidos.
 - ✓ A concentração muscular e hepática de IGF-1.
 - ✓ A concentração plasmática de uréia e creatinina.
 - ✓ A expressão e a fosforilação das proteínas IRS-1, Akt1, mTOR, p70S6K e 4E-BP1, no músculo plantar.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Arginina

A arginina é um aminoácido denominado básico porque possui um grupo guanidino carregado positivamente em pH=7,0 e quimicamente é chamada de ácido (2S)-2-Amino-5-guanidinopentanoico (NELSON; COX, 2004a). Sua fórmula química ($C_6H_{14}N_4O_2$) pode ser observada na figura 1.

Quanto à classificação biológica esta é considerada um aminoácido condicionalmente essencial, pois em condições normais o organismo é capaz de sintetizá-la em quantidades suficientes para atingir a necessidade biológica, contudo em situações de estresse fisiológico, como infecções, este aminoácido tem sua síntese limitada (CAMPBELL, et al, 2004).

Figura 1: Estrutura química da Arginina.

Há mais de um século a arginina vem sendo estudada e considerada um dos aminoácidos mais versáteis por atuar em várias rotas metabólicas podendo originar compostos como, citrulina, ornitina, uréia, óxido nítrico (NO), creatina, glutamato, prolina, agmatina e poliaminas (WU, 2009).

Por sua vez, a arginina pode ser sintetizada a partir do glutamato ou da prolina na mucosa intestinal iniciando pela ação da enzima *pirrolina-5-carboxilato (PC5) sintetase* que catalisa a reação de síntese do intermediário pirrolina-5-carboxilato (P5C) a partir de um destes aminoácidos. O P5C serve de substrato para a enzima *ornitina aminotransferase* que origina a ornitina e posteriormente a citrulina. A citrulina, por sua vez é liberada na corrente sanguínea e pode ser captada por diferentes células como, por exemplo, as

endoteliais, renais e macrófagos. Quando captada pelas células renais, a citrulina dá origem ao argininosuccinato pela ação da enzima *argininosuccinato sintetase* (ASS) incorporando um grupo amino doado pelo aspartato e em seguida o argininosuccinato é clivado em arginina e fumarato pela *argininosuccinato liase* (ASL) (MORRIS, 2004; GRILLO; COLOMBATO, 2004). Um resumo da síntese de arginina está ilustrado na figura 2.

O transporte da arginina recém sintetizada para os tecidos se dá por transportadores específicos sódio-independentes de aminoácidos básicos, a saber, CAT-1, CAT-2, CAT-3 e CAT-4 (*cation amino acid transporters*) que são expressos em maior dimensão no fígado (GRILLO; COLOMBATO, 2004).

Isto se deve ao fato da arginina representar um papel fundamental na atividade do ciclo da uréia no fígado, que por sua vez se inicia com a união da amônia, como produto das reações de desaminação, com o bicarbonato proveniente do dióxido de carbono liberado na respiração celular para formar o composto carbamoil-fosfato. Posteriormente este composto cede seu grupo carbamoil para a ornitina gerando citrulina e a partir daí as reações são as mesmas já citadas para originar arginina. O ponto diferencial seria que após a síntese de arginina a enzima *arginase* é capaz de agir sobre este aminoácido e produzir novamente ornitina e finalmente a uréia. Criando uma analogia, a ornitina age no ciclo da uréia como o oxalacetato no ciclo de Krebs recebendo material a cada volta do ciclo e reiniciando-o. Além disso, retomando à etapa em que o argininosuccinato dá origem à arginina e ao fumarato, deve-se ressaltar que este fumarato é responsável pela criação de um ponto de intersecção do ciclo da uréia com o ciclo de Krebs, sendo aproveitado como intermediário do mesmo (NELSON;COX, 2004b).

Em outros tecidos, como o endotélio vascular e nos macrófagos a arginina também é substrato da enzima *óxido-nítrico sintetase* (NOS) que além de originar o próprio óxido nítrico, também produz citrulina (MORRIS, 2004). Diante disso, pode-se afirmar que a relação entre ornitina, citrulina e arginina é bastante estreita e que este metabolismo acontece envolvendo vários tecidos diferentes. Uma síntese das reações enzimáticas envolvendo esses três aminoácidos está demonstrado na figura 3.

Figura 2: Síntese Endógena de Arginina

Fonte: Acervo Pessoal, 2012

Siglas: ASL: argininosuccinato liase; ASS: argininosuccinato sintetase.

Figura 3. Principais rotas metabólicas da arginina

Adaptado de Morris (2004)

Siglas: ADC: arginina descarboxilase; AGAT: arginina:glicina amidinotransferase; ARG: arginase; ASL: argininosuccinato liase; ASS: argininosuccinato sintetase; OAT: ornitina aminotransferase; ODC: ornitina descarboxilase; OTC: ornitina transcarbamoilase; P5C, pirrolina-5-carboxilato.

3.2. Suplementação da arginina no exercício físico

Atualmente muitos atletas acreditam que o uso de suplementos nutricionais pode trazer benefícios que incluem a melhora na adaptação ao treinamento e consequentemente o aumento da *performance*. No meio esportivo de competição esse uso é comum em mais de 80% dos atletas, porém ainda há grande discussão sobre a regulamentação do uso destes suplementos assim como sua eficácia e efeitos colaterais (MAUGHAN, et al 2011).

Os atletas que buscam a suplementação de arginina a fazem por três razões principais: a.) como precursora de creatina, b.) pelo aumento da produção de NO e c.) estímulo à da secreção de GH (CAMPBELL, et al, 2004).

A primeira razão explica-se pelo fato da creatina sob a forma de creatina-fosfato atuar numa das principais vias do metabolismo energético durante exercícios de alta intensidade. Por isso, esta tem sido relacionada com aumento de desempenho físico e utilizada como um suplemento ergogênico entre atletas (TORRES-LEAL; MARREIRO, 2008).

O processo de síntese endógena da creatina tem início a partir da arginina, a qual doa o grupo amino para a glicina, formando guanidinoacetato e ornitina, através de uma reação mediada pela enzima *L-arginina: glicina aminotransferase* (AGAT). Em uma segunda reação, catalisada pela enzima *guanidinoacetato N-metil transferase* (GAMT), o guanidinoacetato é metilado pela S-adenosil-metionina, derivando, finalmente, a creatina. Essa síntese ocorre preferencialmente no fígado em função da maior expressão dessas enzimas neste tecido, porém a creatina é transportada para o músculo esquelético, o qual representa o tecido de maior armazenamento (BROSNAN; BROSNAN, 2004).

A segunda razão diz respeito ao aumento da disponibilidade de NO no organismo que tem sido relacionado com efeitos positivos sobre a *performance* dos atletas.

O NO pode ser sintetizado em vários locais, em especial células endoteliais e macrófagos, e atuar em diversas reações bioquímicas no organismo. No tocante à função muscular KOBZIK et al (1994) notaram que ambas isoformas tipo I (neuronal) e tipo III (endotelial) da NOS são expressas no músculo esquelético e que isto poderia relacionar o NO com a modulação da função contrátil do músculo. O exercício pode aumentar a produção de NO pelo músculo pelas evidências de aumento da excreção urinária de nitritos/nitratos e da concentração cGMP pós-exercício e a arginina pode potencializar essa produção (McCONNELL, 2007).

O papel da arginina na síntese de NO está envolvido com respostas de vasodilatação, imunológica, neurotransmissão e adesão de plaquetas e leucócitos. Os macrófagos sintetizam arginina a partir de citrulina e a expressão da *argininosuccinato sintase* apresenta-se elevada quando as essas células são estimuladas por mediadores inflamatórios. (COLOMBATO; GRILLO, 2004).

Na medida em que aumenta a concentração plasmática de arginina ocorre aumento da atividade da NOS e conseqüentemente maior liberação de NO, porém este fenômeno é conhecido como “Paradoxo da Arginina” uma vez que a constante de Michaelis-Menten para a NOS endotelial é cerca de 3 μ mol/L e a concentração de arginina plasmática em humanos varia entre 40 e 100 μ mol/L. Esses valores sugerem que as concentrações fisiológicas de arginina são suficientes para saturar a NOS endotelial, mas mesmo assim o acréscimo de arginina é capaz de aumentar a atividade da NOS (DIOGUARDI, 2011a; ÁLVARES, 2011).

É clássico o papel da arginina como indutor de efeito vasodilatador mediado pelo NO (BODE-BÖGER, 1998). Esse efeito, por sua vez é desejado por atletas de *endurance* no intuito de aumentar o fluxo sanguíneo e a perfusão de oxigênio para o músculo que resultaria em aumento da capacidade aeróbia. Além disso, também seria responsável por um aumento temporário do volume muscular causando a impressão de ganho de massa muscular, o que torna a arginina muito procurada por *bodybuilders* também.

A terceira razão induz mais comumente os atletas a buscarem a suplementação com arginina, acreditando que este aminoácido possa estimular uma maior secreção de GH e trazer resultados de aumento de massa muscular e força. Esse efeito somado ao fato de que o exercício *per se*, tanto de força quanto de *endurance*, provocaria um aumento das concentrações circulantes de GH que poderia potencializar os resultados esperados em relação ao aumento da incorporação de proteína muscular (CHROMIAK, 2002; VUGHT et al, 2008).

Além disso, investiga-se ainda a capacidade da arginina em reduzir as concentrações de amônia e lactato que são fatores que desencadeiam a fadiga no exercício, porém este é um tema bastante controverso ainda (LIU et al, 2009).

3.3. Eixo GH/IGF-1 e exercício

O IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) é um peptídeo de estrutura terciária com 70 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 7649 Da (PIMENTEL, 1994; PHILLIPS et al, 1998). A síntese de IGF-1 ocorre principalmente no fígado, órgão responsável pela sua secreção endócrina, respondendo por quantidade suficiente para suprir o “turnover” de IGF-1 na circulação, cuja meia vida é de 4 horas. Entretanto o IGF-1 é também sintetizado em outros tecidos, exercendo ação neles próprios ou nos tecidos vizinhos, denotando ação autócrina e parácrina, respectivamente (D’ERCOLE et al, 1994). Geralmente, menos de 1% do peptídeo é encontrado na circulação sanguínea sob forma livre, ou seja, praticamente todo IGF-1 sintetizado circula no sangue ligado à proteínas transportadoras (“binding-proteins”) (KOZIRIS et al, 1999).

Existem 6 IGFBPs e suas ações modulam a disponibilidade e a função dos IGFs, mas também parecem apresentar suas próprias atividades biológicas independente da sua habilidade de interagir com o IGF-1 e 2 (ROSENZWEIG, 2004). Essas proteínas transportadoras possuem grande afinidade pelo sítio de ligação NH₂-terminal do IGF-1 superando a afinidade do IGF-1 com seu receptor IGF-IR, o que geraria um seqüestro de IGF-1 e diminuição de sua ação biológica (ROSENZWEIG, 2004). Contudo, a afinidade das IGFBPs pode

ser alterada por vários mecanismos, incluindo fosforilação, proteólise parcial e ligação destas com a superfície celular. Quando isso ocorre, diminui a afinidade das IGFBPs aos IGFs e ocorre uma maior liberação dos IGFs para seus receptores IGF-IR (ADAMO et al, 2005).

O receptor de IGF-1 apresenta 48% de homologia na sequência de aminoácidos com o receptor de insulina e ambos possuem atividade intrínseca tirosina-quinase. Apesar destas semelhanças a especificidade da ligação é bastante restrita, por exemplo, a afinidade do receptor de IGF é 1000 vezes maior pelo próprio IGF em relação à insulina, enquanto o receptor de insulina apresenta 100 vezes mais afinidade pela insulina em comparação ao IGF (CLEMMONS, 2012).

São vários os fatores que podem estimular a maior secreção de IGF-1 como a concentração de aminoácidos no plasma, o exercício físico e o aumento das concentrações de GH (hormônio de crescimento) (ADAMO et al, 2005). No que diz respeito ao GH, este é o principal regulador da síntese de IGF-1 hepático e da IGFBP-3, a qual carrega a maioria do IGF-1 e inclusive, atualmente tem se utilizado as respectivas concentrações plasmáticas de IGF-1 e IGFBP-3 como biomarcadores da utilização do GH como anabolizante nos esportes (PICHINI et al, 2010).

É fato conhecido que o exercício modula as secreções de GH e este por sua vez promove alterações no organismo que favorecem o bom desempenho esportivo e a partir disto pode-se esperar que a secreção de IGF-1 bem como de suas IGFBPs também sejam afetadas.

Para avaliar melhor a influência do exercício e da ingestão de nutrientes sobre o eixo GH/IGF, Foster et al (2012), avaliaram as concentrações plasmáticas de IGF-1, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, GH e insulina por três horas após séries de exercício intenso em cicloergômetro com 2 suplementações diferentes. A primeira suplementação foi uma bebida elaborada com carboidrato apenas (CHO), a segunda continha carboidrato (0,85 g/kg de massa magra) e um mix de aminoácidos essenciais enriquecido com leucina (CHO + EAA) na proporção de 0,50 g/kg + 0,35 g/kg de massa magra e uma terceira foi usada como placebo sem valor energético. Os autores encontraram aumento na secreção de GH logo após o exercício

sessenta vezes maior em relação ao período pré-exercício que permaneceu elevado por 80 minutos no período de recuperação, porém sem diferença entre os tipos de suplementação. As concentrações de insulina também foram maiores, porém somente nos grupos CHO e CHO + EAA sem diferença entre ambos. As concentrações de IGFBP-1 e 2 foram maiores ao final do exercício para os três grupos, porém os indivíduos que receberam a solução placebo mantiveram esses valores elevados por mais tempo, enquanto a IGFBP-3 não sofreu alteração. As concentrações de IGF-1 livre elevaram-se ao final do exercício em todos os grupos sem diferença estatística, porém manteve-se elevada por mais tempo no grupo que recebeu a solução com aminoácidos. Os autores concluíram que o exercício intenso é mais eficaz em produzir efeitos sobre o eixo GH/IGF-1 e que as concentrações de IGF-1 aumentam em resposta ao exercício mas, são reguladas também pela concentração de aminoácidos no plasma de forma inversamente proporcional à IGFBP-1.

Em revisão publicada recentemente por Gatti et al (2012) os autores destacam que o eixo GH/IGF-1 representa um papel chave nas modificações que ocorrem no organismo em resposta ao exercício e que muitos estudos encontram relações entre o grau de tolerância ao exercício, força muscular ou velocidade com as concentrações de IGF-1 e IGFBP-3.

