

O PAPEL DOS EXERCÍCIOS FÍSICOS E DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS SHR OVARIETOMIZADAS

Cássio Marcos Vilicev¹, Jaci Jociane Barbosa de Oliveira², Fernando Acácio Batista³

RESUMO:

Mudanças na composição corporal (CC), ou massa corporal (MC), acontecem frequentemente entre as mulheres após a menopausa, dentre elas, a redução da massa magra (MM). O organismo pode responder ao treinamento físico produzindo várias alterações anatomofisiológicas, dentre as que acometem o tecido muscular. A administração oral de arginina vem sendo relacionada ao aprimoramento do desempenho físico por provável redução da fadiga muscular, associada à vasodilatação promovida pelo óxido nítrico (NO). O presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos dos exercícios físicos (EF) e da suplementação de L-Arginina no músculo sóleo em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas. Métodos: Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR, n=40; inicialmente com massa corporal entre 180 e 200g) com 13-17 semanas de idade. Após a cirurgia de ovariectomia os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10/grupo): Grupo I: Hipertenso Sedentário (SHR-S), Grupo II: Hipertenso Treinado (SHR-T), Grupo III: Hipertenso Sedentário Associado com Suplementação de L-Arginina (SHR-SLA), Grupo IV: Hipertenso Treinado Associado com Suplementação de L-Arginina (SHR-TLA). Os grupos treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico em esteira ergométrica adaptada para roedores (Master-Inbramed). Resultados: Comparando o SHR-I em relação aos outros grupos, houve um aumento extremamente significativo ($p < 0.001$) em termos absolutos da massa do músculo sóleo. Conclusão: A hipertrofia muscular observada no músculo sóleo se deve provavelmente ao aumento de NO e do GH em consequência dos exercícios físicos (EF) e/ou a suplementação de L-Arginina (L-ARG), corroborando a literatura.

Palavras-chave: menopausa, músculo esquelético, exercício, arginina.

ABSTRACT

Changes in body composition (CC), or body mass (BM), frequently occur in women after menopause, among them the reduction of lean mass (LM). The body may respond to physical training produced se-

veral anatomical and physiological changes, among those that affect the muscle tissue. Oral administration of arginine has been related to the improvement of physical performance, probably due to reduction of muscle fatigue, will be associated with vasodilation promoted by nitric oxide (NO). The present study aims to investigate the effects of physical exercise (PE) and supplementation of L-Arginine in the soleus muscle in spontaneously hypertensive rats (SHR) ovariectomized. Methods: We used spontaneously hypertensive rats (SHR, n = 40, initially with body mass between 180 and 200g) at 13-17 weeks of age. After surgery the ovariectomized animals were divided into four experimental groups (n = 10/group): Group I: Sedentary hypertensive rats (SHR-S), Group II: Trained Hypertensive (SHR-T), Group III: Sedentary Associated with Hypertension supplementation of L-arginine (SHR-SLA), Group IV: Associated with Hypertensive Trained L-Arginine supplementation (SHR-TLA). The trained groups underwent a protocol of physical training on a treadmill adapted for rodents (Master-Inbramed). Results: Comparing the SHR-I in relation to other groups, there was a highly significant increase ($p < 0.001$) in absolute soleus muscle mass. Conclusion: The muscle hypertrophy observed in the soleus muscle is probably due to the increase of NO and GH as a result of physical exercise (FE) and / or supplementation of L-Arginine (L-ARG), confirming the literature.

Keywords: menopause, skeletal muscle, exercise, arginine.

INTRODUÇÃO

O estudo do envelhecimento das populações e de seus aspectos determinantes aponta para a realidade de que estamos vivendo mais, e a longevidade, sem dúvida, é uma das características do nosso tempo, isso porque em um século, a média de idade aumentou consideravelmente¹. No sexo feminino, o aumento da perspectiva de vida é mais evidente em relação ao sexo masculino, devido à menor exposição aos fatores de risco de mortalidade, o que nos faz observar um maior contingente de mulheres entre os idosos².

