

## Artigo original

# Análise histomorfométrica do músculo esquelético de ratas suplementadas com L-arginina

## *Histomorphometric analysis of the skeletal muscle of female rats supplemented with L-arginine*

Rodrigo Rodrigues Marcondes\*, Lívia Mara Alves Figueiredo\*, Jairo José Matozinho Cubas\*\*, Manuel de Jesus Simões\*\*\*, Vinícius Cestari do Amaral\*\*\*\*

\*Alunos de iniciação científica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, \*\*Professor Adjunto da Faculdade Unida de Suzano – UNISUZ, \*\*\*Chefe da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, \*\*\*\*Pós-graduando da Disciplina de Ginecologia (LIM 58) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP

### Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da suplementação de L-arginina no tecido muscular esquelético de ratas. Foram utilizadas oito ratas divididas em dois grupos, com quatro animais cada, sendo: grupo I (GI), suplementado com L-arginina; grupo II (GII), controle. Os animais do GI foram suplementados com L-arginina por meio de gavagem por 30 dias. Após esse período, os animais foram sacrificados e o músculo gastrocnêmio foi retirado, fixado em formol a 10% e submetido a montagem das lâminas com a coloração de hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica e as imagens destas foram capturadas em um sistema de análise de imagens. No sistema de análise de imagens foram mensuradas as circunferências das células musculares esqueléticas e os dados destas mensurações foram analisados estatisticamente pelo teste *T student*. Os resultados revelaram que houve aumento da circunferência das células musculares esqueléticas das ratas do GI em relação ao GII. Assim, a média de circunferência do GI foi  $2069 \pm 32,98 \mu\text{m}^2$  e a média de circunferência do GII foi  $1096 \pm 17,41 \mu\text{m}^2$ . Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Conclui-se que a suplementação com L-arginina promove aumento significativo da massa muscular de ratas.

**Palavras-chave:** arginina, óxido nítrico, morfologia, músculo gastrocnêmio.

### Abstract

The aim of this study was to analyze the effects of L-arginine supplementation in skeletal muscle tissue of female rats. Eight rats divided into two groups were used, containing four animals each, as follows: group I (GI), supplemented with L-arginine; group II (GII), control. The animals of the GI were supplemented with L-arginine, by gavage, for 30 days. Later, the animals were sacrificed and the gastrocnemius muscle was removed, fixed in formaldehyde 10% and submitted to haematoxylin and eosin staining. Glass slides were analyzed by optical microscopy and their images were captured in a picture analysis system. In the picture analysis system, the circumferences of the skeletal muscle cells were measured and these data were analyzed statistically by the T student test. The results revealed that there was an increase in circumference of the rat's skeletal muscle, being the circumferences of the GI muscle cells bigger than GII. So the GI circumference mean was  $2069 \pm 32,98 \mu\text{m}^2$  and the GII circumference mean was  $1096 \pm 17,41 \mu\text{m}^2$ . This difference was statistically significant ( $p < 0.0001$ ). It was concluded that the supplementation with L-arginine promotes a significant increase in muscle mass of the female rats.

**Key-words:** arginine, nitric oxide, morphology, gastrocnemius muscle.

Recebido em 2 de setembro de 2010; aceito em 12 de novembro de 2010.

**Endereço para correspondência:** Rodrigo Rodrigues Marcondes, Estrada da Grama, P-1891, Bairro da Grama 08970-000 Salesópolis SP, Tel: (11) 7313-7907, E-mail: marcondes\_rr@hotmail.com

## Introdução

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial extremamente versátil, presente em uma grande diversidade de processos fisiológicos [1]. Dentre esses processos, a síntese do óxido nítrico (NO) é atribuída como uma das mais importantes funções do metabolismo da L-arginina [2].

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a reação bioquímica que dá origem ao NO [3], de modo que todas as isoformas da NOS estão presentes no tecido muscular esquelético [4]. O NO tem sido descrito como o mais potente vasodilatador endógeno [5] e, em estudos com animais, demonstrou-se que a ingestão de L-arginina melhora a vasodilatação dependente do endotélio [6,7].

