

IGF-1 MINIMIZA OS EFEITOS DELETÉRIOS DO DESUSO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS

IGF-1 MINIMIZES THE HARMFUL EFFECTS OF DISUSE ON RAT SOLEUS MUSCLE

CARLOS ALBERTO DA SILVA¹, CARLOS PETERMANN³, KARINA MARIA CANCELLIERO², JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN², MARIA LUÍZA OZORES POLACOW¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do tratamento com IGF-1 sobre o perfil metabólico e morfológico do músculo sóleo submetido à imobilização articular de tornozelo. Métodos: Ratos Wistar foram divididos em 3 grupos (n=6): controle (C), imobilizado (I) e imobilizado tratado com IGF (I+IGF; 40mg/Kg) durante 7 dias. Resultados: A imobilização reduziu o peso (34%), o conteúdo de glicogênio (31,6%) a área das fibras musculares (44%), e elevou na densidade do tecido conjuntivo (216%). Por outro lado, o IGF-1 aumentou o glicogênio em 234,6% quando comparado ao I, minimizou a redução de 33,7% na área das fibras musculares e aumentou de 76% no tecido conjuntivo comparado ao C (p<0,05). Conclusões: O tratamento com IGF demonstrou uma ação anti-catabólica, fato esse que pode favorecer uma recuperação mais rápida na fase pós-imobilização. Nível de evidência: Nível II: estudo prospectivo comparativo.

Descritores: Fator de crescimento insulin-like I. Imobilização. Glicogênio. Músculo esquelético.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the effect of IGF-1 treatment on the morphological and metabolic profile of the soleus muscle submitted to ankle joint immobilization. Methods: Wistar rats were divided into 3 groups (n = 6): control (C), immobilized (I) and immobilized treated with IGF (I + IGF; 40mg/kg) for 7 days. Results: Immobilization led to a reduction in the weight (34%), glycogen content (31.6%) and area of muscle fibers (44%), and increased the density of connective tissue (216%). Also, the IGF-1 increased the glycogen by 234.6% compared to I, minimized the area of muscle fibers by 33.7% and increased the connective tissue by 76% compared to C (p <0, 05). Conclusions: Treatment with IGF has an anti-catabolic action, which can promote faster recovery in the post-immobilization phase. Level of Evidence: Level II, prospective comparative study.

Keywords: Insulin-like growth factor I. Immobilization. Glycogen. Muscle, skeletal.

Citação: Silva CA, Petermann C, Cancelliero KM, Durigan JL, Polacow ML. IGF-1 minimiza os efeitos deletérios do desuso no músculo sóleo de ratos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(3):137-40. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Silva CA, Petermann C, Cancelliero KM, Durigan JL, Polacow ML. IGF-1 minimizes the deleterious effects of the disuse in rats soleus muscle. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(3):137-40. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Vários modelos experimentais são propostos no intuito de identificar os eventos desencadeados pelo desuso muscular e deflagração dos processos precursores da atrofia, merecendo destaque, a desnervação, tenotomia, repouso prolongado em leito, suspensão dos membros posteriores do animal ou ainda a imobilização unilateral de membros por órteses.¹

Apesar de muitas vezes necessária, a imobilização apresenta efeitos colaterais como atrofia da fibra muscular, fibrose intramuscular, perda de extensibilidade muscular e limitação de movimento articular.² Diversos estudos demonstraram que concomitante à atrofia muscular, ocorrem grandes modificações na homeostasia do músculo esquelético, comprometendo a síntese de proteínas miofibrilares ou não fibrilares, afetando a dinâmica contrátil bem como a efetividade das vias metabólicas.²

O desuso muscular induz resistência à insulina e a um estado catabólico nos músculos esqueléticos de humanos,³ porém ainda não está claro como o desuso muscular crônico ou a imobilização alteram a sinalização de insulina.⁴ No intuito de minimizar os eventos desencadeados pelo desuso muscular, diversas técnicas têm sido utilizadas, buscando melhorar as condições homeostáticas das fibras musculares, com destaque para estimulação elétrica neuromuscular, fármacos como o clenbuterol e suplementos como o sulfato de vanadil, a creatina, a glutamina e o CGT (creatina, glutamina, taurina).⁵

Na literatura, há estudos relacionados à via de sinalização pela qual o estímulo mecânico e a atividade de IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina 1) levam a mudanças funcionais nas células satélites, quantidade de DNA muscular, quantidade de proteína muscular, massa muscular e área da fibra muscular.⁶

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1- Fisioterapia – FACIS / UNIMEP – Piracicaba – SP.

2- Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

3- Universidade Estácio de Sá, Belo Horizonte – MG, Brasil

Trabalho realizado na Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP.

Correspondência: Universidade Metodista de Piracicaba - Faculdade de Ciências da Saúde - PPG-FISIOTERAPIA. Rodovia do Açúcar, Km 156 – Taquaral, Piracicaba – São Paulo - Brasil - CEP 13400-911 Email: gruposquisacas@yahoo.com.br

Artigo recebido em 08/10/09, aprovado em 26/03/10

Acta Ortop Bras. 2011;19(3): 137-40

Segundo Barton-Davis *et al.*⁷, a expressão local do IGF mantém a massa e a força do músculo durante o envelhecimento. Além disso, ao menos em dois modelos de doença em experimentos animais, a esclerose lateral amiotrófica e a distrofia muscular de *Duchenne*, o tratamento local com IGF demonstrou retardar o início e a progressão da doença bem como reduzir sua gravidade.⁸ Porém, há escassez de estudos que demonstrem os efeitos do IGF-1 na fase aguda da imobilização.

A hipótese desse estudo foi que o tratamento com IGF-1 minimize os efeitos deletérios promovidos pela imobilização no músculo sóleo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do tratamento com IGF no músculo sóleo na condição de imobilização articular, sob os aspectos do peso, conteúdo de glicogênio, área das fibras musculares e densidade de tecido conjuntivo intramuscular.

METODOLOGIA

Ratos da linhagem *Wistar* (3 a 4 meses), foram tratados com ração e água *ad libitum* e mantidos sob condições controladas de biotério (23±2°C; ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12h). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos em experimentação animal 015/2006.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=6): controle, imobilizado e imobilizado tratado com IGF. Para a imobilização, os ratos foram anestesiados (pentobarbital sódico, 40mg/Kg de peso corporal) e a órtese de resina acrílica foi adaptada mantendo a posição neutra (90°) tornozelo.⁵ O IGF-1 (Sigma, código I2656) foi administrado na dose de 50mg/Kg⁹ pela via subcutânea diariamente. O período tanto da imobilização quanto do tratamento foi sete dias.

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica e o músculo sóleo foi retirado e encaminhado para a análise do conteúdo de glicogênio, peso muscular, área das fibras musculares e densidade do tecido conjuntivo intramuscular. Para a determinação do glicogênio muscular seguiu-se a proposta de Siu *et al.*¹⁰ que consta da digestão das amostras musculares em KOH a quente, passagem por etanol, centrifugação e submissão à hidrólise ácida na presença de fenol. Para a avaliação do peso úmido muscular foi utilizada a balança analítica.

Para a morfometria, o tecido foi fixado em formol a 10% e processado para a inclusão em paraplast. Cortes transversais não seriados de 7µm de espessura da porção ventral do músculo sóleo foram corados por Hematoxilina-Eosina (H:E).

Foram selecionados cinco cortes e para cada um deles foram coletadas cinco áreas, por meio de um sistema de captação e análise de imagens constituído de um *software Image Pró-plus 4.0* (Media Cybernetics®), câmera digital (JVC®) acoplada a um microscópio (Zeiss®) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com objetiva e ocular de 10x.

As áreas de secção transversa de 375 fibras do músculo sóleo por animal, foram assim determinadas: 15 fibras por área, sendo cinco áreas por corte, e cinco cortes por animal. Para a escolha das fibras a serem analisadas, utilizou-se de um retículo com quadrados de 12100µm² de área, contendo 20 intersecções de reta, e foram consideradas as fibras que coincidiam com 15 intersecções, de forma aleatória.

A análise da densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular foi quantificada utilizando-se o sistema de planimetria por contagem de pontos,⁵ por meio de um retículo com quadrados de 2500µm² contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímio, em cinco áreas por corte, sendo cinco cortes por animal, perfazendo um total de 1400 pontos por

animal. A área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perímio) pelo número total de pontos.

Para a análise estatística dos dados, inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e o teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% (p<0,05).