Mudanças na composição corporal (CC), ou massa

corporal (MC), acontecem frequentemente entre as mulheres após a menopausa, dentre elas, a redução da massa magra (MM)³.

O organismo pode responder ao treinamento físico produzindo várias alterações anatomofisiológicas, dentre as que acometem o tecido muscular. Para observar os efeitos do treinamento físico em animais de laboratório pode ser utilizado é o treinamento físico através da esteira rolante, este tipo de atividade que vêm sendo largamente empregado em programas de reabilitação e treinamento físico⁴

A administração oral de arginina vem sendo relacionada ao aprimoramento do desempenho físico por provável redução da fadiga muscular, associada à vasodilatação promovida pelo óxido nítrico (NO), cuja biossíntese, é uma das mais importantes funções do metabolismo de L-Arginina (L-ARG), resultando no aumento da perfusão muscular⁵. Como a administração prolongada de arginina eleva a produção de NO, sua suplementação tem sido relacionada à melhora da função contráctil do músculo esquelético, além disto, a suplementação de L-Arginina também pode estar correlacionada a um efeito causador do aumento de força, massa magra (MM) e síntese protéica^{6,7,8}.

Levando em consideração estes aspectos, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos dos exercícios físicos (EF) e da suplementação de L-ARG no músculo sóleo em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas.

Métodos

Animais

Foram utilizadas ratas espontaneamente hipertensas (SHR, n=40; inicialmente com massa corporal entre 180 e 200g) com 13-17 semanas de idade.

Após o desmame, os animais, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), foram mantidos em salas com ventilação, temperatura (23°C) e luminosidade (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas) controladas e receberam água e ração comercial (NUVILAB® CR1 – Nutrivital Nutrientes Ltda) ad libitum. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, contendo cinco animais em cada uma. Todos os experimentos foram realizados pelo menos 24 horas, mas não mais do que 48 horas, após a última sessão de treinamento físico para evitar tanto o efeito agudo do exercício como

a perda do efeito do treinamento físico. O presente estudo foi realizado seguindo as resoluções brasileiras específicas sobre a bioética em experimentos com animais (lei nº 6638 de 08 de maio de 1979 e decreto nº 24645 de 10 de julho de 1934).

Materiais

Os materiais utilizados durante o período experimental consistiu em: a) material cirúrgico: tesouras, pinças, seringas para introdução dos anestésicos, agulhas, porta agulhas, fios nylon 2.0, cama cirúrgica aquecida, soro fisiológico, álcool iodado, algodão, gaze, luvas estéreis e máscaras cirúrgicas; b) drogas cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis©), cloridrato de Xylazina (Rompum, Bayer©) e Cefazolina; c) outros materiais: L-Arginina, gaiolas metabólicas, esteira ergométrica, balança de prato, balança analítica de precisão, água destilada, etanol, parafina, Hematoxilina-Eosina, microscópio óptico.

Ovariectomia

Os animais foram submetidos à anestesia por injeção intraperitoneal (i.p.) de cloridrato de Cetamina na dosagem de 0,08ml para cada 100g de massa corporal, associado ao relaxante muscular e analgésico cloridrato de Xylazina na dosagem de 0,04ml para cada 100g de massa corporal. Os animais foram colocados em decúbito dorsal para a realização de uma pequena incisão abdominal (1 cm) na linha mediana do corpo na pele, e na musculatura no terço inferior na região abdominal. Os ovários foram localizados pela exposição da gordura periovariana, exteriorizados, ligados e totalmente removidos. Após o procedimento, a incisão foi totalmente fechada, o tecido muscular e posteriormente a pele foram suturadas, utilizando fios de algodão 2.0. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à profilaxia antibiótica, e foi administrado i.p. em dose única Cefazolina de 20mg para cada 100g de massa corporal.

Delineamento experimental

Após a cirurgia de ovariectomia os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10/grupo):

- Grupo I: Hipertenso Sedentário (SHR-S), numerados 01 a 10. Estes animais foram submetidos aos procedimentos relativos à rotina diária do biotério de experimentação durante a duração do período experimental (8 semanas). Além disto, durante este

período, foram transportados diariamente à sala de treinamento e suas gaiolas posicionadas ao lado da esteira ergométrica no modo operante com objetivo de serem submetidos ao mesmo estresse sonoro que o grupo treinado.