A relação entre o aumento GH e a maior síntese de IGF-1, pode ser explicada pelo seguinte mecanismo: O receptor do GH (GHR) não possui atividade intrínseca tirosina-quinase, mas por outro lado apresenta uma proteína constitutivamente associada à ele denominada JAK2 (*janus kinase 2*), que se auto-fosforila quando o GH se liga ao GHR e é responsável ainda por fosforilar o próprio GHR em múltiplos sítios. Os resíduos fosforilados da JAK2 e do GHR servem de sítios de fosforilação para diferentes mediadores da transdução do sinal intracelular, incluindo membros de uma família de fatores de transcrição denominados STATS 1, 3, 5a e 5b, dentre as quais a STAT-5b está relacionada diretamente com expressão do gene do IGF-1 (ROTWEIN et al, 1997; HERRINGTO; CARTER-SU, 2001; DOMINICI et al, 2005).

A STAT-5b é uma proteína chave na ativação do gene do IGF-1, cuja estimulação ocorre de forma aguda pelo GH em ratos (WOELFLE, et al 2003).

A partir desta afirmação, alguns estudos vem sendo feitos no intuito de avaliar a dependência do IGF-1 em relação ao GH.

MATHENY et al. (2009) avaliaram a relação GH/IGF-1 em camundongos treinados em exercício de resistência (subida em escada) com aumento de carga progressiva e em camundongos sedentários, sendo um grupo deficiente de IGF-1 hepático (LID) e outro controle (L/L). Os camundongos LID são modelos de animais que já apresentam uma redução de IGF-1 plasmático na ordem de 75 a 85%, mas por outro lado secretam GH em quantidades supra fisiológicas e apresentam crescimento normal.

No experimento em questão, todos os músculos avaliados no grupo LID sedentário apresentaram maior conteúdo de mRNA para IGF-1 no músculo e a fosforilação da STAT-5b aumentou em relação ao controle, demonstrando que o aumento das concentrações plasmáticas de GH de forma crônica foi capaz de aumentar a expressão do IGF-1 muscular a fim de compensar a falta de expressão hepática. Contudo o exercício promoveu aumento na expressão do IGF-1 no músculo de ambos grupos treinados, sendo quase duas vezes maior no grupo L/L e aumento da ordem de 3,2 e 2,5 na fosforilação do IGF-IR em L/L e LID respectivamente. Por outro lado, a fosforilação da STAT-5b foi diminuída em ambos os genótipos dos animais exercitados. A partir desses resultados, os autores concluíram que o GH pode atuar diretamente no estímulo à expressão gênica do IGF-1 muscular a ponto de compensar a supressão hepática, sem interferir negativamente no crescimento, e ainda sugerem que em situações de exercício ocorre uma hipertrofia muscular compensatória que parece ser independente de GH.

Em concordância com esses dados, YAMAGUCHI et al. (2003) observaram um aumento das concentrações de mRNA para IGF-1 em ambos ratos normais e hipofisectomizados em resposta ao exercício com sobrecarga sugerindo mecanismo de hipertrofia muscular independente de GH e, possivelmente, do IGF-1 circulante também.

Estes resultados sugerem que o exercício pode promover o aumento da expressão do gene do IGF-1 em tecidos extra-hepáticos de forma independente, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente conhecido. A

hipótese da transdução mecânica destaca a possibilidade da participação de um fator de transcrição conhecido como NF-AT (*nuclear factor for activated T cell*) em resposta ao exercício isolado. Nesta perspectiva, sugere-se que o exercício pelo próprio efeito físico cause uma sensibilização nos osteoclastos e isto provocaria um aumento da concentração de cálcio intracelular, pela abertura dos canais de cálcio “*stretch-activated ion channel*” e da liberação de cálcio das reservas intracelulares (abertura de canais mitocondriais) via integrina-PLC-PI3. Este cálcio se ligaria à calcinerina, uma proteína fosfatase cálcio-dependente que age sobre o NF-AT, desfosforilando-o e dessa forma ele torna-se ativo. Uma vez ativo esse fator de transcrição pode atuar no gene do IGF-1 que apresenta em sua região promotora várias sequências consenso para a ligação do NF-AT (IQBAL; ZAIDI, 2005).

Outro fator a se considerar é a ação das IGFBPs que podem regular a ação do IGF-1 nos tecidos extra-hepáticos, independe do GH. Por exemplo, quando a secreção de GH é suprimida pela somatostatina há um aumento da IGFBP-1, a qual se atribui um efeito de inibitório da ação do IGF-1 nos tecidos (NORRELUND et al, 2003, NORRELUND et al, 2005). Isto sugere que os estudos relativos à ação do IGF-1 devem explorar também o comportamento das suas proteínas transportadoras.

3.4. Vias de sinalização envolvidas na via de síntese proteica muscular

As interações entre GH, IGF-1, IGFBPs e insulina são complexas e a elucidação de suas inter-relações é importante para se compreender seus mecanismos de ação. Uma vez aumentada a secreção de IGF-1, sua ação mais evidente dentro deste contexto é o estímulo à síntese proteica, hipertrofia e proliferação celular e para isso ele estimula duas principais vias: 1.) Via Ras-Raf-MEK-ERK e 2.) Via PI3K-Akt-mTOR (GLASS, 2003).

A primeira é fundamental para a proliferação celular e resumidamente ocorre da seguinte forma: O receptor de IGF-1 pertence à família dos receptores tirosina-quinase (TKR que se auto-fosforilam e recrutam o substrato do receptor de insulina – 1 (IRS-1). Após a fosforilação do IRS-1, o resíduo de

tirosina-fosfato (Tyr-P) é ligado pelo domínio SH2 da proteína Grb2 que por sua vez se liga à Sos (uma proteína de troca denominada *son-of-sevenless*) responsável por catalisar a substituição do GDP pelo GTP ligado em Ras que pertence à família de proteínas de ligação de nucleotídeos de guanina (proteínas G) e medeiam uma ampla transdução de sinais. Enquanto o GTP está ligado à ele, Ras pode ativar uma proteína quinase chamada Raf-1 que é a primeira de três proteínas quinases pertencentes à família MAPK (proteínas quinases ativadas por mitogênicos) a saber, Raf-1, MEK e ERK, as quais vão sendo fosforiladas em cascata. A fosforilação em ERK promove sua translocação desta para o núcleo onde será responsável por fosforilar fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes relacionados com a proliferação e diferenciação celular (SAKAMOTO;GOODYEAR, 2002; TANIGUCHI et al., 2006; YANG et al, 2008).

Na segunda via, o IRS-1 leva à ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) que catalisa a transferência de um grupo fosfato para a posição 3 do fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) ligado à membrana celular que por sua vez se torna fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) e recruta duas quinases adicionais: Akt/PKB e PDK-1 (SALTIEL;KAHAN, 2001;SARTORELLI;FULCO, 2004).

Existem duas isoformas de Akt que parecem ter funções distintas. A Akt1 está envolvida no processo de hipertrofia muscular enquanto a Akt2 no transporte de glicose (NADER, 2005). Desta forma a PDK-1 fosforila e ativa a Akt1 na thr³⁰⁸, contudo ela requer uma segunda fosforilação em ser⁴⁷³ para sua completa ativação que possivelmente é realizada pelo mTORC2 (mammalian target of rapamicina complex 2). A Akt1 é uma proteína chave na ativação desta via, pois é capaz de fosforilar várias proteínas, uma delas é PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40kDa*) um componente inibidor pertencente ao mTORC1 (mammalian target of rapamicina complex 1) e promove sua dissociação deste complexo e consequentemente ativação da quinase mTOR (GUNN;HAILES, 2008).

Outra forma de ativar a mTOR é por meio da fosforilação do TSC2 que compõem um heterodímero com o TSC1 (*tuberous sclerosis complex1/2*), este complexo quando fosforilado torna-se inibido e deixa de exercer sua atividade

GTPase, dessa forma permite que a proteína Rheb permaneça no estado ligada ao GTP e consequentemente ativa. Rheb ativa então é capaz de fosforilar o mTORC1 (BALLOU;LIN 2008).

A Akt1 também fosforila e inibe a GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) que é inibidora da GS (*glicogênio sintase*) promovendo assim um aumento da síntese de glicogênio e indiretamente na síntese proteica. A GSK-3 β na forma ativa é capaz de inibir a atividade da eIF-2B que por sua vez é responsável por reativar o *elongation factor* eIF2-GTP pertencente ao complexo de pré-iniciação da tradução (PIC), sendo um mecanismo independente da via da mTOR (GLASS 2003; VANDER et al, 2007; SONENBERG;HINNEBUSCH,2009).

Duas proteínas principais são alvo da fosforilação pela mTOR, uma é a p70S6K (*proteína ribossomal 6 quinase*) e outra é a 4E-BP1 ou PHAS-1 (*phosphorylated heat and acid stable protein*). A p70S6K quando fosforilada torna-se ativa e fosforila a proteína ribossomal S6 na subunidade 40S do ribossomo promovendo o reconhecimento ou recrutamento preferencial de RNAs com trato oligopirimídico 5' terminal (uma sequência ininterrupta de resíduos de pirimidina adjacentes a estrutura m⁷GTP-cap) que faz a tradução dos fatores de iniciação de síntese proteica: eIF-4G e eIF-4A (KIMBAL; JEFFERSON, 2001; SONENBERG; HINNEBUSCH,2009; YANG et al, 2009).

A fosforilação da 4E-BP1, concomitante à fosforilação da p70S6K, implica na sua dissociação do fator de iniciação eIF-4E, pois uma vez conjugado à 4E-BP1 exerce uma regulação negativa sobre a formação do complexo eIF4F. Este complexo é formado pelos fatores 4G, 4A e 4E e depende da liberação do eIF-4E para concluir a estrutura. A p70S6K também fosforila o eIF-4B e estes fatores integrados atuam de forma complementar no mecanismo de iniciação da síntese proteica. (KIMBAL;JEFFERSON, 2001; SONENBERG;HINNEBUSCH,2009; YANG et AL, 2009)

A atividade da mTOR é regulada *upstream* pelo menos por três fatores: aminoácidos, glicose e fatores de crescimento. Os aminoácidos, em particular a leucina, regulam a formação do mTORC1 através do componente sensível à nutrientes (raptor) e facilitam o reconhecimento de substratos pela mTOR em condições de maior disponibilidade de nutrientes (KIM et al, 2002; KIM et al,

2003; NOBUKUNI et al, 2005). Da mesma forma, Kimball & Jeffereson (2004) argumentam que Rheb e o TCSC2 também parecem estar envolvidos na transdução de sinais para a mTOR mediados pela disponibilidade de aminoácidos no interior da célula. Esquemas desta via podem ser observados nas figuras 4 e 5.

Recentemente a arginina foi correlacionada com o aumento dos fatores de iniciação da tradução. Um estudo realizado por YAO et al (2008) com porcos suplementados por 7 dias com 0,6% de arginina na dieta obteve como resultado menor associação do eIF4E com a 4E-BP-1 e aumento na formação de eIF4E e eIF4G no músculo dos animais suplementados, o que indica maior estímulo à síntese proteica. Houve maior fosforilação da 4E-BP1 e da mTOR também nestes animais. Isto indica que a arginina também pode auxiliar na regulação da síntese proteica, além do aminoácido leucina.

Figura 4: Estímulo ao complexo mTORC1 pela via PI3-K-PKB-mTOR
Fonte: Gunn;Hailes (2008)

Figura 5: Estímulo à síntese proteica e à proliferação celular pelos fatores de crescimento. Adaptado de Yang et al (2008)

3.5. Eixo GH/IGF-1 e Arginina

No que diz respeito à relação entre os aminoácidos e os hormônios GH e IGF-1, observa-se que a concentração plasmática de aminoácidos modula a secreção destes hormônios, principalmente os aminoácidos de cadeia ramificada e supostamente a arginina.

De uma forma geral a deficiência de proteína leva à uma diminuição significativa nas concentrações de IGF-1 plasmático e muscular demonstrando a correlação significativa entre as concentrações de aminoácidos nos plasma e a concentração de IGF-1 (GOMES et al, 1998; GOMES et al. 2003).

Collier et al (2005) estudaram a ingestão aguda de quatro doses diferentes de arginina: 0, 5, 9 e 13g em indivíduos adultos e coletaram em seguida o sangue dos participantes. O resultado encontrado foi um aumento significativo na secreção de GH nas doses de 5 e 9 e menores no placebo (0 g) e na de 13g. Este aumento foi observado 30 minutos após a ingestão com pico de concentração em 60 minutos. Os autores comentam que a arginina

potencializa a liberação do GH através da supressão da somatostatina. Essa hipótese já foi descrita anteriormente por Alba-Roth et al (1988).

A hipótese do aumento da secreção de GH ser baseada na supressão da somatostatina também é apresentada no contexto do exercício físico. Nas atividades de intensidade moderada haveria maior atividade colinérgica que suprimiria a secreção hipotalâmica de somatostatina, enquanto que na atividade de alta intensidade haveria um aumento da liberação de GHRH (hormônio liberador de GH) em adição à supressão de somatostatina (CASANUEVA et al, 1984; THOMPSON et al, 1993; COLLIER et al. 2006). Dessa forma há a possibilidade da suplementação de arginina associada ao exercício resultar numa maior inibição da somatostatina e consequentemente numa maior resposta à secreção de GH (COLLIER, 2006). Contudo os resultados encontrados na literatura não são consistentes na afirmação desta hipótese.

Abel et al (2004) não conseguiram comprovar aumento do GH após suplementação crônica de 28 dias em triatletas ou ciclistas de sua amostra, nem mesmo no grupo que consumiu as maiores doses de 5,7g de arginina associada a 8,74g de aspartato em comparação ao grupo com doses menores e o placebo.

Collier et al (2006) combinaram o efeito do exercício de força e a suplementação de 7g de arginina em indivíduos treinados distribuídos em 4 grupos: placebo, arginina, placebo + exercício e arginina + exercício. As análises de sangue eram realizadas nos dias de exercício e em dias de repouso. Estes autores observaram que a secreção de GH era maior nos dias de exercício e nos dias de exercício + arginina em relação aos momentos placebos, mas não houve diferença estatisticamente significativa entres os dias de exercício + placebo e exercício + arginina. O aumento do GH nos dias de combinação entre arginina e exercício foi menor que 50% em comparação ao dia de exercício isolado Esses autores concluíram que a ingestão de arginina estimulou a secreção de GH, mas a maior resposta foi induzida pelo exercício separadamente e que o efeito combinado de arginina com exercício na verdade atenuou a resposta do GH provavelmente por um efeito de *feedback* negativo.

Em acordo com os resultados de Collier (2006), Suminski et al (1997) já haviam encontrado um aumento da secreção de GH com o exercício resistido e a suplementação de 1,5g de arginina + 1,5g de lisina isoladamente, mas quando estes foram combinados a secreção de GH não aumentou.

Por outro lado Wideman et al (2000) encontraram aumento da liberação de GH com a infusão intravenosa de 30g de arginina associada ao exercício (ciclismo acima do limiar de lactato) em relação ao placebo e ao exercício isolado.