RESULTADOS

A imobilização promoveu redução significativa (p<0,05) nas reservas de glicogênio do músculo sóleo de 31,6%, bem como no peso, na ordem de 34%. Também foi observado redução de 44% (p<0,05) na área das fibras musculares e aumento de 216% (p<0,05) na densidade do tecido conjuntivo intramuscular quando comparado ao grupo controle. (Tabela 1 e Figura 1)

O tratamento com IGF-1 elevou de forma significativa (p<0,05) o conteúdo de glicogênio (234,6%), sem alteração no peso muscular (p>0,05) com relação ao grupo imobilizado. Com relação à área das fibras musculares, esta foi reduzida em 33,7% (p<0,05) e a densidade de área do tecido conjuntivo foi aumentada em 76% (p<0,05) quando comparado ao controle, porém com valores menores (p<0,05) que o grupo imobilizado. (Tabela 1 e Figura 1)

Tabela 1. Conteúdo de glicogênio (mg/100mg), peso (mg), área da fibra (µm²) e densidade de área do tecido conjuntivo (%) do músculo sóleo dos grupos controle (C), imobilizado 7 dias (I) e imobilizado tratado com IGF 7 dias (I+IGF). n=6, valor da média±epm.

Grupos	Glicogênio	Peso	Área da fibra	Tecido conjuntivo
C	0,35 0,07	125,5 1,1	2647 97	7,9 1,9
I	0,26 0,03	81 0,6*	1301 52*	28,8 0,9*
I + IGF	0,91±0,05*†	77±0,7*	1706 93*†	15,54 1,3*†

* Difere significativamente (p<0,05) do grupo controle
† Difere significativamente (p<0,05) do respectivo grupo imobilizado

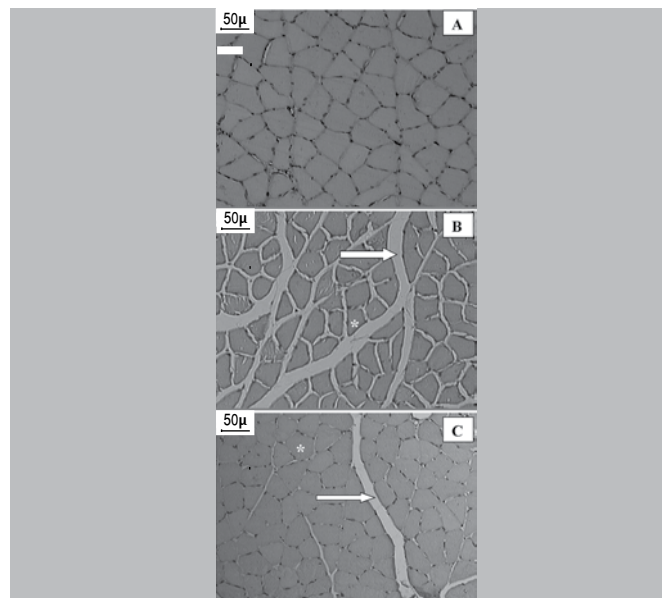


Figura 1. Fibras musculares do sóleo (Hematoxilina-Eosina, 100x). A- Controle: Fibras com aspecto normal (*) e formato hexagonal. B- Imobilizado: Presença de atrofia da fibra muscular (*) e aumento de tecido conjuntivo (seta). C- Imobilizado tratado com IGF: Presença de atrofia da fibra muscular (*) e aumento de tecido conjuntivo (seta), porém com valores menores que o grupo imobilizado

DISCUSSÃO

Este estudo foi o pioneiro em demonstrar o efeito de IGF-1 no músculo sóleo imobilizado após sete dias sobre variáveis metabólicas e morfométricas. Nossos resultados demonstraram que o IGF-1 pode ser utilizado na fase inicial do desuso muscular, pois minimiza a redução do conteúdo de glicogênio muscular, área das fibras, bem como o aumento da densidade de área do tecido conjuntivo. Tal fato sugere um possível efeito protetor promovido por esse fator de crescimento contra a atrofia observada em pacientes submetidos ao desuso muscular.