- Grupo II: Hipertenso Treinado (SHR-T), numerados 11 a 20. Estes animais foram submetidos a treinamento físico aeróbio, 1 hora por dia, 5 vezes por semana, por 08 semanas consecutivas em esteira ergométrica (Imbramed TK-01).

- Grupo III: Hipertenso Sedentário Associado com Suplementação de L-Arginina (SHR-SLA), numerados 21 a 30. Estes animais tiveram os mesmos procedimentos realizados com os animais do grupo I (Hipertenso Sedentário: SHR-S). Além disto, os animais receberam suplementação de L-Arginina desde o início do protocolo de treinamento físico.

- Grupo IV: Hipertenso Treinado Associado com Suplementação de L-Arginina (SHR-TLA), numerados 31 a 40. Estes animais foram submetidos a treinamento físico aeróbio, 1 hora por dia, 5 vezes por semana, por 8 semanas consecutivas em esteira ergométrica (Imbramed TK-01). Os animais receberam suplementação de L-Arginina desde o início do protocolo de treinamento físico.

Descrição do treinamento físico

Após a cirurgia de ovariectomia, os grupos treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico em esteira ergométrica adaptada para roedores (Master-Inbramed). A esteira ergométrica era constituída de 8 raias de acrílico transparente, pintadas em preto, criando um ambiente para o qual as ratas são atraídas durante as sessões de treinamento. Vale destacar que todo o protocolo experimental foi realizado no período ativo dos animais, ou seja, o período noturno, pela inversão do ciclo claro/escuro.

Anteriormente ao início do treinamento foi realizado um teste de esforço, tal teste serviu de base para prescrição do treinamento físico para os grupos treinados e para divisão dos grupos. O teste consistiu em corrida dos animais em esteira ergométrica (que comporta 08 animais) a 0,3Km/h por 3 minutos, sendo esta carga incrementada em 0,3 km/h a cada 3 minutos até que o animal alcançasse a exaustão.

O tempo de teste e a velocidade da última carga foram anotados e serviram de base para prescri-

ção do treinamento físico para os grupos treinados, bem como para evidenciar melhora na capacidade de exercício após o período de treinamento físico. Antes da realização do teste de esforço inicial, os animais foram adaptados em esteira ergométrica (10 minutos a 0,3 Km/h) durante pelo menos 3 dias. Após os testes de esforço, a divisão dos animais por grupo obedeceu a uma distribuição homogênea de acordo com o rendimento no teste e a massa corporal. O teste foi realizado para todos os animais antes do início dos protocolos (semana zero), na metade (5ª semana) e do final dos protocolos (8ª semana).

Os grupos treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento físico em esteira ergométrica com velocidade e carga progressiva durante 8 semanas (5 dias por semana) e intensidade de 50 a 60% da velocidade máxima no teste de esforço inicial. (Quadro 1).

SEMANA	DURAÇÃO (min)	VELOCIDADE (Km/h)
TESTE DE ESFORÇO INICIAL		
1ª	15 - 25	0,3 - 0,6
2ª	25 - 45	0,3 - 0,7
3ª	45 - 60	0,3 - 0,7
4ª	60	0,3 - 0,7
TESTE DE ESFORÇO INTERMEDIÁRIO		
5ª	60	0,3 - 0,9
6ª	60	0,3 - 0,9
7ª	60	0,3 - 1,0
8ª	60	0,0 - 1,0
TESTE DE ESFORÇO FINAL		

Quadro 1: Resumo do protocolo de treinamento

Ao final do período experimental (24 horas após a última sessão de treinamento), os animais foram eutanasiados por decapitação. No entanto, a obrigação legal e moral de salvaguardar o bem-estar do animal e minimizar o desconforto, na eutanásia os animais foram submetidos à anestesia por injeção intraperitoneal (i.p.) de cloridrato de Cetamina. O músculo sóleo direito foi removido e pesado (peso úmido). Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica de precisão (Denver Instrument M-220D).