A arginina também tem sido associada com aumento de proteína e decréscimo de gordura corporal. He et al (2009) observaram aumento da síntese proteica e alteração do catabolismo de lipídeos em porcos suplementados com 1% de arginina na dieta por 46 dias. Da mesma forma Tan et al (2009) verificaram um aumento do conteúdo de proteína muscular na ordem de 5,5% e decréscimo de gordura em 11% na carcaça de porcos em crescimento que foram suplementados com 1,0% de arginina na dieta.

Diante disso parece que os efeitos positivos são observados com estudos que usaram doses muito altas de aminoácidos ou administraram-nos de forma intravenosa, uma vez que a arginina em particular é altamente metabolizada pelos enterócitos (Wu, 2009), porém, ainda há muita controvérsia na literatura em relação a correlação da ingestão prévia de aminoácidos e a liberação de GH induzida pelo exercício.

De uma forma geral a arginina parece estar envolvida com o aumento da síntese proteica, mas as hipóteses ainda estão sendo construídas e experimentadas. Ainda são escassos os estudos relacionando a suplementação de arginina crônica ou aguda com a via da mTOR diretamente e ainda mais raros aqueles que buscam uma correlação entre arginina, eixo GH/IGF e mTOR. Diante destes fatos torna-se importante que se ampliem as pesquisas neste sentido e ainda sobremaneira no contexto do exercício físico visando melhor recuperação muscular e estímulo à hipertrofia em atletas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Condições experimentais

4.1.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com cerca de 200g de massa corporal provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A sala onde os animais foram mantidos apresentava ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$ e com ciclo biológico invertido de 12h claro/12h escuro.

Todos os procedimentos com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (processo nº253 – anexo 2), segundo os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 14 animais de forma homogeneia garantindo que a média de massa corporal entre os grupos não apresentasse diferença estatisticamente significativa. Os grupos foram nomeados da seguinte maneira: Arginina Sedentário (AS), Arginina Treinado (AT), Dieta Controle Sedentário (CS) e Dieta Controle Treinado (CT).

O tempo total do experimento foi de sete semanas, sendo que a primeira semana foi considerada de adaptação ao novo ambiente, à dieta e ao meio líquido pois os animais nadavam por quinze minutos sem carga todos os dias.

4.1.2. Dieta

As dietas oferecidas foram elaboradas com base na proposta feita em 1993 pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Reeves, 1993; 1997), sendo que a Dieta enriquecida com Arginina foi acrescida de 2% deste aminoácido e a Dieta Controle recebeu um mix de aminoácidos não essenciais (alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina cuja quantidade correspondeu ao total de nitrogênio oferecido na dieta suplementada com arginina seguindo o modelo utilizado por Rogero et al (2008). Desta forma as rações eram isonitrogenadas e isocalóricas e foram oferecidas de forma *ad libitum*.

Todos os aminoácidos utilizados na elaboração das rações foi doado gentilmente pela empresa Ajinomoto Ltda e a composição das dietas encontram-se detalhadas nas tabelas 1 e 2.

Em relação à dose de arginina ingerida diariamente pelos animais, esperou-se uma ingestão aproximada de 0,4g de arginina por dia por animal baseando-se num consumo médio de ração de 20g por dia encontrados nos experimentos de nosso laboratório.

Para facilitar o consumo alimentar dos animais as rações foram peletizadas e notou-se que a arginina conferiu uma textura mais rígida à ração em comparação com a ração controle.

A peletização foi realizada adicionando água gradualmente à ração, que estava na forma de pó, até obter uma massa moldável semelhante à uma massa de pão. Após atingir a consistência ideal a massa era dividida em pequenos *pelets* e levados à estufa à 100°C por 24 horas. A forma peletizada das rações facilita o consumo e apresenta menos desperdício comparada à ração em pó, uma vez que se leva em consideração o fato do animal ser um roedor.

Além da ração, os animais recebiam água livremente por garrafas próprias para o consumo animal adaptadas às gaiolas.

Tabela 1. Composição das dietas Controle e Arginina para o experimento.

	Dieta Controle	Dieta Arginina
INGREDIENTES	<i>g/kg</i>	
AMIDO	569,83	600,69
CASEÍNA	140,00	140,00
AÇÚCAR	100,00	100,00
ÓLEO DE SOJA	40,00	40,00
FIBRA	50,00	50,00
MINERAL MIX	35,00	35,00
VITAMINA MIX	10,00	10,00
L-CISTINA	1,80	1,80
COLINA	2,50	2,50
T-BUTIL	0,01	
Mix de aas não essenciais	47,53	---
Arginina	---	20
Total calórico (kcal)	3789,44	3802,76
Total Nitrogênio (g)	26,2	26,2
Proteína %	17,25%	16,33%

Tabela 2. Composição do mix de aminoácidos não essenciais utilizados na ração controle do experimento.

MIX DE AAS NÃO ESSENCIAIS	1kg
Alanina	8,1832
Ác. Aspártico	12,2281
Glicina	6,8939
Prolina	10,5703
Serina	9,6504
Total (g)	47,53

4.1.3. Treinamento

A partir da segunda semana os animais dos grupos AT e CT iniciaram o treinamento que consistia em quatro séries de dez saltos com carga de 50% do peso corporal em cuba de água com intervalo de um minuto entre as mesmas para a recuperação muscular. A contagem válida para cada salto se dava quando o animal conseguia emergir da

água para respirar. Este protocolo de exercício intenso foi adaptado do modelo proposto por Rogatto (2001) e validado como exercício anaeróbio por Araújo et al (2007).

A cuba de água foi confeccionada a partir de tubos de PVC com diâmetro de 30 cm e altura de 90 cm seguindo o modelo proposto por Vieira et al (1988) e altura da água foi equivalente à 150% o comprimento médio dos animais e mantida numa temperatura média de 30°C.

A atribuição da carga foi gradual, sendo na primeira semana 30%, na segunda 40% e a partir da terceira semana 50% do peso corporal, como descrito no quadro 1, acoplado ao tórax do animal em uma espécie de mochila de tecido impermeável com vélcro. Esta, por sua vez, era preenchida com pequenas barras de chumbo e ajustadas semanalmente de acordo com a evolução do peso do animal. No momento do ajuste de peso as mochilas eram previamente mergulhadas na água e preenchidas com as barras de chumbo contando o peso total como carga. Os animais eram treinados individualmente devido ao risco de afogamento.

O protocolo descrito foi selecionado para o presente estudo porque era necessário impor um treinamento anaeróbio aos animais, uma vez que este é mais eficaz em produzir o efeito de aumento de massa muscular.

O modelo da mochila e da cuba de água podem ser observados nas figuras 6 e 7 respectivamente, ressaltando que estas representam apenas um modelo semelhante ao utilizado neste experimento, não se tratando dos nossos animais. Devido ao fato dos animais treinarem no ciclo escuro, mantendo na sala somente uma lâmpada vermelha para a realização do nosso trabalho, não foi possível captar imagens em fotografias para demonstração.

		Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
Sem. 1	Carga	0%	0%	0%	0%	0%
	Tempo	5'	10'	10'	15'	15'
Sem. 2	Carga	30%	30%	30%	30%	30%
	Saltos	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10
Sem. 3	Carga	40%	40%	40%	40%	40%
	Saltos	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10
Sem. 4	Carga	50%	50%	50%	50%	50%
	Saltos	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10
Sem. 5	Carga	50%	50%	50%	50%	50%
	Saltos	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10
Sem. 6	Carga	50%	50%	50%	50%	50%
	Saltos	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10
Sem. 7	Carga	50%	50%	50%	50%	50%
	Saltos	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10	4 x 10

Quadro 1. Protocolo de treinamento adaptado de Rogatto (2001)

Figura 6. Demonstração da mochila para acoplar a carga ao corpo do animal para o treinamento de saltos em tanque de água. Foto concedida gentilmente por Rodrigo Dala, doutorando da Escola de Educação Física – UNESP – Rio Claro.

Figura 7. Modelo de cuba de água em PVC para natação de ratos.

Fonte: Gobatto et al. Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte – 2008, 7 (1): 137-147

4.2. Coleta de material e Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada 72 horas depois da última sessão de treino para evitar que variáveis inflamatórias interferissem nos resultados bioquímicos de objetivo do estudo. O procedimento iniciou-se após jejum de 12 horas seguido de anestesia com fármacos Ketamina e Xilazina (Sespo indústria e comércio Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas concentrações respectivas de 0,18/100 g de peso do rato e 0,05/100 g de peso do rato.

Quando constatado que o animal não apresentava mais reflexos foram extraídos cirurgicamente os músculos gastrocnêmio e plantar da pata esquerda, em seguida administrada endovenosamente 1U de insulina e após 90 segundos retirados os mesmos músculos da pata direita. O protocolo de infusão de insulina baseou-se na descrição de Saad et al (1993) e Araújo et al (2005). O intuito desta prática foi estimular a via da mTOR, a fim de avaliar com mais precisão a capacidade de fosforilação das proteínas da via de estudo.

Os músculos recém extraídos eram imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido, embalados e estocados em freezer – 80°C. Esse procedimento foi realizado em seis animais de cada grupo e após a retirada dos tecidos os animais foram eutanasiados por veno-secção ainda anestesiados.

Os animais restantes de cada grupo (n=8) foram anestesiados da mesma forma, retirados os músculos gastrocnêmio de ambas as patas, uma parte do fígado e eutanasiados por decapitação para se obter maior quantidade de sangue. Após a decapitação, o sangue do tronco foi coletado em um tubo *falcon* de 15 mL, sem anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos, separadas as respectivas porções séricas e devidamente armazenadas, em microtubos, em freezer (-80 °C).

A distribuição dos animais no momento da eutanásia está representado na figura 8.

Figura 8: Esquema da divisão dos grupos no momento da eutanásia para coleta dos tecidos e sangue.

4.3. Análises

4.3.1. Avaliação do consumo de ração e evolução da massa corporal dos animais

O consumo de ração era avaliado três vezes por semana por diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade que sobrava no coquinho. A partir destes valores era extraída uma média de consumo semanal e transformada em gramas por 100g de peso corporal para facilitar a comparação dos valores uma vez que os animais não foram mantidos em gaiolas individuais.

O peso corporal foi aferido três vezes por semana também, inclusive nos mesmos dias da avaliação do consumo de ração e optou-se por não calcular uma média semanal uma vez que o peso do rato em condições adequadas é sempre crescente. Decidiu-se por fazer uma comparação entre o peso inicial e o peso final em média de cada grupo.

4.3.2. Aminograma

Foi realizado aminograma em ambos tipos de rações com o intuito de garantir a que a proporção de aminoácidos planejada na elaboração das mesmas estaria sendo realmente oferecida. Além disso, foi necessário assegurar que o teor de proteína era semelhante entre as rações para se atribuir à arginina os possíveis efeitos encontrados e não ao teor de proteína ou nitrogênio das dietas.

As amostras de soro dos animais também foram analisadas quanto ao teor de aminoácidos para avaliar se houve alguma alteração na concentração dos mesmos por conta da suplementação.

O Aminograma foi realizado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Este consiste num método de separação físico-químico no qual os constituintes da amostra são separados entre duas fases (líquidas) sendo uma estacionária e uma móvel. Este ensaio foi realizado pela empresa CBO – Análises Laboratoriais Ltda. (Campinas - SP).

4.3.3. O Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)

O OGTT foi realizado no final da primeira semana do experimento enquanto os ratos estavam na fase de adaptação e repetido no final da última semana para fins de comparação.

O procedimento do teste incluiu jejum de oito horas e as coletas de sangue, pela veia caudal de cada rato, ocorreu nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. O tempo 0 (zero) correspondia ao basal de cada animal marcando a glicemia de jejum e em seguida foi administrado, via gavagem, uma solução de dextrose (Atlética, SP, Brasil, pureza de 99,5%) de dois gramas de dextrose por quilograma de peso corporal (FREIRE *et al.*, 2008).

A dosagem glicêmica foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®, SP, Brasil) e para garantir que a média do tempo de jejum fosse similar entre os grupos, o teste foi realizado em rodízio sendo os primeiros animais de cada grupo, depois os segundos, os terceiros e assim por diante.

Os valores das concentrações plasmáticas de glicose foram utilizados para elaborar uma curva glicêmica e na sequência analisada a média da área sob a curva (ASC) de cada grupo experimental.

4.3.4. Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina (TTIip)

O Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina foi realizado dois dias depois do teste OGTT na primeira e na última semana de experimento também para se obter valores iniciais e finais que poderiam ser comparados.

O teste consistiu na determinação da curva glicêmica após injeção de insulina intraperitoneal nos animais em dose de 0,75 U/kg de peso corporal de insulina regular humana (NovolinR, Novo Nordisk, Araucária, P. R., Brasil) após em jejum de 4 horas.

A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®, SP, Brasil) em amostras de sangue retiradas da veia caudal nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos após a

administração de insulina. As coletas de sangue respeitaram o sistema de rodízio dos animais como realizado no OGTT.

Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 min foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (Kitt), mediante análise da curva de decaimento, de acordo com o método proposto por Bonora et al (1989).

4.3.5. Parâmetros bioquímicos

Todas as determinações dos parâmetros bioquímicos foram realizadas nas dependências do Instituto Gênese de Análises Científicas, da empresa Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda (São Paulo - SP).

4.3.5.1. Insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada com auxílio de kits comerciais de Rat/Mouse Insulin ELISA - MARCA: MILLIPORE (EZRMI-13K).

Nesta análise, padrões, controles e amostras do soro foram incubados em placas de microtitulação impregnadas com anticorpo policlonal de captura anti-GH. Após incubação e lavagem, as cavidades foram tratadas com uma solução contendo outro anticorpo de detecção de anti-hGH marcado com enzima *peroxidase* de rábano (HRP). Após uma segunda etapa de incubação e lavagem, as cavidades foram incubadas com substrato tetrametilbenzidina (TMB). Uma solução ácida de interrupção foi então adicionada e o grau de reposição enzimática pode ser determinado por medida de absorbância em duplo comprimento de onda a 450 a 620 nm.

A absorbância medida era diretamente proporcional concentração de GH presente na amostra. Um conjunto de padrões de GH foi utilizado para determinar uma curva padrão de absorbância versus a concentração de GH, e a partir da qual as concentrações nas amostras desconhecidas puderam ser calculadas.

4.3.5.2. GH (Hormônio do Crescimento)

O GH sérico foi determinado por imunoensaio enzimático tipo sanduiche de dois sítios a partir do kit comercial Rat/Mouse Growth Hormone-ELISA Marca: MILLIPORE (EZRMGH-45K).

Nesta análise, os princípios e procedimentos são idênticos aos descritos para a análise de insulina no item anterior.