O desuso muscular provocado por condições de longos períodos no leito, utilização de órteses, fixações de membros ou microgravidade induz o estado de resistência à insulina e conseqüentemente a um estado catabólico nos músculos esqueléticos.⁵ Neste sentido, Ploug *et al.*¹¹ aprimoraram a compreensão do comportamento metabólico muscular durante um curto período de imobilização (48 horas) ao demonstrarem diminuição significativa na população dos transportadores GLUT1 e GLUT4 nas fibras vermelhas. A redução no número de receptores insulínicos e da atividade quinase do receptor sugere, em um curto período, haver resistência ao transporte de glicose que é específica ao tipo de fibra e seletiva ao processo contrátil e à ação da insulina. O presente estudo demonstrou uma expressiva redução nas reservas glicogênicas do músculo sóleo, além da redução no peso muscular, corroborando, assim, com a hipótese de expressão multifatorial no controle metabólico da musculatura esquelética.

A utilização de IGF-1 enquanto agente terapêutico merece especial atenção, visto a capacidade da molécula de promover elevação na captação tecidual de glicose, além de expressar uma potente ação anabólica.¹² É sabido que o peptídeo IGF-1 exerce um potente efeito trófico participando eficientemente no desenvolvimento da musculatura esquelética bem como da modulação na captação tecidual de substratos metabolizáveis, em especial a glicose.¹³ Embora haja relatos na literatura comprovando que na presença deste peptídeo há elevação na captação tecidual da glicose, este tem menor intensidade se comparado à insulina, uma vez que esta molécula é de 5 a 10 vezes menos potente.¹⁴ Tem sido observado que as reservas glicogênicas têm relação direta com o desempenho de *endurance* da musculatura esquelética, melhorando com isso a disponibilidade energética e retardando a fadiga.⁴ Sendo assim, o presente estudo demonstrou que o IGF-1 promoveu aumento das reservas de glicogênio do músculo sóleo imobilizado. Esse fato pode estar relacionado à ação glicogênica do IGF desencadeada pela ativação de receptores específicos presentes na membrana da fibra muscular, os quais sinalizam promovendo elevação na captação de glicose, translocação do GLUT4 de reservatórios citosólicos em direção à membrana propiciando com isso elevação na captação da hexose além da ativação da enzima glicogênio sintetase.¹⁴ Além disso, foi demonstrado que o tratamento com IGF-1 aumenta também a sensibilidade à insulina, um fenômeno conhecido como “efeito IGF poupador de insulina”. O mecanismo exato pelo qual o IGF-1 aumenta a sensibilidade à insulina permanece desconhecido, mas ele pode estar envolvido em efeitos diretos do IGF-1 em tecidos-alvos da insulina assim como uma inibição mediada por *feedback* do IGF-1 na secreção do hormônio do crescimento.¹⁵

Com relação à análise morfométrica do músculo sóleo, foi observado que no período de sete dias, houve redução significativa no peso muscular acompanhada de redução na área das fibras musculares, apontando para o quadro de atrofia muscular inerente

ao desuso, corroborando com trabalhos presentes na literatura. Segundo Kannus *et al.*² relataram redução de 69% da área das fibras do músculo sóleo imobilizado por meio de aparelho gessado durante 3 semanas.

Está bem estabelecido que hormônios anabólicos, bem como fatores de crescimento como o IGF-1, podem preservar a massa muscular em estados catabólicos.¹⁶ Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que o tratamento com o IGF-1 minimizou a redução da área de secção transversa do músculo sóleo imobilizado, ratificando o resultado apresentado por Zdanowicz e Teichberg⁹ que relataram que o IGF-1 diminuiu a degradação de proteínas intramusculares, bem como a densidade das fibras do músculo sóleo de ratos submetidos à suspensão durante 10 dias.

Esses resultados podem ser justificados pelo fato do IGF-1 promover efeitos mitogênicos e anabólicos no músculo esquelético. Ele tem a capacidade de mediar tanto a diferenciação quanto a proliferação dos mioblastos.¹⁷ Análises do receptor de IGF tipo 1 (IGFR1) indicam que a capacidade de promover diferenciação celular pode estar dissociada dos efeitos mitogênicos da ligação do IGFR1, sugerindo que vias distintas de sinalização intracelular podem mediar esses processos.¹⁸ *In vitro*, a caracterização das vias de sinalização intracelular que respondem à ligação do IGFR1 no músculo esquelético tem levado a focalização de duas vias, uma caracterizada pela atividade aumentada da cascata Ras-ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), importante em estimular a proliferação celular e uma segunda que envolve a sinalização da fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K), relacionada à diferenciação celular.¹⁸

Com relação a análise do tecido conjuntivo, a imobilização durante sete dias promoveu aumento significativo na densidade de área do tecido conjuntivo na ordem de 216% se comparado ao grupo controle. Esses resultados estão de acordo com a literatura, já que para Jozsa *et al.*¹⁹, independente do modelo de desuso muscular estudado (imobilização, tenotomia ou desnervação), a quantidade de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio aumentam significativamente, variando de 50% a 700%.

