

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO INTERMITENTE DE ALTA INTENSIDADE
E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CARBOIDRATOS NO METABOLISMO DE
GLICÍDIOS EM RATOS TREINADOS**

VIVIAN TREICHEL GIESEL

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, 2011

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Edison Capp, pelo estímulo, orientação e
compreensão.

Ao meu marido Helenilton pelo carinho diário, por me entender em todos
os momentos e por ser sempre a pessoa certa em minha vida.

Aos meus filhos Vitor e Betina que simplesmente por existirem me
enchem de paz e amor.

À minha amada mãe, Lederly Treichel, e ao meu padrasto, Francisco,
pelo imenso carinho e por serem eternamente especiais.

À minha querida irmã, Helen Treichel, meu cunhado Altemir Mossi e à
Luiza pelo carinho proporcionado.

Aos meus sogros, Celmira Maria Rabassa Giesel e Enilton Einhardt
Giesel, pelo apoio, carinho e compreensão.

Às amigas, Gisele, Samanta e Débora por suas grandes amizades e por
serem incondicionalmente confortantes em todos os momentos.

À minha prima, Livian, meu cunhado, Humberto e meu sobrinho
Guilherme pela companhia e compreensão em todos os momentos.

À minha cunhada, Henriette, meu cunhado, Peragíbio, e minha sobrinha
Giovana pelo carinho e compreensão.

À Lolita Schneider Pizzolato por sua grande dedicação e colaboração.

Ao professor Airton José Rombaldi por ter sido a pessoa que me incentivou a seguir na Fisiologia, pelos conhecimentos sempre transmitidos com muita clareza.

Às professoras Ilma Simoni Brum da Silva e Helena Von eye Corleta, pela compreensão, serenidade e apoio.

Ao incansável Klaus Von Eye pela imensa colaboração incondicional em todos os momentos do trabalho.

Aos funcionários do HCPA por trabalharem precisamente em função dos objetivos do experimento.

"No passado do poeta que escreveu versos sublimes, há quase de certeza um professor que o obrigou a exercitar-se na sintaxe, que o forçou a corrigir vezes sem conta frases mal escritas, que ralhou com ele quando se desleixava. Na juventude daquele que escreveu uma bela sinfonia houve muito possivelmente uma professora, talvez já velhota, que lhe explicou cem vezes, pacientemente, qual era a forma correta de colocar as mãos quando se sentava ao piano. O poeta e o músico tiveram os seus nomes escritos na História, mas ninguém recorda quem foram os seus mestres. No entanto, há uma beleza imensa nesse passar despercebido, nesse ter rasgado as mãos ao trabalhar nos escuros alicerces de um mundo melhor. Uma beleza que só é apreciada pelas grandes sensibilidades, como são as daquelas pessoas que se dedicaram de corpo e alma à educação. Uma boa parte da humanidade prefere aquilo que dá nas vistas ou produz frutos imediatos..."

(Paulo Geraldo - educador)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. As alterações fisiológicas provenientes do exercício físico e do treinamento físico	3
2.1.1. O exercício físico intermitente.....	5
2.2. O lactato	7
2.2. A glicose como ativador metabólico.....	9
2.3. A regulação hormonal no exercício físico.....	11
2.3.1. O hormônio do crescimento.....	12
2.3.2. O IGF-I.....	14
2.3.3. A IGFBP-I	18
2.3.4. A corticosterona.....	21
2.3.5. O receptor de IGF-I.....	23
2.4. A suplementação de carboidratos	24
2.5. As alterações hormonais promovidas pela suplementação de glicose	30
2.6. A fadiga no exercício físico	32
2.7. Particularidades dos experimentos conduzidos em ratos	34

2.7.1. A organização da musculatura esquelética dos membros posteriores dos ratos	34
1.9.2. A extrapolação dos resultados das pesquisas	36
1. HIPÓTESES.....	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Geral.....	38
3.2. Específicos	38
4. DELINEAMENTO, POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	40
4.1. Experimento.....	40
4.2. Determinação da glicose e do lactato séricos	44
4.3. Determinação do glicogênio hepático e muscular	45
4.4. Radioimunoensaio para IGF-I	45
4.5. Radioimunoensaio e Elisa para IGFBP-I.....	46
4.6. Radioimunoensaio para hormônio do crescimento (GH).....	47
4.7. Radioimunoensaio para corticosterona	48
4.8. Extração do RNA total para determinação da expressão gênica do IGF-I e seu receptor	48
4.8.1. Reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa (RT-PCR) para determinação da expressão gênica do IGF-I e IGF-Ir	50
4.8.2. Síntese do cDNA	50
4.8.3. Protocolo geral da PCR	51
4.9. Cálculo do tamanho da amostra	53
4.10. Análise Estatística.....	54
4.11. Aspectos éticos e de biossegurança.....	54

5. RESULTADOS.....	56
5.1. Massa Corporal.....	56
5.2. Glicogênio	57
5.3. Glicemia	58
5.4. Lactato	59
5.5. Hormônio do crescimento (GH).....	60
5.6. IGF-I sérico	61
5.7. Corticosterona.....	61
5.8. IGFBP-I	62
5.9. RT-PCR.....	62
5.10. IGF-I Sólido.....	66
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÕES	81
8. PERSPECTIVAS.....	83
10. ANEXOS	115
10.1 Artigo.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de captação da glicose pela célula muscular no exercício físico e no repouso.....	5
Figura 2. Glicose: ativador metabólico do metabolismo dos carboidratos.....	10
Figura 3. Análise esquemática do eixo hipotálamo/hipófise/GH/IGF-I e suas variáveis.....	13
Figura 4. Efeitos diretos e indiretos (mediados pelo IGF-I) do GH.....	14
Figura 5. Proteínas transportadoras e receptores da família IGF.....	18
Figura 6. Zonas do músculo gastrocnêmio do rato	35
Figura 7. Divisão dos grupos do experimento	41
Figura 8. Variação do Lactato (T60 – T0).....	60
Figura 9. Glicogênio Hepático	57
Figura 10. Expressão gênica do IGF-1 no músculo gastrocnêmio (Sedentários X Treinados).....	63
Figura 11. Expressão gênica do IGF-1 no fígado de ratos exercitados.....	65
Figura 12. Expressão gênica do IGF-1 e IGF-1r no músculo sóleo.....	67
Figura 13. Concentração sérica de hormônio do Crescimento (GH).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo geral para as reações de PCR, utilizando o “hot start”	52
Tabela 2. Características dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos específicos de cDNA.	53
Tabela 3. Massa corporal e concentração de glicogênio dos animais nos distintos grupos	56
Tabela 4. Resultados das variáveis séricas nos grupos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH → Hormônio Adenocorticotrófico

ADP → Adenosina difosfato

AGL → Ácido graxo livre

ATP → Adenosina trifosfato

AMP → Adenosina monofosfato

AMPc → AMP cíclico

CAT → Carnitina acil transferase

DEPC → Dietil-pirocarbonato

dNTP → desoxirribonucleotídeos fosfatados

FADH₂ → Flavina adenina dinucleotídeo

GHRH → Hormônio liberador do hormônio do crescimento (Growth hormone releasing hormone)

GH → Hormônio do crescimento (Growth hormone)

GLUT → Transportador de glicose (Glucose transporter)

IGF-I → Fator de crescimento semelhante à insulina I (Insulin-like growth factor-I)

IGFBP-I → Proteína de ligação do IGF-I (Insulin-like growth factor binding protein-I)

IGF-Ir → Receptor de IGF-I

IRS-I → Receptor do substrato de inulina

IR → Receptor de Insulina

MAPK → Proteína quinase de ativação mitogênica

MCT → Transportador monocarboxílico

NADH → Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO → Óxido Nítrico

PCr → Creatina fosfato

PEPCK → Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PFK → Fosfofrutoquinase

PGK → Fosfoglicerato quinase

PI3K → Fosfatidil inositol 3 kinase

pKa → Constante de dissociação

PKA → Proteína quinase A

pH → Potencial hidrogeniônico

RNA → Ácido ribonucléico

SGLT1 → co-transportador glicose-sódio

UDP-glicose → Uridina difosfato glicose

RESUMO

O exercício físico intermitente tem se mostrado uma modalidade de elevado gasto calórico e, mesmo quando praticado em altas intensidades, pode ser mantido por grandes períodos de tempo. A suplementação com carboidratos tem sido utilizada e estudada como forma de manutenção do desempenho esportivo. O exercício físico intermitente e a suplementação com fontes carboidratadas produzem alterações hormonais condizentes com as alterações orgânicas provenientes da sua prática. O eixo GH/IGF-I é afetado por ambas as intervenções. Objetivou-se estabelecer um protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade para ratos e verificar os efeitos da administração de solução de glicose a 10% sobre as concentrações sanguíneas de lactato e glicemia, além de verificar alterações séricas de GH, IGF-I, IGFBP-I e corticosterona relacionadas à prática deste tipo de exercício físico. Foram verificadas também as concentrações musculares (gastrocnêmio e sóleo) e hepáticas de glicogênio, bem como a expressão gênica do IGF-I e do IGF-Ir nestes tecidos. Para tal, quarenta (40) ratos Wistar machos foram separados em 8 grupos (n=5/grupo): TEC (Treinados, exercitados, com suplementação de carboidrato), TES (Treinados, exercitados, sem suplementação de carboidrato), TNC (Treinados, não exercitados, com suplementação de carboidrato), TNS (Treinados, não exercitados, sem suplementação de carboidrato), SEC (Sedentários, exercitados, com suplementação de carboidrato), SES (Sedentários, exercitados, sem

suplementação de carboidrato), SNC (Sedentários, não exercitados, com suplementação de carboidrato), SNS (Sedentários, não exercitados, sem suplementação de carboidrato). O protocolo de exercício físico consistiu de um minuto correndo em esteira a 110% da velocidade final do teste máximo e 30 segundos a 40% desta, num total de 60 minutos, sendo o treinamento de noventa (90) dias. Como resultado foi verificado que o exercício físico agudo se mostrou uma forma de aumentar a expressão gênica de IGF-I, já o treinamento fez com que houvesse uma redução nesta expressão. O aumento da IGFBP-I ocorreu somente em ratos treinados, que apresentaram também uma maior expressão gênica de IGF-Ir no músculo gastrocnêmio quando não suplementados. Os animais não exercitados apresentaram níveis séricos de GH superiores aos exercitados. A corticosterona mostrou concentrações mais elevadas em ratos sedentários do que treinados, com ou sem exercício físico agudo. Conclui-se que o exercício físico agudo em ratos pode, em alguns hormônios estudados, produzir resultados divergentes dos esperados, já o treinamento prolongado tende a reverter as concentrações destes.

Palavras-chave: exercício físico, GH, IGF-I, IGFBP-I, glicose.

ABSTRACT

The intermittent exercise has been shown to be a kind of high caloric expenditure and, even when practiced at high levels, can be maintained for long periods of time. Supplementation with carbohydrate has been used and studied in order to maintain athletic performance. The intermittent exercise and supplementation with carbohydrate sources produce hormonal changes consistent with the organic changes from its practice. The GH/IGF-I axis is deeply affected by both interventions. The objective was to establish a protocol for high-intensity intermittent training for rats and assess the effects of administering a glucose solution (10%) on blood concentrations of lactate and glucose in addition to investigating changes in serum GH, IGF-I, IGFBP-I and corticosterone related to the practice of this type of exercise. Also, it was analyzed the muscle (gastrocnemius and soleus) and hepatic concentrations of glycogen and gene expression of IGF-I and IGF-Ir in these tissues. For such, forty (40) male wistar rats were divided into eight groups (n=5/ group): TEC (trained, exercised with carbohydrate supplementation), TES (trained, exercised without carbohydrate supplementation), TNC (trained, nonexercised with carbohydrate supplementation), TNS (trained, nonexercised without carbohydrate supplementation), SEC (sedentary, exercised with carbohydrate supplementation), SES (sedentary, exercised without carbohydrate supplementation), SNC (sedentary, nonexercised with carbohydrate supplementation), SNS (sedentary nonexercised without carbohydrate supplementation). The protocol consisted of one minute on a treadmill running

at 110% of maximum test speed and thirty seconds at 40% of a total 60 minutes (90 days training). As a result it was found that acute exercise proved to be a way to increase gene expression of IGF-I, since the training had led to a reduction in this expression. The increase in IGFBP-I occurred only in trained rats, which also had a higher gene expression of IGF-Ir in the gastrocnemius muscle, when not supplemented. The animals that did no exercise had higher serum GH levels than those exercised. The corticosterone showed higher concentrations in sedentary than in trained rats with or without acute exercise. We conclude that acute exercise in rats may, in some hormones, produce different results from those expected, since the prolonged training tends to reverse these concentrations.

Keywords: exercise, GH, IGF-I, IGFBP-I, glucose.

1. INTRODUÇÃO

O exercício físico e as intervenções dietéticas produzem conhecidas alterações hormonais (Hew-Butler *et al.*, 2008; Riddell, 2008). O hormônio do crescimento (GH) é produzido pela glândula hipófise anterior de maneira pulsátil e sofre regulação por três peptídeos: GHRH (estimula), somatostatina (inibe) e grelina (age sinergisticamente com GHRH). Sua síntese e secreção são também reguladas por alguns fatores como: exercício físico, glicemia, neurotransmissores, esteróides gonadais e estresse (Clayton *et al.*, 2010). A ligação do GH ao seu receptor estimula a síntese e secreção de IGF-I.

O IGF-I é um polipeptídeo de 7,5 kDa estruturalmente relacionado à pro-insulina (Roberts *et al.*, 2010). O IGF-I possui um importante papel na regulação do crescimento somático, no metabolismo, na proliferação celular, na diferenciação e na prevenção da apoptose. É produzido localmente em numerosos tecidos, entretanto o fígado é o local de maior síntese e secreção. A produção do IGF-I, além de estar sob controle do GH, é concomitante a algumas alterações na expressão dos receptores de GH nos tecidos alvo (LeRoith, 2008). A transcrição do gene do IGF-I possui variabilidade considerável. Fatores nutricionais são importantes reguladores da síntese de IGF-I (Cannata *et al.*, 2010).

A maioria das ações do IGF-I é mediada por sua ligação a um único receptor de alta afinidade, chamado receptor tipo I ou IGF-Ir. Além disso, o IGF-I nos tecidos e no soro está ligado a proteínas de ligação específicas que modulam suas ações. A IGFBP-I é uma proteína de baixo peso molecular

(aproximadamente 30 kDa) produzida pelo fígado. É uma moduladora local capaz de mostrar flutuação rápida e marcada no plasma, respondendo a mudanças nas concentrações de insulina e de glicose. Tem sido proposta a sua ação na glicorregulação através do controle da bioatividade dos IGFs livres na circulação (Frystyk, 2000; Nedic *et al.*, 2010).

Os efeitos díspares do exercício físico no IGF-I circulante podem ser atribuídos a diversas variações na ingestão alimentar e níveis de aptidão física. Além de responder às alterações do lactato sérico e do glicogênio tecidual (Lavoie *et al.*, 2002). Atualmente sugere-se que mais que responder ao balanço energético total, o sistema IGF-I é responsivo ao fluxo energético do sistema metabólico, definido como o nível absoluto de ingestão energética e gasto sob condições de balanço energético (Zhu *et al.*, 2005; Haspolat *et al.*, 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As alterações fisiológicas provenientes do exercício físico e do treinamento físico

O exercício físico caracteriza-se por uma situação que retira o organismo de sua homeostase, pois implica no aumento instantâneo da demanda energética da musculatura exercitada. Assim, para suprir a nova demanda metabólica, várias adaptações fisiológicas são necessárias, principalmente no músculo esquelético, em função do tipo de exercício físico realizado. Entre elas estão o aumento no conteúdo muscular de GLUT4 (Holloszy, 2005; Helge *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2006) e a concentração e atividade de enzimas como a hexoquinase (Fueger *et al.*, 2003; Fueger *et al.*, 2005). Também se modifica a atividade dos receptores hormonais como o de insulina (Howlett *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2008; Hoene *et al.*, 2009), glucagon (Charbonneau *et al.*, 2005; Charbonneau *et al.*, 2007), adrenalina (Webster *et al.*, 1986; Ji *et al.*, 2008) e GH (Salvatori *et al.*, 2002).

A atividade contrátil de longa duração, tanto aguda quanto crônica, resulta em um aumentado fluxo das duas rotas metabólicas que regeneram a maioria do ATP usado pela célula muscular: fosforilação oxidativa e glicólise. O controle do fluxo nestas rotas é determinado pelas enzimas individuais e sua regulação intrínseca na respectiva rota (Kostic *et al.*, 2009). As possíveis enzimas afetadas pelas rotas específicas são ditadas pelas características do exercício físico a ser executado. As mudanças específicas dependem do tipo de metabolismo, da taxa metabólica e do substrato utilizado (Talanian *et al.*,

2007; Watt, 2009). Todas as alterações são mais acentuadas quando se faz uso da prática regular. Como exemplo poder-se-ia citar um aumento na atividade máxima de uma gama de enzimas mitocondriais que participam do ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons em resposta a um exercício físico submáximo (Watt, 2009). Assim, também se podem esperar grandes aumentos da atividade enzimática da rota glicolítica em resposta ao treinamento envolvendo exercício físico de intensidade elevada (Arkininstall *et al.*, 2004).

O exercício físico e o treinamento também aprimoram a capacidade de captação de glicose pela musculatura esquelética, propiciando também a captação de glicose induzida pela contração muscular, conforme mostra a figura 1, através de mecanismos semelhantes àqueles da ativação dos receptores insulínicos (Skov-Jensen *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Merry & McConell, 2009).

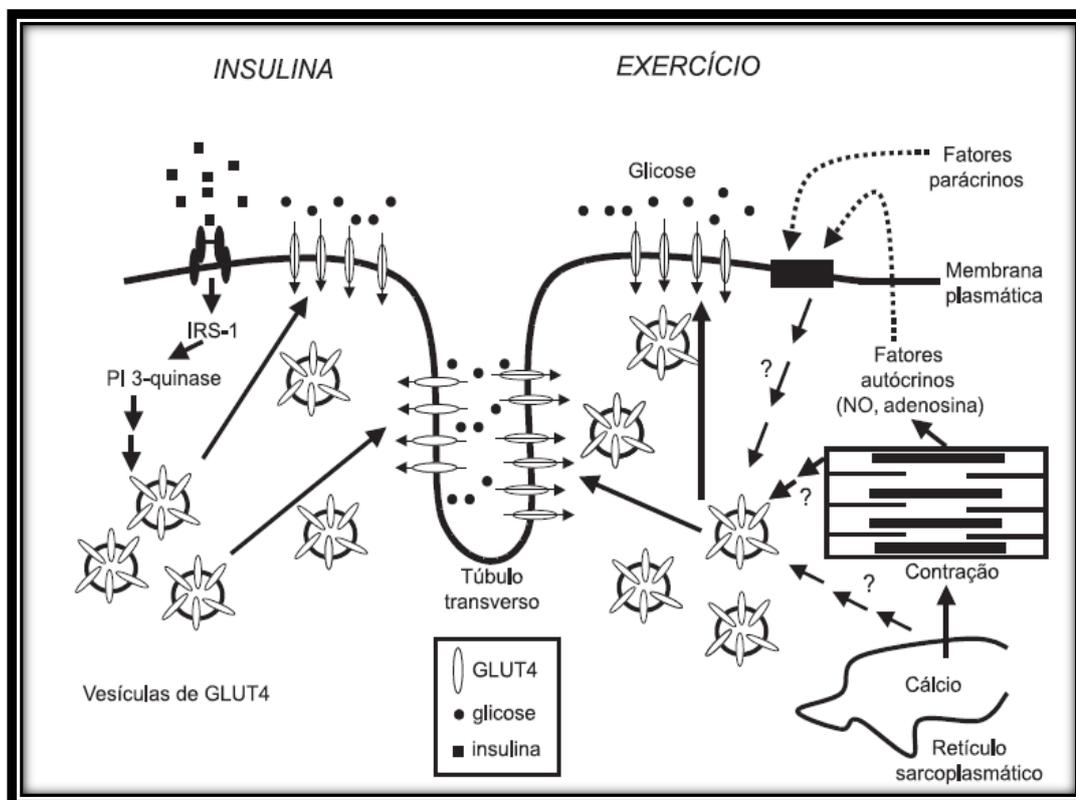


Figura 1. Mecanismos de captação da glicose pela célula muscular no exercício físico e no repouso.

Fonte: Adaptado de www.scienceinschool.org.

2.1.1. O exercício físico intermitente

O exercício físico intermitente, conforme já citado, é aquele que intercala períodos de esforço intenso com períodos de recuperação parciais ativos ou passivos, ou seja, alterna rapidamente a rota metabólica para fornecimento de energia (McCartney *et al.*, 1986; Gaitanos *et al.*, 1993; Mohr *et al.*, 2006). Este tipo de exercício pode causar significativas reduções na

adiposidade, inclusive maiores do que se comparado ao exercício físico em *steady-state*. Os fatores responsáveis são o gasto calórico total, que é maior neste tipo de protocolo e o gasto energético maior pós-exercício físico (Trapp *et al.*, 2007; Trapp *et al.*, 2008; Krstrup *et al.*, 2010).

É plausível se pensar que o exercício físico intermitente cria uma “lançadeira de substratos” devido ao repetido intercâmbio das fontes energéticas aeróbia e anaeróbias, sendo que picos anaeróbios de alta intensidade do exercício físico intermitente trazem consigo um grande déficit de oxigênio (Glaister, 2005) e sua recuperação se baseia nas fontes aeróbias (Tanisho & Hirakawa, 2009). Os AGL contribuem para esta recuperação. Além destes, parte da energia é derivada da oxidação de glicose e parte da oxidação do lactato produzido no metabolismo anaeróbio glicolítico (Lancha *et al.*, 1994).