4.3.5.3. IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina) sérico, hepático e muscular

O IGF-1 sérico e tecidual foi determinado por imunoensaio utilizando kit comercial MILLIPLEX Rat/Mouse IGF-1 Single Plex - Marca: MILLIPORE (RMIGF187K) para tecnologia Luminex™ xMAP.

A Tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex.

Os kits Milliplex foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados as microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção.

O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

4.3.5.4. IGFBP-3 (Proteína transportadora do fator de crescimento semelhante à insulina – 3)

A IGFBP-3 foi determinada por imunoensaio enzimático tipo “sanduiche”, utilizando kit comercial mouse/rat IGFBP-3-ELISA (m/rl IGFBP-3). Marca: MEDIAGNOSTIC (E031). Este ensaio utiliza dois anticorpos específicos e de alta afinidade para IGFBP-3. A IGFBP-3 nas amostras liga-se ao primeiro anticorpo específico em uma placa de microtitulação. No passo seguinte, o anticorpo secundário conjugado com biotilato e *Streptavidina-peroxidase* se liga ao complexo formado para a detecção das concentrações de IGFBP-3 nas amostras.

4.3.5.5. Uréia

Para determinação da Uréia sérica foram utilizados quites comerciais da empresa CELM adquiridos diretamente na mesma. O princípio do método é provocar a reação de hidrólise da uréia catalisada pela enzima uréase, liberando assim amônia e NADH pelo α -cetoglutarato catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GLDH). O consumo de NADH medido pela diminuição da absorbância lida em espectrofotômetro a 340 nm é proporcional à concentração de uréia da amostra, sendo este método denominado cinético.

4.3.5.6. Creatinina

Para determinação da creatinina sérica foram utilizados quites comerciais da empresa CELM adquiridos diretamente da mesma. O princípio do método, denominado cinético, é provocar a reação da creatinina com o picrato alcalino (reação de Jaffé), produzindo um cromógeno vermelho medido em espectrofotômetro a 500 nm.

4.3.6. Western Blotting

a.) Extração de proteínas

As amostras de músculo (plantar) que estavam armazenadas no freezer -80°C foram retirados, mergulhados em nitrogênio líquido, pulverizados entre placas de aço e pesados em microtubos. Imediatamente foi adicionado o tampão de extração quente ou frio de acordo com a proteína a ser investigada.

Para a análise da expressão de IRS-1 e p70S6K foi utilizado o protocolo de tampão quente e para as demais, protocolo de tampão frio de acordo com a tabela 3.

No caso do tampão quente, este foi preparado e mantido em banho-maria com água em ebulição até o momento da sua utilização.

O tecido foi, então, homogeneizado na quantidade de 80 uL de tampão frio para cada 10 mg de músculo ou 1 mL de tampão quente para cada 50 mg de músculo para lise e extração das proteínas.

Tabela 3. Componentes dos tampões frio e quente utilizados para extração de proteínas da amostra.

Tampão Frio	Tampão quente
Tampão fosfato de potássio (pH=7) 50mM	Trisma Base 1M
Sacarose 0,3M	EDTA 200nM (pH=7)
DTT 0,5mM	SDS 10%
PMSF 0,3mM	Fluoreto de sódio
NaF 10mM	Pirofosfato
Inibidor de fosfatase I 1:1000*	Ortovanadato
Inibidor de fosfatase II 1:1000*	Água ultra pura
Inibidor de protease 1:1000*	
Água ultra pura	

*todos os inibidores foram adquiridos da Empresa Sigma-Aldrich Ltda.

Para a homogeneização, foi usado homogeneizador elétrico tipo *polytron* (Ika T10 basic), diretamente no microtubo onde estavam as amostras, na velocidade máxima, em 3 *bursts* de cerca de 30 segundos cada. Na troca de amostras o homogeneizador era lavado primeiramente em álcool 70% e em seguida em água ultrapura. Após a homogeneização de cada amostra, os microtubos eram mantidos em gelo até o momento da centrifugação. Nas amostras extraídas com tampão quente, antes de serem acondicionadas no gelo, eram mantidas no máximo por 10 minutos em banho fervente para no intuito de reduzir a atividade de *fosfatases* uma vez que este coquetel não recebia inibidores de *fosfatases* e enzimas proteolíticas como no do tampão frio.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm em temperatura de -4°C , feitas alíquotas de 30 μL em vários microtubos e armazenadas em *freezer* (-80°C).

b.) Quantificação de proteína na amostra

A quantificação do teor de proteína na amostra foi realizada pelo método BCA (Pierce BCA protein assay kit – Thermo Scientific).

As amostras foram diluídas em vinte vezes para que as concentrações de proteínas detectadas nas amostras estivessem dentro da curva padrão. Foram pipetados em triplicata 25 μg de cada amostra bem como dos padrões, para plotar a curva, em microplaca de Elisa e em seguida foram adicionados 200 μL do reagente de trabalho em cada cavidade e deixado em banho Maria a 37°C sob agitação por 30 minutos. Após este procedimento foi realizada a leitura no aparelho de ELISA Biotek EL800 e as absorbâncias obtidas foram utilizadas para a construção da curva padrão e cálculo da concentração de proteínas nas amostras a partir da equação da reta.

A partir da concentração de proteína total conhecida nas amostras foi possível calcular a quantidade de amostra a ser pipetada no gel de poliacrilamida de acordo com o teor de proteína desejado.

c.) Preparo do gel de poliacrilamida

Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento ou empilhamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % persulfato de amônia e 0,1 % TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5% (para análise as proteínas mTOR), 8% (para IRS-1) 10% (para Akt e p70S6K) e 15% (para 4E-BP1), 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

c.) Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e *Western Blotting*

A quantidade de amostra a ser utilizada foi calculada de acordo com o teor de proteína desejada, sendo 100 ug para IRS-1 e 50 ug para as demais.

As amostras foram combinadas com tampão de amostra ou chamado de tampão Laemmli contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8%SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol.

Amostras provenientes do tratamento com tampão quente foram previamente aquecidas em banho-maria por dez minutos com o intuito de desnaturar as proteínas. Aquelas provenientes do tampão frio não necessitavam deste procedimento porque já recebiam o reagente DTT no tampão.

A cuba de eletroforese foi previamente preenchida com tampão de corrida (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM, 0,1% SDS, água ultra pura, pH 8,3) e logo em seguida, as amostras combinadas com tampão Laemmli foram aplicadas no gel de poliacrilamida, com ponteiras para gel (diâmetro da ponta 0,57 mm), balizado por marcador padrão de peso molecular *Full-Range Rainbow* de 12.000 a 225.000Da (Amersham GE Healthcare - RPN800E).

A eletroforese foi realizada em cubas para gel (Bio Rad), inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a

voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida. A exceção deste procedimento foi para a proteína IRS-1, para a qual a eletroforese foi realizada *overnight* a uma voltagem constante de 30 V.

d.) Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL Nitrocelulose) foi hidratada e, então, um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm (Whatman), gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM, 0,02% SDS, água ultra pura pH 8,3), sob corrente de 25 V, por 90 min. Deve-se destacar que a transferência foi gelada, colocando gelo dentro da cuba ao redor das "sanduicheiras".

A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 minutos, com corante *Ponceau* (1% *ponceau*, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% $\text{KH}_2(\text{PO})_4$, 1,15% $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO})_4$, 0,5% Tween].

e.) Sondagens das proteínas com anticorpos

As membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada e os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de albumina bovina a 5%, em tampão PBST, por 60 minutos, sob agitação. Em seguida foram feitas três lavagens com PBST de 5 minutos cada uma.

Os anticorpos específicos de cada proteína de interesse foram adquiridos da empresa *Cell Signaling Technology* (Beverly, MA, USA), com exceção do anticorpo para IRS-1 fosforilada no resíduo de tirosina 612 que foi proveniente da Invitrogen Corporation (Camarillo, CA, USA) foi diluído [1: 1000 para fosfo-IRS-1 (Tyr⁶¹²), IRS-1, Akt-1, p70S6k e 4E-BP1 totais], [1:500 fosfo-Akt-1 (Thr³⁰⁸, Ser⁴⁷³), fosfo-p70S6K (Thr³⁸⁹), fosfo-4E-BP1 (Thr⁷⁰), fosfo-mTOR (Thr²⁴⁴⁸) e mTOR total] em 10 mL de PBST a 3% de albumina bovina por

membrana. A incubação das membranas com a solução de anticorpo foi realizada *overnight*, sob agitação em geladeira a 4°C.

Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes, por 5 min, com PBST, e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em PBST, por 1h, sob agitação em geladeira e novamente lavada no mesmo sistema para a revelação.

A proteína normalizadora para fins de quantificação foi a alfa-tubulina, que é uma proteína constitutiva de 52 kDa. Para a obtenção dos *blottings* dessa proteína foi utilizado o método de *stripping* quando a localização era próxima da proteína chave ou dividia-se a membrana em 2 partes para incubação paralela com o anticorpo específico na diluição de 1: 1000.

f.) Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do *kit* ECL *Advance* (GE Healthcare), composto por luminol, fenol e peróxido dehidrogênio, e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas.

Os *blots* foram visualizados pelo sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare), que capturou imagens por 7 minutos, e analisados pelo *software* Quantity One (Bio-Rad).

g.) Stripping de membrana

Após a revelação das membranas com as proteínas de interesse, algumas conseguiram ser reutilizadas para verificar as proteínas totais ou a proteína normalizadora pelo procedimento de *stripping* da membrana que consiste na retirada dos anticorpos da superfície da mesma.

O processo teve início com três lavagens de 5 minutos cada com 20 mL de PBST por par de membranas num recipiente pequeno, em seguida as membranas permaneceram por 30 minutos, sob agitação em geladeira a 4°C, em 20 mL de solução de *stripping* preparada no laboratório (pH 2,8) contendo glicina, cloreto de sódio e água. Finalizada esta etapa, essa solução foi desprezada e mais 20 mL da mesma solução de *stripping* foi adicionada

juntamente com 1.250 µL de solução de hidróxido de sódio 1 N, permanecendo assim por mais 30 minutos sob agitação em geladeira a 4°C. Após o término deste processo, as membranas foram lavadas por três vezes novamente e repetido o mesmo ciclo por mais duas vezes.

4.4. Análise Estatística

Inicialmente, foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk e nas variáveis cuja normalidade não foi confirmada, procedimentos não paramétricos foram utilizados com auxílio do programa software Graph Pad Prism 5.

Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão. As comparações entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA-one-way), seguida do teste post hoc de Scheffe, para identificação dos contrastes significantes ($p < 0,05$). Porém, os resultados foram previamente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias (*Levene's*.)

Em todas as análises foi considerado um valor de alfa de 0,05. A análise estatística foi realizada no software SPSS versão 18.0.

5. Resultados

5.1. Evolução da massa corporal dos animais

A evolução da massa corporal dos animais foi avaliada semanalmente e está representada na figura 9. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados ao longo das sete semanas de experimento ($P < 0,05$).

Figura 9. Valores de massa corporal por semana expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.2. Consumo médio de ração

O consumo médio de ração foi avaliada semanalmente e expressa em gramas/100 g de massa corporal dos ratos como pode ser observada na figura 10. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ao longo das sete semanas de experimento ($p < 0,05$).

Figura 10. Consumo de ração médio, valores expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

Tabela 4. Quantidades médias consumidas de proteína e energia proporcionais ao consumo médio de ração em gramas por 100 g de massa corporal dos animais.

	Proteína (g)	Energia (kcal)
CS	1,36 ± 1,19	29,87 ± 4,13
CT	1,24 ± 0,13	27,25 ± 2,96
AS	1,21 ± 0,17	28,23 ± 3,87
AT	1,10 ± 0,13	25,55 ± 3,17

Valores Expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. Arginina Sedentário; AT – Arginina Treinado; CS – Dieta Controle Sedentário; CT- Dieta Controle Treinado.

5.3. Teste de Tolerância à Glicose (OGTT)

O teste de tolerância oral à glicose foi realizado na primeira e repetido na última semana de experimento, sendo os valores expressos em relação à área sob a curva de cada animal e posteriormente calculada a média e o desvio-padrão de cada grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparando os momentos iniciais e finais do experimento ($p < 0,05$). Esses resultados podem ser observados nas figuras 11 e 12.

Figura 11. Área sobre a curva (ASC) de glicemia após administração de glicose via gavagem antes do início do experimento (OGTT inicial). Valores expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

Figura 12. Área sobre a curva (ASC) de glicemia após administração de glicose via gavagem antes do início do experimento (OGTT final). Valores expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.4. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

O teste de tolerância à insulina foi realizado na primeira e repetido na última semana de experimento, sendo os valores expressos em relação à taxa de decaimento da glicose sanguínea ($\% \text{ min}^{-1}$) de cada animal e posteriormente calculados a média e o desvio-padrão de cada grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparando os momentos iniciais e finais do experimento ($p < 0,05$). Esses resultados podem ser observados nas figuras 13 e 14.

Figura 13. Taxa de decaimento da glicemia em %^{min-1} após administração de insulina antes do início do experimento (Kitt inicial). Valores expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

Figura 14. Taxa de decaimento da glicemia em %^{min-1} após administração de insulina ao final do experimento (Kitt final). Valores expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.5. Aminograma

Foi realizado aminograma nas rações experimentais para garantir a proporção adequada de aminoácidos oferecidos e certificar-se da porcentagem de arginina correspondente ao desenho experimental do estudo. Pode-se observar que as em relação específica a arginina a ração controle apresentava 0,49% enquanto a ração arginina apresentava 2,3% deste aminoácido conferindo confiabilidade ao estudo. Esses valores podem ser observados na tabela 5.

Para verificar se a suplementação de arginina ou do mix de aminoácidos não essenciais foi capaz de alterar as concentrações plasmáticas dos mesmos, foi realizado aminograma também no plasma dos animais. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$) e esses dados podem ser observados na tabela 6.

Tabela 5. Aminograma das rações experimentais.

<i>Aminoácidos</i>	<i>Ác. Aspartico</i>	<i>Ác. Glutâmico</i>	<i>Serina</i>	<i>Glicina</i>	<i>Histidina</i>	<i>Arginina</i>	<i>Treonina</i>	<i>Alanina</i>	<i>Prolina</i>	<i>Tirosina</i>	<i>Valina</i>	<i>Metionina</i>	<i>Cistina</i>	<i>Isoleucina</i>	<i>Leucina</i>	<i>Fenilalanina</i>	<i>Lisina</i>	<i>Proteína Bruta</i>	<i>Soma - aa</i>
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Ração Arginina	0,92	2,9	0,57	0,22	0,37	2,3	0,56	0,38	1,29	0,67	1,07	0,26	0,28	0,75	1,17	0,68	0,88	16,44	15,27
Ração Controle	2,33	3,13	1,5	0,93	0,41	0,49	0,65	1,26	2,44	0,73	1,14	0,37	0,11	0,79	1,25	0,72	0,97	17,77	19,21

Tabela 6. Concentrações séricas de arginina e dos aminoácidos utilizados no mix de aminoácidos essenciais na ração dos animais.

