

# DIFERENÇAS ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E IGF-I NO MÚSCULO E FÍGADO DE RATAS SUBMETIDAS A TREINAMENTO FÍSICO INTENSO E RESTRIÇÃO ALIMENTAR

Zirlene Adriana dos Santos<sup>1,2</sup>, Renata Juliana da Silva<sup>2,3</sup>, Paula Maria Dalvio Gonçalves<sup>2</sup>, Sandra Maria Ribeiro de Lima<sup>2,4</sup>

## RESUMO

O treinamento físico pode aumentar significativamente os níveis séricos de IGF enquanto que a restrição energética provoca sua diminuição. A degradação de proteína no músculo pode ser aumentada, inalterada ou diminuída a depender da intensidade e duração do mesmo. Para verificar as diferenças de concentrações de proteína e IGF a amostra foi constituída de 27 ratas distribuídas em 4 grupos. Os animais foram submetidos ao treinamento na esteira ergométrica e restrição energética. Após oito semanas de treinamento físico e restrição energética pode-se inferir que, o IGF-I do músculo não se mostrou diferente entre os quatro grupos. O IGF-I guarda uma relação estreita com a concentração de proteína nos tecidos e, tanto no fígado quanto no músculo, o presente protocolo experimental não parece ter provocado diferenças na concentração de proteína tecidual. A restrição alimentar foi, por outro lado, responsável por uma diminuição da concentração de proteína na carcaça dos animais.

**Palavras-chave:** IGF-I, restrição alimentar, treinamento físico intenso.

## ABSTRACT

The physical training can increase the levels serum of IGF significantly while the energy restriction provokes his decrease. The protein degradation in the muscle can be increased, unaffected or decreased to depend on the intensity and duration of the same. To verify the differences of protein concentrations and IGF the sample it was constituted of 27 female rats distributed in 4 groups. The animals were submitted to the training in the mat ergometric and energy restriction. After eight weeks of physical training and energy restriction can be inferred that, the IGF-I of the muscle was not shown different among the four groups. The IGF-I keeps a narrow relationship with the protein concentration in the fabrics and, in the liver and in the muscle, the present experimental protocol doesn't seem to have provoked differences in the concentration of protein tissue. The alimentary restriction was, on the other hand, responsible for a decrease of the protein concentration in the carcass of the animals.

**Key-words:** IGF-I, food restriction, intense physical training.

## INTRODUÇÃO

### IGF-I

Em 1957 Salmon & Daughaday observaram que a sulfatação da cartilagem era estimulada por soro de animais normais, mas não por soro de animais com hipopituitarismo, e que esta propriedade era recuperada após o tratamento destes animais com hormônio de crescimento, mas não pela simples adição de hormônio do crescimento (GH) ao meio de cultura. Este fator inicialmente denominado fator de sulfatação, foi posteriormente renomeado somatomedina e finalmente IGF (*Insulin-like Growth Factor*) ou fator de crescimento similar à insulina (JÚNIOR *et al.* 2002).

A similaridade molecular com a insulina levou posteriormente à hipótese de um mecanismo regulador do metabolismo, embora algum tempo tenha se passado para uma maior compreensão desse aspecto (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1976). Os IGFs são produzidos na maioria dos órgãos e tecidos, sendo o fígado a principal fonte dos IGFs circulantes. Suas ações autócrina, parácrina e endócrina são observadas na maioria dos tecidos do organismo. Diversos fatores estão envolvidos na regulação da síntese dos IGFs. O GH é um dos principais estimuladores da produção de IGF-I, cuja síntese é também estimulada pelos hormônios tireoideanos, esteróides sexuais, insulina e influenciada pelo estado nutricional, dentre outros fatores. (JÚNIOR *et al.* 2002).

## IGF-I EXERCÍCIO E RESTRIÇÃO ALIMENTAR

As concentrações séricas totais de IGF-I são aumentadas e mantidas com treinamento de longa duração e exercício de força (KOZIRIS *et al* 1999; BANG *et al*, 1990). Isto pode ser evidenciado tanto em humanos quanto em ratos.

A relação entre o volume de treinamento e os níveis de IGF-I foi estudada após 13 semanas de treinamento físico, mostrando aumento significativo dos níveis de IGF-I, tanto no grupo que realizou um protocolo com maior volume de treinamento, como no grupo que realizou um protocolo com menor volume de treinamento físico (BORST *et al*, 2001).