O glicogênio não parece ser ressintetizado durante os períodos de repouso no exercício físico intermitente, pois se observa uma diminuição constante deste durante as sessões (Trapp *et al.*, 2007). Mas isto também merece um pouco mais de atenção nas análises experimentais, pela discordância nos protocolos e nos resultados dos diferentes artigos (Turner *et al.*, 2006; Utter *et al.*, 2007).

Há também relatos de que a glicólise ficaria prejudicada neste tipo de exercício físico devido a uma acumulação de citrato no citosol que inibe a atividade da PFK. Este fator permitiria repetidas sessões de exercício físico de alta intensidade e reduziria a quantidade de lactato acumulado. Este reduzido

acúmulo, acompanhado pelo metabolismo aeróbio, poderia permitir um maior uso de ácidos graxos como substrato energético (Trapp *et al.*, 2007).

A grande vantagem do exercício físico intermitente parece ser o alcance de diversos parâmetros metabólicos relacionados ao trabalho físico de alta intensidade com a possibilidade de manutenção de sua execução por um tempo compatível com um trabalho de média a baixa intensidade. Nestas vantagens se incluem parâmetros hormonais e de aptidão física, visto já existir diversos experimentos demonstrando elevações nas catecolaminas, hormônio do crescimento e padrões enzimáticos musculares similares em diversos picos de exercício físico, quando comparados a um exercício físico contínuo (Talanian *et al.*, 2007; Trapp *et al.*, 2008; Wallman *et al.*, 2009).

Indivíduos treinados de forma intermitente diferem dos sedentários por uma tendência a apresentarem picos de glicérol de forma precoce e concentrações de lactato mais altas tanto em intervalos longos quanto em intervalos curtos de exercício físico, quando mantidas as intensidades proporcionais (Denadai *et al.*, 2004). Um aumento na concentração de glicérol sugere aumento na combustão de AGL como substrato energético apesar do aumento na concentração de lactato (Trapp *et al.*, 2007).

2.2. O lactato

Até os anos noventa, a hipótese de que o músculo esquelético produzia ácido láctico durante o exercício físico de alta intensidade era amplamente

aceita, haveria então uma dissociação deste em lactato e próton H^+ . Isto seria responsabilizado pela acidose muscular, fadiga e redução do desempenho (Cotes, 1955; Donald *et al.*, 1961; Lorentzen, 1962). Atualmente, se sabe que a glicólise anaeróbia não produz ácido láctico e sim lactato, devido à formação do 3-fosfoglicerato pela enzima PGK (catalizadora) (Robergs *et al.*, 2004).

Em pH fisiológico, nunca há formação de ácidos ou liberação de prótons pelo grupo carboxila do 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato ou lactato, pois os intermediários da glicólise possuem valores de pKa variando entre 3.42 e 3.87. Assim, os prótons produzidos pela glicólise anaeróbia são derivados da hidrólise do ATP (Liu, 2003; Robergs *et al.*, 2004).

O mesmo lactato, que por muito tempo foi visto como um vilão é a fonte mais provável para a síntese de glicogênio no repouso (Van Hall, 2000; Chatham, 2002) e, ainda que tenha sua produção como metabólito de rotas energéticas, o mesmo é um substrato de grande valor oxidativo. Através da conversão de sua molécula de três carbonos em piruvato, se pode utilizá-lo diretamente nas fibras tipo I (Stallknecht *et al.*, 1998) e coração (Goodwin & Taegtmeyer, 2000). No fígado, via Ciclo de Cori, novas moléculas de glicose prontamente oxidáveis são formadas (gliconeogênese) tendo o lactato como substrato (Brooks, 1991; Coggan *et al.*, 1995; Lehninger A. L.; Nelson, 2000).

A produção do lactato no exercício físico é proporcional à intensidade (Juel *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2005) e ocorre sempre que a rota anaeróbia glicolítica estiver predominante. Em uma dada intensidade a produção de

lactato ultrapassa a capacidade de oxidação do mesmo e suas concentrações se elevam por acumulação (Robergs *et al.*, 2004).

Durante alguns tipos de exercício físico, a velocidade de oxidação do lactato pode representar quase um terço da oxidação total de carboidratos, excedendo o *turnover* da glicose (Brooks, 1991). O metabolismo aumentado deste substrato acaba por gerar efeitos no metabolismo da glicose em exercício físico (De Feo *et al.*, 2003).

2.2. A glicose como ativador metabólico

Estreitas relações são observadas entre as concentrações de glicose e glicogênio e uma variedade de respostas metabólicas ao exercício físico (Lavoie *et al.*, 1989; Lavoie *et al.*, 2002; Knechtle, 2004; Sriwijitkamol *et al.*, 2006).

A glicose é um conhecido ativador metabólico na oxidação dos ácidos graxos (Curi *et al.*, 2003), como demonstrado na figura 2, e sua presença em concentrações normais é bastante importante. Em altas cargas de trabalho o metabolismo energético prioriza os carboidratos (Jeukendrup, 2004; Manetta *et al.*, 2005) e, com a diminuição de intensidade do exercício físico para baixa ou moderada, o organismo passa a utilizar predominantemente lipídeos como substrato energético (Achten & Jeukendrup, 2004; Brandou *et al.*, 2005; Slentz *et al.*, 2005). No exercício físico intermitente, diferentes substratos são

utilizados como fonte de energia (Backhouse *et al.*, 2007; Utter *et al.*, 2007; Giesel *et al.*, 2009).

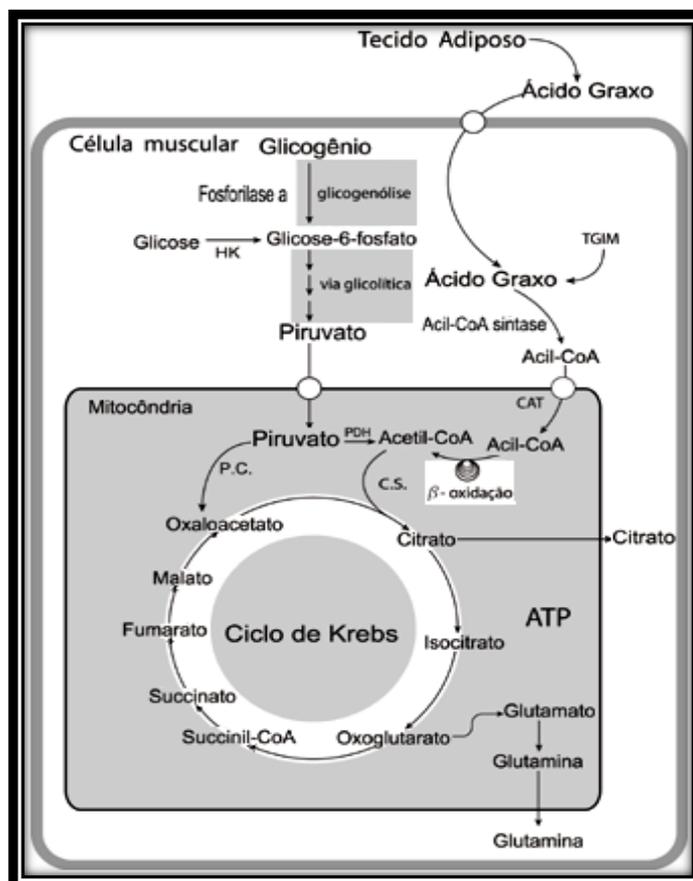


Figura 2. Glicose: ativador metabólico do metabolismo dos carboidratos

Fonte: Arq. Bras. Endocrinol. Metab. vol. 47 n°.2 São Paulo (Curi *et al.*, 2003)

Os AGL oriundos do triacilglicerol (lipólise) são transportados através da corrente sanguínea para os tecidos periféricos associados à proteína albumina. Nestes tecidos, os ácidos graxos penetram no citoplasma por difusão e ocorre transporte destes até o interior das mitocôndrias via carnitina acil-transferase (CAT). Nesta etapa, estas longas cadeias carbônicas sofrem

beta oxidação para fornecimento de acetil-CoA para o ciclo de Krebs (Lehninger A. L.; Nelson, 2000). Assim, começa a haver uma grande produção de moléculas de ATP que, nesta via metabólica e, por inibição alostérica, causam uma inativação do complexo enzimático piruvato desidrogenase. A formação de acetil-CoA passa a ser então proveniente dos AGLs. Ocorre a seguir, uma consequente ativação da piruvato carboxilase, enzima que converte piruvato proveniente da glicólise em oxaloacetato. Este último metabólito condensa-se ao acetil-CoA e forma citrato, pela ação da citrato sintase, facilitando a oxidação da acetil-CoA no ciclo de Krebs (Curi *et al.*, 2003).

As principais limitações para maior utilização de AGL no exercício físico de intensidade moderada e de longa duração são, então, a disponibilidade de glicogênio e/ou glicose para o fornecimento de intermediários do ciclo de Krebs (Gibala *et al.*, 2000) e a mobilização de AGL do tecido adiposo e do músculo esquelético (Brouns & van der Vusse, 1998).

2.3. A regulação hormonal no exercício físico

O exercício físico promove alterações responsivas no sistema endócrino (Kraemer & Ratamess, 2005). Na prática, a maioria destas alterações se dá em função da individualidade dos limiares de intensidade, da duração do exercício físico, do nível de adaptação do organismo ao exercício físico e da capacidade funcional do sistema endócrino (Virus & Smirnova, 1995; Bauman *et*

al., 1999). Ainda, a motivação individual, as condições ambientais e a dieta também têm função importante nesta regulação (Piziak, 1991; Kharitonova *et al.*, 2000; Mormede *et al.*, 2002). Hormônios como o GH, IGF-I, insulina, glucagon, catecolaminas e cortisol participam diretamente destas alterações. As alterações hormonais relacionadas ao exercício físico visam poupar ao máximo os substratos e obter destes o máximo de energia (Kristiansen *et al.*, 2000).

2.3.1. O hormônio do crescimento

Uma vez liberado pela glândula hipófise anterior, o GH se liga com alta afinidade ao seu receptor que é encontrado em alguns tecidos. O hormônio do crescimento é transportado no plasma por uma proteína de ligação que é homóloga ao domínio extracelular clivado do receptor de GH. A molécula deste hormônio exibe dois sítios de ligação para o receptor, resultando na dimerização do mesmo, um passo que é necessário para a atividade biológica do hormônio. A ativação deste receptor estimula e regula o crescimento pós-natal nos vertebrados (Amit *et al.*, 2000). Sua síntese e secreção são também reguladas por alguns fatores como exercício físico, glicemia, neurotransmissores e esteróides gonadais (Clayton *et al.*, 2010).

O exercício físico agudo é um potente estimulante da liberação do GH, variando conforme a intensidade e duração do exercício físico, aptidão física e gênero do praticante. Exercícios físicos contínuos e intermitentes são

igualmente efetivos em aumentar os perfis secretórios de GH por 24h (Weltman *et al.*, 2008).

A ligação do GH ao seu receptor hepático estimula a expressão e liberação do IGF-I na circulação, sendo influenciada por diversos outros fatores (figura 3).

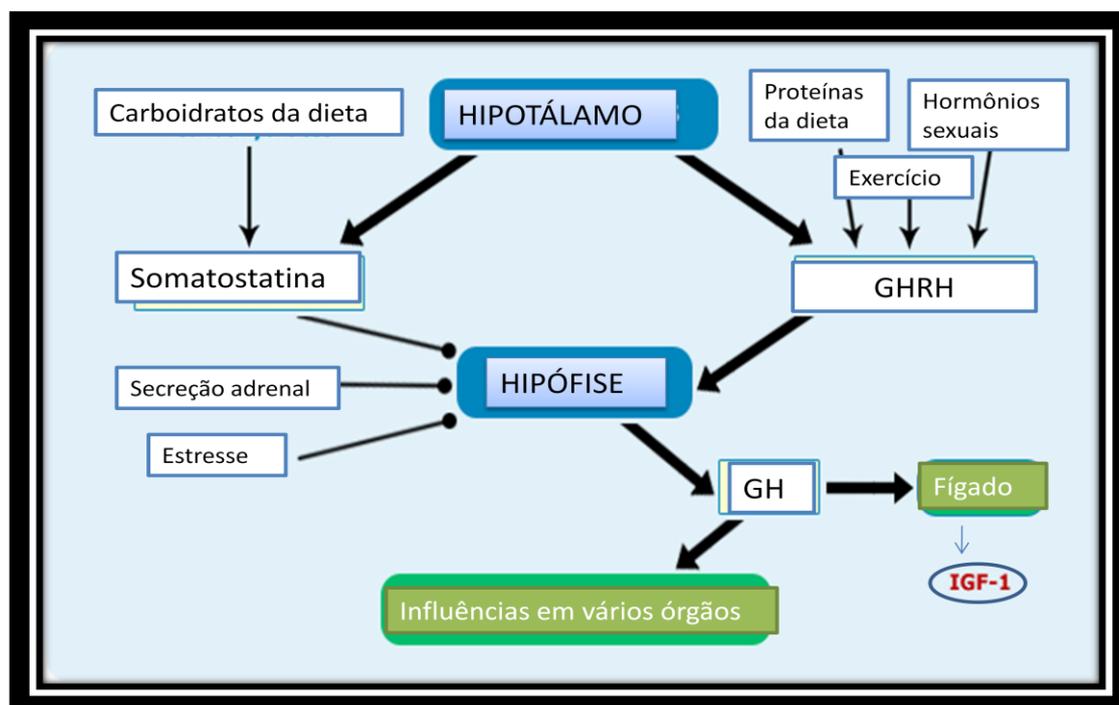


Figura 3. Análise esquemática do eixo hipotálamo/hipófise/GH/IGF-I e suas variáveis.

Fonte: Adaptado de www.models.cellml.org

2.3.2. O IGF-I

O IGF-I, além das características já citadas, é um hormônio importante para o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central, tecidos esqueléticos e órgão reprodutivos (Cannata *et al.*, 2010). Também chamado somatomedina C, é um importante mediador dos efeitos do GH (Figura 4).

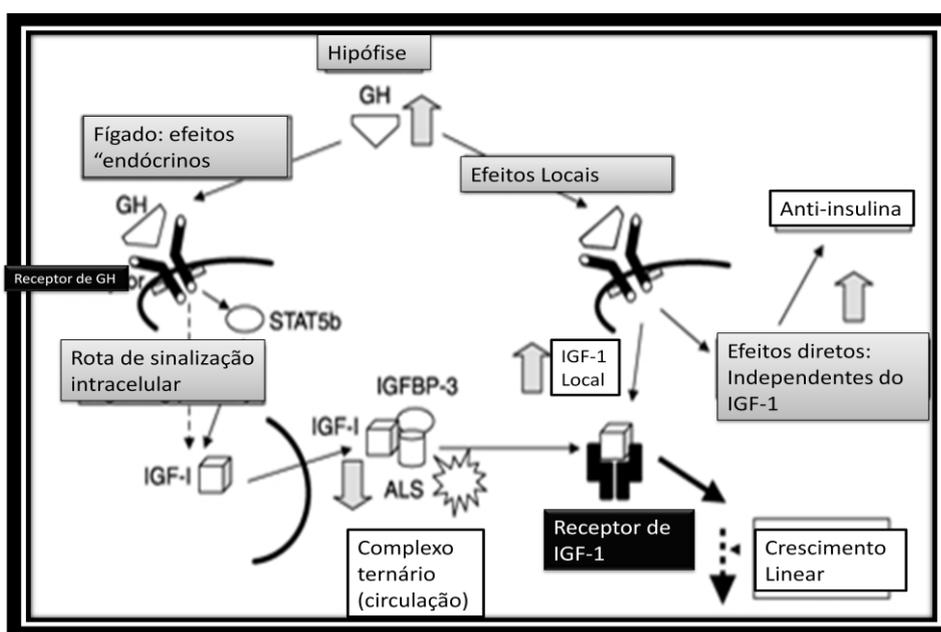


Figura 4. Efeitos diretos e indiretos (mediados pelo IGF-I) do GH

Fonte: Savage M.O. et al. 2007 Idiopathic short stature: will genetics influence the choice between GH and IGF1 therapy? *Society of European Journal of Endocrinology* (2007).

O IGF-I maduro consiste em domínios A, B, C e D. Os domínios A e B são homólogos aos da insulina, no entanto, o domínio C não é clivado neste, ao contrário da insulina. O IGF-I também contém um domínio D adicional, que não está presente na insulina (LeRoith & Roberts, 2003). O maior local de

síntese de IGF-I é o fígado, mas este é produzido também, localmente, por quase todos os tecidos e, por sua ampla gama de efeitos biológicos e seu potencial terapêutico, tem se tornado foco de inúmeras pesquisas (Cannata *et al.*, 2010).

A produção do IGF-I está sob controle do GH que, em conjunto com a insulina, são reguladores positivos da produção de IGF-I. A indução da síntese de IGF-I pelo GH está associada a um aumento do RNAm e à transcrição do gene do IGF-I. Esta síntese possui considerável variabilidade de animal para animal e entre os ratos machos e alguns fatores nutricionais são importantes reguladores de sua síntese (Yakar *et al.*, 2001).

A maioria das ações do IGF-I é mediada por sua ligação ao IGF-Ir, um receptor tirosina-quinase com conhecida homologia ao receptor de insulina (Schmitz *et al.*, 2002). Nos tecidos e no soro, o IGF-I está ligado a proteínas de ligação específicas que modulam suas ações. Menos de 1% do IGF-I circulam na sua forma livre ou em estado rapidamente dissociável, seus efeitos são modulados por múltiplas IGFBPs. O IGF-I tem seis proteínas ligantes (IGFBPs de 1 a 6) que funcionam ligando mais de 95% do IGF-I circulante. As IGFBPs são uma família de proteínas homólogas, que modificam a biodisponibilidade e a bioatividade do IGF-I (Hopkins *et al.*, 1994).

A administração, *in vivo*, de IGF-I baixa os níveis de glicemia. Estudos, *in vitro*, mostraram que o IGF-I pode diretamente estimular o transporte de glicose para o tecido muscular esquelético. Em ratos normais, a infusão de IGF-I provoca hipoglicemia, principalmente por estimulação da captação de glicose nos tecidos periféricos (Lavoie *et al.*, 2002). Além disso, o peso de

ratos *knockout* para IGF-I ao nascer é mais ou menos 60% inferior ao dos ratos selvagens (Baker *et al.*, 1993). Um aumento na expressão do IGF-I em ratos aumenta o peso corporal em 30% (Mathews *et al.*, 1988). A administração do peptídeo IGF-I em ratos aumenta a síntese protéica e o crescimento corporal (Tomas *et al.*, 1992).

Em uma futura extrapolação dos resultados de pesquisas em animais para humanos poder-se-iam citar diversas alterações fisiológicas causadas pela alteração do eixo GH/IGF-I. São encontrados níveis anormalmente altos destes hormônios em várias células tumorais (LeRoith & Roberts, 2003). A deleção parcial do gene associado ao IGF-I está relacionada a retardo mental e sensorial (Woods *et al.*, 1996). Em ratos *knockout* para IGF-I há uma diminuição significativa no número de neurônios auditivos e um aumento na apoptose de neurônios da cóclea (Camarero *et al.*, 2001). O *knockout* do IGF-I causa infertilidade (Baker *et al.*, 1996) e subdesenvolvimento do tecido muscular (Philippou *et al.*, 2007). Ratos transgênicos com expressão aumentada do gene para IGF-I no Sistema Nervoso Central (SNC) tem um aumento no crescimento cerebral, neurogênese, sinaptogênese e redução na apoptose neuronal (D'Ercole *et al.*, 2002). A expressão aumentada do IGF-I nos osteoblastos de ratos leva a uma melhoria na estrutura óssea, incluindo densidade e mineralização (Zhao *et al.*, 2000).

No metabolismo da glicose vê-se que uma redução nos níveis de IGF-I está associada com o diabetes tipo I e o tratamento com IGF-I melhora o metabolismo de proteínas e glicose, além de atenuar a cardiomiopatia diabética (Carroll *et al.*, 2000; Norby *et al.*, 2002). A expressão aumentada do

IGF-I nas células beta pancreáticas melhora este tipo de diabetes (George *et al.*, 2002) e o tratamento com IGF-I aumenta a sensibilidade à insulina e melhora o controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo II (Moses *et al.*, 1996).

Após evidenciar as funções no IGF-I nas variáveis relacionadas à saúde, em humanos, é importante destacar que evidências estão se acumulando a respeito do efeito do exercício físico como regulador dos níveis de IGF-I. Exercício físico e consumo máximo de oxigênio estão correlacionados aos níveis plasmáticos deste hormônio no descanso (Koziris *et al.*, 1999).

No exercício físico, alterações na atividade do IGF-I podem ser mediadas por mudanças agudas em diferentes IGFBPs (Figura 5). Pesquisas laboratoriais e baseadas na população indicam que a insulina pode regular parcialmente a ação do IGF-I através da regulação da síntese de suas proteínas transportadoras (Schmitz *et al.*, 2002).

Algumas discrepâncias observadas entre os resultados dos diversos estudos acerca do IGF-I e de suas proteínas ligantes podem ser explicadas pelos diferentes níveis de treinamento, aptidão física, composição corporal, sexo e idade das pessoas pesquisadas.