Recentemente, a melhora do desempenho físico tem sido relacionada com a suplementação com L-arginina [8], sendo que isto pode ocorrer de três modos: pelo papel deste composto na indução de secreção do hormônio de crescimento; através do seu envolvimento na síntese de creatina; e por ser a molécula precursora do NO [9,10].

Além disso, os aminoácidos em geral são conhecidos como potentes estimuladores da síntese proteica muscular, porém tem sido sugerido que a L-arginina, em especial, possui um papel anabólico muscular privilegiado [11]. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da suplementação oral de L-arginina na massa muscular de ratas, por meio de análise histomorfométrica.

## Material e métodos

### Animais

O projeto de pesquisa foi inicialmente enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP - UNIFESP) e, após a aprovação deste (CEP 0986/07), deu-se início ao experimento. Para este experimento foram utilizadas 8 ratas adultas (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente 3 meses de idade e peso médio de 250 g, sendo estas fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da UNIFESP. Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo I (GI) foi submetido à suplementação com L-arginina e o grupo II (GII) serviu como controle.

### Protocolo de gavagem

A solução era composta por 1 g de L-arginina (Sigma) dissolvida em 5 ml de água filtrada. Esta solução foi administrada 1 vez ao dia por 30 dias consecutivos, entre as 15:00 e 17:00 h. Este protocolo foi adaptado de Penaforte *et al.* [12].

## Procedimento

Os animais foram confinados em gaiolas plásticas com medidas de 45 x 35 x 15 cm, de comprimento, largura e altura, respectivamente, com tampa de metal gradeada. As 8 ratas foram mantidas em duas gaiolas plásticas, de modo que cada gaiola apresentasse 4 ratas, com a temperatura ambiente a 22° C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, mantendo-se o período de iluminação de 12 horas intercalado com o período escuro de 12 horas, considerando o período de iluminação das 7:00 às 19:00 h.

Após o período de 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e o músculo gastrocnêmio de cada animal foi retirado e submetido a técnicas histológicas para montagem das lâminas com a coloração de hematoxilina e eosina (H. E.), de modo que para cada animal foi confeccionada uma lâmina.

As lâminas foram analisadas morfológica e histomorfometricamente por meio microscópio de luz (modelo Axiolab Standart 20, Carl Zeiss), com aumento de 400x.

## Histomorfometria

A análise histomorfométrica foi realizada por meio de um microscópio de luz (Axiolab Standart 20) acoplado a uma câmera de vídeo colorida (modelo Hyper Had SSC-DC 54, Sony) que transmite a imagem para um computador, dotado de um software de análise gráfica (Imagelab, Softium) instalado em sistema operacional Windows XP.

Para a mensuração da circunferência das células musculares foram escolhidos e fotografados feixes musculares encontrados em quatro quadrantes diferentes de cada lâmina. Foram mensuradas 50 células por lâmina, o que compôs um total de 200 células mensuradas para cada grupo de estudo. As circunferências foram mensuradas somente em células com contorno sarcolêmico totalmente visível.

## Análise estatística

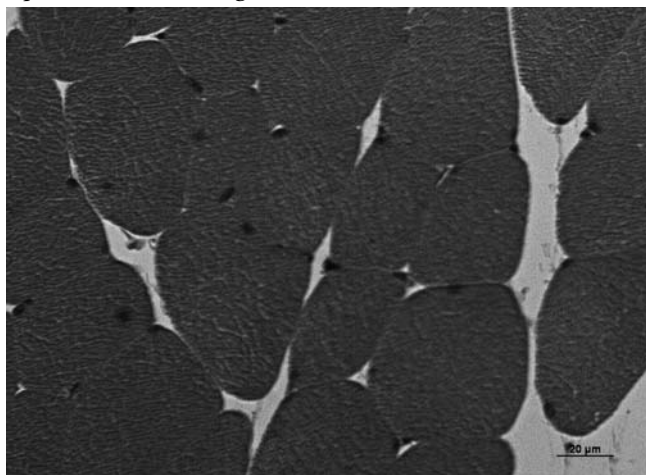
Após o cálculo da média do total de mensurações da circunferência das células musculares das ratas do grupo I e grupo II, foi visto a significância estatística entre os valores das mensurações dos grupos experimentais pelo teste *T-student* não pareado, com valor de significância estipulado em  $p < 0,05$ .