Aminoácidos	Grupos (n=8)				
mg/kg	AS	AT	CS	CT	<i>p</i>
Arginina	22,7 ± 3,7	22,1 ± 3,7	22,2 ± 2,1	19,8 ± 1,5	0,1824
Ácido aspártico	3,9 ± 1,6	4,4 ± 2,8	5,8 ± 4,5	2,2 ± 0,8	0,5272
Serina	18,39 ± 1,9	18,8 ± 1,4	18,4 ± 2,7	17,3 ± 1,0	0,5159
Glicina	19,7 ± 1,4	20,2 ± 1,0	22,6 ± 2,3	23,2 ± 4,8	0,1730
Alanina	30,9 ± 3,3	32,3 ± 4,5	31,0 ± 4,6	28,1 ± 3,8	0,3575
Prolina	13,6 ± 1,8	14,3 ± 2,4	14,1 ± 1,8	11,7 ± 1,0	0,0844

Valores Expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. Arginina Sedentário; AT – Arginina Treinado; CS – Dieta Controle Sedentário; CT- Dieta Controle Treinado.

5.6. Parâmetros bioquímicos séricos e teciduais

Os parâmetros bioquímicos relativos às concentrações sanguíneas de glicose, uréia, creatinina, insulina, GH, IGF-1 e IGFBP-3, bem como as concentrações musculares e hepáticas de IGF-1 podem ser observados nas tabelas 7 e 8. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, com exceção das concentrações de creatinina que foram significativamente maiores nos grupos suplementados com arginina ($p < 0,05$).

Tabela 7. Perfil hormonal sérico e tecidual dos grupos experimentais.

Parâmetro	Grupos (n=8)				
	AS	AT	CS	CT	<i>p</i>
Insulina sérica ng/dL	0,97 ± 0,75	1,33 ± 0,91	1,36 ± 0,68	2,31 ± 1,47	0,0730
GH sérico ng/dL	8,56 ± 9,53	8,97 ± 13,58	8,34 ± 10,42	10,75 ± 15,03	0,9891
IGF-1 sérico ng/dL	525,5 ± 111,7	607,2 ± 79,9	502,7 ± 51,8	513,4 ± 60,8	0,0560
IGF-1 muscular ng/dL	1,34 ± 0,94	0,65 ± 0,39	1,06 ± 0,90	0,94 ± 0,67	0,6141
IGF-1 hepático ng/dL	14,0 ± 4,1	11,7 ± 1,7	11,8 ± 1,9	13,7 ± 5,1	0,6847
IGFBP-3 ng/dL	136,2 ± 40,1	164,3 ± 42,5	133,7 ± 23,1	135,8 ± 8,1	0,3478

Valores Expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. Arginina Sedentário; AT – Arginina Treinado; CS – Dieta Controle Sedentário; CT- Dieta Controle Treinado

Tabela 8. Concentrações de Glicose, Uréia e Creatinina encontrados nos grupos experimentais.

Parâmetro	Grupos (n=8)				
	AS	AT	CS	CT	<i>p</i>
Glicose plasmática mg/dL	118,7 ± 9,7	110,7 ± 9,1	123,5 ± 13,6	127,8 ± 14,3	0,111
Uréia sérica mg/dL	28,8 ± 5,7	32,8 ± 8,9	26,6 ± 2,9	26,4 ± 7,0	0,188
Creatinina mg/dL	0,575 ± 0,052 ^a	0,570 ± 0,043 ^a	0,518 ± 0,040 ^b	0,508 ± 0,056 ^b	0,035

Valores Expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Tukey considerando $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. AS – Arginina Sedentário; AT – Arginina Treinado; CS – Dieta Controle Sedentário; CT- Dieta Controle Treinado

5.7. Expressão de proteínas da via da IRS-1 e mTOR (*Western blotting*)

5.7.1. IRS-1 Total

A expressão da proteína IRS-1 pode ser observada na figura 15, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de IRS-1 representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 15. Valores de IRS-1 (substrato do receptor de insulina – 1) expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.2. Phospho-IRS-1 (Tyr⁶¹²)

A fosforilação da proteína IRS-1 em resíduo de Tyr⁶¹² pode ser observada na figura 16, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de p-IRS-1 representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 16. Valores de IRS-1 (substrato do receptor de insulina – 1) fosforilado em resíduos de Tyr⁶¹² expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.3. Akt-1 Total

A expressão da proteína Akt-1 pode ser observada na figura 17, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de Akt-1 representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 17. Valores da proteína Akt totais expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.4. Phospo-Akt-1 (Thr³⁰⁸ e Ser⁴⁷³)

As fosforilações da proteína Akt-1 em resíduo de Thr³⁰⁸ e Ser⁴⁷³ podem ser observadas na figura 18 e 19 respectivamente. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de p-Akt (Thr³⁰⁸) e p-Akt (Ser⁴⁷³) representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 18. Valores de Akt fosforilada em resíduos de Thr³⁰⁸ expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

Figura 19. Valores Akt fosforilada em resíduos de Ser⁴⁷³ expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.5. mTOR Total

A expressão da proteína mTOR pode ser observada na figura 20, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de mTOR representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 20. Valores da mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) totais expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.6. Phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸)

A fosforilação da proteína mTOR em resíduo de Ser²⁴⁴⁸ pode ser observada na figura 21, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de p-mTOR representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 21. Valores da mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) fosforilada em resíduos de Ser²⁴⁴⁸ expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.7. 4E-BP1 Total

A expressão da proteína 4E-BP1 pode ser observada na figura 22, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de 4E-BP1 representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 22. Valores de 4E-BP1 totais expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.8. Phospho-4E-BP1 (Thr⁷⁰)

A fosforilação da proteína 4E-BP1 em resíduo de Thr⁷⁰ pode ser observada na figura 23, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de p-4E-BP1 representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 23. Valores de 4E-BP1 fosforilados em resíduos de Thr⁷⁰ expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.9. p70S6K Total

A expressão da proteína p70S6K pode ser observada na figura 24, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de p70S6K representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 24. Valores de p70S6K (proteína-70 ribossomal S6 quinase) totais expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

5.7.10. Phospho-p70S6K (Thr³⁸⁹)

A fosforilação da proteína p70S6K em resíduo de Thr³⁸⁹ pode ser observada na figura 25, na qual os valores estão expressos em unidades arbitrárias e as bandas de fosfo-p70S6K representadas pelas melhores fotos das membranas de cada grupo com sua alfa-tubulina correspondente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 25. Valores de p70S6K (proteína-70 ribossomal S6 quinase) fosforilada em resíduos de Thr³⁸⁹ expressos em Média e Desvio-padrão. Contrastes calculados por *anova-one-way* seguida do teste post hoc de Scheffe considerando $p < 0,05$. AS = Arginina Sedentário; AT = Arginina Treinado; CS = Dieta Controle Sedentário; CT = Dieta Controle Treinado.

6. Discussão

No presente trabalho foram verificados o efeito da suplementação de arginina em condição de exercício de alta intensidade sobre parâmetros relacionados ao metabolismo proteico, tendo como referência a via de síntese proteica muscular mediada pela *quinase* mTOR. Como esta via é também regulada pelos hormônios insulina, GH e IGF-1, além dos próprios aminoácidos presentes na célula muscular, foram avaliados parâmetros bioquímicos relativos à sensibilidade à insulina e ao eixo GH/IGF-1 para melhor esclarecimento dos resultados obtidos.

Outros parâmetros tidos como de acompanhamento, como evolução da massa corporal e consumo de ração foram somados a esta discussão para incrementar as referidas interpretações.

Relativo ao acompanhamento da massa corporal dos animais, durante o presente estudo, ressalta-se que este foi fundamental para garantir que os animais não apresentassem desnutrição ou qualquer alteração do estado nutricional que poderia ter interferido no objetivo do estudo.

Dessa maneira, pôde se observar que a massa corporal média dos grupos estudados não diferiu significativamente entre si e isso condiz com o consumo alimentar que também não foi diferente entre os grupos. Os animais dos quatro grupos estudados mantiveram semelhante ingestão alimentar a despeito de a arginina alterar significativamente as características organolépticas da ração.

É fato conhecido o efeito de diminuição de peso corporal causado pelo exercício físico, porém a maioria dos estudos diz respeito ao tipo de exercício de resistência ou aeróbio que mobiliza predominantemente reservas de gordura corporal como fonte de energia (KO et al, 2004; SLENTZ, et al, 2011; BRAY, 2012). Já os exercícios de força ou velocidade (anaeróbios) são capazes de alterar significativamente a proporção de massa magra, mas não refletem necessariamente em uma diminuição da massa corporal (KO et al, 2004; SLENTZ, et al, 2010).

Neste sentido, esse experimento se mostrou coerente, uma vez que o protocolo de exercício foi considerado anaeróbio e não se esperava redução da massa corporal dos animais treinados em relação aos sedentários.

Esses dados foram congruentes com os descritos no experimento de Rogatto (2001) que desenvolveu o protocolo de treinamento de saltos em cuba de água e que inclusive serviu de modelo para o presente estudo. Os animais que foram treinados neste mesmo sistema por seis semanas não apresentaram diferenças em relação à massa corporal dos animais sedentários.

Neste contexto de avaliação de alterações na massa corporal, Tan et al (2009) demonstraram que porcos suplementados com arginina numa proporção de 1,0% na ração por 60 dias não alteraram o peso corporal em relação ao início do experimento e nem comparado ao grupo controle que recebeu 2,05% de alanina para fins de equivalência nitrogenada na dieta. Contudo, esses autores perceberam, ao analisar a composição corporal dos animais, que aqueles suplementados com arginina demonstraram aumento no conteúdo de massa muscular em 5,5% e diminuição no tecido adiposo em 11% sendo dados estatisticamente significativos. A hipótese dos autores para explicar tais fenômenos baseou-se no aumento da fosforilação da AMPK, da enzima *lipase hormônio sensível*, da biogênese mitocondrial e do efeito de vasodilatação mediados pela ação do NO derivado da arginina.

Porém, isto não explicaria o aumento da massa muscular, pois a ativação da AMPK, por exemplo, resultaria na inibição da mTOR e consequentemente da síntese proteica. A AMPK é uma enzima que funciona como um “sensor” intracelular de baixa energia, de forma que a alta concentração de AMP, por privação de energia, promove sua ativação para que sejam iniciadas as reações de degradação de lipídeos e glicose a fim de restaurar o saldo energético positivo na célula (TULIPANO, 2012).

He et al (2009) também encontraram resultados semelhantes com a suplementação de 1,0% na ração de porcos por 46 dias. Os resultados incluíram um aumento de 8,1% no conteúdo de músculo esquelético na carcaça e diminuição de 8,0% do tecido adiposo no grupo suplementado em relação ao controle.

Isso demonstra que além do exercício, a arginina poderia favorecer *per se* o aumento da síntese proteica muscular e diminuição da gordura corporal refletindo num aumento de massa magra com a manutenção do peso corporal. Entretanto os mecanismos responsáveis por tal resposta ainda precisam ser elucidados.

Esse efeito pode ter ocorrido nos animais deste estudo, porém não foi possível afirmar que os suplementados ou treinados mantiveram a mesma massa corporal devido ao aumento da massa muscular e diminuição da gordura, porque não foi possível avaliar a composição corporal dos mesmos.

A relação entre a suplementação da arginina e o aumento do conteúdo de músculo esquelético encontrado em alguns estudos gerou a investigação sobre a possibilidade da arginina regular a via da mTOR, uma das mais importantes relacionadas com o aumento da síntese proteica. Em 2008, em um estudo pioneiro Yao et al avaliaram o efeito da suplementação de 0,6% de arginina na ração de porcos por 7 dias sobre a expressão de proteínas da via da mTOR e dos fatores de tradução eIF4E e eIF4G. A suplementação de arginina aumentou a fosforilação da mTOR, 4E-BP1 mas não afetou a p70S6K no músculo esquelético. Houve uma redução da associação da 4E-BP1 com o eIF4E e um aumento da formação do complexo ativo eIFG-eIF4E indicando que houve estímulo à tradução de proteínas musculares.

Em cultura de célula do jejuno de porcos neonatos (IPEC-J2) Bauchart-Thevret et al (2010) observaram que na presença de arginina houve aumento da fosforilação de mTOR em razão com sua proteína total (+79%) após 4 horas de incubação e também da 4E-BP1 (+ 329%) em razão com sua proteína total após 1 hora de incubação com 0,5 mM de arginina. Esse aumento foi significativo em relação ao tempo de incubação e não à concentração de arginina, sendo que não diferiu quando com as concentrações variando entre 0,1, 0,5 e 1 mM.

Outro estudo, também em cultura de células, porém utilizando uma linhagem de células trofoblásticas suínas isoladas (pTr2) para investigar retardo de crescimento intra-uterino (RCIU) demonstrou aumento da fosforilação da mTOR, 4E-BP1 e p70S6K quando incubadas com arginina numa concentração de 350 μ M. Os autores argumentam, a partir destes resultados, que várias espécies mamíferas, como porcos, ratos e ovelhas, poderiam aumentar a sobrevivência e o crescimento fetal se as fêmeas fossem suplementadas com arginina durante a gestação (KONG et al, 2011).

Esses efeitos não foram observados no presente estudo. O teor de arginina suplementada nas rações dos grupos AT e AS foi superior à maioria dos estudos da mesma linha de associação da arginina com a via da mTOR e mesmo assim não refletiu em alteração no conteúdo total ou fosforilação das

proteínas mTOR, 4E-BP1 e p70S6K. Isso indica que nesta concentração a arginina não é efetiva em promover um estímulo à síntese proteica em animais sedentários ou treinados por seis semanas.

As pesquisas em relação à ação da arginina com a via da mTOR ainda é bastante escassa e diversa em relação aos protocolos de estudo, fato que limita as discussões dos resultados deste estudo.

Por outro lado, a ativação da via molecular de síntese proteica no músculo depende de estímulos hormonais como GH, IGF-1 e insulina, que por sua vez podem ser modulados pela arginina também. Devido a isso, decidiu-se determinar as concentrações plasmáticas dos referidos hormônios para complementar os resultados encontrados.

O IGF-1 em particular foi determinado no sangue, músculo e fígado devido à sua ação endócrina, parácrina e autócrina. Nenhum desses hormônios sofreu alteração em resposta ao exercício ou à suplementação de arginina demonstrando que o protocolo deste experimento não foi eficaz em promover alterações hormonais que pudessem ser perceptíveis em estado de repouso.