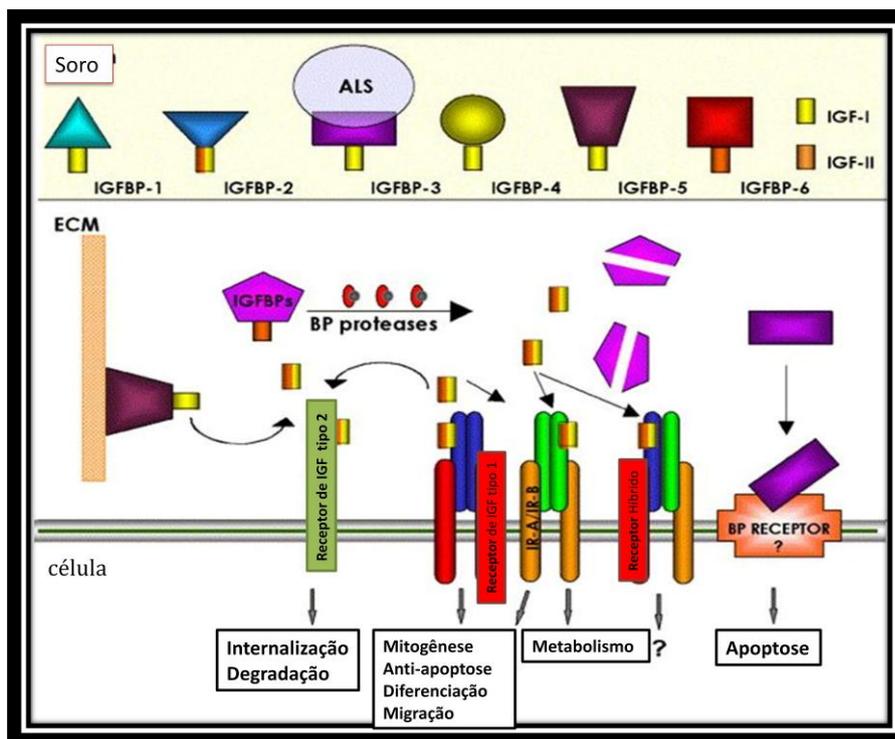


Figura 5. Proteínas transportadoras e receptores da família IGF

Fonte: The International Society for IGF research (<http://www.igf-society.org>)

2.3.3. A IGFBP-I

A IGFBP-I faz parte de uma família de proteínas que possui pelo menos seis membros. A expressão das IGFBPs depende do tecido e do estágio de desenvolvimento, tendo concentrações diferentes em distintos compartimentos corporais. As funções das IGFBPs são reguladas por fosforilação, proteólise, polimerização e associação com a matriz celular. Todas mostram um papel na função do IGF-I. A maioria inibe sua ação, mas as IGFBP-I, 3 e 5 também mostram efeitos estimulatórios. Alguns efeitos das IGFBPs podem ser

independentes dos IGF-I. Enquanto as IGFbps têm afinidade extremamente alta pelo IGF-I, uma variedade de análogos do IGF-I tem reduzida afinidade pelas IGFbps, mas mantém afinidade normal pelo IGF-Ir (Crowe *et al.*, 2009). As IGFbps funcionam regulando a disponibilidade do IGF-I em relação ao seu receptor nos tecidos alvo e proteases específicas são necessárias para clivar a proteína IGF-I do seu complexo protéico ligador (Koziris *et al.*, 1999).

A IGFBP-I é uma proteína de baixo peso molecular (aproximadamente 30 kDa), que é produzida pelo fígado. É uma moduladora local capaz de mostrar flutuação rápida e marcada no plasma, respondendo a mudanças nas concentrações de insulina e de glicose (Frystyk, 2000; Nedic *et al.*, 2010).

A expressão gênica da proteína IGFBP-I altera-se dramaticamente em resposta a mudanças no estado nutricional. A IGFBP-I sérica tem seus níveis aumentados cedo da manhã e à noite devido à ausência de ingestão alimentar. A insulina é um potente regulador negativo da expressão de IGFBP-I. A diminuição dos níveis de insulina plasmática em animais nutricionalmente restritos é provavelmente a maior causa do aumento na síntese de IGFBP-I. Alguns estudos mostram que após 120 min de hiperinsulinemia os níveis de IGFBP-I caem aproximadamente 50% assim tornar-se-ia mais provável que uma única medida de IGFBP-I refletisse os padrões de secreção da insulina melhor do que uma única medida da insulina, isto porque a IGFBP-I tem uma meia vida de 89 min, o que está em contraste com a insulina, cuja meia vida é de apenas alguns minutos. Alguns nutrientes podem também exercer efeito

direto na expressão desta proteína transportadora, como glicídios e alguns aminoácidos (Frystyk, 2000; Nedic *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a sensibilidade à insulina foi aumentada pelo treinamento físico e os níveis de IGFBP-I destes indivíduos também aumentaram. Em contraste, indivíduos cujos níveis de sensibilidade à insulina não aumentaram com o treinamento também não demonstraram alterações na IGFBP-I (Hopkins *et al.*, 1994; Lavoie *et al.*, 2002).

No rato, as concentrações séricas diminuem de acordo com o envelhecimento. Elas são maiores em fetos de ratos, excedendo 4 mg/L, e diminuem para (menos de) 0,1 mg/L em ratos adultos. Os níveis séricos de IGFBP-I de ratos aumentam durante o jejum. A regulação do IGFBP-I aparenta ser feita de uma maneira similar à glicose, através de hormônios como glucagon e cortisol (Lewitt *et al.*, 1994). Na circulação humana, a IGFBP-I é suprimida por glicose oral e intravenosa e aumenta com hipoglicemia (Crowe *et al.*, 2009).

Existem similaridades grandes na regulação do gene do IGFBP-I e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a enzima limitante da gliconeogênese. Ambos os genes são ativados pelo HNF1 α e positivamente regulados pelos glicocorticóides e AMPc. Além disso, ambos os genes são reprimidos pela insulina, e este efeito é dominante sobre o efeito indutivo dos glicocorticóides e AMPc. A regulação coordenada da IGFBP-I e da enzima PEPCK é consistente com a idéia de que a IGFBP-I tem seu papel como contra reguladora da glicemia (Hopkins *et al.*, 1994; Lavoie *et al.*, 2002).

Vários estudos têm encontrado níveis séricos de IGFBP-I aumentados com o exercício físico, provavelmente refletindo uma redução da secreção de insulina e altos níveis de hormônios do estresse. Entretanto, essa visão foi questionada por análises recentes. A ingestão de uma solução contendo um polímero de glicose durante exercício físico para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose e insulina não preveniu o aumento de IGFBP-I em humanos (Crowe *et al.*, 2009). De forma semelhante, a administração oral de uma refeição após duas horas de exercício físico em ratos, elevando assim as concentrações plasmáticas de glicose e insulina, não preveniu que as concentrações de IGFBP-I continuassem aumentadas (Hopkins *et al.*, 1994; Lavoie *et al.*, 2002).

2.3.4. A corticosterona

A corticosterona é um glicocorticóide produzido no córtex da glândula supra-renal que tem como principal fator de liberação o estresse (Karacabey *et al.*, 2005; Mastorakos & Pavlatou, 2005; Mastorakos *et al.*, 2005). A atividade do eixo hipotálamo/hipófise/supra-renal está diretamente ligada às respostas fisiológicas do organismo ao estresse. Sabendo-se que este eixo é formado pelos hormônios ACTH e corticosterona, as concentrações séricas desses hormônios são consideradas importante indicador de estresse (Turner *et al.*; Lavoie *et al.*, 1992).

Por ser o exercício físico uma forma de estresse, a corticosterona age neste estado metabólico inibindo a síntese protéica e liberando aminoácidos

para a utilização como substrato energético. Além disso, este hormônio atua sobre todas as enzimas da gliconeogênese e, ao mesmo tempo, induz a ativação de enzimas de degradação protéica que levam a formação de precursores da gliconeogênese (Girard & Garland, 2002; Rengarajan & Balasubramanian, 2007). Para minimizar esta possível degradação provocada pela corticosterona é necessário que a glicose sanguínea seja mantida dentro de níveis fisiológicos, principalmente durante exercício físico intenso ou prolongado (Marliss & Vranic, 2002), cuja característica principal é o aumento da captação da glicose sanguínea pelas células (Coker & Kjaer, 2005). Lactato, glicerol e alguns aminoácidos são convertidos em glicose pela gliconeogênese, no fígado, no intuito de manter os níveis de glicose sanguínea (Brooks, 1987; Nuutila *et al.*, 1994; Fernandez-Pastor *et al.*, 1999). A manutenção da glicemia normal age como um mecanismo de prevenção da liberação dos hormônios glicocorticóides (Ferrari, 2003; Clow *et al.*, 2004; Crofton & Midgley, 2004; Enyeart, 2005).

A síntese de corticosterona pelo córtex da supra-renal é derivada da molécula de colesterol, em um processo de oxi-redução com participação do ácido ascórbico. Assim, poder-se-ia utilizar a depleção de colesterol e ácido ascórbico na glândula supra-renal como marcadores de estresse (Girard & Garland, 2002; Rengarajan & Balasubramanian, 2007).

Quando se investigam as possíveis influências mediadas pela corticosterona no eixo GH/IGF-I poucos estudos são encontrados (Canton *et*

al., 2006; El Elj *et al.*, 2010). Estes são ainda menos comuns quando se analisam os efeitos do exercício físico e/ou treinamento.

2.3.5. O receptor de IGF-I

O IR e o IGF-Ir são membros da mesma subfamília dos receptores tirosina quinase. Os dois receptores fosforilam muitos dos mesmos substratos e ativam os mesmos módulos de sinalização, incluindo as rotas de sinalização da MAPK e PI3K. Estes receptores são homólogos na estrutura primária, mas diferem em seus efeitos fisiológicos, o que pode ser explicado em parte pela especificidade dos sinais intracelulares gerados, usando substratos preferenciais/específicos ou adaptadores moleculares/rotas de sinalização (Foti *et al.*, 2004).

O receptor de IGF-I humano é o produto de um gene localizado no cromossomo 15. O receptor maduro é um tetrâmero que consiste de duas cadeias alfa extracelulares e duas cadeias beta intracelulares. As cadeias beta incluem um domínio tirosina quinase que é visto como essencial para a maioria dos efeitos biológicos do receptor.

No que diz respeito ao domínio extracelular, apesar da similaridade estrutural entre IGF-I e insulina os respectivos receptores têm de cem a mil vezes mais afinidade por seus ligantes cognatos (a subunidade alfa parece conferir esta especificidade) (Foti *et al.*, 2004). No domínio citoplasmático, diferenças estruturais contribuem para a divergência nas duas rotas de sinalização. Um alto grau de homologia é visto no domínio tirosina quinase

(mais ou menos 84%), enquanto a região de maior divergência é o domínio justa membrana (mais ou menos 61%) e o domínio carboxiterminal (mais ou menos 56%) (Yakar *et al.*, 2005).

A saciedade alimentar causa um aumento no número de receptores de IGF-I em diversos tecidos. Parte deste aumento pode ser uma consequência de uma diminuição dos IGF-I ligantes, levando a uma melhor internalização do receptor. Sugere-se também que, nestas condições, haja um aumento na biossíntese do receptor (Yakar *et al.*, 2005).

2.4. A suplementação de carboidratos

Está bem estabelecido que a ingestão de carboidratos durante o exercício físico retarda todo o processo de fadiga e pode melhorar o desempenho em diversos tipos de exercício físico. Este desempenho ergogênico é, em grande parte, devido à biodisponibilidade de glicose sanguínea para fornecimento de substrato energético aos músculos em atividade (De Bock *et al.*, 2008). Por mais de vinte anos, controvérsias consideráveis existiram sobre a contribuição na economia do glicogênio e os benefícios da ingestão de carboidratos.

O aperfeiçoamento no metabolismo oxidativo parece estar associado aos estoques de glicogênio, dado que a depleção destes é fator limitante em exercícios físico de alta intensidade (Costill, 1991; Knechtle, 2004). Questões a respeito do tipo, tempo e quantidade de carboidratos necessários para

aumentar a síntese de glicogênio e a melhoria no efeito da ingestão de outros macro nutrientes permanecem incertas e não bastante claras (Koopman *et al.*, 2007; Beelen *et al.*, 2008; Howarth *et al.*, 2009).

Mas os dados a respeito da economia do glicogênio durante o exercício físico são de certa forma, escassos. Na prática, é muito comum o uso de reposição de carboidratos em exercício físicos de curta duração e até uma associação desta com melhorias no desempenho (De Bock *et al.*, 2007).

Além disso, o glicogênio parece ser uma molécula sinalizadora que pode regular a transcrição gênica. A diminuição na lise do glicogênio pode, por isso, ter uma substancial influência na capacidade e metabolismo musculares. Esta diminuição pode ser favorecida pela ingestão apropriada de carboidratos durante o exercício físico. Assim, mantendo a euglicemia, a glicose proveniente da corrente sanguínea é apenas uma fonte extra de substrato, que por sua vez diminui a lise do glicogênio (Zderic *et al.*, 2004; Zehnder *et al.*, 2005).

O padrão de degradação do glicogênio muscular durante as contrações depende do balanço entre a atividade da glicogênio sintase e da glicogênio fosforilase. Está bem estabelecido que a intensidade da contração, a concentração de glicogênio existente na célula muscular e os níveis circulantes de insulina têm papel crucial neste balanço (De Bock *et al.*, 2007).

Além disso, as enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase são expressas de formas diferentes em cada tipo de fibra, as fibras tipo I exibem menos glicogênio fosforilase e tem maior atividade da glicogênio sintase quando comparadas com as fibras tipo II. Por isso, é razoável assumir que os

efeitos da ingestão de carboidratos na taxa de degradação do glicogênio durante o exercício físico podem diferir entre os tipos de fibras (Yamamura & Negami, 1984). Exercícios físicos em jejum comparados com um exercício físico idêntico, mas em conjunto com a suplementação de carboidrato antes e durante, estimulam a lise de lipídeos intramiocelulares nas fibras tipo I, mas não nas fibras tipo II (Gibala, 2009).

A ingestão de carboidrato pré-competição (30 – 60 minutos antes) é um guia nutricional padrão para atletas (3–5 g CHO/kg de peso corporal). A baixa concentração de insulina é conhecidamente um supressor da captação de glicose muscular durante o exercício físico (De Bock *et al.*, 2007). Apesar dos altos níveis de insulina circulante, elevada concentração de glicose sanguínea e baixos níveis de ácidos graxos livres podem também facilitar a captação da glicose e ativar a enzima glicogênio sintase.

Uma velocidade alta de oxidação de carboidratos acontece quando sua ingestão se dá imediatamente antes ou durante exercício físico prolongado. A glicose e o glicogênio são necessários para a atividade muscular e, quando presentes em grandes quantidades, evitam a utilização de outros substratos provenientes da gliconeogênese no fígado (Brooks, 1987).

Os carboidratos, por exemplo a glicose, como já descritos, têm papel nos exercícios físicos de resistência e força (Hakkinen *et al.*, 1988; Maughan *et al.*, 1989; Maughan *et al.*, 1996; Welsh *et al.*, 2002; Von Duvillard *et al.*, 2004). As fontes exógenas reduzem a glicogenólise hepática e aumentam a glicemia. Isto faz com que se diminua o catabolismo das proteínas, se retarde a fadiga e

se melhore o desempenho (Wasserman & Cherrington, 1991; Fournier *et al.*, 2002; Kimber *et al.*, 2003; Hargreaves, 2004).

A ingestão de fluidos carbo-eletrolíticos durante o exercício físico de longa duração pode prevenir a desidratação e atenuar os efeitos sobre a função cardiovascular e no desempenho, além de retardar o aparecimento da fadiga (Maughan *et al.*, 1989; Maughan *et al.*, 1996; 2000; ADA, 2000; Welsh *et al.*, 2002; Von Duvillard *et al.*, 2004).

A melhor utilização da glicose contida nos líquidos depende da entrada dos nutrientes no intestino delgado, fatores que determinam o aparecimento da glicose na circulação porta potencialmente incluem a quebra dos carboidratos complexos em glicose, absorção da glicose pela mucosa intestinal, padrões motores do intestino delgado e fluxo sanguíneo esplâncnico (Duchman *et al.*, 1997). Para tal, os polissacarídeos são degradados em oligossacarídeos e monossacarídeos pelas enzimas da borda em escova e borda luminal. Nos enterócitos, a absorção se dá predominantemente no intestino delgado proximal via co-transportador glicose-sódio (SGLT1) na membrana luminal e via GLUT2 na membrana basolateral (Pencek *et al.*, 2002; Shepherd *et al.*, 2004). Uma regulação para cima na membrana luminal (*up-regulation*) através do aumento no transporte de glicose ocorre em resposta a modificações na dieta.

Os 10% restantes da absorção se dão de forma paracelular com difusão através da parede intestinal (Pappenheimer, 1990). Um aumento no número ou atividade dos carreadores na membrana basolateral parece ser responsável

pela aumentada captação observada durante a hiperglicemia. O aparecimento da glicose na circulação sistêmica também parece ser influenciado pelo fluxo sanguíneo mesentérico superior, influenciado pela composição da refeição (Gulliford *et al.*, 1989).

Outro fator que influencia na absorção é o estímulo adrenérgico do intestino delgado, que resulta em aumento na absorção intestinal de glicose. Alguns hormônios bastante estudados mostram relação com a absorção intestinal de glicose como o IGF-1, IGF-2, EGF por terem seus receptores já descritos nos enterócitos (Goodlad *et al.*, 1993). A gastrina, enteroglucagon, PYY também participam desta regulação (Young *et al.*, 1996).

A suplementação com líquidos carbo-eletrolíticos requer alguns cuidados. A ingestão deve ser feita com o fluido em baixas temperaturas (gelado, $\pm 8^{\circ}$) e em concentrações pequenas (6 a 10%) e condizentes com o maior esvaziamento gástrico (Maughan & Leiper, 1994). Para tal deve-se levar em conta o índice glicêmico, o qual diz respeito à velocidade com que a glicose alcança a corrente sanguínea após sua ingestão (Burke, 1997). É importante considerar que quanto maior o índice glicêmico, menores as concentrações aceitáveis para permitir uma melhor absorção. Também o volume do líquido ingerido não deve ser muito grande, por exemplo, 200-300mL em humanos, pelo risco de retardar o esvaziamento gástrico (Jeukendrup & Jentjens, 2000; Jeukendrup, 2004; Leiper *et al.*, 2005). Fontes solúveis de carboidratos ingeridas na forma líquida estarão mais depressa

disponíveis na circulação (Maughan et al., 1989; Maughan et al., 1996; Welsh et al., 2002; Von Duvillard et al., 2004).

Fontes de carboidratos processadas ou pré-digeridas são mais eficazes e, preferencialmente, devem conter baixas quantidades de fibras dietéticas. Isto inclui os monossacarídeos, como a glicose e a frutose; dissacarídeos como sacarose e maltose; e alguns polímeros como maltodextrinas e extrato de malte. São carboidratos prontamente dissolvíveis em líquido e igualmente efetivos em aumentar os níveis de glicose sanguínea, embora com diferentes índices glicêmicos. A frutose, utilizada para adoçar a maioria dos alimentos processados, por um lado é capaz de manter a glicemia e não influenciar a secreção da insulina, resultando numa inibição mais fraca da mobilização dos ácidos graxos livres que a glicose. No entanto, a frutose é mais lentamente absorvida e pode causar distúrbios gastrointestinais quando ingerida em quantidade superior a 10g/L (Shephard & Leatt, 1987; Mitchell *et al.*, 1989; Moyer & Rodin, 1993; Jeukendrup & Jentjens, 2000).

De forma alternativa, a diminuição na quebra do glicogênio durante o exercício físico pode estimular a utilização de glicose. Mas apenas estudos futuros poderão validar cada um destes mecanismos (De Bock *et al.*, 2008).

Todas as constatações descritas indicam que fatores dietéticos agudos podem ser mais dominantes do que os efeitos do treinamento em curto prazo em modular as mudanças na transcrição gênica induzida pelo exercício físico. Na maioria dos indivíduos fisicamente ativos o treinamento serve para aumentar a saúde e a aptidão física. No entanto, em atletas o desempenho é o

foco absoluto do treinamento. Em cada caso é importante buscar estratégias ótimas para alcançar as metas específicas (De Bock *et al.*, 2008).

2.5. As alterações hormonais promovidas pela suplementação de glicose

No que se refere à glicose é importante ressaltar que sua captação durante o exercício físico difere dos mecanismos já bem descritos do repouso. Na prática, a concentração de insulina plasmática diminui (Hawley, 2004; Sriwijitkamol *et al.*, 2006). Esta diminuição parece estar associada à liberação do hormônio adrenalina pela glândula supra-renal que é uma característica do exercício físico (Watt *et al.*, 2001). O aumento na captação de glicose durante o exercício físico envolve outros fatores que não apenas a interação insulina-receptor (Henriksen *et al.*, 1990; Goodyear *et al.*, 1991; Goodyear *et al.*, 1996; Anthony *et al.*, 2001).