Microscopia De Luz (Óptico)

Para o processamento histológico, foi utilizada microscopia de luz convencional para análise das estruturas e as características das fibras musculares comparadas aos diferentes grupos. Os tecidos

preparados submetidos a procedimentos histológico convencional foram posteriormente cortados em cortes seriados de 5µm e 20µm de espessura. Para o estudo microscópico foram realizados cortes transversais de 5µm, das peças obtidas, que foram submetidas inicialmente aos procedimentos histológicos convencionais e posteriormente coradas. O estudo mesoscópico foi realizado com cortes seriados transversais e longitudinais de 20µm. Os cortes foram corados para observação das fibras musculares (FM).

RESULTADOS

A análise estrutural do músculo sóleo dos animais de todos os grupos foi realizada por meio de técnicas rotineiras de histologia: Hematoxilina-Eosina (HE), Periodic Acid-Schiff (PAS) e Azul de Toluidina (AT).

Nas lâminas coradas com HE, foram observadas alterações morfológicas no músculo sóleo das ratas exercitadas e suplementadas com L-ARG, tais como fibrose intersticial, com algum tempo de evolução; aparecimento de células de menor diâmetro, supostamente células em formação, com citoplasma hipercorado, evidenciando intensa atividade mitocondrial. Na observação do músculo sóleo das ratas SHR-I observamos FM de forma poligonal e tamanho regular, ou seja, com pouca modificação de volume, sem fibrose intersticial e células em mosaico, justapostas, que estabelece o padrão normal das FM, podendo ser observado nas figuras 1 e 2, respectivamente.

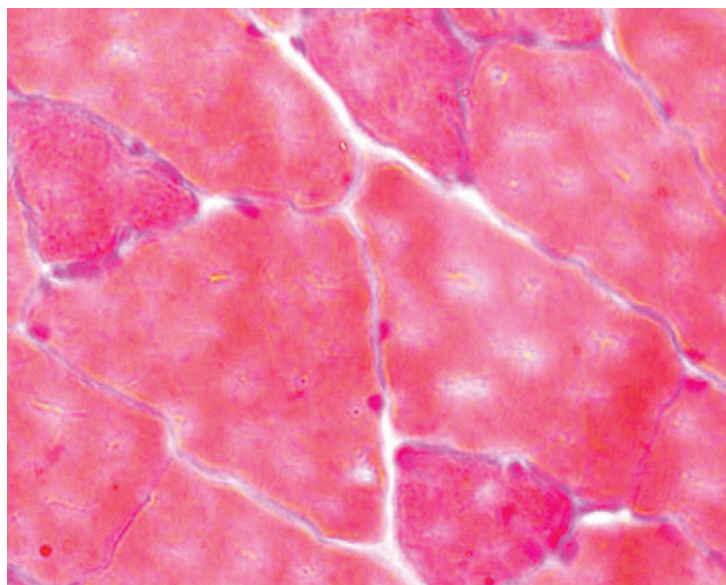


Figura 1. Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo sóleo de SHR-TLA. Coloração: HE. Barra: 20 µm.

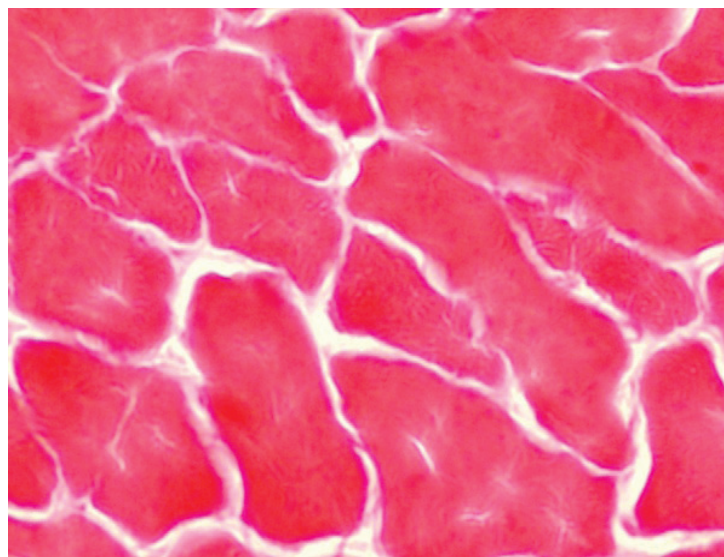


Figura 2. Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo sóleo de SHR-I. Coloração: HE. Barra: 20 µm.