Concordando com esses dados, Gomes et al (2004) não encontraram aumento na concentração plasmática ou tecidual (fígado e músculo) de IGF-1 em ratos que submetidos à treinamento moderado 6 semanas. Neste sentido a intensidade do exercício parece não alterar as concentrações de IGF-1 plasmáticas e teciduais decorridas 48 ou 72 horas da última sessão de treino. Esses dados foram condizentes com os observados por Gomes et al (2003) que utilizaram protocolo de exercício intenso também por seis semanas como treinamento de ratos adultos. Isto pode indicar que a intensidade do exercício não influenciaria os valores basais destes hormônios.

Fayh et al (2007) também não observaram aumento na concentração plasmática de GH e IGF-1 de jejum após um período de suplementação com 7 g por dia de arginina em indivíduos saudáveis. A suplementação foi administrada por sete dias e não alterou o perfil hormonal dos participantes, porém aumentou a excreção de uréia na urina em relação ao grupo placebo. Isso indica que a arginina pode ter sido utilizada principalmente no ciclo da uréia.

Tan et al (2009) em seu estudo já mencionado, também avaliaram as concentrações plasmáticas de insulina, GH e IGF-1 e não encontraram diferenças significativas entre os animais suplementados com arginina e controle.

No tocante à relação entre arginina e secreção de GH, esta é largamente discutida na literatura e ainda apresenta dados bastante controversos.

Alguns estudos apontam que a suplementação de arginina é capaz de estimular a secreção de GH (SUMINSKI et al, 1997, WIDEMAN et al, 2000, KANALEY, 2008).

Mais recentemente, Olinto et al (2012) realizaram um experimento incubando hemi-hipófises de ratos com três diferentes concentrações de arginina (7,1, 71 e 710 mM) e observaram que houve aumento do conteúdo de GH-mRNA somente na concentração de 71 mM de arginina e que este aumento era notável num período de tempo entre 60 minutos e 120 minutos de incubação. Isso reforça a idéia de que as respostas da suplementação de arginina em relação à secreção de GH dependem da dosagem que são utilizadas nos estudos.

Contudo, Collier et al (2006) já haviam constatado que o exercício foi mais eficaz em promover o aumento das concentrações séricas de GH em relação à suplementação de arginina isolada. Neste mesmo estudo, a combinação do exercício com a suplementação de arginina atenuou a secreção de GH.

A secreção aumentada de GH em resposta à suplementação de arginina parece ocorrer logo após o exercício, como observado por Zajac et al (2010), os quais relataram que a concentração de GH e IGF-1 foram maiores após 2 minutos do término da sessão de exercício de força e também 1 hora após, no período de recuperação, nos grupos que receberam arginina. Contudo, estes mesmos grupos apresentaram concentrações diminuídas de IGFBP-3 durante o período de recuperação.

No presente estudo, as concentrações de GH se mantiveram semelhantes em todos os grupos, indicando que a suplementação crônica de arginina, bem como o momento de coleta (72 horas após a última sessão de treino) não conseguiram evidenciar alterações na secreção de GH. Pelo fato do estímulo do treino ser compatível com um exercício de força, as concentrações

plasmáticas de GH poderiam estar aumentadas no período de recuperação como observado nos estudos citados, porém após 72 horas estas já teriam retornado aos valores basais.

O momento da eutanásia dos animais foi determinante para a apresentação destes resultados, pois como se especulava o efeito crônico da suplementação de arginina e do exercício físico anaeróbio, optou-se por realizar as coletas 72 horas após a última sessão de treino. Neste período, provavelmente já haveria um restabelecimento das concentrações plasmáticas de aminoácidos e dos hormônios investigados. Pôde se observar que as concentrações séricas de arginina não diferiram entre os grupos, assim como de GH, IGF-1 e IGFBP-3, o que torna esses dados coerentes.

Da mesma forma, as concentrações semelhantes de IGF-1 muscular e hepática entre os grupos são coerentes com a não alteração do GH, uma vez que o GH representa o principal estímulo para a síntese de IGF-1 principalmente no fígado. Gomes et al (2004) também não encontraram alterações nas concentrações musculares e hepáticas entre ratos treinados 48 horas após a última sessão de treinamento e ratos sedentários.

Atualmente, discute-se a ação independente das IGFBPs, das quais a IGFBP-3 parece ter efeitos contrários ao IGF-1 como diminuir a proliferação celular e estimular a apoptose enquanto a IGFBP-1 aumentaria a migração celular (ROSENZWEIG, 2004). A IGFBP-3 quando ligada ao IGF-1 prolonga sua meia vida e funciona como um *pool* de reserva do IGF-1, pois este na forma livre é rapidamente degradado. Para garantir a ação do IGF-1 nos tecidos, 90% deste circula associado às IGFBPs e a sua ligação o receptor celular (IGF-IR) depende da diminuição da afinidade com as IGFBPs.

Neste contexto, a IGFBP-3 representa um papel regulador chave na biodisponibilidade de IGF-1 porque diminui sua afinidade com o IGF-1 quando se liga à superfície celular e diante disso, as concentração séricas de IGFBP-3 costumam ser inversamente proporcionais às concentrações de IGF-1 livre (ADAMO et al, 2005).

O exercício parece estimular o aumento da secreção de GH, IGF-1 e IGFBP-3 que podem ser percebidas algumas horas após o fim do exercício, porém pouco se sabe em relação ao impacto da intensidade na secreção destes elementos. Wahl et al, (2010) observaram que as concentrações de GH e IGFBP-3 se elevaram após uma sessão de exercício de alta intensidade, mas

não após uma sessão de exercício moderado, enquanto as concentrações de IGF-1 não se alteraram em ambas as situações. Hasani-Ranjbar et al (2012) também não detectaram alterações de IGF-1 pós-exercício resistido, porém descreveram decréscimo significativo das concentrações de IGFBP-3 após o exercício o que condiz com os achados de Zajac et al (2010) descritos anteriormente.

O exercício parece resultar em diferentes alterações sobre o IGF-1 e suas IGFBPs e essas variações podem reforçar a idéia de que as IGFBPs possuem ações independentes do IGF-1, que vão além de simplesmente transportá-lo e aumentar sua biodisponibilidade.

Para se avaliar o efeito do exercício sobre a secreção de GH, IGF-1 e IGFBPs, as coletas de sangue devem ser realizadas logo após o treino, inclusive isso permitiria as comparações com os estudos citados neste trabalho. Contudo o foco deste experimento não foi avaliar o efeito do exercício sobre a secreção destes elementos e sim o efeito da suplementação crônica de arginina sobre os mesmos em condição de estado treinado ou sedentário. Neste sentido, as coletas de sangue foram realizadas após a recuperação muscular total dos animais e se houvessem quaisquer alterações nestes parâmetros espera-se que fossem em decorrência da suplementação da arginina e dificilmente devido ao efeito agudo do exercício.

Em relação às concentrações de insulina, também não foi observada diferença estatisticamente significativa. Tem se encontrado na literatura recentes trabalhos revelando menores concentrações de insulina em indivíduos treinados em função de o exercício aumentar a sensibilidade celular à mesma (HUFFMAN et al, 2011; SUH et al, 2011; HOUGHAN; ROSS, 2011), contudo isto parece ser evidenciado em exercícios aeróbios quando praticados com maior frequência semanal (DUBÉ et al, 2012). Inclusive, no estudo de Slentz, et al (2010) foi demonstrado que o exercício aeróbio foi mais eficaz em aumentar a sensibilidade à insulina, entre outros parâmetros como gordura visceral e subcutânea em relação ao exercício anaeróbio em humanos.

No presente trabalho, objetivou-se mimetizar uma situação de exercício anaeróbio e a não alteração da concentração de insulina estão condizentes com estes dados.

A síntese proteica é profundamente afetada pela ação da insulina no músculo esquelético (GLASS, 2003; SARTORELLI & FULCO, 2004; FANZANI

et al, 2012) e por isso foi de fundamental aspeito avaliá-la paralelamente à sensibilidade celular à insulina do ponto de vista molecular e não somente pelas concentrações sanguíneas.

Primeiramente foi necessário garantir que todos os grupos iniciassem o experimento sem alterações prévias na sensibilidade à insulina que pudessem alterar a resposta de síntese proteica e que não diferiam entre si. Isso pode ser observado tanto pelo teste de tolerância oral à glicose (OGTT) quanto pelo teste de tolerância à insulina (ITT) iniciais e notou-se também que ao final do experimento estes grupos não desenvolveram resistência à insulina como observada nos estudos de Barbosa et al (2006) e Barbosa et al (2009), bem como não tiveram também a sensibilidade aumentada.

A expressão de IRS-1 e Akt-1 foram convergentes em confirmar uma não alteração da sensibilidade à insulina, pois não foram diferentes entre os grupos estudados. Ambas as proteínas reagiram ao estímulo à insulina semelhantemente demonstrando que a via da mTOR poderia ser ativada por esse caminho, mas não foi diferente entre os grupos estudados.

Akt é regulada por dois eventos de fosforilação independentes, cada qual ocorrendo em um resíduo específico. Até o momento assume-se que a proteína responsável pela fosforilação no resíduo Thr³⁰⁸ é a PDK1 que é ativada pela sequencia de eventos oriundos da fosforilação da IRS-1 e a fosforilação concomitante no resíduo de Ser473 é, em princípio, de responsabilidade do complexo mTOR2. Esse mecanismo, principalmente relativo à fosforilação em Ser473, ainda não está claro, porém sabe-se que ele não é essencial para a ativação completa da Akt, pois substratos da Akt conseguem ser fosforilados por ela, mesmo quando não há fosforilação no resíduo Ser⁴⁷³ (GUNN, 2008).

Neste estudo foi observado que a fosforilação em Akt, em resposta ao estímulo à insulina, foi mais expressivo na Akt-Ser⁴⁷³ em relação à Akt-Thr³⁰⁸, o que de certa forma não era esperado de acordo com as descrições na literatura. Como não foram determinadas as atividades dos complexos da mTOR, não há como especular o resultado desta fosforilação mais intensa em Ser⁴⁷³, porém pode-se afirmar que a proteína Akt respondeu ao estímulo à insulina mesmo em resíduo de Ser⁴⁷³ mas não propagou esse estímulo para a mTOR.

A mTOR, assim como as demais proteínas *downstream* avaliadas neste estudo, não repetiram o padrão “com ou sem” estímulo de insulina, demonstrado na IRS-1 e Akt, talvez porque sua ativação não seja dependente exclusivamente da cascata iniciada no receptor de insulina. Maiores investigações são necessárias no âmbito da dupla fosforilação da Akt e sua resposta para mTOR para se elucidar melhor essa regulação.

Entretanto, não se pode ignorar a relação entre a ativação da sinalização intracelular da insulina com a resposta de síntese proteica e neste contexto a arginina tem se correlacionado tanto com a diminuição da sensibilidade à insulina quanto com o seu aumento, o que poderia interferir de modo positivo ou negativo na resposta de síntese proteica muscular.

A resistência parece estar associada à dosagens menores como no estudo de Barbosa et al (2009), no qual os autores encontraram menor fosforilação de IRS-1/2 e de Akt em músculo, fígado e tecido adiposo, além de menor translocação do GLUT-4 em músculo e tecido adiposo de ratos que receberam uma água adicionada de arginina (35 mg/d). Os autores argumentam que a resistência à insulina pode ser reflexo da interação da via do GH com a da insulina (cross-talk), uma vez que os mesmos encontraram também aumento no mRNA para GH e dessa forma o estímulo da secreção de GH induzido pela arginina poderia causar alterações pós-receptor nas células sensíveis à insulina.

Em estudo anterior do mesmo grupo de pesquisadores (Barbosa et al, 2006) já haviam encontrado aumento do conteúdo de mRNA para GH na hipófise de ratos suplementados com arginina e estes dados se correlacionaram com uma menor taxa de decaimento da glicose plasmática observada no ITT e uma maior concentração de insulina plasmática denotando quadro de resistência periférica à insulina.

De acordo com Dominici et al (2005) a ligação do GH em seu receptor promove a fosforilação das proteínas Stats que atuam como fatores de transcrição para diversos genes inclusive de proteínas denominadas SOCS. Essas últimas são responsáveis por fosforilar a IRS-1 e promover sua degradação pelo processo de ubiquitinação e também competir pelos sítios de fosforilação da JAK2, proteína constitutiva do receptor de GH, que também fosforila resíduos de IRS-1 para auxiliar à captação de glicose em estado de jejum. Diante deste cenário, pode-se inferir que o GH de forma indireta

colabora para um aumento da resistência periférica à insulina e justificaria os achados de Barbosa et al (2009).

Por outro lado, o mecanismo atribuído para o aumento da sensibilidade à insulina por intermédio da arginina pode estar associado ao aumento da produção de NO (HIGAKI et al, 2001).

Em estudo recente, Solomon et al (2011) encontraram correlação entre a tolerância à glicose, perfusão muscular e as concentrações de NO_x ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) em indivíduos obesos adultos com diabetes tipo II. Este estudo demonstrou que a sensibilidade à insulina pode ser afetada pela diminuição da disponibilidade de nutrientes para o tecido muscular em indivíduos obesos devido à menor irrigação sanguínea e menor concentração de NO. A densidade capilar muscular e a biodisponibilidade do NO são progressivamente diminuídas conforme o aumento da intolerância à glicose limitando a captação e o metabolismo de nutrientes nestas células.

Considerando que o tecido muscular representa o principal elemento no controle glicêmico, os autores alegam que se o fluxo sanguíneo para o músculo está prejudicado, a concentração de glicose permanece alta no sangue e conseqüentemente induz à hiperinsulinemia. O aumento da produção de NO pode representar um fator chave na melhora da sensibilidade à insulina ao passo que promoveria uma maior vasodilatação e melhoraria o fluxo de sangue e nutrientes para as células musculares.

Acrescentando a variável do exercício à relação arginina/insulina, Tsai et al (2009) submeteram atletas de judô a uma única sessão de exercício de *endurance* a 75% do VO_2 máx por 60 minutos e logo em seguida eles foram suplementados com arginina (0,1 g/kg) em solução de 150mL. Cateteres foram colocados nos indivíduos para coletas de sangue antes do exercício e nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o exercício. Os autores descreveram um aumento significativo da concentração de glicose após 15 minutos, insulina após 30 minutos e diminuição da concentração de ácidos graxos livres após 30 minutos da ingestão de arginina.

Os mecanismos responsáveis por esse efeito ainda são discutidos, mas a hipótese que os autores levantaram seria que a arginina pode ser captada pelas células pancreáticas para estimular a secreção de glucagon que resultaria num aumento da glicemia e indução subsequente da secreção de insulina. Outro mecanismo possível seria pela ação do NO, porém os mesmos

pesquisadores quantificaram o NO medindo a sua oxidação enzimática para NO_2^- (nitrito) e NO_3^- (nitrato) denominando de NO_x ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$), uma vez que o NO é rapidamente oxidado na presença de oxihemoglobina e excretado pela urina e sua determinação é bastante difícil. Todavia, neste estudo não foi observado aumento da concentração de NO_x estimulada pela arginina.