O tratamento com IGF minimizou o aumento da densidade de área do tecido conjuntivo quando comparado ao imobilizado. Pelo fato de possuir ação anabólica, era esperado aumento da síntese das proteínas da matriz extracelular. Como esse fato não foi observado, talvez as diferenças na taxa de renovação entre as proteínas intramusculares e da matriz extracelular podem ter influenciado os resultados. Uma vez que as proteínas colágenas possuem taxa de renovação mais lenta do que as do tecido muscular,²⁰ possivelmente o período de sete dias de tratamento não foi suficiente para o aumento da densidade de área do tecido conjuntivo pela utilização do IGF-1, já que nesse período foi observado aumento da área das fibras em relação ao grupo imobilizado. Esse achado é extremamente importante, porém são necessários mais estudos para se determinar o mecanismo pelo qual o IGF-1 reduziu a densidade de área do tecido conjuntivo no músculo imobilizado durante sete dias, já que tais alterações determinam a elasticidade, rigidez e extensibilidade muscular.

CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que o tratamento com IGF durante 7 dias minimizou os efeitos deletérios desencadeados no músculo sóleo pela imobilização articular aguda, mantendo o músculo em melhores condições energéticas, além de demonstrar uma ação anti-catabólica, fatores que podem favorecer a reabilitação na fase pós-imobilização.

REFERÊNCIAS

1. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2001;24:893-9.
2. Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Järvinen TA, *et al*. Free mobilization on a low to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol*. 1998;84: 1418-24.
3. Ferrando AA, Lane HW, Stuart AA, Davis-Street J, Wolfe RR. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 1):E627-33.
4. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:E1235-41.
5. Cancelliero KM, Durigan JL, Vieira RP, Silva CA, Polacow ML. The effect of a low dose of clenbuterol on rat soleus muscle submitted to joint immobilization. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:1054-8.
6. Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol*. 1997;273(4 Pt 1):E790-800.
7. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Sweeney HL. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1999;167:301-5.
8. Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage, FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*. 2003;301:839-42.
9. Zdanowicz MM, Teichberg S. Effects of insulin-like growth factor-1/binding protein-3 complex on muscle atrophy in rats. *Exp Biol Med*. 2003;228:891-7.
10. Siu LO, Rousseau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28:234-6.
11. Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1995;268:980-6.
12. Frick F, Oscarsson J, Vikman-Adolfsson K, Ottosson M, Yoshida N, Eden S. Different effects of IGF-I on insulin-stimulated glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278:729-37.
13. Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Action of insulin like growth factors. *Ann Rev Physiol*. 1985;47:443-67.
14. Hussain MA, Schmitz O, Christiansen JS, Zapf J, Froesch ER. Metabolic effects of insulin-like growth factor-I: a focus on insulin sensitivity. *Metabolism*. 1995;44(10 Suppl 4):108-12.
15. Ørskov L, Møller N, Bak JF, Pørksen N, Schmitz O. Effects of the somatostatin analog, octreotide, on glucose metabolism and insulin sensitivity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1996;45:211-7.
16. Clemmons DR, Smith-Bank A, Underwood LE. Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor-I in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:234-8.
17. Singleton JR, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. *Neurobiol Dis*. 2001;8:541-54.
18. Kim JJ, Accilli D. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm IGF Res*. 2002;12:84-90.
19. Jozsa L, Reffy A, Demel S, Thoring J, Rapcsak M, Szoor A, Hideg J. Quantitative alterations of intramuscular connective tissue in calf muscles of the rat during combined hypoxia and hypokinesia. *Acta Physiol Hung*. 1989;73:393-40.
20. Järvinen TA, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23:245-54.