Nas lâminas coradas com azul de toluidina, as alterações morfológicas encontradas no músculo sóleo das ratas exercitadas e suplementadas com L-ARG foram FM com maiores calibres, já o músculo sóleo das ratas SHR-I observamos FM normais e formato poligonal. No entanto, não foram observados aumento do número de vasos sanguíneos, ou angiogênese da musculatura esquelética, conforme pode ser observado nas figuras 3 e 4, respectivamente.

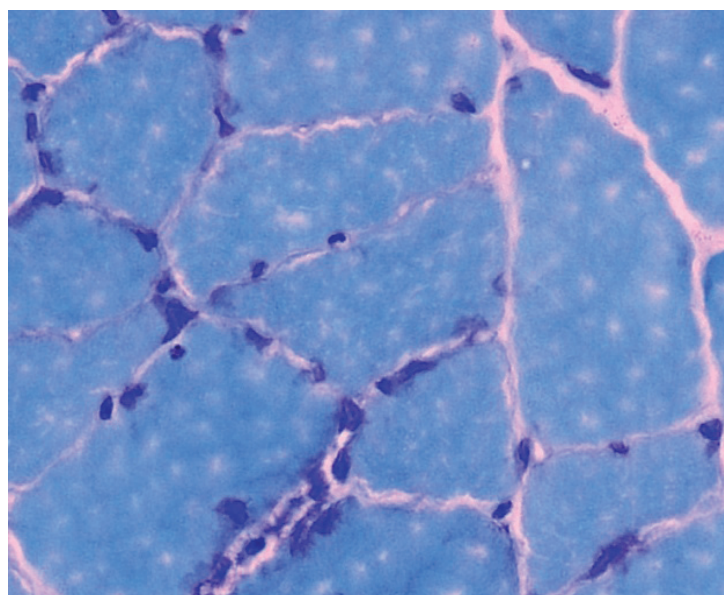


Figura 3. Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo sóleo de SHR-TLA. Coloração: AT. Barra: 20 µm

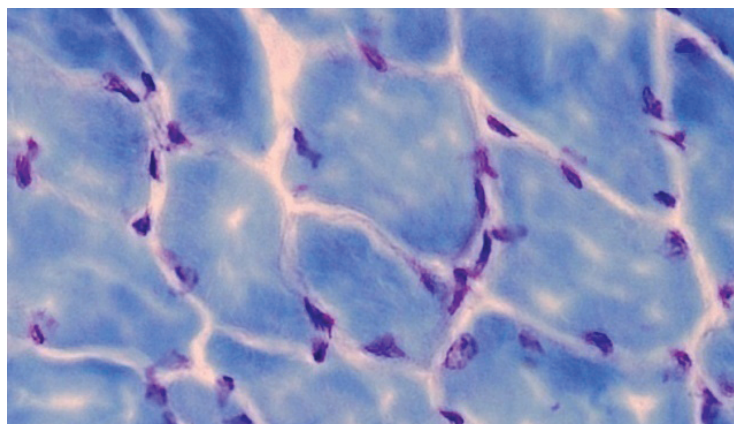


Figura 4. Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo sóleo de SHR-I. Coloração: AT. Barra: 20 μ m

As alterações morfológicas, observadas nas lâminas coradas com PAS, no músculo sóleo das ratas exercitadas e suplementadas com L-ARG apresenta quantidades variáveis de glicogênio muscular e utilizados sob a forma de glicose para a contração muscular. Na análise do músculo sóleo das ratas SHR-I pode ser sugerido presença de glicogênio muscular, mas se verifica FM de tamanho regular, podendo ser observado nas figuras 5 e 6.