Outro estudo de Jang et al (2011) encontrou alterações significativas na concentração de glicose e insulina após o consumo de uma solução contendo 1,2 g/kg de glicose ou 1,0 g/kg de glicose + 0,1 g/kg de arginina + 0,1 g/kg de BCCA logo após 3 séries de velocidade em cicloergômetro. Todavia, não houve diferença entre o grupo que recebeu somente carboidrato e no grupo que recebeu carboidrato com arginina e BCAA, demonstrando que o efeito de elevação da glicose e da insulina plasmática foi dada pelo carboidrato em ambos os grupos.

Quando não há alteração da sensibilidade à insulina ou aumento da concentração de NO em protocolos de suplementação de arginina pode-se supor que este aminoácido foi preferencialmente utilizado como substrato pela enzima *arginase* do ciclo da uréia convertendo-a em ornitina e uréia. (Apostol et al, 2003).

Os ciclos da uréia e de Krebs são integrados no fígado, de forma que a maior atividade do primeiro pode induzir à maior liberação de fumarato a partir da ação da enzima *argininosuccinato sintetase* que catalisa a reação de citrulina para arginina + fumarato. A arginina, por sua vez segue no ciclo da uréia para produzir ornitina e uréia na etapa final e o fumarato pode ser aproveitado como intermediário do ciclo de Krebs aumentando assim a geração de citrato. (NELSON; COX, 2004b) A atividade da *fosfofrutoquinase* (FFK) é sensível às concentrações de citrato e pode diminuir a velocidade da via glicolítica, o que representa inclusive uma preservação na utilização da glicose (Apostol et al, 2003).

Em concordância com os resultados de Tsai et al (2009), Tang et al (2011) também não encontraram diferenças na concentração de NO após ingestão de arginina. Os autores mediram as concentrações plasmáticas de nitritos, nitratos como marcadores de NO, antes e depois de uma sessão com repetições de exercício força (*leg press* e cadeira extensora), sendo que ao final do exercício os participantes receberam uma bebida enriquecida com aminoácidos essenciais contendo 10 g de arginina ou glicina (para controle). O

fluxo sanguíneo foi monitorado também e não mostrou alteração no grupo que recebeu a solução com arginina.

Os autores discutem que estes resultados vão de encontro à maioria dos estudos publicados nesta área, provavelmente porque os fenômenos positivos em relação à maior produção de NO e vasodilatação após suplementação de arginina se ocorre quando esta é infundida intravenosamente. Apesar de a arginina apresentar uma boa biodisponibilidade (cerca de 70%) após administração oral o pico de concentração plasmática da mesma é ainda inferior àquele produzido pela infusão endovenosa (BODE-BÖGER, 1998), e ainda não seria possível fazer os indivíduos consumirem doses muito altas de arginina porque esta está associada com distúrbios gastrointestinais (WU, 2009)

Em estudo semelhante também não foi encontrado aumento da concentração de NO_x no período de recuperação após 3 séries de exercício de força para o bíceps, sendo que a suplementação foi administrada 80 minutos antes da sessão de exercício contendo 6g de arginina (ÁLVARES et al, 2012).

Os efeitos anabólicos da arginina independentes do NO já foram descritos anteriormente por Zhang et al (2008), pois os autores observaram um aumento da síntese proteica, a partir do método de fenilalanina marcada, em dois tecidos, músculo intacto e orelha de coelho que sofreu injúria por queimadura. Os animais foram distribuídos em dois estudos e infundidos com arginina ou L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina-metil-ester), um conhecido inibidor da NOS, após a lesão. O balanço da síntese proteica foi maior tanto nos coelhos que receberam infusão de arginina quanto naqueles que receberam L-NAME em relação aos seus controles, indicando que a arginina exerceu uma ação anabólica independente do NO.

Nesta perspectiva, não encontrar efeitos da suplementação da arginina sobre a vasodilatação ou mesmo a síntese proteica muscular pode indicar que esses efeitos sejam doses-dependentes como visto em alguns estudos em cultura de células e que estas doses geram maior concentração plasmática de arginina quando administradas de forma endovenosa em comparação à via oral.

A despeito da questão das doses, também se deve ponderar que a arginina é um dos aminoácidos mais versáteis do metabolismo e muitas vezes o destino que o organismo reserva ao aumento da biodisponibilidade de

arginina nem sempre é o esperado quando se traça um desenho experimental com a suplementação deste aminoácido.

Segundo Dioguardi, (2011b) deve-se considerar que a suplementação crônica de arginina aumenta progressivamente a atividade da *arginase*, enzima que produz uréia e compete pela arginina com a NOS, e que quanto mais arginina suplementada mais arginina seria destruída sem descartar a hipótese de toxicidade.

Considerando esta hipótese, foram dosados neste estudo as concentrações de uréia circulantes, contudo não pôde se observar alterações significativas. Deve-se ponderar que após jejum de 12 horas, a uréia produzida pelo ciclo da uréia no fígado, mesmo que aumentada devido à maior oferta de arginina, já poderia ter sido eliminada pelos rins a fim de restabelecer as concentrações séricas normais.

Por outro lado, as concentrações de creatinina mostraram-se elevadas significativamente nos grupos que receberam arginina na ração. É de conhecimento que a arginina é um dos aminoácidos precursores de creatina, que por sua vez é metabolizada no músculo até a formação irreversível de creatinina. Dessa forma, pode se atribuir o aumento da creatinina nestes grupos à possibilidade da arginina ter sido direcionada para uma maior síntese de creatina.

Sureda & Pons (2012) discutem em uma recente revisão que a suplementação de citrulina parece ser mais eficaz para aumentar a oferta de arginina do que a própria suplementação de arginina diretamente. Isto porque a citrulina seria considerada um doador indireto de NO pelo fato de ser convertida em arginina e devido à sua menor eliminação poderia manter elevadas as concentrações extracelulares de arginina por mais tempo. Contudo não há muita informação na literatura sobre a proporção da síntese de arginina a partir de citrulina.

De qualquer forma, os estudos recentes relacionando a arginina com aumento da síntese proteica, são de grande valia e devem ser aprofundados, porque não se imaginava que um aminoácido em princípio, não essencial poderia apresentar alguma relação com o aumento da expressão de proteínas envolvidas na regulação da síntese protéica muscular.

A maioria dos trabalhos tendem à esse raciocínio porém no presente estudo não conseguimos demonstrar este efeito e sim na verdade uma

ineficácia da arginina sobre a síntese proteica do ponto de vista molecular. Contudo, deve-se considerar que a maioria desses trabalhos realizaram experimentos *in vitro* e que as repostas podem ser completamente diferentes quando experimentadas *in vivo*. Sobretudo, esses dados incrementam a literatura ainda bastante escassa nesta área e todos esses resultados são importantes para elucidar e nortear as aplicações clínicas da arginina no contexto atual.

7. Conclusões

A partir dos resultados encontrados dentro das presentes condições experimentais pode-se concluir que:

- Não houve diferença em relação à evolução de peso corporal e consumo de ração entre os grupos estudados.
- Não houve diferença na sensibilidade à insulina pelos métodos de OGTT e ITT nos momentos iniciais e finais do experimento entre os grupos estudados.
- A suplementação e o exercício anaeróbio não foram capazes de alterar as concentrações sanguíneas de repouso de GH, IGF-1, IGFBP-3, glicose e aminoácidos bem como as concentrações hepáticas e musculares de IGF-1 entre os grupos.
- A suplementação de arginina não resultou em aumento da concentração sanguínea de uréia, porém demonstrou efeito sobre a concentração de creatinina. Os valores séricos de creatinina foram maiores significativamente nos grupos suplementos indicando que houve possivelmente um desvio desta arginina para a síntese de creatina.
- A suplementação de arginina e o exercício não interferiram na expressão e fosforilação das proteínas chaves da via da mTOR em músculo de ratos.
- A suplementação de arginina, nas condições estudadas, não causou efeito sobre a sensibilidade à insulina nem sobre a expressão de proteínas envolvidas na síntese proteica muscular de ratos adultos.

8. Referências bibliográficas

- ABEL, T.; KNECHTLE, B.; PERRET, C.; ESER, P.; ARX, P.V.; KNECHT, H. Influence of chronic supplementation of arginina aspartate in endurance athletes on performance and substrate metabolism. **International Journal of Sports Medicine**, v.26, p.344-349, 2005.
- ADAMO, M.L.; WANG, L.; HERON, L.; BEN-YOSEF, D.; ZHAO, H.; ROITH, D.L. Overview and molecular aspects of insulin-like Growth factor system. In: HOUSTON, M.S.; HOLLY, J.M.P.; FELDMAN, E.L. **IGF and nutrition in health and disease**. Totowa: Humana Press, 2005. p.3-16.
- ALBA-ROTH, J.; MULLER, O.A.; SCHOPOHL, J.; VON WERDER, K. Arginina stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.67, p.1186-1189, 1988.
- ÁLVARES, T.S.; MEIRELLES, C.M.; BHAMBHANI, Y.N.; PASCHOALIN, V.M.F., GOMES, P.S.C. L-arginine as a potential ergogenic AID in health subjects. **Sports Medicine**, v.41, n.3, p.233-248, 2011.
- APOSTOL, A.T.; TAYEK, J.A. A decrease in glucose production is associated with an increase in plasma citrulline response to oral arginine in normal volunteers. **Metabolism**, v.52, n.11, 1512-1516, 2003.
- ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v.148, n.4, p.888-892, 2007.
- BALLOU, T.W.; NADLER, J.L. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.82, p.359-363, 1997.
- BARBOSA, T.C.; CARVALHO, J.E.N.; POYARES, L.L.O.; BORDIN, S.; MACHADO, U.F.; NUNES, M.T. Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. **Endocrinology**, v.150, p.2080–2086, 2009.
- BARBOSA, T.C.; POYARES, L.L.O.; MACHADO, U.F.; NUNES, M.T. Chronic oral administration of arginine induces GH gene expression and insulin resistance. **Life Sciences**, v.79, p.1444-1449, 2006.
- BAUCHART-THEVRET, C.; CUI, L.; WU, G.; BURRIN, D. Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by mTOR but not nitric oxide. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.299, n.E889-E909, 2010.

BODE-BÖGER, S.M.; BÖGER, R.H.; GALLAND, A.; TSIKAS, D.; FRÖLICH, J.C. L-Arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. **British Journal of Pharmacology**, v.46, p.489-497, 1998.

BRAY, G.A. Diet and exercise for weight loss. **JAMA , the Journal of the American Medical Association**, v.307, n.24, p.2641-2642, 2012.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.68, n.2, p.374-378, 1989.

BROSNAN, M.E.; BROSNAN, J.T. Renal arginine metabolism. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2791S-2795S, 2004.

CAMPBELL, B.I.; BOUNTY, P.M.; ROBERTS, M. The ergogenic potential of arginina. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.1, p.35-38, 2004.

CASANUEVA, F.F.; VILLANUEVA, L.; CABRANES, J.A.; CEBAZAS-CERRATO, J.; FERNANDEZ-CRUZ, A. Cholinergic mediation of growth hormone secretion elicited by arginina, clonidine, and physical exercise in man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.59, p.526-534, 1984.

CHROMIAK, J.A.; ANTONIO, J. Use of amino acid as growth hormone-releasing agents by athletes. **Nutrition**, v.18, p.657-661, 2002.

CLEMMONS, D.R. metabolic actions of insulin-like growth factor-1 in normal physiology and diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.41, p.425-443, 2012.

COLLIER, S.R.; CASEY, D.P.; KANALEY, J.A. Growth hormone reponses to varying doses of oral arginina. **Growth Hormone & IGF Research**, v.15, p.139-139, 2005.

COLLIER, S.R.; COLLINS, E.; KANALEY, J.A. Oral arginina attenuates the growth hormone response to resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.101, p.848-852, 2006.

D'ERCOLE, A.J.; ALLAN, D.S.; UNDERWOOD, E.L. Tissue concentrations of somatomedin C, further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, p.935-939, 1984.

DIOGUARDI, F. To give or not to give? Lessons from the arginine paradox. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v.4, p.90-98, 2011a.

DIOGUARDI, F. Clinical use of amino acids as dietary supplement: pro and cons. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.2, p.75-80, 2011b.

DOMINICI, F.P.; ARGENTINO, D.P.; MUNÓZ, M.C.; MIQUET, J.G.; SOTELO, A.I.; TURYN, D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. **Growth Hormone & IGF Research**, v.15, p.324–336, 2005.

DUBÉ, J.J.; FLEISHMAN, K.; ROUSSON, V.; GOODPASTER, B.H.; AMATI, F. Exercise dose and insulin sensitivity: relevance for diabetes prevention. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.44, n.5, p.793-799, 2012.

FANZANI, A.; CONRAADS, V.M.; PENNA, F.; MARTINET, W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.3, n.3, p.163-179, 2012.

FAYH, A.P.T.; FRIEDMAN, R.; SAPATA, K.B.; OLIVEIRA, A.R. Efeito da suplementação de L-arginina sobre a secreção de hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina em adultos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.51, v.4, p.132-140, 2007.

FOSTER, E.B.; FISHER, G.; SARTIN, J.L.; ELASSER, T.H.; WU, G.; COWAN, W.; PASCOE, D.D. Acute regulation of IGF-1 by alterations in post-exercise macronutrients. **Amino Acids**, v.42, p.1405-1416, 2012.

GATTI, R.; DE PALO, E.F.; ANTONELLI, G.; SPINELLA, P. IGF-I/IGFBP system: metabolism outline and physical exercise. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.35, n.7, p.699-707, 2012.

GLASS, D.J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends in Molecular Medicine**, v.9, p.344-350, 2003.

GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R.; MANCHADO-GOBATTO, F.B.; PAPOTI, M.; VOLTARELLI, F.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; ARAUJO, G.G. Adaptações fisiológicas adaptadas à roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v.7, n.1, p.137-147, 2008.

GOMES, J.R.; CAETANO, F.H.; HERMINI, H.A.; ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico sobre o hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.11, n.3, p.57-62, 2003.

GOMES, M.R.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A.; TIRAPEGU, J. Effect of moderate physical exercise on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor (IGF-1) in adults rats. **Nutrition Research**, v.24, p.555-564, 2004.

GOMES, M.R.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A.; TIRAPEGU, J. Effect of protein restriction on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor (IGF-1) in adults rats. **Nutrition Research**, v.23, p.1239-1250, 2003.

GOMES, M.R.; TIRAPEGU, J. Relação entre o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e atividade física. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v.3, p.66-76, 1998.