Luciano *et al.* (1998) demonstraram que o treinamento físico de natação aumentou os níveis de IGF-I em ratos diabéticos, demonstrando um importante papel no desenvolvimento corporal. Yen *et al* (1994) observaram um aumento nas concentrações de IGF-I em ratos depois de nove semanas de treinamento e Eliakim *et al.* (1997) encontraram um aumento das concentrações de IGF-I em músculo de ratos depois de cinco dias de treinamento de endurance. No entanto, respostas sobre as concentrações de IGF-I pelo exercício físico podem sofrer alterações pela manipulação da dieta. (NEMET *et al*, 2003). Existe uma redução dos níveis plasmáticos de IGF-I em homens e animais de experimentação depois de uma restrição energética (THISSEN *et al.*, 1994).

O balanço energético negativo causado pelo exercício ou a ingestão reduzida de energia causam a redução das concentrações de IGF-I (KATS *et al*, 2003). O contrário também é verdadeiro, concentrações totais de IGF-I aumentam com superalimentação, mesmo sem mudanças na atividade física (FORBES *et al*. 1989).

Mulheres com amenorréia provocada pelo desbalanço nutricional têm associadas múltiplas alterações endócrinas e metabólicas, dentre elas: reduzidos níveis de glicose plasmática, redução de T<sub>3</sub>, diminuição da taxa de IGF-I, acelerada frequência de pulso e elevados interpulsos de GH. As magnitudes das respostas glicorregulatórias (aumento na secreção de cortisol, diminuição de insulina e diminuição da ação de IGH-I) estão diretamente relacionadas com o grau de supressão da frequência de pulso de GnRH/LH (LAUGHLIN *et al*, 1998, RICKENLUND *et al*, 2004). Em estudo realizado por Loucks *et al*, (1994), foi observado que depois de quatro dias de restrição alimentar em mulheres sedentárias não obesas, as concentrações de T<sub>3</sub> foram reduzidas em 20%, de IGF-I em 58% e de insulina em 54% e a frequência de pulso de LH em 23% durante as horas sem sono.

## PROTEÍNA E RESTRIÇÃO ALIMENTAR

Embora existam muitos fatores nutricionais que podem afetar o treinamento de força, a proteína é o nutriente mais freqüente associado ao aumento da massa muscular. Até o início do século a proteína era considerada o mais importante combustível para prática de exercícios (ZUCA, 1980). Naquela época começaram a acumular evidências de que na verdade os principais combustíveis utilizados durante o exercício era o carboidrato e o lipídeo. Em conseqüência, a opinião científica mudou, passando a acreditar que a prática de exercício pouco afetava a necessidade protéica (ADAMS, 1998). Em contrapartida, estudos realizados atualmente têm indicado que as necessidades protéicas e/ou aminoácidos podem estar aumentadas em indivíduos submetidos a treinamento físico, quer de alta intensidade e curta duração, quer de intensidade moderada e alta e longa duração (LEMON, 1997, 1998). Os processos de síntese de proteína requerem fontes de energia da dieta e são conseqüentemente sensitivos à privação de energia. Conseqüentemente, o equilíbrio de energia do corpo torna-se um fator importante na determinação do equilíbrio de nitrogênio e influencia a utilização de proteínas na dieta. A magnitude das necessidades de energia basal e da quantidade de proteína em um dia são ambas relacionadas à massa tecidual (FAO, 1985).

## PROTEÍNA E ATIVIDADE FÍSICA

Para Tirapegui *et al*, (2005) durante o exercício, a degradação de proteínas pode ser aumentada, inalterada ou diminuída a depender da intensidade e duração do mesmo. Luciano *et al.* (1998) mostraram que o teor de proteínas totais no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos submetidos à natação por quatro semanas foi aumentado. Por outro lado Gomes *et al.* (2004), também trabalhando com natação não observou diferença na concentração protéica no músculo gastrocnêmio em seis semanas. Como se pode observar, os resultados em diferentes estudos são bastante controversos.

## OBJETIVO

Identificar diferenças entre a concentração de proteína e IGF-I no músculo e fígado de ratas submetidas a treinamento físico intenso e restrição alimentar.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais de experimentação

Foram estudadas 27 ratas Wistar fêmeas com idade de três meses, todas em fase reprodutiva, com média de peso de  $244,26g \pm 20g$ , provenientes do biotério da Universidade São Judas Tadeu. As ratas foram mantidas em ambiente controlado, com ciclo obedecendo 12h claro/12h escuro, e mantidas em gaiolas individuais e água *ad libitum*.

Os animais foram acompanhados por um período de nove semanas, sendo a primeira semana para adaptação ao ciclo biológico, a segunda semana para realização do teste de esforço máximo e adaptação ao treinamento físico e restrição alimentar e as oito semanas posteriores foram destinadas ao treinamento e restrição alimentar propriamente dito.