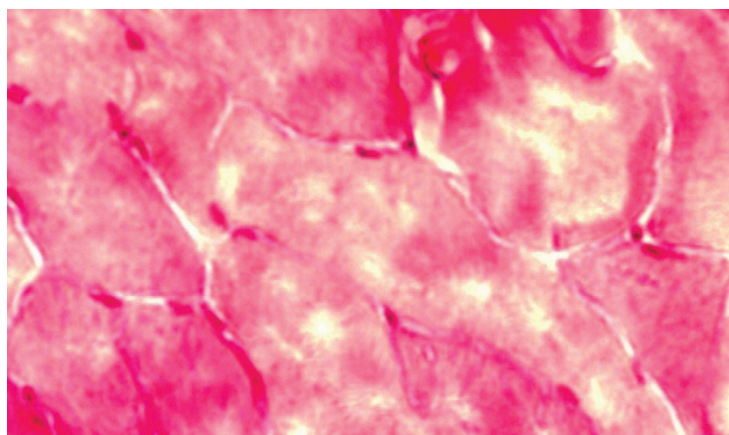


Figura 5. Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo sóleo de SHR-TLA. Coloração: PAS. Barra: 20 μ m.

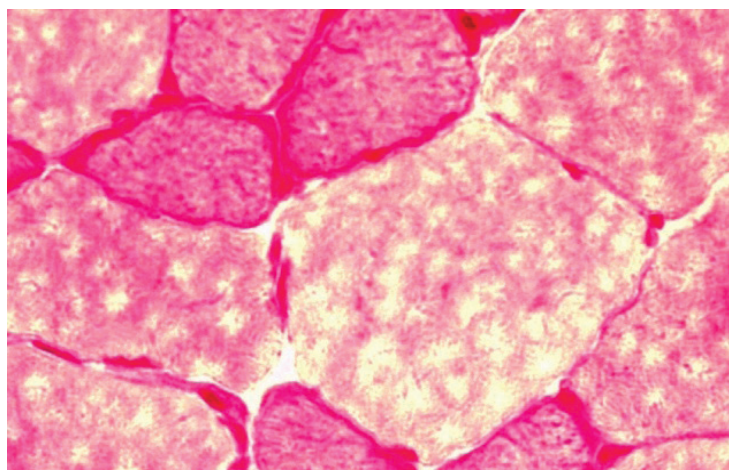


Figura 6. Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo sóleo de SHR-I. Coloração: PAS. Barra: 20 μ m.

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel dos EF e da suplementação de L- ARG no músculo sóleo de ratas SHR ovariectomizadas. Os efeitos dos EF e da suplementação de L-ARG no componente da MM foram comparados com aqueles dos animais SHR-I.

A suplementação oral de L-ARG tem vem sendo relacionada ao aperfeiçoamento do desempenho físico por possível diminuição da fadiga muscular, associada à vasodilatação gerada pelo óxido nítrico (NO), resultando na elevação da perfusão muscular e pela redução do consumo de glicose pelos músculos estriados esqueléticos (MEE)⁵. Como a administração prolongada de L-ARG aumenta a produção de NO⁶, sua suplementação tem sido relacionada à melhora da função contráctil do MEE⁷. Além disto, a suplementação de L-ARG pode estar incluída a um segundo efeito determinante da elevação de força e da MM, além da síntese protéica⁸.

O NO é produzido por estímulos químicos ou físicos. O estímulo físico é gerado pela força que o sangue exerce sobre a parede dos vasos arteriais, denominada shear stress ou força de cisalhamento que é exasperada com os EF^{9,10}.

Já a regeneração das FM fisiologicamente lesadas pelos EF, gera hipertrofia do MEE, e depende da ativação das células-satélites. O NO é o responsável por interceder à ativação das células-satélites¹¹, que se diferenciam e participam na formação de FM maduras. O objetivo é a manutenção e adaptação dos MEE às demandas funcionais¹². Segundo Tapiero¹³ a administração oral da L-ARG produz potente estímulo em relação à secreção de hormônio do crescimento (GH). Os EF também aumentam a concentração sérica do GH, cuja função é provocar o desenvolvimento e a hipertrofia muscular^{14,5}.