## Resultados

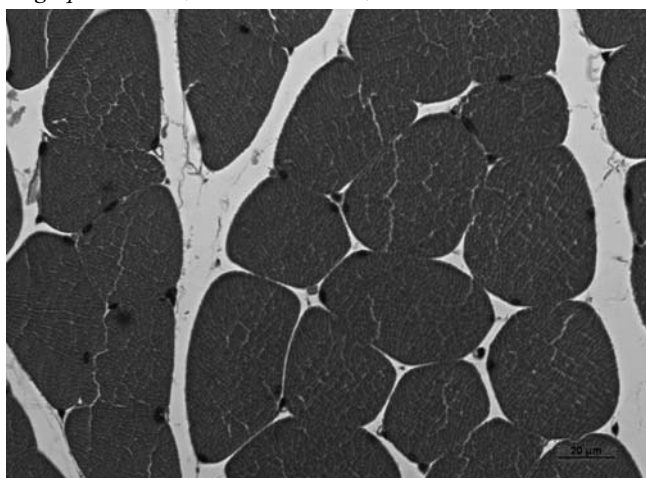
### Análise morfológica

No aumento de 400x, ambos os grupos apresentaram células musculares com aspecto normal, multinucleadas, núcleos periféricos, com espaço normal do perimísio e endomísio. Porém, nota-se maior espessura das células musculares das ratas suplementadas com L-arginina (Figura 1) em relação às células do grupo controle (Figura 2).

**Figura 1** - Fotomicrografia do tecido muscular esquelético de rata suplementada com L-arginina (aumento de 400x).



**Figura 2** - Fotomicrografia do tecido muscular esquelético de rata do grupo controle (aumento de 400x.)



### Análise histomorfométrica do tecido muscular esquelético

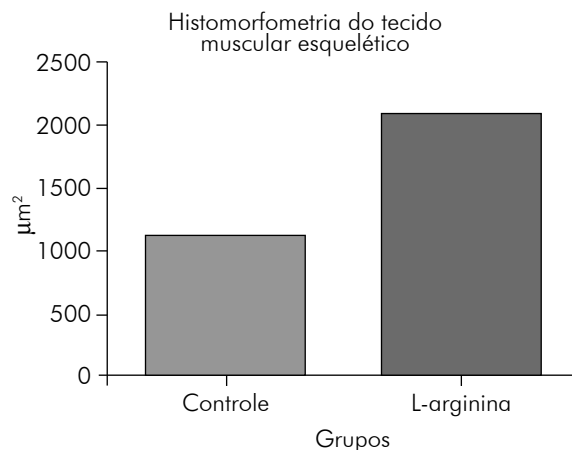
A média das mensurações da circunferência das células musculares esqueléticas das ratas do grupo I (suplementadas com L-arginina) foi de  $2069 \pm 32,98 \mu\text{m}^2$ . Já a média das mensurações das células musculares das ratas do grupo II (controle)  $1096 \pm 17,41 \mu\text{m}^2$  (Figura 3). Os resultados comparados pelo teste *T-student* não pareado demonstram haver diferença estatisticamente significativa entre as mensurações das células musculares do grupo I e II ( $p < 0,0001$ ).

### Discussão

No presente trabalho, a circunferência das células musculares do grupo de ratas suplementadas com L-arginina apresentaram-se maior em relação ao grupo controle, sendo demonstrada diferença significativa entre os grupos experimentais. Este resultado corrobora com o estudo de Angeli *et al.* [13], que analisou os efeitos da suplementação oral de

L-arginina associado à ingestão de vitamina C na massa e força muscular durante um programa de treinamento com pesos. 10 indivíduos que participaram desse estudo foram submetidos à suplementação oral de L-arginina por oito semanas e exercícios com pesos 3 vezes por semana, de modo que o grupo controle, composto também por 10 indivíduos, seguiu o mesmo protocolo de exercícios. Ao final da pesquisa notou-se que o grupo suplementado com este aminoácido apresentou aumento significativo da massa muscular.