O metabolismo da glicose na prática de exercícios físicos é controlado fundamentalmente pela interação entre glucagon e insulina. Um aumento na relação glucagon/insulina resulta em aumentada liberação de glicose hepática. Um aumento nas catecolaminas e decréscimo na insulina causa aumento na mobilização da gordura e glicogênio muscular. (Kraemer, 1988; McMurray & Hackney, 2005). A ingestão de carboidratos imediatamente antes ou durante o exercício físico modifica o perfil hormonal durante exercício físico, reduzindo a resposta das catecolaminas, glucagon e cortisol (Mastorakos *et al.*, 2005). Há

um aumento na concentração sérica de insulina quando esta ingestão é realizada 30-60 min antes de exercício físico prolongado (Louis-Sylvestre, 1987), enfatizando a importância da administração destes fluidos imediatamente antes ou durante o exercício físico. A ingestão de carboidratos durante o exercício físico suprime o aumento do cortisol e não causa aumento nas concentrações de insulina (Virus, 1992; McMurray & Hackney, 2005).

Os níveis de insulina plasmática têm suas concentrações significativamente diminuídas durante exercício físico (Louis-Sylvestre, 1987). A noradrenalina aumenta, em média, dez vezes durante exercício físico em relação ao nível de repouso, com poucas diferenças significativas entre treinados e sedentários. O mesmo ocorre com a adrenalina, embora o aumento seja de apenas cinco vezes durante exercício físico em relação aos níveis de repouso (Greiwe *et al.*, 1999).

Sob exercício físico intermitente de intensidade menor (Krustrup & Bangsbo, 2001), relatou-se que os níveis de glucagon e insulina de sujeitos suplementados com carboidratos em concentrações de 5%, 6% e 7,5% não apresentaram diferenças significativas em relação àqueles suplementados com placebo durante exercício físico (Haff *et al.*, 2001). A ingestão de carboidratos diminuiu significativamente os níveis de cortisol somente em líquidos glicosilados concentrados a 7,5%, e os níveis de adrenalina e noradrenalina não foram afetados pela suplementação carboidratada (Tsintzas & Williams, 1998). Apesar destas investigações, poucos estudos têm procurado pelos efeitos de diferentes estratégias dietéticas na disponibilidade de glicogênio no treinamento. Alguns autores sugerem também que o

consumo de carboidratos durante exercício físico intermitente poderia mascarar a liberação de glicocorticóides e seu potencial impacto no sistema imunológico (McFarlin *et al.*, 2004).

2.6. A fadiga no exercício físico

Apesar do aprimoramento das rotas metabólicas propiciado por diversas intervenções, a excitação repetida do músculo leva também a uma reduzida produção de força comumente conhecida como fadiga. Esta se dá por múltiplas mudanças iônicas que acontecem no sarcolema (McKenna, 1992), assim como diversas alterações metabólicas que incluem reduzido ATP, reduzida glicose ou conteúdo de glicogênio, elevado H_2PO_4 e elevada produção de H^+ (Tenan *et al.*, 2010) no tecido muscular em contração.

Exercício físicos de longa duração promovem mudanças no volume dos fluidos e alterações iônicas que podem prejudicar o desempenho muscular (Noakes, 1993; Boulay *et al.*, 1995; Hebestreit *et al.*, 1996). As mudanças iônicas que atraem maior interesse envolvem o aumento de potássio extracelular (hipótese da fadiga pelo K^+). O K^+ é medido tradicionalmente no plasma venoso durante o exercício físico e valores em torno de 8 mM são considerados extremos. Em exercício físico observam-se inúmeras trocas iônicas (K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , H^+ , HCO_3^- , Mg^{++} , H_2PO_4^- , PCr e lactato). A água e os íons Na^+ e Cl^- são transportados do plasma para o músculo em exercício físico, enquanto o K^+ e o lactato saem do músculo em contração (Renaud, 2002; Schott *et al.*, 2002; Sostaric *et al.*, 2006). A contribuição das trocas

iônicas para a fadiga muscular durante o exercício físico é complexa, pois envolve despolarização celular, contração muscular e armazenamento de nutrientes. Além disso, mudanças simultâneas na condutividade iônica e nas concentrações iônicas intra e extracelulares, na função da bomba de Na^+K^+ influenciam na excitabilidade e desempenho contrátil. Alterações nos gradientes iônicos exercem efeitos interativos na força muscular e precisam ser considerados em conjunto (Harmer *et al.*, 2000).

A princípio, os metabólitos poderiam exacerbar as trocas iônicas, modulando a condutância dos canais ou influenciando processos sensíveis a íons, tais como a excitabilidade do sarcolema (Harmer *et al.*, 2000). Desta forma fibras musculares metabolicamente exauridas apresentam aumentada condutância ao K^+ ; função mitocondrial inibida, despolarização e excitabilidade da membrana dos túbulos T prejudicada; consumo de energia diminuído (pela inibição da atividade da ATPase miosínica e liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático). Estes efeitos na excitabilidade estão todos relacionados à concentração de ATP e ao metabolismo dos carboidratos alterado principalmente nos microdomínios subsarcolemais (Harmer *et al.*, 2000).

A maioria dos testes desenvolvidos a fim de monitorar o condicionamento físico leva em conta a velocidade na qual os indivíduos a eles submetidos entram em exaustão. O teste máximo para roedores é um deles.

2.7. Particularidades dos experimentos conduzidos em ratos

2.7.1. A organização da musculatura esquelética dos membros posteriores dos ratos

A pata do rato em sua porção posterior possui dois grupos musculares: a porção superficial é composta pelo músculo tríceps sural, formada por gastrocnêmio e sóleo, que se originam de forma independente e terminam em um único tendão, e pelo músculo plantar. A porção mais profunda é composta por flexor longo do halux, flexor longo dos dedos e tibial posterior (Stein & Padykula, 1962; Brooke & Kaiser, 1970; Sher & Cardasis, 1976).

O gastrocnêmico do rato possui duas porções que emergem de pontos diferentes, sendo a porção medial originária do epicôndilo medial do fêmur e da fabela medial e a porção lateral é originária do epicôndilo lateral e da fabela lateral. No terço médio da perna, as duas porções se agregam e originam um tendão comum único que, após unir-se ao tendão do músculo sóleo, passa a denominar-se tendão calcâneo, vindo a inserir-se no tubérculo do calcâneo (Stein & Padykula, 1962; Brooke & Kaiser, 1970; Sher & Cardasis, 1976).

A variação nas proporções entre os vários tipos de fibras é bastante comum para um determinado músculo em animais de uma forma geral. Até mesmo para uma determinada região de um músculo esta característica é notória (Pullen, 1977a, b). Alguns músculos, como gastrocnêmio apresentam um predomínio de fibras tipo II. Todavia na cabeça medial do gastrocnêmio ocorrem três tipos de fibras, distribuídas em um padrão de mosaico, semelhante ao encontrado no músculo humano. No sóleo predominam as

fibras do tipo I e no tibial anterior 2/3 das fibras são do tipo II (Brooke & Kaiser, 1970; Sher & Cardasis, 1976).

Pode-se identificar na cabeça medial do músculo gastrocnêmio de ratos três tipos de fibras, como mostrado na figura 6, e no sóleo dois tipos. O gastrocnêmio apresenta um padrão de distribuição não homogêneo, com predomínio de fibras brancas na porção interna e fibras vermelhas na porção superficial. O sóleo apresenta uma distribuição homogênea dos dois tipos de fibras (Stein & Padykula, 1962). Especificamente no músculo gastrocnêmio do rato, os tipos de fibra encontrados são equivalentes às do músculo gastrocnêmio humano, permitindo a extrapolação dos achados em ratos para o homem (Brooke & Kaiser, 1970; Brooke *et al.*, 1971).

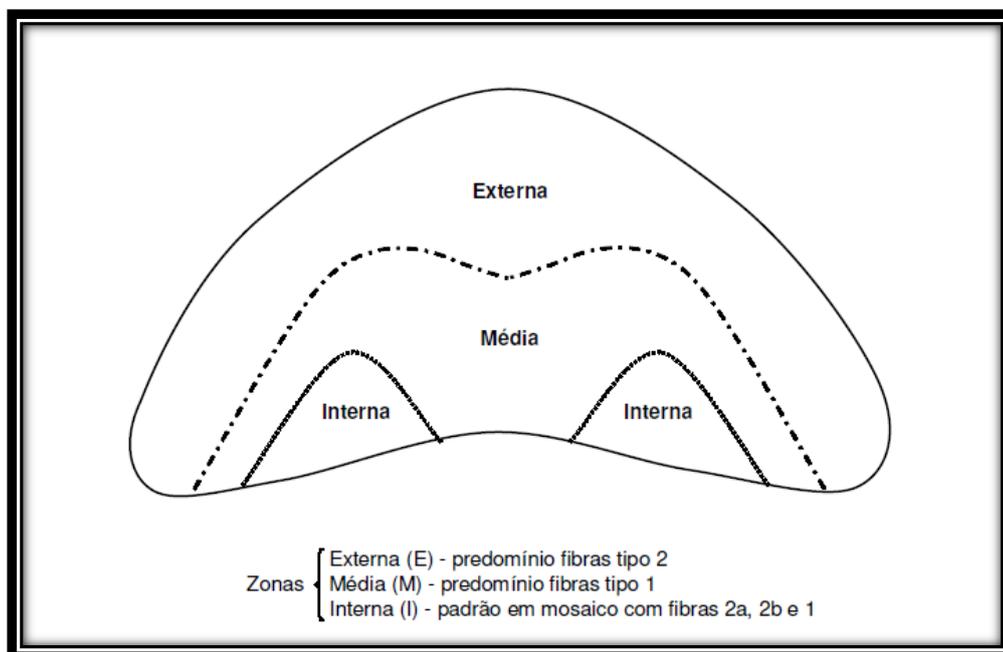


Figura 6. Zonas do músculo gastrocnêmio do rato

Fonte: Sher e Cardasis (1976)

1.9.2. A extrapolação dos resultados das pesquisas

Ao se estudar respostas metabólicas em roedores dificilmente se encontra a mesma variação encontrada em humanos nas diversas etapas do metabolismo e/ou variáveis fisiológicas. Apesar disto, para fins experimentais, é importante que seja compreendida a idéia de que em modelos animais existe uma facilidade de padronização e/ou homogeneização da amostra, o que em humanos facilmente torna-se um viés. Além disso, alguns tipos de extração tecidual e outras análises plasmáticas tornam-se menos complexas em experimentos com roedores (Bexfield *et al.*, 2009).

1. HIPÓTESES

H₁ O exercício físico intermitente, apesar de ser praticado em alta intensidade, previne picos de lactato sanguíneo.

H₂ O treinamento físico aumenta os estoques musculares e hepáticos de glicogênio.

H₃ O exercício físico intermitente com suplementação de carboidratos economiza as fontes endógenas de glicose

H₄ O exercício físico e o treinamento promovem uma redução na expressão gênica e nos níveis circulantes de IGF-I, além de promover um aumento nas concentrações da IGFBP-I.

H₅ O exercício físico e o treinamento promovem aumento na expressão gênica do receptor de IGF-I.

H₆ O exercício físico não altera os níveis de GH, embora o treinamento seja capaz de reduzi-lo.

H₇ A corticosterona tem sua concentração aumentada em exercício físico agudo, mas sua concentração tende a se reduzir com o treinamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estabelecer um protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade para ratos e verificar os efeitos da administração de solução de glicose a 10% durante exercício físico intermitente de alta intensidade sobre as concentrações séricas de lactato, glicemia, GH, corticosterona, IGF-I e IGFBP-I e expressão gênica de IGF-I e seus receptores na musculatura esquelética e fígado de ratos treinados, além das concentrações hepáticas e musculares de glicogênio.

3.2. Específicos

- estabelecer um protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade para ratos, através de aumentos no VO_2 máx medidos periodicamente pelo teste máximo, determinando os níveis séricos de lactato e glicose antes e depois do exercício físico;

-determinar os níveis séricos de IGF-I e IGFBP-I após o exercício físico, por radioimunoensaio;

-determinar a expressão gênica de IGF-I e seus receptores na musculatura esquelética (sóleo e gastrocnêmio) e tecido hepático através de PCR, após exercício físico;

-determinar os níveis séricos de corticosterona após exercício físico, por radioimunoensaio;

-determinar os níveis séricos de GH após exercício físico, por radioimunoensaio;

-determinar as concentrações de glicogênio musculares (sóleo e gastrocnêmio) e hepáticas;

4. DELINEAMENTO, POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foi realizado um estudo experimental. Cinquenta e cinco (55) ratos Wistar machos foram usados nos experimentos. Os animais foram adquiridos na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) com 60 dias de vida e aclimatados por duas semanas em uma temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Este período é denominado quarentena e tem como objetivo a avaliação e descarte de patologias externas. Todos foram mantidos em gaiolas coletivas (49 x 34 x 16 cm) com cinco (5) ratos em cada e assoalho contendo maravalha. O ciclo de luz claro/escuro foi invertido desde a aclimação (12 horas/12 horas) e os animais foram tratados diariamente com a ração comercial Nuvilab e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos na unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-UFRGS).

Projeto piloto

Dos 55 ratos, quinze (15) foram utilizados no projeto piloto. O projeto piloto constituiu-se em três (3) semanas realizando os mesmos procedimentos do estudo experimental apenas para verificação da parte metodológica.

4.1. Experimento

Os outros quarenta (40) ratos foram divididos em oito grupos com cinco (5) ratos em cada, baseados no treinamento, exercício físico agudo e suplementação com carboidrato (glicose 10%). Tratou-se de um estudo de

delineamento fatorial 3x2 (animais treinados versus sedentários; animais exercitados versus não exercitados e; animais que receberam carboidrato versus água).

Os grupos foram: TEC (treinado, exercitado com carboidrato), TES (treinado, exercitado sem carboidrato), TNC (treinado, não exercitado com carboidrato), TNS (treinado, não exercitado sem carboidrato), SEC (sedentário, exercitado com carboidrato), SES (sedentário, exercitado sem carboidrato), SNC (sedentário, não exercitado com carboidrato) e SNS (sedentário, não exercitado sem carboidrato) (Figura 7).

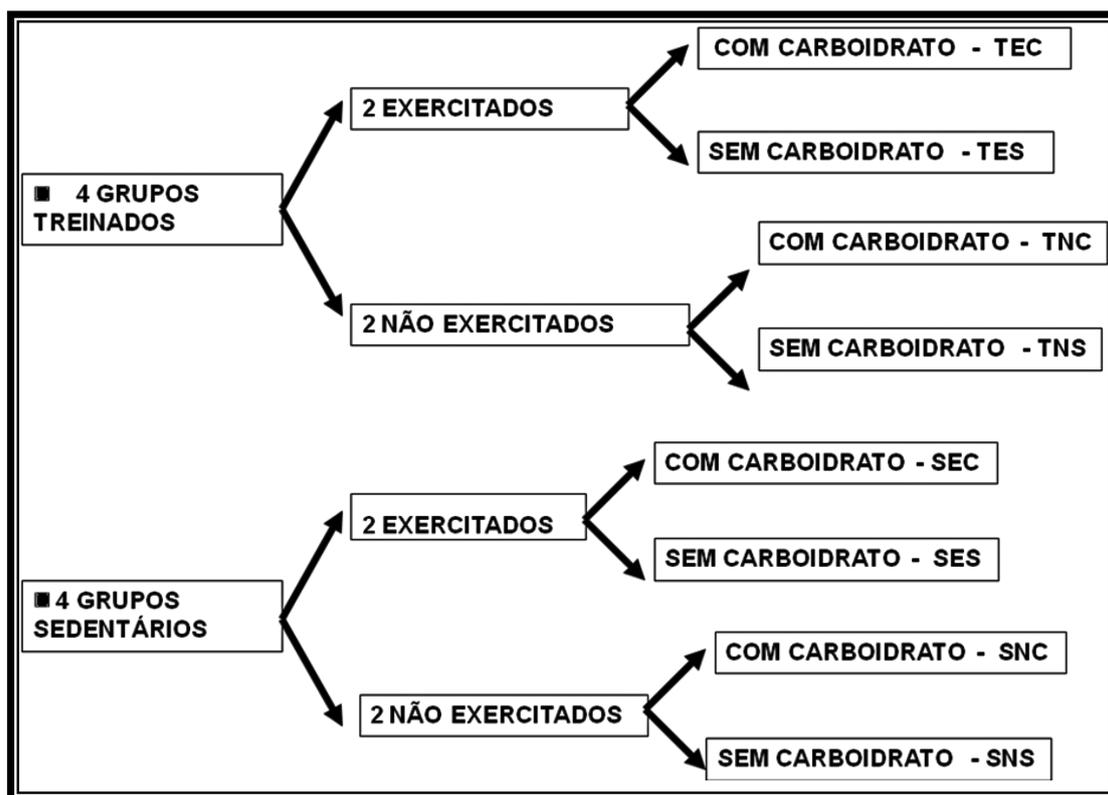


Figura 7. Divisão dos grupos do experimento

Os ratos treinados (T) passaram por três meses (90 dias) de exercício físico (5x/semana – 1x/dia) e os exercitados (E) passaram pelo exercício físico

agudo no dia do experimento. Os animais com carboidrato (C) receberam água e glicose (10%) enquanto os sem carboidrato (S) receberam apenas água.

Todos os ratos passaram por um protocolo de adaptação e foram mantidos sempre com ração e água à vontade.

Protocolo de adaptação – O protocolo de adaptação consistiu de corrida em esteira por cinco (5) dias consecutivos com 10, 20, 30, 40 e 50 minutos/dia de exercício físico, de forma intermitente, em baixas velocidades.

O treinamento consistiu em três meses (90 dias), sempre no escuro, no turno da manhã, cinco vezes por semana, de forma intermitente.

O protocolo de treinamento utilizado na presente pesquisa é oriundo de uma série de adaptações de um protocolo criado no ano de 2000 para uma pesquisa em humanos, realizada na Escola Superior de Educação Física da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), que teve como órgão de fomento a FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul). Na época, o objetivo do nosso grupo de pesquisa foi simular os tempos e alterações de intensidades de exercício físico de uma partida de um esporte coletivo, no intuito de verificar as alterações de lactato e glicemia provenientes desta forma de exercício físico. Os resultados da pesquisa deram origem ao protocolo de treinamento de um primeiro experimento realizado anteriormente e adaptado para o trabalho com ratos, realizado pelo nosso grupo (Giesel *et al.*, 2009). Este foi mais uma vez adaptado, dando origem ao protocolo do presente estudo.

O protocolo de treinamento - Metade dos ratos foi submetida a exercício físico em esteira, cinco (5) vezes por semana (treinamento), intermitente, com carga equivalente a 40% (30 segundos) e 110% (1minuto) de suas velocidades máximas (detectadas pelo teste de esforço máximo), outros permaneceram em repouso, num total de 60 minutos. Mensalmente novo teste de esforço máximo era realizado e as velocidades eram reajustadas de acordo com o nível de treinamento.

Protocolo do Teste máximo – consistiu de exercício físico em esteira com aumento da velocidade em 5m/min a cada 3 minutos, iniciando com a velocidade de 5 m/min e tendo como limite a intensidade máxima de cada animal (Melo *et al.*, 2003).

Todos os ratos que participaram de grupos treinados passaram por treinamentos e teste máximo. Os ratos pertencentes ao grupo sedentário passaram apenas pelo teste máximo. No restante das etapas eram colocados na esteira desligada pelo mesmo período de tempo.

No dia do exercício agudo, a ração foi removida das gaiolas as 06h00min horas e os testes realizados entre 09h00min e 12h00min horas. Todos os ratos foram pesados antes do exercício físico (T0) e 25µL de sangue (uma gota, perfuração com lancetador) foram coletados da cauda do animal para dosagem de lactato e glicemia. Imediatamente após as medidas de glicose e lactato a administração oral de glicose era feita com seringa por gavagem. Os ratos que não participaram dos grupos com carboidrato receberam água no mesmo volume (1 mL).

O protocolo de exercício físico neste dia consistiu, também, em um minuto correndo em esteira acima do limiar de lactato com carga equivalente a 110% (1 minuto) e 40% (30 segundos) de suas velocidades máximas (detectadas pelo teste de esforço máximo), de forma intermitente, durante 60 minutos.

Em seguida, os animais foram rapidamente retirados da esteira e pesados (T60). Uma amostra de sangue foi, mais uma vez, retirada com lanceta para medida de glicemia e lactato (T60). A seguir, os ratos foram imobilizados e sofreram um deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta, o sangue coletado por punção cardíaca em tubos de 500 μ L. Um fragmento do lobo esquerdo do fígado e, a seguir, amostras dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram retirados, identificados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C . O sangue foi centrifugado e o plasma estocado para dosagem hormonal (-20°).

4.2. Determinação da glicose e do lactato séricos

Os níveis de glicose foram determinados através do medidor de glicose e tiras (*Advantage II*). O lactato foi determinado com o auxílio de um lactímetro (*Accusport*). Ambos fornecidos pela empresa Roche.

4.3. Determinação do glicogênio hepático e muscular

A extração do glicogênio seguiu o método de Van Handel (Van Handel, 1965) e os valores foram determinados como equivalentes de glicose (método da glicose oxidase) após hidrólise ácida (HCl) e neutralização com Na_2CO_3 (Geary *et al.*, 1981). Os resultados estão expressos em mg/g de tecido.

Todos os radioimunoensaios que serão descritos abaixo foram realizados no setor de radioimunoensaio do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA):

4.4. Radioimunoensaio para IGF-I

O IGF-I foi medido após extração a partir do soro com etanol ácido (40 μL de soro e 160 μL de etanol ácido). A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugada. Cem (100) μL do sobrenadante foram neutralizados 1:6 antes da análise. O IGF-I sérico foi determinado por radioimunoensaio (RIA) usando um Kit IGF-I RIA (DSL-2900 *Mouse/Rat IGF-I RIA Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Inc, USA*).