GRILLO, M.A.; COLOMBATTO, S. Arginine revisited: Minireview article. **Amino Acids**, v.26, p.345-315, 2004.

GUNN, R.M.; HAILES, H.C. Insights into the PI3-K-PKB-mTOR signaling pathway from small molecules. **Journal of Chemical Biology**, v.1, p.49-62, 2008.

HASANI-RANJBAR, S.; FAR, E.S.; HESHMAT, R.; RAJABI, H.; KOSARI, H. Time course responses of serum GH, insulin, IGF-1, IGFBP1 and IGFBP3 concentrations after heavy resistance exercise in trained and untrained men. **Endocrine**, v.41, p.144-151, 2012.

HE, Q.; KONG, X.; WU, G.; REN, P.; TANG, H.; HAO, F.; HUANG, R.; LI, T.; TAN, B.; LI, B.; TANG, Z. Metabolomic analysis of the response of growing pigs to dietary L-arginine supplementation. **Amino Acids**, v.37, p.199-208, 2009.

HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, p.252-5-257, 2001.

HIGAKI, Y.; HIRSHMAN, M.F.; FUJII, N.; GOODYEAR, L.J. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. **Diabetes**, v.50, p.241-247, 2001.

HOUGHAM K.A.; ROSS R. Evidence that the association between exercise intensity and insulin sensitivity is sex dependent. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v.36, n.5, 730-735, 2011.

HUFFMAN, K.M.; SLENTZ, C.A.; BATEMAN, L.A.; THOMPSON, D.; MUEHLBAUER, M.J.; BAIN, J.R.; STEVENS, R.D.; WENNER, B.R.; KRAUS, V.B.; NEWGARD, C.B.; KRAUS, W.E. Exercise-induced changes in metabolic intermediates, hormones, and inflammatory markers associated with improvements in insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v.34, n.1, p.174-176, 2011.

IQBAL, J.; ZAIDI, M. Molecular regulation of mechanotransduction. **Biochemical and biophysical research communications**, v.328, n.3, p.751-755, 2005.

JANG, T.R.; WU, G.L.; CHANG, C.M.; HUNG, W.; FANG, S.H.; CHANG, C.K. Effects of carbohydrate, branched-chain amino acids, and arginine in recovery period on the subsequent performance in wrestlers. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.8, p.21-32, 2011.

KANALEY, J.A. Growth hormone, arginine and exercise. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.11, p.50–54, 2008.

KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; KING, J.E.; LATEK, R.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v.110, p.163-175, 2002.

KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; LATEK, R.R.; GUNTUR, K.V.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Molecular Cell**, v.11, n.4, p.895-904, 2005.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Amino acids as regulators of gene expression. **Nutrition and Metabolism**, v.1, p.1-10, 2004.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Control of protein synthesis by amino acid availability. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.5, p.1-5, 2001.

KO, G.T. Short-term effects after a 3-month aerobic or anaerobic exercise programme in Hong Kong Chinese. **Diabetes, Nutrition & Metabolism**, v.17, n.2, p.124-127, 2004.

KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDET, D.S.; STAMLER, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**, v.372, n.6506, p.546-548, 1994.

KONG, X.; TAN, B.; YIN, Y.; GAO, H.; LI, X.; JAEGER, L.A.; BAZER, F.W.; WU, G. L-Arginine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophoblast cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, n.9, p.1178-1183, 2012.

KOZIRIS, L.P.; HICKSON, R.C.; CHATTERTON, R.T.; GROSETH, R.T.; CHRISTIE, J.M.; GOLDFLIES, D.G.; UNTERMAN, T.G. Serum levels of total and free IGF-1 and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. **Journal of Applied Physiology**, v.86, p.1436-1442, 1999.

LIU, T.H.; WU, C.L.; CHIANG, C.W.; LO, Y.W.; TSENG, H.F.; CHANG, C.K. No effect of short-term arginine supplementation on nitric oxide production, metabolism and performance in intermittent exercise in athletes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, n.6, p.462-468, 2009.

MATHENY, W.; MERRITT, E.; ZANNIKOS, V.; FARRAR, R.P.; ADAMO, M.L. Serum IGF-1-deiciency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.164-170, 2009.

MAUGHAN, R.J.; GREENHAFF, P.L.; HESPEL, P. Dietary supplements for athletes: emerging trends and recurring themes. **Journal of Sports Sciences**, v.29, suppl.1, p.S57-S66, 2011.

Mc CONELL, G.K. Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.10, p.46-51, 2007.

MORRIS, S.M. Enzymes of arginine metabolism. **Journal of Nutrition**, v.134, p.2743S-2747S, 2004.

NADER, G.A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p.1985-1996, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., eds. **Lehninger principles of biochemistry**. 4.ed. New York: Worth Publishers, 2005a. p.74-113.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidação de aminoácidos e produção de uréia. In: LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4.ed. New York: Worth Publishers, 2005b. p.650-683.

NOBUKUNI, T.; JOAQUIN, M.; ROCCIO, M.; DANN, S.G.; KIM, S.Y.; GULATI, P.; BYFIELD, M.P.; BACKER, J.M.; NATT, F.; BOS, J.L.; ZWARTKRUIS, F.J.T. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.14238-14243, 2005.

NORRELUND, H.; FRYSTYK, J.; JORGENSEN, J.O.L.; MOLLER, N.; CHRISTIANSEN, J.S.; ORSKOV, H.; FLYVBJERG, A. The effect of growth hormone on the insulin-like growth factor-I system during fasting. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.88, p.3292-3298, 2003.

NORRELUND, H. The metabolic role of growth hormone in humans with particular reference to fasting. **Growth Hormone & IGF Research**, v.15, p.95-122, 2005.

OLINTO, S.C.F.; ADRIÃO, M.G.; CASTRO-BARBOSA, T.; GOULART-SILVA, F.; NUNES, M.T. Arginine induces GH gene expression by activating NOS/NO signaling in rat isolated hemi-pituitaries. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n.11, p.1066-1073, 2012.

PHILLIPS, L.S.; PAO, C.I.; VILLAFUERTE, B.C. Molecular regulation of insulin-like growth factor-I and its principal binding protein, IGFBP-3. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.60, p.195-265, 1998.

PICHINI, S.; VENTURA, R.; PALMI, I.; CARLO, S.; BACOSI, A.; LANGOHR, K.; ABELLAN, R.; PASCUAL, J.A.; PACIFICI, R. Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of growth hormone and insulin misuse: immunoassay-based measurement in urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, p.1003-1010, 2010.

PIMENTEL, E. Insulin: and insulin-like growth factors In: PIMENTEL, E. **Handbook of growth factors: peptide growth factors**. Boca Raton: CRC Press, 1994. v.2.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as Improvements in the AIN – 76 diet. **Journal of Nutrition**, v.127, suppl.5, p.838S-841S, 1997.

ROGATTO, G.P. Influência do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de proteínas. **Motriz**, v.7, n.2, p.75-82, 2001.

ROGERO, M.M.; TIRAPGUI, J.; VINOLO, M.A.R.; BORGES, M.C.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O.; BORELLI, P. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with mycobacterium bovis bacillus calmette-guérin. **Journal of Nutrition**, v.138, p.1343-1348, 2008.

ROSENZWEIG, S.A. What's new in the IGF-binding proteins? **Growth Hormone & IGF Research**, v.14, p.329-336, 2004.

ROTWEIN, P.; THOMAS, M.J.; HARRIS, D.M.; GRONOWSKI, A.M., STUNFF, C.L. Nuclear actions of growth hormone: an *in vivo* perspective. **Journal of Animal Science**, v.75, suppl.2, p.11-19, 1997.

SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L.J. Exercise effects on muscle insulin signaling and action. Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.93, p.369-383, 2002.

SALTIEL, A.L.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SARTORELLI, V.; FULCO, M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. **Science's STKE**, v.224, p.re11, 2004.

SLENTZ, C.A.; BATEMAN, L.A.; WILLIS L.H.; SHIELDS, A.T.; TANNER, C.J.; PINER, L.W.; HAWK, V.H.; MUEHLBAUER, M.J.; SAMSA, G.P.; NELSON, R.C.; HUFFMAN, K.M.; BALES, C.W.; HOUMARD J.A.; KRAUS, W.E. Effects of aerobic vs. resistance training on visceral and liver fat stores, liver enzymes, and insulin resistance by HOMA in overweight adults from STRRIDE AT/RT. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.301, n.5, E1033-1039, 2011.

SOLOMON, T.P.J.; HAUS, J.M.; LI, Y.; KIRWAN, J.P. progressive hyperglycemia across the glucose tolerance continuum in older obese adults is related to skeletal muscle capillarization and nitric oxide bioavailability. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.96, n.5, p.1377-1384, 2011.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v.136, p.731-745, 2009.

SUH, S.; JEONG, I.K.; KIM, M.Y.; KIM, Y.S.; SHIN, S.; KIM, S.S.; KIM, J.H. Effects of resistance training and aerobic exercise on insulin sensitivity in overweight korean adolescents: a controlled randomized trial. **Diabetes & Metabolism Journal**, v.35, n.4, p.418-426, 2011.

SUMINSKI, R.R.; ROBERTSON, R.J.; GOSS F.L.; ARSLANIAN, S.; KANG, J.; SILVA, S.; UTTER, A.C.; METZ, K.F. Acute effects of amino acids ingestion and resistance exercise on plasma growth hormone concentration in young men. **International Journal of Sport Nutrition**, v.7, n.1, p.48-56, 1997. SUREDA, A.; PONS, A. Arginine and citrulline supplementation in sports and exercise: ergogenic nutrients. **Medicine and Sport Science**, v.59, p.18-28, 2012.

TAN, B.; YIN, Y.; LIU, Z.; LI, X.; XU, H.; KONG, X.; HUANG, R.; TANG, W.; SHINZATO, I.; SMITH, S.B.; WU, G. Dietary L-arginine supplementation increases muscle gain and reduces body fat mass in growing-finishing pigs. **Amino Acids**, v.37, p.169-175, 2009.

TANG, J.E.; LYSECKI, P.J.; MANOLAKOS, J.J.; MACDONALD, M.J.; TARNOPOLSKY, M.A.; PHILLIPS, S.M. Bolus arginine supplementation affects neither muscle blood flow nor muscle protein synthesis in young men at rest or after resistance exercise. **Journal of Nutrition**, v.141, p.195-200, 2011.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHAN, R.C. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature**, v.7, p.85-96, 2006.

TASAI, P.H.; TANG, T.K.; JUANG, C.L.; CHEN, K.W.C.; CHI, C.A.; HSU, M.C. Effects of arginine supplementation on post-exercise metabolic responses. **Chinese Journal of Physiology**, v.52, n.3, p.136-142, 2009.

THOMPSON, D.L.; WELTMAN, J.Y.; ROGOL, A.D.; METZGER, D.L.; VELDHUIS, J.D.; WELTMAN, A. Cholinergic and opioid involvement in release of growth hormone during exercise and recovery. **Journal of Applied Physiology**, v.75, p.870-878, 1993.

TORRES-LEAL, F.L.; MARREIRO, D.N. Considerações sobre a participação da creatina no desempenho físico. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.10, p.294-300, 2008.

TULIPANO, G.; FAGGI, L.; SIBILIA, A.G.; GIUSTINA, A. Points of integration between the intracellular energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and the somatotroph axis function. **Endocrine**, v.42, n.2,

VANDER, H.E.; BANDHAKAVI, L.S.; GRIFFIN, T.J.; KIM, D.H. Insulin signaling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nature Cell Biology**, v.9, p.316-323, 2007.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, E.; HELL, N.S.; CURI, R. Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.31, p.387-394, 1988.

VUGHT, A.J.A.H.; NIEUWENHUIZEN, A.G.; BRUMMER, R.J.M.; WESTERTERP-PLATENGA, M.S. Effects of oral ingestion of amino acids and proteina on the somatotrophic axis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, p.584-590, 2008.

WAHL, P.; ZINNER, C.; ACHTZEHN, S.; BLOCH, W.; MESTER, J. Effect of high- and low-intensity exercise and metabolic acidosis on levels of GH, IGFBP-3 and cortisol. **Growth Hormone & IGF Research**, v.20, p.380-385, 2010.

WIDEMAN, J.; WELTMAN, J.Y.; PATRIES, J.T.; BOWERS, C.Y.; SHAH, N.; STORY, S.; VELDHUIS, J.D.; WELTMAN, A. Synergy of L-arginine and GHRP-2 stimulation of growth hormone in men and women: modulation of exercise. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.279, n.4, p.R1467-R1474, 2000.

WOELFLE, J.; CHIA, D.J.; ROTWEIN, P. Mechanisms of growth hormone (GH) action. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.51261-51266, 2003.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v.37, p.1-17, 2009.

YAMAGUCHI, A.; IKEDA, Y.; HIRAI, T.; FUJIKAWA, T.; MORITA, I. Local changes of IGF-1 mRNA, GH receptor mRNA, and fiber size in rat plantaris muscle following compensatory overload. **Japanese Journal of Physiology**, v.53, n.1, p.53-60, 2003.

YANG, X.; YANG, C.; FARBERMAN, A.; RIDEOUT, T.C.; LANGE, C.F.M.; FRANCE, J.; FAN, M.Z. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. **Journal of Animal Science**, v.86, suppl., p.E36-E50, 2008.

YAO, K.; YIN, Y.L.; CHU, W.; LIU, Z.; DENG, D.; LI, T.; HUANG, R.; ZHANG, J.; TAN, B.; WANG, W.; WU, G. Dietary arginina supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. **Journal of Nutrition**, v.138, p.867-872, 2008.

ZAJAC, A.; POPRZECKI, S.; ZEBROWSKA, A.; CHALIMONIUK, M., LANGFORT, J. Arginine and ornithine supplementation increases growth hormone and insulin-like growth factor-1 serum levels after heavy-resistance exercise in strength-trained athletes. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.24, n.4, p.1082-1090, 2010.

ZHANG, X.J.; CHINKES, D.L.; WOLFE, R.R. The anabolis effect of arginine on proteins in skin wound and muscle is independent of nitric oxide production. **Clinical Nutrition**, v.27, p.649-656, 2008.

Anexos

Anexo 1.	Normas Específicas da CPG da FCF-USP	104
Anexo 2.	Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	104
Anexo 3.	Ficha de Aluno	104
Anexo 4.	Curriculum <i>Lattes</i>	104

Anexo 1. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Secretaria de Pós-Graduação****Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo 2.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/111 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Efeitos da suplementação de arginina sobre a expressão de proteínas envolvidas na regulação da síntese protéica muscular em ratos treinados em exercício intenso"** (Protocolo nº 253), de responsabilidade da pesquisadora **Mariana de Rezende Gomes** sob a orientação do Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 9 de novembro de 2009.

São Paulo, 10 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br