### Grupos Experimentais

Todos os animais estudados foram submetidos a um protocolo de teste de esforço máximo em esteira ergométrica adaptada no início do programa de treinamento físico. Este 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 a 0,3 km/h por 3 minutos, sendo esta carga incrementada em 0,3 km/h a cada 3 minutos até que o animal atinja a exaustão (Brooks & White, 1978). O tempo de teste e a velocidade da última carga foram anotados e serviram para determinar a capacidade de exercício de cada grupo.

Desta forma, a divisão foi feita conforme a seguir:

### Animais Sedentários

- Grupo AS (8 ratas) – ratas sedentárias alimentadas com ração *ad libitum* de acordo com o American Institute of Nutrition - AIN-93 (REEVES, 1997);
- Grupo SR (7 ratas) – ratas sedentárias, com restrição alimentar de 50% em relação ao consumo do grupo SA.

### Animais Exercitados

- Grupo TA (7 ratas) – ratas treinadas, alimentação *ad libitum*, de acordo com as recomendações;
- Grupo TR (5 ratas) – ratas treinadas, e com restrição alimentar de 50% em relação ao consumo do grupo TA.

### Dieta Experimental

Para os grupos aos quais foi imposta a restrição alimentar foi seguido o seguinte esquema:

Grupo sedentário com ração normal (SA) ↓	Grupo treinado com ração normal (TA) ↓
Calculo diário da ingestão ↓	Calculo diário da ingestão ↓
Restrição de 50% para o grupo SR	Restrição de 50% para o grupo TR

### Monitoramento do consumo de ração

A ração foi pesada todos os dias, subtraindo a sobra do dia anterior. Este procedimento era feito sempre no mesmo horário por volta das 07:00h.

### Monitoramento do peso dos animais

Os animais foram pesados no início do experimento, uma vez por semana durante as sete semanas de treinamento e no dia do sacrifício para futuras análises. Para pesagem dos animais foi

utilizada uma balança analítica de precisão da marca C&F instrumentos de medidas Ltda, modelo T-15, com três casas decimais.

### Treinamento Físico

Anteriormente ao início do treinamento e ao teste de esforço, os ratos foram submetidos a um período de adaptação, por uma semana. As velocidades no período de adaptação foram de 0,3 km/h com duração de 10 minutos uma vez ao dia. Após os testes de esforço, a divisão dos ratos por grupo obedeceu a uma distribuição homogênea de acordo com o rendimento no teste.

A carga do treinamento físico foi progressiva, e calculada com base no teste de esforço, considerando que os treinos atingissem 85% do máximo.

As ratas eram submetidas ao treino duas vezes por dia, por um período de uma hora, com intervalo mínimo de descanso entre os treinos de 4 horas, cinco dias na semana, durante oito semanas.

### Concentração de IGF-I nos tecidos musculares e hepáticos

Foi utilizado o kit DSL-2900, Texas, USA. O método baseia-se no princípio de radioimunoensaio onde ocorre uma competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo. A quantidade de [I-125] marcado ligado a um anticorpo é inversamente proporcional à concentração de IGF-I presente. A separação de antígenos livres e ligados é alcançada usando um sistema de duplo anticorpo.

### Determinação da proteína muscular

Foram calculados os valores de proteínas totais no músculo, de acordo com LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se o reagente de Folin. Para obtenção da curva padrão, utilizou-se albumina bovina. Na diluição das curvas e da amostra, utilizou-se água destilada. Após a reação, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 660nm.

### Determinação da proteína da carcaça

A proteína da carcaça foi determinada pelo método de Kjeldahl (Albaneze & Orto, 1963), através da extração de nitrogênio da amostra analisada, e posterior conversão do mesmo em porcentagem de proteína, considerando-se para tal o fator arbitrário indicativo do conteúdo de nitrogênio da amostra protéica de 6,25. Tal análise foi realizada em triplicata.

### Análise dos dados

Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de comparação ANOVA ONE WAY, quando encontradas diferenças significativas, procedeu à comparação das médias, utilizando-se o teste de pos-hoc de Tuckey, foram consideradas significativas às diferenças cujo  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Concentração de proteína e IGF-I no músculo e no fígado e da proteína acumulada na carcaça.