Princípio do teste:

Radioimunoensaio por competição de fase líquida entre o antígeno marcado (I^{125}Ag) e o antígeno da amostra (Ag) pelo anticorpo. A quantidade de I^{125}Ag ligado ao anticorpo foi inversamente proporcional à concentração do Ag presente. A separação do I^{125}Ag livre e do ligado ao anticorpo foi realizada usando um segundo anticorpo.

4.5. Radioimunoensaio e Elisa para IGFBP-I

Os níveis de IGFBP-I séricos foram determinados utilizando uma técnica imunoradiométrica *two-sites* (IGFBP-I IRMA, DSL-7800, *Diagnostic Systems Laboratories*). A sensibilidade da técnica foi de 0,5 ng/mL. No entanto, devido à especificidade da técnica (kit para humanos), os dados não puderam ser aproveitados e foi utilizada então a técnica de Elisa, através do KIT IB59128 (*Diagnostic Systems Laboratories, INC, USA*).

Princípio do teste:

A Proteína carreadora do IGF-I foi dosada pelo método de ELISA, ensaio imunossorvente ligado a enzima (*Active®Total IGFBP-I ELISA, DSL, Diagnostic Systems Laboratories, INC, USA*). Foi um ensaio sanduíche enzimaticamente amplificado de dois passos. No ensaio, padrões, controles e amostras foram incubados em tiras com poços de microtitulação que foram revestidos com anticorpos anti IGFBP-I. Após incubação e lavagem, o anticorpo de detecção anti IGFBP-I marcado com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) foi adicionado a cada poço da placa. Um segundo passo de incubação e lavagem foi realizado, e adicionado o substrato Tetrametilbenzidina (TMB) a cada poço da placa. Por último, uma solução ácida foi utilizada para encerrar a reação. Procedeu-se a leitura das absorbâncias a 450 nm de comprimento de onda. A absorbância medida foi diretamente proporcional a concentração de IGFBP-I nas amostras.

Sensibilidade: 0,25 ng/mL.

CV intra-ensaio: 4,6%

CV inter-ensaio: 7,6%

4.6. Radioimunoensaio para hormônio do crescimento (GH)

O GH foi dosado com o kit Linco's *Research Rat Growth Hormone radioimmunoassay* (RGH- 45 HK). Foi feito um radioimunoensaio de fase líquida por competição. Uma concentração fixa de antígeno marcado com I¹²⁵ foi incubada com uma diluição constante de anticorpo, de maneira que somente 50% do antígeno marcado pode se ligar ao anticorpo. Quando um antígeno não marcado foi adicionado ao sistema, ocorreu uma competição entre os dois antígenos pelo limitado e constante número de sítios de ligação do anticorpo. A concentração de antígeno marcado que se ligou ao anticorpo decresceu conforme a concentração de antígeno não marcado aumentou. Um segundo anticorpo foi adicionado para separar o antígeno marcado ligado à reação, do antígeno marcado livre. Foi realizada uma curva padrão de concentrações conhecidas, através da qual, foi calculada a concentração das amostras e controles.

Sensibilidade: 0,5 ng/mL.

4.7. Radioimunoensaio para corticosterona

A Corticosterona foi dosada com o kit *Coat-a-Count Rat Corticosterone In-vitro Diagnostic test (DPC- Diagnostic Products Corporation, USA)*. Foi feito um radioimunoensaio de fase sólida, no qual a corticosterona de rato marcada com I^{125} compete por um tempo fixo com a corticosterona da amostra pelos sítios do anticorpo. O anticorpo encontra-se imobilizado na parede do tubo, então a separação da fração de antígeno marcado com I^{125} ligado ao anticorpo e a livre se deu por decantação.

Sensibilidade: 5,7 ng/mL

CV intra-ensaio: 12,2%

CV inter-ensaio: 14,9%.

4.8. Extração do RNA total para determinação da expressão gênica do IGF-I e seu receptor

Amostras de músculo esquelético e fígado foram homogeneizadas e lisadas com um (1) mL do reagente Trizol® (*Invitrogen, Life Technologies*), seguindo uma adaptação do protocolo do fabricante, já padronizada em nosso laboratório. Incubou-se o homogeneizado em microtubos de 2 mL a 15-30°C por 5 minutos, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio por cada mL de Trizol e agitaram-se as amostras vigorosamente por 15 segundos (em vórtex), incubou-se por 3 minutos a 15-30°C. Em seguida foram centrifugadas as amostras a 12000 x g por 15 min a 4°C para separar a mistura em fase

fenólica, interface e fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos, e precipitou-se o RNA com 1 mL de álcool isopropílico a -20°C por cerca de 24 horas. Centrifugou-se então a 12000 x g por 10 min a 4°C, removendo o sobrenadante e lavando o precipitado com 1 mL de etanol 75% gelado. Centrifugou-se novamente a 8000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ficou em temperatura ambiente até secar. O RNA foi redissolvido em água ultrapura, tratada com DEPC (10 a 30 µL), e incubado por 10 min a 60°C, seguido de banho de gelo por 1 min para quantificação das amostras e estocagem a -20°C. Para a quantificação, alíquotas de 1 µL da solução de RNA das amostras foram diluídas em 499 µL de água com DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (*GeneQuant*), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Onde: A= absorvância e D= diluição da alíquota usada para a quantificação.

4.8.1. Reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa (RT-PCR) para determinação da expressão gênica do IGF-I e IGF-Ir

A avaliação da expressão do mRNA dos fatores em estudo foi realizada a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa. A técnica consistiu em duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do mRNA mensageiro a DNA complementar (cDNA), o qual foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase, que permitiu a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

4.8.2. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA (DNA complementar) foi feita a partir de 1 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estimou-se que 1 µg de RNA total dariam origem a 20 ng de cDNA. O kit usado para síntese do cDNA foi o *Super Script First- Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o *primer* Oligo (DT)12-18 e os desoxirribonucleotídeos (dNTPs). Em seguida foi adicionada uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mmol/L pH 8,4 com KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, DTT 0,1mol/L e 40 unidades (U) da enzima RNase OUT, e incubado por 2 minutos a 42°C. Após, foram adicionadas 50U da enzima transcriptase

reversa, seguindo-se um período de incubação a 42°C por 50 min. Após nova desnaturação a 70°C por 15 min para inibir a atividade enzimática, a mistura foi incubada com 2U da enzima Rnase H de *E. coli* por 20 min a 37°C para destruir o RNA remanescente. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 21 µL, que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR (Branchini *et al.*, 2009).

4.8.3. Protocolo geral da PCR

As reações foram feitas num volume final de 50 µL seguindo uma adaptação do protocolo sugerido pela *Invitrogen, Life Technologies*. As amostras de 2 µL cDNA (correspondentes a 2 ng de cDNA) foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 2 minutos na presença de Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,4 com KCl 50 mmol/L e cloreto de magnésio 50 mmol/L. Após esse procedimento, conhecido como *hot start*, os tubos foram imersos em gelo e receberam 10 µL de uma mistura contendo as mesmas concentrações de tampão e MgCl₂, acrescida dos oligonucleotídeos específicos *sense* e *antisense*, da mistura de dNTPs e da enzima Taq DNA Polimerase (Schneider *et al.*, 2009). Os volumes e as concentrações finais dos reagentes utilizados na PCR estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1. Protocolo geral para as reações de PCR, utilizando o “hot start”.

	Mix inicial	Pós Hot start	Volume Final	Conc. final
Água	32,8 µL	6,4 µL	39,2 µL	-
Tampão 10X	4 µL	1 µL	5 µL	1x
MgCl ₂ 50mmol/L	1,2 µL	0,3 µL	1,5 µL	1,5 mmol/L
dNTP mix (10mmol/L cada)	-	1 µL	1 µL	0,2 mmol/L
Primer sense (10µmol/L)	-	0,5 µL	0,5 µL	100 nmol/L
Primer antisense (10µmol/L)	-	0,5 µL	0,5 µL	100 nmol/L
cDNA	2 µL	-	2 µL	-
Taq (5UI/µl)	-	0,3 µL	0,3 µL	30 mUI/µL
Volume final	40 µL	10 µL	50 µL	-

Para eliminar qualquer diferença de massa existente entre as amostras, o que poderia alterar os resultados, as mesmas foram amplificadas para o gene da β -actina, um gene constitutivamente expresso no rato e que não sofre alterações por exercício físico ou suplementação de carboidratos.

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para cada mRNA em estudo foram desenhados com o programa *Primer 3* e testados em relação à identidade da sua sequência com a sequência do gene em questão. A tabela 2 resume a localização e a sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo, bem como o tamanho dos fragmentos de cDNA amplificados. Os oligonucleotídeos para o gene da β -actina foram sintetizados pela *Invitrogen, Life Technologies*, e os para os genes do IGF-I e IGF-Ir, pela *Gene Link*.

Tabela 2. Características dos primers utilizados para a amplificação dos fragmentos específicos de cDNA.

Gene	Nucleotídeos	Sequência	Fragmento
β-actina			
<i>Sense</i>	457 – 477	5' ACCTTCAACACCCCAGCCATG 3'	309 pb
<i>Antisense</i>	765 – 745	5' GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC 3'	
IGF-I			
<i>Sense</i>	49 – 68	5' TGCTTGCTCACCTTTACCA 3'	212 pb
<i>Antisense</i>	260 - 241	5' TACATCTCCAGCCTCCTCA 3'	
IGF-Ir			
<i>Sense</i>	3238 – 3258	5' CGGTTGCTGGGTGTAGTATC 3'	201pb
<i>Antisense</i>	3438 – 3418	5' CTTGTTGGCATTGAGGTAGG 3'	

4.9. Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado a partir dos dados de Lavoie, Fillion et al. (2002) para um nível de significância de $P < 0,05$ e um poder de amostra de 80% e para que a diferença entre as médias seja de 1500 unidades arbitrárias, o número de ratos necessário estabelecido é de cinco (5) animais por grupo, utilizando os pontos de 0 e 45 minutos da dosagem de IGFBP-I (Lavoie et al., 2002).

4.10. Análise Estatística

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e o teste de esfericidade de Mauchly foram aplicados. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para comparação das médias das amostras. O teste *t* foi utilizado como post hoc para as variáveis paramétricas (PCR IGF-Ir dos tecidos gastrocnêmio e fígado; PCR IGF-I dos tecidos gastrocnêmio e fígado; Glicogênio do fígado, gastrocnêmio e sóleo; IGF-I sérico; Corticosterona sérica). O teste de Mann Whitney foi utilizado para as variáveis não paramétricas (PCR IGF-Ir do músculo sóleo; PCR IGF-I do músculo sóleo; GH sérico). Os valores diferentes no tempo zero, como os encontrados para a glicemia, foram ajustados por uma análise de covariância (ANCOVA). Todos os dados foram processados e analisados com a ajuda dos programas PEPI 3.0 e SPSS 17.0. Dados foram considerados como significativos se $P < 0,05$.

4.11. Aspectos éticos e de biossegurança

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do COBEA (Código Brasileiro de Experimentação Animal) - 1988, concordando com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório do National Institutes of Health (NIH). O laboratório onde foram realizados os experimentos é credenciado no CNEN (AP-0875), e cumpre a legislação recomendada.

A higienização dos insumos utilizados com os animais era sempre realizada com detergente clorado e água quente (aproximadamente 70°C para as caixas dos animais). Os bebedouros e grades eram submetidos a processo de esterilização por calor seco e a maravalha era esterilizada em autoclave a vapor.

Quanto ao uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) era obrigatório o uso de propés e gorro para acessar a Unidade de Experimentação Animal. O uso de avental exclusivo e luvas sempre foram exigidos quando havia a manipulação de animais. Máscaras e óculos foram utilizados quando havia risco de contaminação por sangue e secreções.

As carcaças dos animais foram congeladas em sacos plásticos, identificados com os procedimentos a que foram submetidas e armazenadas a -20°C. Diariamente, os animais de descarte e produtos oriundos das pesquisas assim como os dejetos dos animais eram recolhidos por empresa terceirizada (Aborgama), que atende o HCPA, obedecendo às normas vigentes para descarte de material biológico.

5. RESULTADOS

5.1. Massa Corporal

Todos os ratos ganharam massa durante o treinamento, uma vez que foram meses de experimentos, e os valores apresentados na tabela 3 (média +/- desvio padrão) referem-se ao último dia (pré-exercício físico agudo).

Tabela 3. Massa corporal e concentração de glicogênio dos animais nos distintos grupos

Grupo	Massa (g)	Glicogênio Fígado (mg/g)	Glicogênio Gastrocnêmio (mg/g)	Glicogênio Sóleo (mg/g)
SNS	336,4 ± 29,90	3,06 ± 1,68	0,07 ± 0,05	0,47 ± 0,11
SNC	359,8 ± 48,94	2,66 ± 1,64	0,08 ± 0,04	0,28 ± 0,01
SEC	375,0 ± 29,86	1,71 ± 1,44	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,11
SES	362,4 ± 33,09	0,44 ± 0,41	0,04 ± 0,04	0,14 ± 0,07
TNS	359,0 ± 33,81	2,44 ± 1,13	0,11 ± 0,06	0,47 ± 0,13
TNC	342,8 ± 51,49	3,75 ± 1,93	0,05 ± 0,03	0,43 ± 0,17
TES	323,8 ± 7,60	3,53 ± 1,78	0,04 ± 0,02	0,18 ± 0,17
TEC	324,2 ± 21,22	5,77 ± 1,39	0,04 ± 0,02	0,37 ± 0,23

Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=5/grupo)

Legenda dos grupos:

TEC – treinado, exercitado, com suplementação de carboidrato

TES – treinado, exercitado, sem suplementação de carboidrato

TNC – treinado, não exercitado, com suplementação de carboidrato

TNS – treinado, não exercitado, sem suplementação de carboidrato

SEC - sedentário, exercitado, com suplementação de carboidrato

SES - sedentário, exercitado, sem suplementação de carboidrato

SNC - sedentário, não exercitado, com suplementação de carboidrato

SNS – sedentário, não exercitado, sem suplementação de carboidrato

5.2. Glicogênio

A média das concentrações de glicogênio é mostrada na tabela 3.

O glicogênio hepático demonstrou uma maior concentração em ratos treinados (T) quando comparados aos ratos sedentários (S) ($P = 0,002$) após 60 min de exercício físico intermitente de alta intensidade (figura 8).

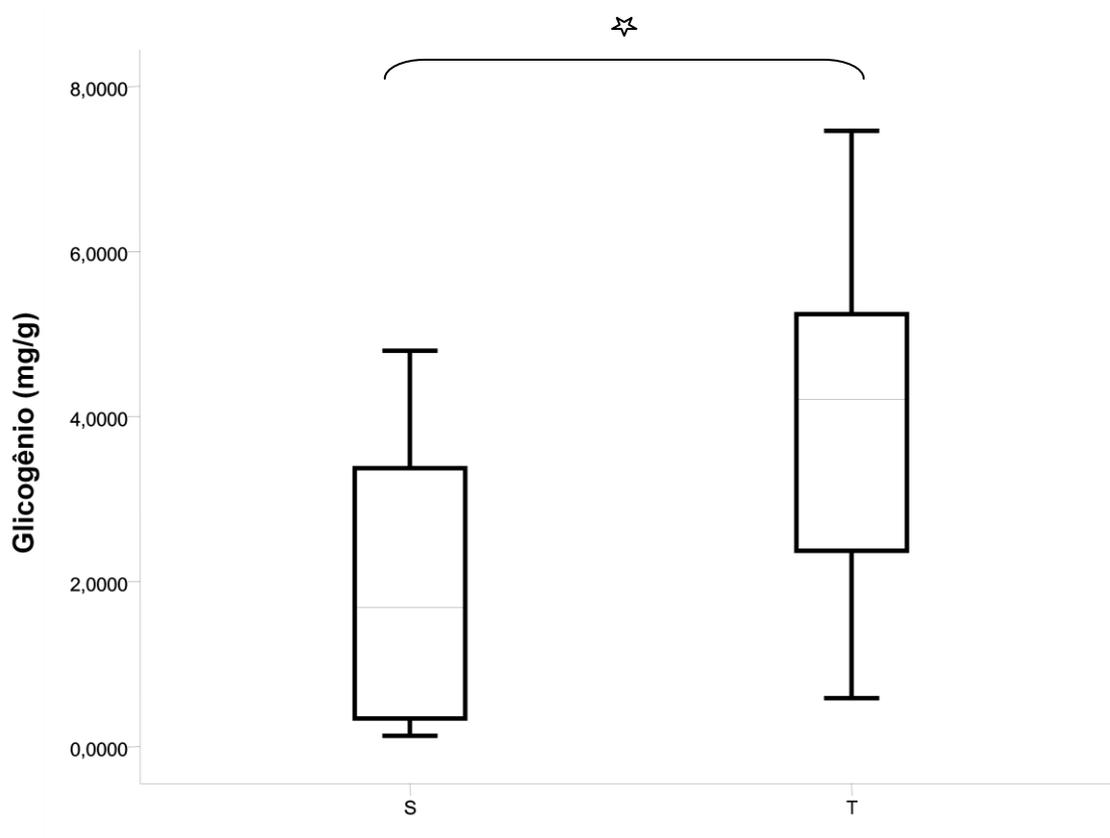


Figura 8. Glicogênio Hepático

☆ $P = 0,002$

S: Ratos sedentários

T: Ratos treinados

Esta proporção continuou mesmo quando comparados apenas os ratos que se exercitaram, sendo maior em TE do que em SE ($P = 0,001$). Se considerada também a suplementação com carboidratos esta relação se mantém, tendo o grupo TEC uma maior concentração de glicogênio no fígado do que o SEC ($P = 0,002$). Já o grupo não suplementado TES tem mais glicogênio no fígado do que os ratos do grupo SES ($P = 0,005$).

Tanto nas amostras de tecido hepático quanto nas de tecido muscular o glicogênio é maior nos não exercitados do que nos exercitados (S+T) ($P = 0,001$).

5.3. Glicemia

A média das glicemias é mostrada na tabela 4.

Não houve variação na concentração glicêmica em T0, T60 ou delta.

Tabela 4. Resultados das variáveis séricas nos grupos

Grupo	Glicemia (T0) (mg/dL)	Glicemia (T60) (mg/dL)	Lactato (T0) (mmol/L)	Lactato (T60) (mmol/L)	IGF-1 (ng/mL)	GH (ng/mL)	Corticoesterona (ng/mL)
SNS	96,2 ± 13,1	90,2 ± 7,2	1,8 ± 0,5	1,5 ± 0,3	3457,7 ± 1128,9	22,3 ± 39,3	522,7 ± 134,9
SNC	104,2 ± 18,4	96,2 ± 15,4	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1	2732,6 ± 891,7	86,6 ± 132,2	513,1 ± 270,2
SEC	110,0 ± 23,4	137,6 ± 32,6	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,6	2800,0 ± 469,1	2,2 ± 0,7	683,3 ± 40,3
SES	93,4 ± 10,4	134,2 ± 22,5	1,7 ± 0,7	1,9 ± 1,1	3628,2 ± 1619,8	2,5 ± 0,8	677,5 ± 69,7
TNS	127,0 ± 34,4	127,0 ± 34,4	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,5	2977,6 ± 1441,4	14,4 ± 15,7	440,2 ± 77,6
TNC	116,2 ± 23,7	151,6 ± 59,3	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,4	2277,4 ± 897,3	10,7 ± 12,7	380,8 ± 136,8
TES	102,2 ± 13,6	167,8 ± 51,9	1,2 ± 0,25	2,0 ± 1,0	3146,7 ± 993,1	2,6 ± 1,7	571,3 ± 274,9
TEC	134,8 ± 48,2	159,0 ± 35,5	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,6	3134,3 ± 1177,1	8,3 ± 12,4	530,5 ± 63,8

Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=5/grupo)

Legenda dos grupos:

TEC – treinado, exercitado, com suplementação de carboidrato

TES – treinado, exercitado, sem suplementação de carboidrato

TNC – treinado, não exercitado, com suplementação de carboidrato

TNS – treinado, não exercitado, sem suplementação de carboidrato

SEC - sedentário, exercitado, com suplementação de carboidrato

SES - sedentário, exercitado, sem suplementação de carboidrato

SNC - sedentário, não exercitado, com suplementação de carboidrato

SNS – sedentário, não exercitado, sem suplementação de carboidrato

5.4. Lactato

A média das concentrações séricas de lactato é mostrada na tabela 4.

O lactato sanguíneo medido pré-exercício físico não demonstrou diferença entre os grupos. Após 60 min de exercício físico, se considerada toda a amostra, apenas os grupos sedentários (S) apresentaram concentração sérica diferente em relação aos treinados (T). Se comparados sedentários e treinados exercitados (SE+TE) e não exercitados (SN+TN), os exercitados tem maior variação do lactato (delta) ($P = 0,013$) (Figura 9).