Os EF resultam em mudanças nas FM modificando as propriedades funcionais do MEE. Nota-se a alteração da quantidade de FM lentas e de FM rápidas de acordo com a especificidade do EF. De maneira geral, os EF produzem modificações nas proteínas musculares e nos tipos de FM, permitindo a transição no sentido lento para rápido, I→IIA→IID→IIB, ou rápido para lento, IIB→IID→IIA→I6. Nos EF de baixa intensidade e longa duração, há a inferência da conversão de FM rápidas em FM lentas¹⁵.

CONCLUSÃO

Conforme demonstrado nos resultados, comparando o SHR-I em relação aos outros grupos, houve um aumento extremamente significativo ($p < 0.001$) em termos absolutos da massa do músculo sóleo. A hipertrofia muscular observada no músculo sóleo se deve provavelmente ao aumento de NO e do GH em consequência dos EF e/ou a suplementação de L-ARG, corroborando a literatura.

Referências Bibliográficas

1. Rossato DD, Rosa PV, Rosa LHT, Bianchini PD. Qualidade de vida e capacidade funcional de idosos adscritos em um PSF da cidade de Cruz Alta – RS. *Fisioter. Bras.* 2008;9(5):338-342.
2. Menezes TMO, Lopes RLM. Revisando o viver da pessoa idosa na perspectiva de gênero. *R Enferm UERJ.* 2007;15(4):591-6.
3. Bonganha V, Conceição MS, Patrícia M, Chacon-Mikahil T, Madrugada VA. Resposta da taxa metabólica de repouso após 16 semanas de treinamento com pesos em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17(5):350-353.
4. Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Oliveira DAR, Oliveira Júnior AS, Dal Pai V, et al. Análise histológica, histoquímica e morfológica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. *Arq Ciênc Saúde.* 2005;12(3):196-99.
5. Mcconell GK, Huynh NN, Lee-Young RS, Canny BJ, Wadley GD. L-Arginine infusion increases glucose clearance during prolonged exercise in humans. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism.* 2006;290(1):E60-E6.
6. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology.* 1997;170:143-223.
7. Schrage WG, Joyner MJ, Dinunno FA. Local inhibition of nitric oxide and prostaglandins independently reduces forearm exercise hyperaemia in humans. *The Journal of Physiology.* 2004;557:599-611.
8. Flakoll P, Sharp R, Baier S, Levenhagen D, Carr Christopher, Nissen S. Effect of beta-

hydroxy-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition.* 2004;20(5):445-51.

9. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *American Journal of Physiology Cell Physiology.* 2003;285(3):C499-C508.
10. Kuru O, Sentürk UK, Demir N, Yesilkaya A, Erqüler G, Erkiliç. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *European Journal of Applied Physiology.* 2002;87(2):134-40, 2002.
11. Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, Didonna S, Decary S, Hentati F, et al. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Experimental Gerontology.* 2000;35(6-7):711-9.
12. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Developmental Biology.* 2000;218(2):115-24.
13. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies *Biomed & Pharmacother.* 200;256:200-207.
14. Chromiak, JA, Antonio J. Use of amino acids as growth hormone-releasing agents by athletes. *Nutrition.* 2002;18(7-8), 657-661.
15. Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Fredrick C, Hagerman, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European Journal of Applied Physiology.* 2002;88(1-2):50-60.

1 - Mestre em Anatomia Funcional – Universidade de São Paulo - USP – Brasil, Professor Adjunto I da Universidade Paulista – UNIP- São Paulo – Brasil.

2 - Fisioterapeuta e especialista em Fisioterapia Intensiva pela SOBRATI

3 - Fisioterapeuta e Professor do Curso de Pós Graduação em Fisioterapia Intensiva da SOBRATI

Contato: cassiomv@usp.com