Variável	TR	TA	SR	SA	P
Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio (g)	16,779 ± 1,361 <sup>a</sup>	19,249 ± 6,541 <sup>a</sup>	16,507 ± 1,440 <sup>a</sup>	20,644 ± 6,34 <sup>a</sup>	0,352
Concentração de IGF-I no músculo gastrocnêmio (ng/mL)	3,080 ± 0,258 <sup>a</sup>	3,123 ± 0,450 <sup>a</sup>	2,957 ± 0,614 <sup>a</sup>	2,579 ± 0,558 <sup>a</sup>	0,184
Concentração de proteína no fígado (g)	19,041 ± 1,334 <sup>a</sup>	18,812 ± 0,969 <sup>a</sup>	18,316 ± 0,991 <sup>a</sup>	19,681 ± 1,578 <sup>a</sup>	0,231
Concentração de IGF-I no fígado (ng/mL)	2,084 ± 1,188 <sup>a</sup>	3,033 ± 0,336 <sup>a,b</sup>	2,949 ± 0,646 <sup>a,c</sup>	3,359 ± 0,471 <sup>b,c</sup>	0,024
Proteína acumulada na carcaça(g)	15,49 ± 2,57 <sup>a</sup>	26,39 ± 6,79 <sup>b</sup>	16,68 ± 2,33 <sup>a</sup>	26,81 ± 6,00 <sup>b</sup>	0,00

Dados apresentados como média ± desvio padrão; resultados com letras diferentes apresentam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

O IGF-I do músculo não se mostrou diferente entre os quatro grupos. O IGF-I guarda uma relação estreita com a concentração de proteína nos tecidos e, tanto no fígado quanto no músculo, o

presente protocolo experimental não parece ter provocado diferenças na concentração de proteína tecidual. Por isso, pode-se inferir que, as condições experimentais do presente estudo não alteraram de forma significativa o IGF-I e nem as proteínas teciduais. O fato de não ter sido observado diferenças nas concentrações de proteína muscular pode ser justificado provavelmente pelo tipo de treinamento utilizado pelas ratas. As ratas foram submetidas a uma atividade de caráter aeróbio de longa duração e de moderada intensidade e estudos recentes demonstram que a sobrecarga e o exercício resistido são os principais na indução do aumento na expressão gênica de proteínas contráteis (ZOOPI, 2005).

Nos processos de jejum, desnutrição e anorexia nervosa, os resultados são controversos. Alguns estudos com marasmo apresentam diminuição, e outros, aumento nos níveis de IGF-I. Os mecanismos de diminuição de IGF-I parecem ser adaptativos, pela metabolização de ácidos graxos pelo cérebro e tecidos periféricos e pelo aumento do catabolismo de proteínas, permitindo a neoglicogênese hepática (CLEMMONS & UNDERWOOD, 1991; RIBEIRO & TIRAPEGUI, 1996).

A restrição alimentar foi, por outro lado, responsável por uma diminuição da concentração de proteína na carcaça do animal. Na verdade, a análise do teor protéico feito na carcaça do animal reflete principalmente a proteína depositada em forma de pele, pêlos, cartilagens, entre outros.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, e com vistas ao objetivo proposto, pode-se concluir que o treinamento estimulou o músculo a sintetizar mais IGF-I, a alimentação teve maior influência no IGF-I do fígado e no acúmulo de proteína na carcaça e músculo.

Vale ressaltar que experimentos envolvendo um maior número de animais e parâmetros mais específicos de avaliação de síntese de proteínas poderiam melhor elucidar tais dados.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.R. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skelet muscle adaptation to increased loading. **Exercise in Sport Sciences Rewienws**, v.2, p31-60,1998.
- BANG, P; BRANDT, J; DEGERBLAD, M; ENBERG, G; KAISER, L; THOREN, M; HALL, K. Exercise induced changes in insulin-like growth factors and their low molecular weight binding proteins in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 20, p. 285-292, 1990
- BORST, SE; DE HOYOS, DV; GARZARELLA, L.; VICENT, K.; POLLOCK, BH; LOWENTHAL, DT; POLLOCK, ML. Effects of resistance training on insulin-like growth factor and IGF-I binding proteins. **Medicine and Science in sports and exercise.** v. 33, p.648-653, 2001.
- BROOKS GA & WHITE TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol.** v. 46, p. 1009-1015, 1978.
- CLEMMONS, DR; UNDERWOOD, LE. Nutricional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. **Ann. Rev. Nutr.** v. 11, p. 393-412, 1991.
- ELIAKIM, A; MOROMISATO, M; MOROMISATO, D; BRASEL, JA; ROBERTS, C; COOPER, MDA. Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in yong rats. **American Journal of physiology**, v.42, p.R1557-R1561, 1997.
- FAO (Roma, Itália). Necessidades de energia y de proteínas. Roma: FAO/OMS, 1985. 21p. **(FAO/OMS. Série de informes técnicos, 724).**
- FORBES, GB; BROWN, MR; WELLE, SL; UNDERWOOD, EI. Hormonal response to overfeeding. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 49, p. 608-611, 1989.
- GOMES, M.R; PIRES,ISO; CASTRO,I.A; TIRAPEGUI,J. Effect of moderate physical exercise on plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-1 in adult rats. **Departament of food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Science**, University of São Paulo, 2004
- JÚNIOR, M. OLIVEIRA, CRP; BRITO, AVO; COSTA, FO; SILVA, PRC; SERPA, MG; OLIVEIRA, MHA. Diagnóstico da Deficiência de Hormônio de Crescimento, a Rigor de IGF-I. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.46, n.1, p.27-33, 2002.