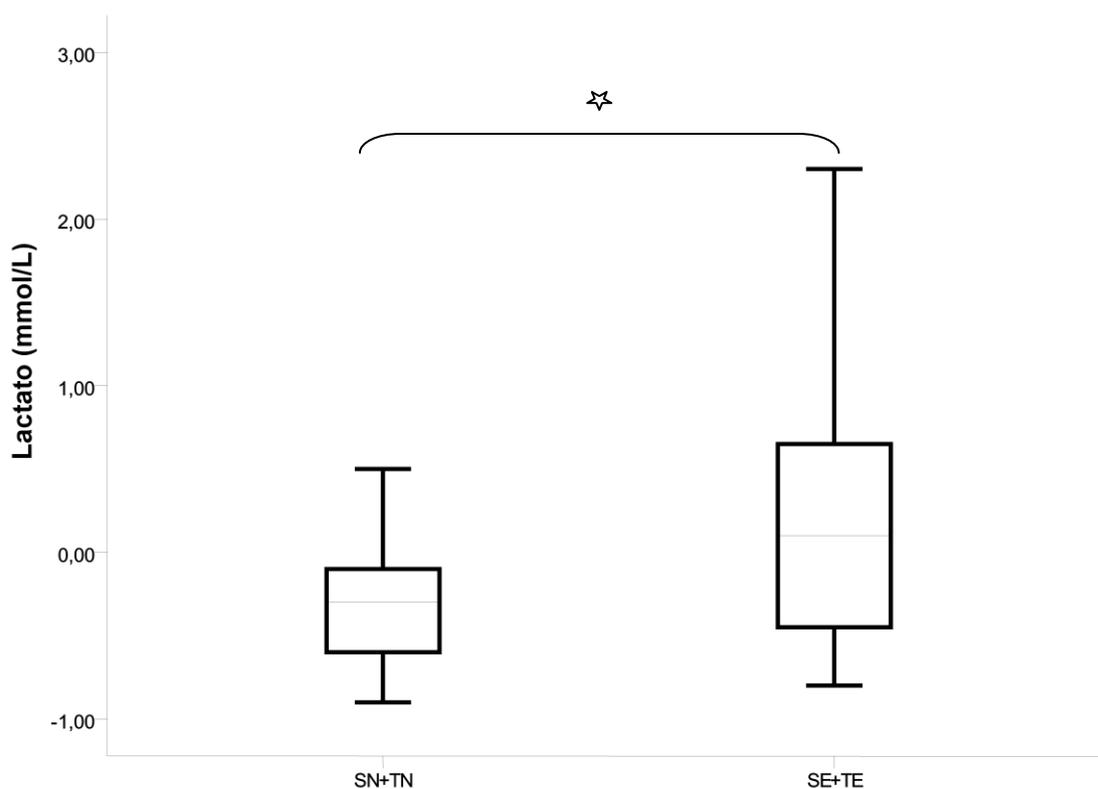


Figura 9. Variação do Lactato (T60 – T0).

☆ $P = 0,013$

SN + TN: Ratos treinados e sedentários que não se exercitaram de forma aguda

SE + TE: Ratos treinados e sedentários que se exercitaram de forma aguda

5.5. Hormônio do crescimento (GH)

A média das concentrações séricas de GH é mostrada na tabela 4.

O GH total apresentou diferença nos grupos que não se exercitaram no dia do experimento (SN+TN) em relação aos que se exercitaram (SE+TE) (Figura 10) ($P = 0,028$).

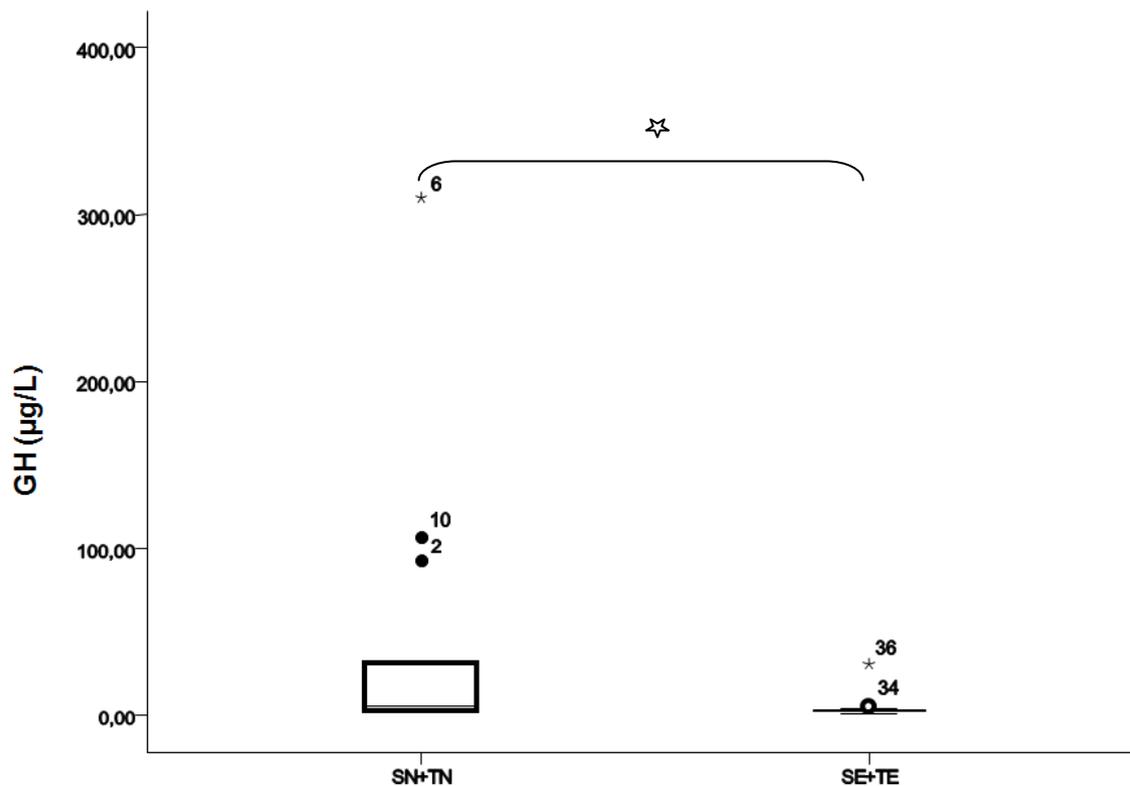


Figura 10. Concentração sérica de hormônio do Crescimento (GH)

☆ $P = 0.028$

SN + TN: Ratos sedentários e treinados que não se exercitaram

SE + TE: Ratos sedentários e treinados que se exercitaram

5.6. IGF-I sérico

O IGF-I sérico não apresentou diferença estatística significativa em nenhum dos grupos estudados (tabela 4).

5.7. Corticosterona

A média das concentrações séricas de corticosterona é mostrada na tabela 4.

A corticosterona, que é o hormônio relacionado ao estresse nos roedores apresentou, conforme esperado, valores superiores nos animais sedentários ($P = 0,030$). Estes valores superiores também foram diagnosticados nos ratos que foram submetidos ao exercício físico agudo, visto ser esta uma forma de estresse tanto em treinados quanto em sedentários (S+T) ($P = 0,005$). A concentração encontrada é 23% maior (680,43 ng/mL) nos sedentários (S) do que nos treinados (T) (550,92 ng/mL).

5.8. IGFBP-I

A proteína transportadora IGFBP-I, medida no soro, apresentou diferença apenas quando comparados os grupos TNS e SNS ($p < 0,001$). O grupo TNS (1,106 ng/mL) apresentou valores, em média, 36% maiores que o SNS (0,810 ng/mL).

5.9. RT-PCR

A expressão gênica do IGF-I no músculo gastrocnêmio de ratos treinados é maior do que nos animais sedentários ($P = 0,002$) (figura 11). Esta relação parece ser devida ao treinamento e não ao exercício físico agudo de forma isolada, visto que a expressão gênica do IGF-I no músculo gastrocnêmio é maior em TE do que em SE ($P = 0,001$).

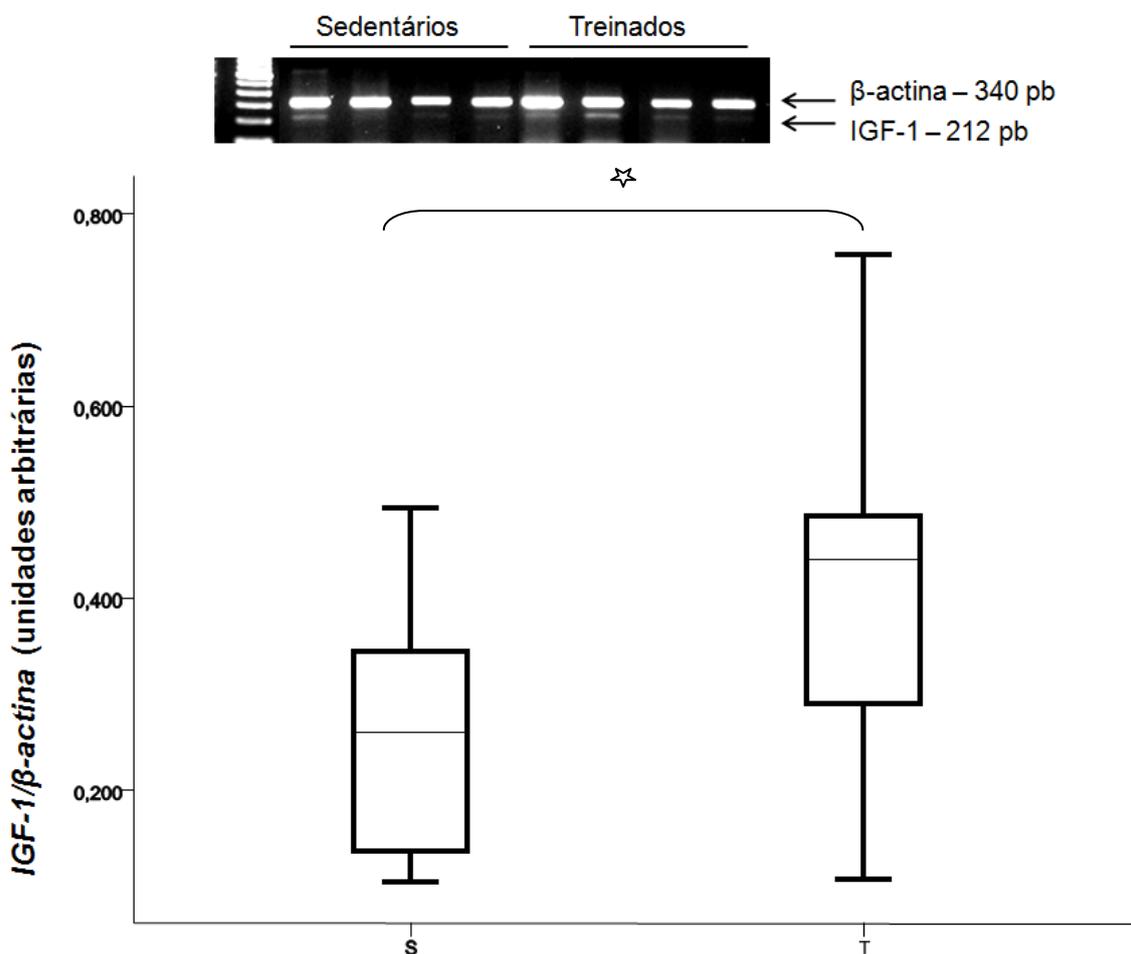


Figura 11. Expressão gênica do IGF-1 no músculo gastrocnêmio (Sedentários X Treinados).

Acima: Gel representativo mostrando os produtos da amplificação por RT-PCR do *IGF-1* e *β-actina* (esquerda = marcador de peso molecular). Abaixo: Medianas e intervalo interquartil da razão *IGF-1/β-actina* (unidades arbitrárias).

☆ $P = 0,02$

SE: Ratos sedentários, exercitados

TE: Ratos treinados, exercitados

Esta diferença parece ser proveniente dos grupos sem suplementação, visto que TES tem maior expressão gênica de IGF-I no músculo gastrocnêmio que o SES ($p < 0,001$). Além disso, dentre os animais treinados, os animais

sem suplementação tem uma maior expressão gênica de IGF-Ir e de IGF-I no músculo gastrocnêmio. ($P = 0,037$ e $P = 0,004$, respectivamente).

No grupo sedentário essa relação se inverte e o grupo SNC tem a expressão gênica do IGF-I no gastrocnêmio maior que o SNS ($P = 0,007$).

No tecido hepático, a expressão gênica do IGF-I de ratos sedentários é maior ($p = 0,024$) do que nos treinados. Esta relação é mantida se considerados apenas os que sofreram exercício físico agudo. Sedentários Exercitados (SE) tem maior expressão gênica de IGF-I do que TE ($P = 0,031$) (Figura 12). Esta diferença se anula quando suplementados, mas é mantida no grupo sem suplementação. O grupo SES tem maior expressão gênica de IGF-I no fígado que o TES ($P = 0,012$).

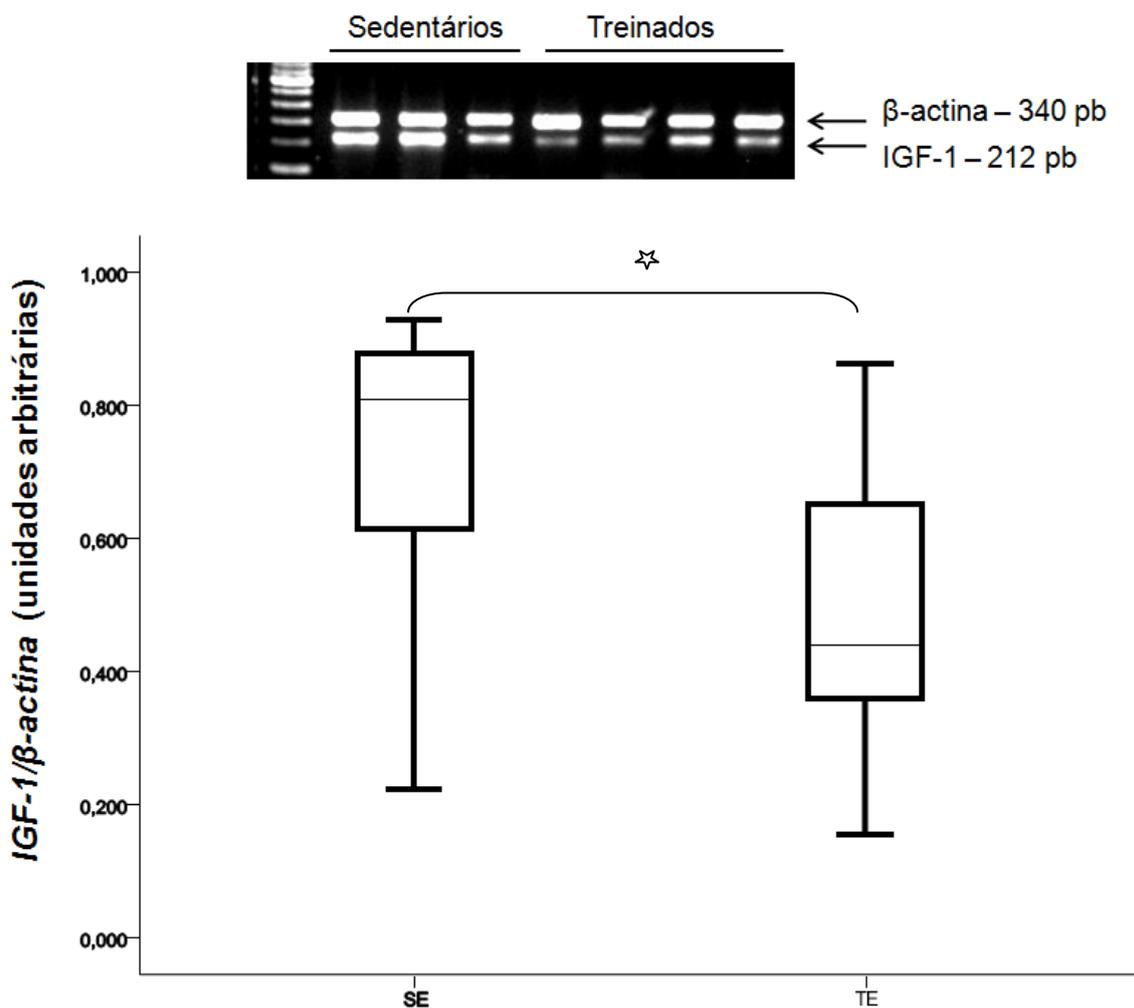


Figura 12. Expressão gênica do IGF-1 no fígado de ratos exercitados.

Acima: Gel representativo mostrando os produtos da amplificação por RT-PCR do *IGF-1* e *β -actina* (esquerda = marcador de peso molecular). Abaixo: Medianas e intervalo interquartil da razão *IGF-1*/ *β -actina* (unidades arbitrárias).

☆ $P = 0,003$

S: Ratos Sedentários

T: Ratos Treinados

No caso do tecido hepático, a suplementação entre os sedentários não exercitados (SN) parece fazer com que haja maior expressão de IGF-I e IGF-Ir no SNC do que no grupo SNS ($P = 0,026$ e $P = 0,023$, respectivamente).

5.10. IGF-I Sóleo

A expressão gênica de IGF-I no músculo sóleo é maior em SE do que em TE ($P = 0,049$), o que faz com que este coincida com as características apresentadas pelo tecido hepático. Esta característica parece ser devida principalmente aos grupos não-suplementados visto que os ratos do grupo SES têm maior expressão gênica de IGF-I no sóleo do que os do grupo TES ($P = 0,047$).

A Figura 13 mostra que se considerados juntos os grupos que não se exercitaram no dia do experimento (SN+TN) contra os que se exercitaram (SE+TE) há diferença na expressão gênica de IGF-I e IGF-Ir do músculo sóleo (Figura 14) ($P = 0,010$, $P = 0,021$).

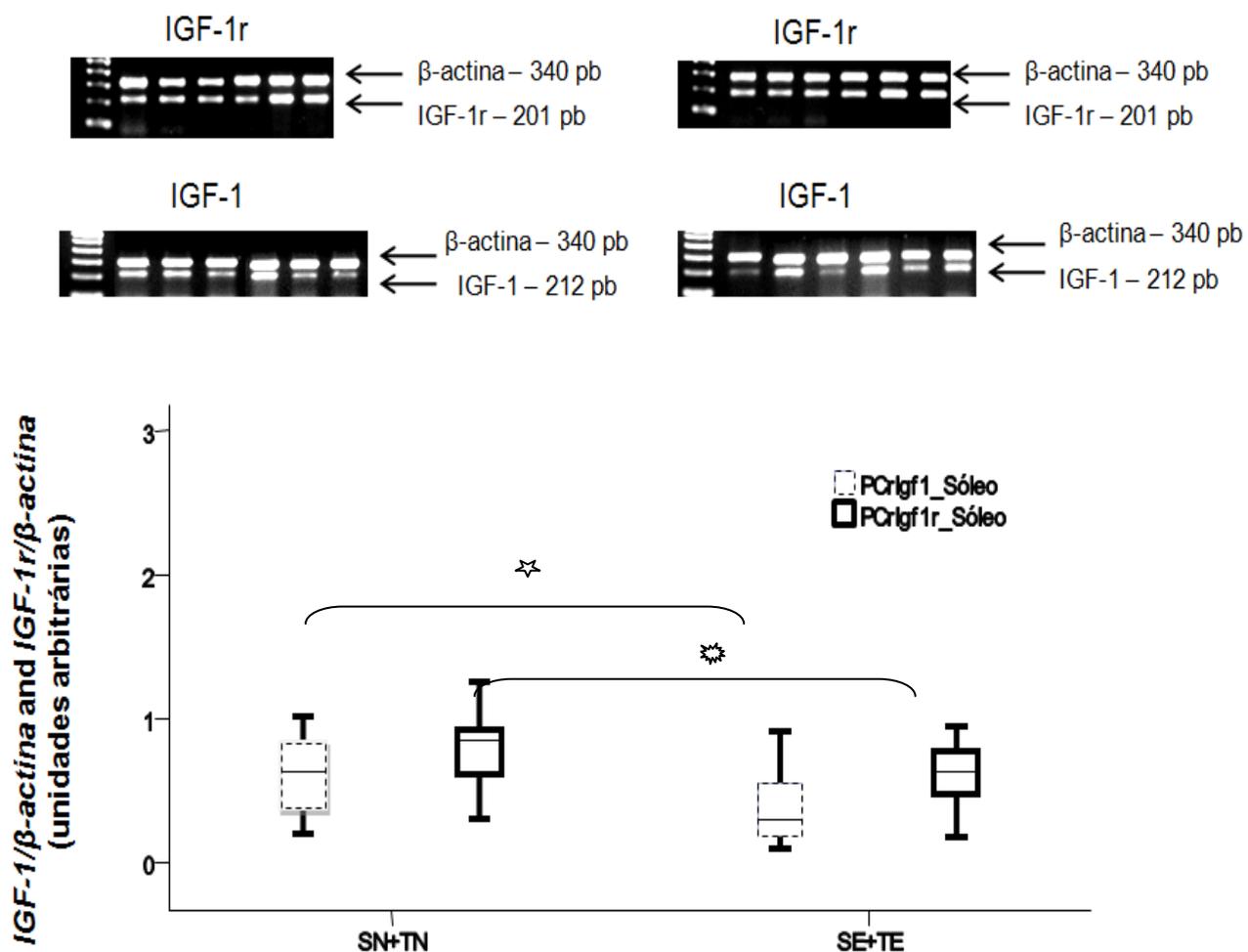


Figura 13. Expressão gênica do IGF-1 e IGF-1r no músculo sóleo.

Acima: Gel representativo mostrando os produtos da amplificação por RT-PCR do *IGF-1* e *β -actina* (esquerda = marcador de peso molecular). Abaixo: Medianas e intervalo interquartil da razão *IGF-1*/ *β -actina* (unidades arbitrárias).