**Figura 3** - Média da circunferência das células musculares esqueléticas das ratas dos grupos I e II.



Borsheim *et al.* [11] estudaram o efeito da suplementação de aminoácidos essenciais junto com a arginina e execução de exercícios físicos na massa muscular, na força e na função física de idosos. Notou-se que, após o período de 16 semanas, houve ganho significativo de massa muscular em resposta a suplementação e exercícios.

Um estudo feito com porcos por Tan *et al.* [14], no qual foi analisado o efeito da suplementação de L-arginina por 60 dias em 24 animais, foi constatado o aumento significativo da massa muscular desses animais.

Já Suzuki [15] observou no seu experimento com 28 ratas que, após 6 semanas de suplementação em associação com exercícios de resistência, houve aumento de forma significativa da massa dos músculos posteriores das pernas.

Na literatura há diversos protocolos de administração de L-arginina analisando seus efeitos no músculo esquelético, porém, na maioria desses protocolos, o uso da L-arginina é associado com o exercício físico, o que faz carecer as provas de que somente o efeito da L-arginina sem a execução de exercícios físicos associados promove alguma alteração na musculatura esquelética. Além disso, há escassez de estudos relacionados à histomorfometria do músculo esquelético após a suplementação com L-arginina, sendo a maioria dos estudos composta por análises macroscópicas, onde a histologia muscular não é estudada.

Por outro lado, sabe-se que a suplementação de determinados compostos ergogênicos pode causar efeitos adversos,

principalmente quando este ato não é orientado por um médico [10]. Devido a isso, são necessários novos estudos visando analisar o efeito da suplementação de L-arginina em outros órgãos, para esclarecer se há ou não algum efeito maléfico após a suplementação com este composto.

## **Conclusão**

Em conclusão, foi demonstrado que a suplementação com L-arginina por 30 dias consecutivos promove aumento estatisticamente significativo da circunferência das células musculares esqueléticas de ratas.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao apoio técnico das pessoas da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da UNIFESP e demais apoios: Pedro Sampaio Amorim, acadêmico do curso de estatística (IME - USP), Dra. Kátia Cândido Carvalho, pesquisadora do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - FMUSP, e David Larronda, pelo auxílio no idioma espanhol.

## **Referências**

1. Morris Jr SM. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* 2006;83(Suppl):508S-12S.
2. Zago AS, Zanesco A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. *Arq Bras Cardiol* 2006;87(6):e264-e270.
3. Morris Jr SM. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 2004;134(10):2143S-7S.
4. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2001;81(1):209-237.
5. Cuevas AM, Germain AM. Diet and endothelial function. *Biol Res* 2004;37:225-30.
6. Adams MR, McCreddie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997;129:261-269.
7. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001;73:673-686.
8. McConell GK, Huynh NN, Lee-Young RS, Canny BJ, Wadley GD. L-arginine infusion increases glucose clearance during prolonged exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290(1):E60-E66.
9. Campbell BI, Bounty PML, Roberts M. The ergogenic potential of arginine. *J Int Soc Sports Nutr* 2004;1(2):35-38.
10. Weitzel LB, Sandoval PA, Mayles WJ, Wischmeyer PE. Performance-enhancing sports supplements: Role in critical care. *Crit Care Med* 2009;37(10 Suppl): S400-S409.
11. Borsheim E, Buib QT, Tissier S, Kobayashi H, Ferrando AA, Wolfe RR. Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clin Nutr* 2008;27(2):189-95.
12. Penaforte LRA, Guimarães SB, Farias RAF, Alves GC, Oliveira TR, Vasconcelos PRC, et al. Efeitos da L-arginina sobre as concentrações *in vivo* de metabólitos do sangue e em retalho miocutâneo contendo cicatriz cirúrgica em ratos Wistar. *Rev Soc Bras Cir Plást* 2003;8(3):55-6.
13. Angeli G, Barros TL, Barros DFL, Lima M. Investigação dos efeitos da suplementação oral de arginina no aumento de força e massa muscular. *Rev Bras Med Esporte* 2007;13(2):129-32.
14. Tan B, Yin Y, Liu Z, Li X, Xu H, Kong X, et al. Dietary L-arginine supplementation increases muscle gain and reduces body fat mass in growing-finishing pigs. *Amino Acids* 2009;37(1):169-75.
15. Suzuki J. Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles. *Exp Physiol* 2005;90(5):763-71.