- KATS, E; DELEON, DD; ZHAO, H; JAWAD, AF. Free and total insulin-like factor (IGF-I) levels decline during fasting: relationships with insulin and IGF-I binding protein-1. **J. Clin. Endocrinol Metab.** v. 87, p. 2978-2983, 2003.
- KOZIRIS, LP; HICKSON, RC; CHATTERTON, RT; GROSETH, RT; CHRISTIE, JM; GOLDFLIES, DG; LUNTERMON TG. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. **J. Appl. Physiol.**, v. 86, n. 4, p. 1436-1442, 1999.
- LAUGHLIN, GA; YEN, SC. Hypoleptinemia in women athletes: Absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. **J. Clin Endocrinol Metab.** v.82, p.318-321, 1998.
- LEMON, P. W. R. Effects of exercise on dietary protein requirements. **J. Sport. Nutr.**, 8, 426-447, 1998.
- LEMON, P. W. R. Influência da proteína alimentar e do total de energia ingerida no aumento da força muscular. **Sports Science Exchange**, 10, 1-5, 1997.
- LOUCKS, AB; HEATH, EM; LAW, VERDUN; TM; WATTS, JR. Dietary restriction reduces luteinizing hormone (LH) pulse frequency during waking hours and increases LH pulse amplitude during sleep in young menstruating women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** v.78, n.4, 1994.
- LOWRY, DH, ROSEBROUGH, NJ, FARR, AL, RENDALL, R.J. Protein measurement with folin, phenol reagent. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, v. 193, p.266-75, 1951.
- LUCIANO, E; MELLO, MA. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculos de ratos diabéticos experimentais. **Revista paulista de Educação Física.** v. 12, p. 202-209, 1998.
- NEMET, D.; PETER HC; ANDREA MP; CHRISTIE RG; JENNIFER KL; PIETRO G.; DAN MC. Negative energy balance plays a major role in the IGF-I response to exercise training. **Journal of Applied Physiology.** v. 96, p. 276-282, 2003.
- REEVES, PG. Componentes of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J. Nutr.** v. 127, p.8385-8415, 1997.
- RIBEIRO, SML; TIRAPGUI, J. Fator de crescimento semelhante a insulina-1 dieta e atividade física. **Cadernos de Nutrição.** v. 10, p. 30-47, 1996.
- RICKENLUND, A; THORÉN, M; CARLSTROM, K; SCHOULTZ, B; HIRSCHBERG, AL. Diurnal profiles of testosterone and pituitary hormones suggest different mechanisms for menstrual disturbances in endurance athletes. **The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 89, n. 2, p. 702-707, 2004.
- RINDERKNECHT, E; HUMBEI, RE. Polypeptides with monosuppressible insulin-like cell-growth-promoting activities in human serum, isolation, chemical characterization and some biological properties of from I and II. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 73, p. 2365, 1976.
- SALMON, WD; DAUGHADAY, WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **J. Lab. Clin. Med.** v.49, p. 825-826, 1957.
- THISSEN, JP; KETELSLEGERS, JM; UNDERWOOD, EI. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocr. Rev.** v.108, p. 824-828, 1994.
- TIRAPGUI, J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física.** São Paulo, v.1, Atheneu, 2005.
- YEN, JK; ALOIA, JF; CHEN, M; LING, N; KOO, HC; MILLARD WJ. Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats. **Am. J. Physiol.** v. 266, p.E129-E135, 1994.
- ZOOPI, C.C. Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico. **Revista Saúde.com.** v.1, p. 60-70, 2005.
- ZUCA, S. M.. Noções básicas de nutrição e metabolismo para o atleta. **Revista Brasileira de Educação Física e Esportes,** São Paulo, v. 45, p. 34-53, 1980.

<sup>1</sup>FMG/IPTAN – <sup>2</sup>Laboratório do Movimento Humano/USJT – <sup>3</sup>ICB-III/USP – <sup>4</sup>EACH/USP