☆ $P = 0.010$

* $P = 0.021$

SN + TN: Ratos sedentários e treinados que não se exercitaram

SE + TE: Ratos sedentários e treinados que se exercitaram

6. DISCUSSÃO

O exercício físico é caracterizado por diversas alterações no perfil metabólico dos indivíduos praticantes. O presente experimento demonstrou que o exercício físico intermitente é uma boa estratégia de melhoria do condicionamento físico em ratos, o que fica bem demonstrado à medida que, a cada novo teste máximo, novas velocidades máximas de treinamento eram estabelecidas, sendo estas maiores que as anteriores. Inicialmente, os estudos relativos às variáveis endócrinas se voltavam quase que em sua totalidade para o exercício físico onde predominasse o metabolismo aeróbio, pois as bases da fisiologia do exercício físico preconizavam que esta seria a melhor forma de se obter algum benefício para a saúde associado a uma redução na gordura corporal total (Gwinup, 1987; Sasaki *et al.*, 1987). Em seguida, percebeu-se que boa parte dos indivíduos que se mantêm em uma prática regular o faz através de exercícios físicos que intercalam intensidades. O exercício físico intermitente de alta intensidade além de ser uma forma de trabalho físico de alto gasto calórico tem se mostrado também uma forma de aumentar a adesão dos praticantes, visto mostrar-se mais prazeroso que o trabalho aeróbio convencional (Zelasko, 1995). Assim, o presente estudo analisou as respostas endócrinas, em um modelo animal, simulando esta modalidade de exercício físico muito praticada em clubes, academias e centros de treinamento, já que a forma cíclica com que as rotas metabólicas são estimuladas no exercício físico intermitente parece exercer efeitos

diferenciados daqueles observados quando considerado apenas o exercício aeróbio.

O eixo GH/IGF-I modula ou altera diversas respostas metabólicas do organismo e o exercício físico influencia de diversas maneiras a produção e secreção de GH e IGF-I, mas, nos experimentos acerca de tais alterações vários cuidados precisam ser tomados. Experimentos que contemplem apenas o exercício físico agudo podem não ser representativos de condições reais, pois, em geral, eles falham em alcançar condições de aumento compensatório na ingestão energética (Harrison *et al.*, 2009). A validade de estudos relacionados a exercício físico que não controlam rigorosamente o balanço energético tem sido questionada, visto que o déficit energético pode ter profundos efeitos no metabolismo. Além disso, a relação do exercício físico com o perfil metabólico tipicamente examina os efeitos de uma sessão única de exercício físico, o que pode comprometer o resultado encontrado quando o mesmo é extrapolado (Harrison *et al.*, 2009).

Estudos realizados em animais também possuem limitações consideráveis e torna-se bastante importante mantê-las sempre em mente quando os resultados são analisados. Além disso, ressalta-se que o presente estudo é bastante invasivo e tornar-se-ia de difícil aplicação em humanos. Ainda, a manutenção de uma dieta similar e padrões similares de exercício físico em grupos de humanos tornariam este experimento de difícil execução. No entanto, cabe lembrar que já existem diversos paralelos entre alterações de IGF-I em humanos e ratos após intervenções semelhantes (Kenyon, 2010).

Uma característica bastante importante do presente estudo é a utilização do ciclo claro/escuro invertido. Sabe-se que os ratos possuem um ciclo biológico que torna seu metabolismo mais intenso à noite (escuro). Sendo assim, fazer com que ratos que estão em um local claro (normalmente dormindo) façam exercício físico é uma forma bastante agressiva. Esta, normalmente, produz redução do desempenho e alterações hormonais condizentes com o período noturno. Portanto, as alterações presentes neste estudo nos parecem mais condizentes com a realidade da prática de exercício físico. Por isso, conseguimos respostas possivelmente mais aptas para extrapolação. Os aumentos de velocidade detectados mensalmente pelo teste máximo, embora de forma indireta, mostram que os animais dos grupos treinados vinham ganhando condicionamento de forma rápida.

Sobre as análises relacionadas à concentração de glicogênio tecidual (muscular e hepática), o conhecimento recente, relacionado às concentrações de glicogênio durante a prática de exercício físico, é bastante baseado nas medidas da concentração de glicogênio no tecido muscular misto. No entanto, os músculos são compostos por unidades motoras tipo I e tipo II que exibem várias propriedades metabólicas diferenciadas (De Bock *et al.*, 2007). No sóleo predominam as fibras do tipo I, no tibial anterior 2/3 das fibras são do tipo II. Alguns músculos, como gastrocnêmio apresentam um predomínio de fibras tipo II. Todavia na cabeça medial do gastrocnêmio ocorrem três tipos de fibras, distribuídas em um padrão de mosaico, semelhante ao encontrado no músculo humano. Nosso estudo procurou utilizar dois tipos de músculos para que se obtivessem respostas mais específicas de cada tipo de fibra. Os resultados

encontrados corroboram dados da literatura demonstrando que o treinamento intermitente aumenta a concentração basal de glicogênio hepático (Ivy, 1991; Fournier *et al.*, 2002; Hargreaves, 2004). A elevação na concentração deste polímero de glicose se mostrou independente da suplementação aguda, visto estar presente nos animais treinados suplementados ou não, o que concorda com estudo previamente apresentado (Tsintzas *et al.*, 2003). No entanto, o presente estudo falha em comprovar um possível aumento na concentração de glicogênio em ambos os grupos musculares. Provavelmente esta ausência de elevação nas concentrações deste polímero se deva justamente a esta característica de alternância de rotas metabólicas e, conseqüentemente, de predominância de tipos de fibras predominantemente ativos.

O estímulo fisiológico do exercício físico intenso induz um mecanismo para rápida e marcante estimulação da oxidação dos substratos exógenos (provenientes da suplementação) (Welsh *et al.*, 2002). Por esta razão, a ingestão de carboidratos na forma líquida possibilita rendimento constante de atletas de alto nível em provas que envolvem diversas horas consecutivas trabalho muscular intenso (Glaister, 2005). Ainda, a menor utilização do glicogênio muscular, propiciada pela utilização da glicose administrada via oral, é particularmente importante para o desempenho em ciclos de exercício físicos breves, repetitivos e extenuantes, como o futebol e o basquete (Glaister, 2005).

No que diz respeito ao lactato sérico, se comparados sedentários e treinados exercitados (SE+TE) e não exercitados (SN+TN) durante sessenta minutos, os exercitados tem maior variação do lactato (delta), o que difere este resultado de outro do nosso grupo de pesquisa (Giesel *et al.*, 2009), embora

ambos mostrem uma prevenção dos picos de lactato no decorrer do exercício físico intermitente em ratos treinados. O pequeno aumento provavelmente deva ser oriundo do aumento do tempo total de exercício físico que neste estudo é de sessenta minutos, reduzindo a taxa de oxidação do lactato nos tecidos que participam do *turnover* deste (coração, fígado e fibras tipo I). Quando considerados todos os grupos sedentários e os grupos treinados, os sedentários apresentam concentrações superiores de lactato sérico, no entanto, outros estudos verificaram valores mais altos de lactato em sessões de alta intensidade intercaladas com períodos de recuperação, sendo as catecolaminas plasmáticas o fator mais provável de associação com o aumento nestas concentrações (McAllister, 1998; Watt *et al.*, 2001).

Além deste, outro fator de extrema importância quando se discute a presença do lactato no soro de ratos submetidos a exercício de alta intensidade é a suplementação com glicose. Sendo o lactato um substrato energético de conhecido valor, sua presença fica diretamente ligada à presença ou não de outras fontes energéticas prontamente oxidáveis (Lecoultre *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010).

O GH mostrou alterações apenas quando comparados os grupos exercitados versus não exercitados. Após a prática do exercício agudo, os grupos submetidos ao mesmo tiveram uma menor concentração de GH. Isto mostra que também este possui apenas alterações de produção na prática de forma aguda, mas parece ter suas concentrações basais recuperadas, ou poder-se-ia dizer aumentadas quando a prática acontece de forma crônica. Ainda quando comparados os mesmos grupos que incluem os ratos não

exercitados e comparando-os ao exercitados (SN+TN X SE+TE), verifica-se que há diferença na expressão gênica de IGF-I e IGF-Ir do músculo sóleo, sendo ambas as expressões menores nos ratos exercitados de forma aguda.

Além das ações do hormônio do crescimento mediadas pelo IGF-I o hormônio do crescimento também possui efeitos diretos em tecidos específicos e/ou de forma sinérgica com IGF-I. Neste experimento, a expressão gênica do IGF-I no músculo gastrocnêmio de ratos treinados mostrou-se superior àquela apresentada pelos animais sedentários. Esta se mostrou mais especificamente relacionada ao exercício físico agudo e não ao treinamento de forma isolada. Tal constatação deve-se ao fato de que a diferença na expressão gênica do IGF-I no músculo gastrocnêmio é maior em TE do que em SE, mas não se mostra diferente quando comparados TN e SN. Dados como este demonstram que, se estas respostas encontradas na presente pesquisa puderem ser um dia extrapoladas para os seres humanos a expressão de IGF-I no exercício físico agudo possui efeitos que, dentro do esperado, contrariam as concepções de qualidade de vida, por se tratar de um fator de estresse para o organismo. No entanto, o treinamento parece, também neste aspecto, reverter os valores encontrados no exercício físico agudo, transformando-os em algo mais próximo do que seria esperado para a saúde. Este achado concorda com estudos recentes que mostram uma grande lacuna no conhecimento a respeito das implicações do exercício físico agudo para a qualidade de vida (Ploeger *et al.*, 2009) e enfatiza, mais uma vez, a necessidade de um programa de exercícios físicos em longo prazo.

Analisando a afirmação anterior e levando em conta o tecido hepático, a expressão gênica do IGF-I de ratos sedentários é maior. Provavelmente este aumento possa ser levado em consideração quando analisados os efeitos do IGF-I sistêmico aumentado em longo prazo. O IGF-I é essencial para o desenvolvimento e o crescimento de todos os vertebrados (Wood *et al.*, 2005). Além do seu papel no crescimento, o IGF-I é importante para o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central, tecidos esqueléticos e órgão reprodutivos. Mas, níveis anormalmente altos de IGF-I são encontrados, também, em várias células tumorais (LeRoith & Roberts, 2003). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem que altos níveis de IGF-I são fatores de risco para câncer de mama, próstata, cólon e pulmão (LeRoith & Roberts, 2003). A expressão gênica de IGF-I no músculo sóleo é maior em SE do que em TE, o que também concorda com as características dos outros tecidos.

As alterações na expressão gênica hepática parecem estar relacionadas ao treinamento crônico visto que sedentários exercitados (SE) têm maior expressão gênica hepática de IGF-I do que treinados exercitados (TE). Esta diferença não é evidente quando suplementados, mas é bastante clara nos grupos sem suplementação. Isto mostra uma possível relação do aporte energético no IGF-I local. O grupo SES tem maior expressão gênica de IGF-I no fígado que o TES.

Esta diferença é significativa nos grupos sem suplementação, ou seja, não está relacionada ao carboidrato ingerido quando comparados sedentários e treinados, visto que TES tem maior expressão gênica de IGF-I no músculo

gastrocnêmio que o SES. Apesar disso, dentre os animais treinados, os animais sem suplementação tem uma maior expressão gênica de IGF-1r e de IGF-1 no músculo gastrocnêmio, o que demonstra uma possível atenuação gerada pelos carboidratos no aumento da expressão gênica.

No grupo sedentário, essa relação se inverte e o grupo SNC tem a expressão gênica do IGF-1 no gastrocnêmio maior que o SNS. Tal relação demonstra que os carboidratos também parecem influenciar de forma significativa na expressão gênica de IGF-1, no entanto, o treinamento se sobressai a esta e, a mesma, só aparece quando se trata de grupos com animais sedentários.

Todas estas constatações demonstram que, conforme já apresentado em outros estudos, provavelmente exista uma necessidade de aumento na produção local de IGF-1 no tecido muscular. Este aumento condiz com uma necessidade de maior atividade autócrina deste hormônio.

No que diz respeito ao IGF-1 sistêmico, alguns estudos mostram aumento, diminuição e até ausência de alterações do IGF-1 após exercício físico crônico. Esta última condiz com os resultados do presente estudo, que mostrou apenas alterações de expressão gênica, mas não encontrou modificações séricas na concentração do mesmo (Mejri *et al.*, 2005; Karatay *et al.*, 2007; Bouhlel *et al.*, 2008). Estes achados são consistentes com a idéia que o IGF-1 produzido localmente tem um papel predominante e pode inclusive ter maior relevância que o IGF-1 circulante.

Se analisados para extrapolação, os dados relacionados à aptidão física mostram que os ratos deste estudo obtiveram uma grande melhora no VO_2

máx. medido indiretamente pelo teste máximo. As concentrações circulantes de IGF-I, como já descritas, estão relacionadas também à continuidade e até ao aparecimento de doenças, além das clássicas funções no crescimento ósseo e densidade do mesmo. O IGF-I circulante também se mostra como um marcador de saúde e aptidão física (Cannata *et al.*, 2010). Isto tudo corrobora possíveis respostas deste hormônio ao balanço energético total e/ou ao fluxo energético do sistema metabólico, definido como o nível absoluto de ingestão energética e gasto sob condições de balanço energético (Zhu *et al.*, 2005; Haspolat *et al.*, 2007). Esta afirmação poderia explicar diversas respostas do IGF-I ao exercício físico agudo e ao treinamento com suplementação, visto que o fluxo energético e a ingestão energética são bastante variáveis nos grupos e também na comparação entre os diversos estudos afins. No que dizem respeito ao exercício físico intermitente, as variações de rotas metabólicas podem propiciar maior discrepância ainda em relação aos protocolos mais estudados, que são o exercício físico aeróbio e o anaeróbio.

O exercício físico é caracterizado por alterações nos níveis de hormônios circulantes, os quais resultam em produção aumentada de glicose para corresponder às demandas energéticas corporais elevadas (Jeukendrup & Jentjens, 2000). Durante o exercício físico prolongado, o glucagon aumenta enquanto a insulina diminui. Além disto, a elevação nas concentrações de glicocorticóides durante o exercício físico poderia também levar a um aumento na absorção intestinal de glicose (Shepherd *et al.*, 2004). O impacto do exercício físico no fluxo sanguíneo esplâncnico poderia potencialmente levar a

alterações na absorção intestinal em exercício físico, sendo assim pequenas mudanças na microcirculação dos vasos que perfundem o intestino poderiam facilitar a absorção de glicose (Leiper *et al.*, 2005).

Por todas estas razões algumas características já descritas como facilitadoras do esvaziamento gástrico e promotoras de uma melhor absorção intestinal dos monossacarídeos precisam ser consideradas. Como, por exemplo, a temperatura do líquido e a concentração do mesmo, que foram levadas em conta neste trabalho. Mas, ainda podem ser consideradas limitações, que venham a ser sanadas em um próximo experimento, outras variáveis relacionadas à absorção intestinal.

No presente estudo, a corticosterona se apresentou elevada em todos os grupos exercitados. Quando duas situações são levadas em conta associadas (estresse dos sedentários + exercício físico agudo) sobrepõe-se o efeito do sedentarismo no aumento dos níveis de corticosterona, já que, entre os exercitados de forma aguda, os sedentários apresentam maiores concentrações deste hormônio (SEC>TEC).

Algumas discrepâncias observadas entre os resultados dos diversos estudos acerca do IGF-I e de suas proteínas ligantes podem ser explicadas pelos diferentes níveis de treinamento, aptidão física, composição corporal, sexo, ciclo claro/escuro, protocolo de experimentação e idade das pessoas e/ou animais pesquisados (Manetta *et al.*, 2003). Isto dificulta a comparação deste estudo com outros já descritos. Como exemplo, poder-se-ia citar este como o primeiro experimento a avaliar as respostas do eixo GH/IGF-I em

exercício físico intermitente com ciclo de luz invertido. Isto faz com que as pesquisas que incluem ratos treinados na luz possam ter sofrido influências negativas desta característica.

O IGF-I circula no sangue tanto livre (meia vida de mais ou menos 15 a 20 minutos) quanto ligado a proteínas de ligação específicas que prolongam a meia vida do peptídeo. Diversas IGFBPs já foram identificadas e constituem um elaborado sistema para regulação da atividade do IGF-I. Como o fígado é a fonte primária de IGFBP-I, que pode atuar como um fator glicorregulatório, torna-se interessante estudar um paralelo entre a diminuição do glicogênio hepático durante o exercício físico e o aumento do IGFBP-I.

A proteína transportadora IGFBP-I apresentou valores maiores em TNS do que em SNS. Tal característica pode ser por um possível aumento da meia-vida plasmática do IGF-I em ratos treinados (Hopkins *et al.*, 1994; Frystyk, 2000), isto concordaria com a menor necessidade de produção do mesmo (baixa expressão gênica) e com a não alteração da concentração plasmática deste hormônio na forma livre.

O IGF-I liga tanto seus receptores quanto suas proteínas transportadoras com alta afinidade. O IGF-I é um importante fator envolvido na proliferação celular e no metabolismo. O IGF-I e as IGFBPs produzidos localmente regulam o crescimento e diferenciação tecidual. As IGFBPs parecem modular a ação do IGF-I de diversas maneiras. Uma delas seria um modelo inibitório no qual as IGFBPs sequestram o IGF-I de seu receptor, outra

forma é transportando o IGF-I até seu tecido alvo, a outra forma seria uma independente do IGF-Ir através de uma interação direta com receptores de IGFBP-I. As IGFBPs são reguladas por diversos fatores endócrinos. O quanto sua ação será importante parece depender de sua concentração relativa ao IGF-I. A modulação dos níveis de IGF-I pelas IGFBPs é também regulada pelas proteases dos IGFBPs que clivam estas em fragmentos de proteínas com baixa afinidade pelo IGF-I, aumentando assim a biodisponibilidade deste hormônio. Este processo leva a redução da inibição do crescimento pelas IGFBPs. As IGFBPs tem ações independentes do IGF-I já descritas na apoptose e sobrevivência celular (Perks & Holly, 2008).

Mais estudos são necessários para que se possa, enfim, comprovar que o exercício físico, embora seja uma forma de estresse quando praticado de forma aguda, pode, em longo prazo, estabelecer mudanças no eixo GH/IGF-I que permitam a prevenção e/ou tratamento de doenças crônico-degenerativas. A extrapolação de pesquisas em animais dar-se-á naturalmente com o aumento do número de experimentos nesta área. A compreensão da participação do IGF-I no metabolismo de carboidratos durante o exercício físico propiciará, também, o desenvolvimento de estratégias para melhoria do desempenho muscular. O efeito da manipulação de nutrientes na cinética e metabolismo muscular durante a recuperação permanece bastante inexplorado. Diversos estudos apontam para um aumento na síntese de proteína muscular pós-exercício físico com suplementação de carboidratos mais proteína, mas a grande maioria destes não é capaz de discernir se este

aumento da massa magra é devido a um aumento no aporte protéico ou simplesmente pelo aumento no consumo calórico (Koopman *et al.*, 2007; Beelen *et al.*, 2008; Howarth *et al.*, 2009).

A lacuna de pesquisas existente neste contexto e as próprias limitações do presente estudo tornam clara a necessidade de que sejam cumpridas, pelo menos, as etapas referentes às perspectivas deste trabalho para que se comece a compreender melhor todas as interações que fazem parte dos objetivos desta tese. Todo este papel de referência da nutrição no treinamento e no desempenho torna muito importante o estudo dos efeitos do treinamento em um contexto nutricional que seja relevante para os atletas ou pessoas que desejem uma vida mais ativa (De Bock *et al.*, 2008).

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que o exercício físico intermitente, quando praticado 5x/semana durante uma hora em ratos, é uma boa forma de treinamento. O protocolo criado para este estudo demonstrou aumentar o consumo máximo de oxigênio destes animais, visto que a cada novo teste máximo uma nova e superior velocidade máxima era alcançada pelos animais treinados.

As outras conclusões dar-se-ão relacionando as hipóteses do experimento com os resultados encontrados para cada uma das variáveis apresentadas:

O exercício físico intermitente, apesar de ser praticado em alta intensidade, previne picos de lactato sanguíneo. Embora tenha havido um aumento significativo no lactato sanguíneo dos grupos exercitados, os valores encontrados são bem inferiores àqueles relativos aos picos do exercício físico anaeróbio exclusivo.

Verificou-se que apenas no tecido hepático houve um aumento na concentração de glicogênio armazenada, o que vai ao encontro da hipótese que sugere uma economia das fontes endógenas de glicose. Ainda, o exercício físico agudo se mostrou uma forma de aumentar a expressão gênica de IGF-1, já com o treinamento esta variável se inverteu, fazendo com que houvesse uma redução nesta expressão. Assim, concluímos que o exercício físico agudo promove uma alteração no sentido de aumentar a expressão gênica de IGF-1 nos tecidos estudados e que o treinamento promove um efeito inverso.

O aumento da IGFBP-1 ocorreu somente quando comparados os ratos treinados com os sedentários (os treinados possuem maior concentração). No entanto, este aumento só é verificado quando comparados os grupos sem exercício físico agudo e sem suplementação, ou seja, sem a interferência de qualquer outra variável que não o treinamento.

Entre os ratos treinados foi encontrada maior expressão gênica de IGF-Ir no músculo gastrocnêmio daqueles que não receberam uma fonte exógena de glicose. Além disso, os ratos não exercitados apresentaram, neste experimento, níveis séricos de GH superiores em relação aos exercitados.

A corticosterona mostrou concentrações mais elevadas em ratos sedentários do que treinados, mesmo quando ambos os grupos foram submetidos a exercício físico agudo.

Assim, verifica-se que o efeito agudo do exercício físico praticado em cargas máximas pode, em alguns aspectos metabólicos, produzir resultados divergentes dos esperados em ratos. Já o treinamento físico tende a reverter os resultados destas variáveis.

8. PERSPECTIVAS

Poucos estudos mostram os fatores responsáveis pelas alterações hemodinâmicas geradas por esta forma de exercício físico, mas aprofundar este conhecimento poderá fazer com que se obtenha um esboço das relações do exercício físico intermitente com o crescimento, com a melhoria do sistema imunológico, com a prevenção de patologias e até mesmo com o tratamento das mesmas. São perspectivas para a continuidade deste estudo:

- Determinar a expressão protéica de IGF-I e IGF-Ir no músculo e fígado de ratos submetidos ao mesmo protocolo;
- Estudar o mesmo protocolo descrito com suplementação de creatina e carboidratos;
- Estudar o mesmo protocolo aumentando o tempo total de exercício físico para duas (2) horas;
- Estudar o mesmo protocolo utilizando duas sessões diárias de exercício físico;
- Estudar o mesmo protocolo inserindo algumas análises de variáveis relacionadas à absorção intestinal;
- Estudar o mesmo protocolo inserindo a avaliação das melhorias da atividade de algumas enzimas-chave no processo de treinamento.
- Repetir as análises em humanos, adaptando as características do estudo às normas éticas aceitáveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2000). Joint Position Statement: nutrition and athletic performance. American College of Sports Medicine, American Dietetic Association, and Dietitians of Canada. *Med Sci Sports Exerc* 32, 2130-2145.

Achten J & Jeukendrup AE (2004). Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition* 20, 716-727.

ADA A (2000). Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *J Am Diet Assoc* 100, 1543-1556.

Amit T, Youdim MB & Hochberg Z (2000). Clinical review 112: Does serum growth hormone (GH) binding protein reflect human GH receptor function? *J Clin Endocrinol Metab* 85, 927-932.

Anthony TG, Anthony JC, Lewitt MS, Donovan SM & Layman DK (2001). Time course changes in IGFBP-1 after treadmill exercise and postexercise food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E650-656.

Arkininstall MJ, Bruce CR, Clark SA, Rickards CA, Burke LM & Hawley JA (2004). Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. *J Appl Physiol* 97, 2275-2283.

Backhouse SH, Ali A, Biddle SJ & Williams C (2007). Carbohydrate ingestion during prolonged high-intensity intermittent exercise: impact on affect and perceived exertion. *Scand J Med Sci Sports* 17, 605-610.

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR & Efstratiadis A (1996). Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10, 903-918.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ & Efstratiadis A (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82.

Bauman WA, Spungen AM, Adkins RH & Kemp BJ (1999). Metabolic and endocrine changes in persons aging with spinal cord injury. *Assist Technol* 11, 88-96.

Beelen M, Tieland M, Gijsen AP, Vandereydt H, Kies AK, Kuipers H, Saris WH, Koopman R & van Loon LJ (2008). Coingestion of carbohydrate and protein hydrolysate stimulates muscle protein synthesis during exercise in young men, with no further increase during subsequent overnight recovery. *J Nutr* 138, 2198-2204.

Bexfield NA, Parcell AC, Nelson WB, Foote KM & Mack GW (2009). Adaptations to high-intensity intermittent exercise in rodents. *J Appl Physiol* 107, 749-754.

Bouhlef E, Zaouali M, Miled A, Tabka Z, Bigard X & Shephard R (2008). Ramadan fasting and the GH/IGF-1 axis of trained men during submaximal exercise. *Ann Nutr Metab* 52, 261-266.

Boulay MR, Song TM, Serresse O, Theriault G, Simoneau JA & Bouchard C (1995). Changes in plasma electrolytes and muscle substrates during short-term maximal exercise in humans. *Can J Appl Physiol* 20, 89-101.

Branchini G, Schneider L, Cericatto R, Capp E & Brum IS (2009). Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas. *Endocrine* 35, 459-466.

Brandou F, Savy-Pacaux AM, Marie J, Bauloz M, Maret-Fleuret I, Borrocoso S, Mercier J & Brun JF (2005). Impact of high- and low-intensity targeted exercise training on the type of substrate utilization in obese boys submitted to a hypocaloric diet. *Diabetes Metab* 31, 327-335.

Brooke MH & Kaiser KK (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23, 369-379.

Brooke MH, Williamson E & Kaiser KK (1971). The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch Neurol* 25, 360-366.

Brooks GA (1987). Amino acid and protein metabolism during exercise and recovery. *Med Sci Sports Exerc* 19, S150-156.

Brooks GA (1991). Current concepts in lactate exchange. *Med Sci Sports Exerc* 23, 895-906.

Brouns F & van der Vusse GJ (1998). Utilization of lipids during exercise in human subjects: metabolic and dietary constraints. *Br J Nutr* 79, 117-128.

Burke LM (1997). Nutrition for post-exercise recovery. *Aust J Sci Med Sport* 29, 3-10.

Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, Pichel JG & Varela-Nieto I (2001). Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci* 21, 7630-7641.

Cannata D, Vijayakumar A, Fierz Y & LeRoith D (2010). The GH/IGF-1 axis in growth and development: new insights derived from animal models. *Adv Pediatr* 57, 331-351.

Canton A, Trainer PJ, Martinez-Caceres E & Simo R (2006). Effect of growth hormone in an experimental model of protein hypercatabolism induced by glucocorticoids. *Horm Metab Res* 38, 556-562.

Carroll PV, Christ ER, Umpleby AM, Gowrie I, Jackson N, Bowes SB, Hovorka R, Croos P, Sonksen PH & Russell-Jones DL (2000). IGF-I treatment in adults with type 1 diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. *Diabetes* 49, 789-796.

Charbonneau A, Melancon A, Lavoie C & Lavoie JM (2005). Alterations in hepatic glucagon receptor density and in Gsalpha and Gialpha2 protein content

with diet-induced hepatic steatosis: effects of acute exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E8-14.

Charbonneau A, Unson CG & Lavoie JM (2007). High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise. *J Physiol* 579, 255-267.

Chatham JC (2002). Lactate -- the forgotten fuel! *J Physiol* 542, 333.

Clayton PE, Banerjee I, Murray PG & Renehan AG (2010). Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nat Rev Endocrinol*.

Clow A, Thorn L, Evans P & Hucklebridge F (2004). The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress* 7, 29-37.

Coggan AR, Swanson SC, Mendenhall LA, Habash DL & Kien CL (1995). Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am J Physiol* 268, E375-383.

Coker RH & Kjaer M (2005). Glucoregulation during exercise : the role of the neuroendocrine system. *Sports Med* 35, 575-583.

Costill DL (1991). Carbohydrate for athletic training and performance. *Bol Asoc Med P R* 83, 350-353.

Cotes JE (1955). The role of oxygen, carbon dioxide and lactic acid in the ventilatory response to exercise in patients with mitral stenosis. *Clin Sci (Lond)* 14, 317-328.

Crofton PM & Midgley PC (2004). Cortisol and growth hormone responses to spontaneous hypoglycaemia in infants and children. *Arch Dis Child* 89, 472-478.

Crowe FL, Key TJ, Allen NE, Appleby PN, Roddam A, Overvad K, Gronbaek H, Tjonneland A, Halkjaer J, Dossus L, Boeing H, Kroger J, Trichopoulou A, Dilis V, Trichopoulos D, Boutron-Ruault MC, De Lauzon B, Clavel-Chapelon F, Palli D, Berrino F, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-de-Mesquita HB, Vrieling A, van Gils CH, Peeters PH, Gram IT, Skeie G, Lund E, Rodriguez L, Jakyszyn P, Molina-Montes E, Tormo MJ, Barricarte A, Larranaga N, Khaw KT, Bingham S, Rinaldi S, Slimani N, Norat T, Gallo V, Riboli E & Kaaks R (2009). The association between diet and serum concentrations of IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-2, and IGFBP-3 in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 1333-1340.

Curi R, Lagranha CJ, Jr JRG, Pithon-Curi TC, Jr AHL, Pellegrinotti ÍL & Procopio J (2003). Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47, 135-143.

D'Ercole AJ, Ye P & O'Kusky JR (2002). Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* 36, 209-220.

De Bock K, Derave W, Eijnde BO, Hesselink MK, Koninckx E, Rose AJ, Schrauwen P, Bonen A, Richter EA & Hespel P (2008). Effect of training in the

fasted state on metabolic responses during exercise with carbohydrate intake. *J Appl Physiol* 104, 1045-1055.

De Bock K, Derave W, Ramaekers M, Richter EA & Hespel P (2007). Fiber type-specific muscle glycogen sparing due to carbohydrate intake before and during exercise. *J Appl Physiol* 102, 183-188.

De Feo P, Di Loreto C, Lucidi P, Murdolo G, Parlanti N, De Cicco A, Piccioni F & Santeusano F (2003). Metabolic response to exercise. *J Endocrinol Invest* 26, 851-854.

Denadai BS, Figueira TR, Favaro OR & Goncalves M (2004). Effect of the aerobic capacity on the validity of the anaerobic threshold for determination of the maximal lactate steady state in cycling. *Braz J Med Biol Res* 37, 1551-1556.

Donald KW, Gloster J, Harris EA, Reeves J & Harris P (1961). The production of lactic acid during exercise in normal subjects and in patients with rheumatic heart disease. *Am Heart J* 62, 494-510.

Duchman SM, Ryan AJ, Schedl HP, Summers RW, Bleiler TL & Gisolfi CV (1997). Upper limit for intestinal absorption of a dilute glucose solution in men at rest. *Med Sci Sports Exerc* 29, 482-488.

El Elj N, Lac G, Alya B, Lasram M, Zaouali M, Tabka Z, Kammoun A, Gharbi N & El Fezaa S (2010). Additive effect of diets and training on total insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in rats. *Ann Endocrinol (Paris)* 71, 297-302.

Enyeart JJ (2005). Biochemical and Ionic signaling mechanisms for ACTH-stimulated cortisol production. *Vitam Horm* 70, 265-279.

Fernandez-Pastor VJ, Ruiz M, Diego-Acosta AM, Avila C, Garcia JC, Perez F, Guirado F & Noguer N (1999). Metabolic and hormonal changes during aerobic exercise in distance runners. *J Physiol Biochem* 55, 7-16.

Ferrari P (2003). Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17, 575-589.

Foti M, Moukil MA, Dudognon P & Carpentier JL (2004). Insulin and IGF-1 receptor trafficking and signalling. *Novartis Found Symp* 262, 125-141; discussion 141-127, 265-128.

Fournier PA, Brau L, Ferreira LD, Fairchild T, Raja G, James A & Palmer TN (2002). Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133, 755-763.

Frystyk J (2000). Role of IGFBP-1 in glucose regulation? *Acta Paediatr* 89, 1025-1027.

Fueger PT, Heikkinen S, Bracy DP, Malabanan CM, Pencek RR, Laakso M & Wasserman DH (2003). Hexokinase II partial knockout impairs exercise-stimulated glucose uptake in oxidative muscles of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E958-963.

Fueger PT, Shearer J, Krueger TM, Posey KA, Bracy DP, Heikkinen S, Laakso M, Rottman JN & Wasserman DH (2005). Hexokinase II protein content is a determinant of exercise endurance capacity in the mouse. *J Physiol* 566, 533-541.

Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH & Brooks S (1993). Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol* 75, 712-719.

Geary N, Langhans W & Scharrer E (1981). Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am J Physiol* 241, R330-335.

George M, Ayuso E, Casellas A, Costa C, Devedjian JC & Bosch F (2002). Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109, 1153-1163.

Gibala M (2009). Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 34, 428-432.

Gibala MJ, Young ME & Taegtmeyer H (2000). Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168, 657-665.

Giesel VT, Reche M, Schneider L, Araujo LC, Scalco R, von Eye Corleta H & Capp E (2009). Effects of intermittent high-intensity exercise and carbohydrate supplementation on IGF-1 and glycogen of Wistar rats. *Growth Horm IGF Res* 19, 156-161.

Girard I & Garland T, Jr. (2002). Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol* 92, 1553-1561.

Glaister M (2005). Multiple sprint work : physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness. *Sports Med* 35, 757-777.

Goodlad RA, Lee CY, Gilbey SG, Ghatei MA & Bloom SR (1993). Insulin and intestinal epithelial cell proliferation. *Exp Physiol* 78, 697-705.

Goodwin GW & Taegtmeyer H (2000). Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H1490-1501.

Goodyear LJ, Hirshman MF, Napoli R, Calles J, Markuns JF, Ljungqvist O & Horton ES (1996). Glucose ingestion causes GLUT4 translocation in human skeletal muscle. *Diabetes* 45, 1051-1056.

Goodyear LJ, Hirshman MF, Smith RJ & Horton ES (1991). Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am J Physiol* 261, E556-561.

Greiwe JS, Hickner RC, Hansen PA, Racette SB, Chen MM & Holloszy JO (1999). Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. *J Appl Physiol* 87, 222-226.

Gulliford MC, Bicknell EJ, Pover GG & Scarpello JH (1989). Intestinal glucose and amino acid absorption in healthy volunteers and noninsulin-dependent diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 49, 1247-1251.

Gwinup G (1987). Weight loss without dietary restriction: efficacy of different forms of aerobic exercise. *Am J Sports Med* 15, 275-279.

Haff GG, Schroeder CA, Koch AJ, Kuphal KE, Comeau MJ & Potteiger JA (2001). The effects of supplemental carbohydrate ingestion on intermittent isokinetic leg exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 41, 216-222.

Hakkinen K, Pakarinen A, Alen M, Kauhanen H & Komi PV (1988). Neuromuscular and hormonal responses in elite athletes to two successive strength training sessions in one day. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57, 133-139.

Hargreaves M (2004). Muscle glycogen and metabolic regulation. *Proc Nutr Soc* 63, 217-220.

Harmer AR, McKenna MJ, Sutton JR, Snow RJ, Ruell PA, Booth J, Thompson MW, Mackay NA, Stathis CG, Crameri RM, Carey MF & Eager DM (2000). Skeletal muscle metabolic and ionic adaptations during intense exercise following sprint training in humans. *J Appl Physiol* 89, 1793-1803.

Harrison M, O'Gorman DJ, McCaffrey N, Hamilton MT, Zderic TW, Carson BP & Moyna NM (2009). Influence of acute exercise with and without carbohydrate replacement on postprandial lipid metabolism. *J Appl Physiol* 106, 943-949.

Haspolat K, Ece A, Gurkan F, Atamer Y, Tutanc M & Yolbas I (2007). Relationships between leptin, insulin, IGF-1 and IGFBP-3 in children with energy malnutrition. *Clin Biochem* 40, 201-205.

Hawley JA (2004). Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* 20, 383-393.

Hebestreit H, Meyer F, Htay H, Heigenhauser GJ & Bar-Or O (1996). Plasma metabolites, volume and electrolytes following 30-s high-intensity exercise in boys and men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 72, 563-569.

Helge JW, Overgaard K, Damsgaard R, Sorensen K, Andersen JL, Dyrskog SE, Hermansen K, Saltin B & Wojtaszewski JF (2006). Repeated prolonged whole-body low-intensity exercise: effects on insulin sensitivity and limb muscle adaptations. *Metabolism* 55, 217-223.

Henriksen EJ, Bourey RE, Rodnick KJ, Koranyi L, Permutt MA & Holloszy JO (1990). Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am J Physiol* 259, E593-598.

Hew-Butler T, Noakes TD, Soldin SJ & Verbalis JG (2008). Acute changes in endocrine and fluid balance markers during high-intensity, steady-state, and prolonged endurance running: unexpected increases in oxytocin and brain natriuretic peptide during exercise. *Eur J Endocrinol* 159, 729-737.

Hoene M, Lehmann R, Hennige AM, Pohl AK, Haring HU, Schleicher ED & Weigert C (2009). Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise. *J Physiol* 587, 241-252.

Holloszy JO (2005). Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 99, 338-343.

Hopkins NJ, Jakeman PM, Hughes SC & Holly JM (1994). Changes in circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) during prolonged exercise: effect of carbohydrate feeding. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1887-1890.

Howarth KR, Moreau NA, Phillips SM & Gibala MJ (2009). Coingestion of protein with carbohydrate during recovery from endurance exercise stimulates skeletal muscle protein synthesis in humans. *J Appl Physiol* 106, 1394-1402.

Howlett KF, Sakamoto K, Yu H, Goodyear LJ & Hargreaves M (2006). Insulin-stimulated insulin receptor substrate-2-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity is enhanced in human skeletal muscle after exercise. *Metabolism* 55, 1046-1052.

Ivy JL (1991). Muscle glycogen synthesis before and after exercise. *Sports Med* 11, 6-19.

Jeukendrup AE (2004). Carbohydrate intake during exercise and performance. *Nutrition* 20, 669-677.

Jeukendrup AE & Jentjens R (2000). Oxidation of carbohydrate feedings during prolonged exercise: current thoughts, guidelines and directions for future research. *Sports Med* 29, 407-424.

Ji Y, Snyder EM, Fridley BL, Salavaggione OE, Moon I, Batzler A, Yee VC, Schaid DJ, Joyner MJ, Johnson BD & Weinshilboum RM (2008). Human phenylethanolamine N-methyltransferase genetic polymorphisms and exercise-induced epinephrine release. *Physiol Genomics* 33, 323-332.

Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M & Bangsbo J (2004). Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E245-251.

Karacabey K, Saygin O, Ozmerdivenli R, Zorba E, Godekmerdan A & Bulut V (2005). The effects of exercise on the immune system and stress hormones in sportswomen. *Neuro Endocrinol Lett* 26, 361-366.

Karatay S, Yildirim K, Melikoglu MA, Akcay F & Senel K (2007). Effects of dynamic exercise on circulating IGF-1 and IGFBP-3 levels in patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 26, 1635-1639.

Kenyon CJ (2010). The genetics of ageing. *Nature* 464, 504-512.

Kharitonova IV, Gornushkina E, Nikolaev VI & Ovchinnikov BV (2000). [The reaction characteristics of the endocrine and cardiovascular systems in persons with different types of temperament to emotional stress]. *Fiziol Cheloveka* 26, 121-125.

Kimber NE, Heigenhauser GJ, Spriet LL & Dyck DJ (2003). Skeletal muscle fat and carbohydrate metabolism during recovery from glycogen-depleting exercise in humans. *J Physiol* 548, 919-927.

Knechtle B (2004). [Energy turnover in endurance exercise]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 93, 457-468.

Koopman R, Beelen M, Stellingwerff T, Pennings B, Saris WH, Kies AK, Kuipers H & van Loon LJ (2007). Coingestion of carbohydrate with protein does not further augment postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E833-842.

Kostic N, Caparevic Z, Marina D, Ilic S, Radojkovic J, Cosic Z, Celic V, Pencic B & Radojkovic I (2009). Impact of acute exercise on antioxidant enzymes activity and lipid status in blood of patients with hypertension. *Vojnosanit Pregl* 66, 695-699.

Koziris LP, Hickson RC, Chatterton RT, Jr., Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG & Unterman TG (1999). Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J Appl Physiol* 86, 1436-1442.

Kraemer WJ (1988). Endocrine responses to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 20, S152-157.

Kraemer WJ & Ratamess NA (2005). Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 35, 339-361.

Kristiansen S, Gade J, Wojtaszewski JF, Kiens B & Richter EA (2000). Glucose uptake is increased in trained vs. untrained muscle during heavy exercise. *J Appl Physiol* 89, 1151-1158.

Krustrup P, Aagaard P, Nybo L, Petersen J, Mohr M & Bangsbo J (2010). Recreational football as a health promoting activity: a topical review. *Scand J Med Sci Sports* 20 Suppl 1, 1-13.

Krustrup P & Bangsbo J (2001). Physiological demands of top-class soccer refereeing in relation to physical capacity: effect of intense intermittent exercise training. *J Sports Sci* 19, 881-891.

Lancha AH, Jr., Recco MB & Curi R (1994). Pyruvate carboxylase activity in the heart and skeletal muscles of the rat. Evidence for a stimulating effect of exercise. *Biochem Mol Biol Int* 32, 483-489.

Lavoie C, Peronnet F & Chiasson JL (1992). Role of the sympathoadrenal system in the regulation of glycogen metabolism in resting and exercising skeletal muscles. *Horm Metab Res* 24, 266-271.

Lavoie JM, Cardin S & Doiron B (1989). Influence of hepatic vagus nerve on pancreatic hormone secretion during exercise. *Am J Physiol* 257, E855-859.

Lavoie JM, Fillion Y, Couturier K & Corriveau P (2002). Evidence that the decrease in liver glycogen is associated with the exercise-induced increase in IGFBP-1. *J Appl Physiol* 93, 798-804; discussion 797.

Lecoultre V, Benoit R, Carrel G, Schutz Y, Millet GP, Tappy L & Schneiter P (2010). Fructose and glucose co-ingestion during prolonged exercise increases lactate and glucose fluxes and oxidation compared with an equimolar intake of glucose. *Am J Clin Nutr* 92, 1071-1079.

Lehninger A. L.; Nelson DL (2000). *Principles of Biochemistry* W.H. Freeman & Company.

Leiper JB, Nicholas CW, Ali A, Williams C & Maughan RJ (2005). The effect of intermittent high-intensity running on gastric emptying of fluids in man. *Med Sci Sports Exerc* 37, 240-247.

LeRoith D (2008). Clinical relevance of systemic and local IGF-I: lessons from animal models. *Pediatr Endocrinol Rev* 5 Suppl 2, 739-743.

LeRoith D & Roberts CT, Jr. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195, 127-137.

Lewitt MS, Saunders H, Phyuat JL & Baxter RC (1994). Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in rat serum. *Diabetes* 43, 232-239.

Liu SQ (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int J Food Microbiol* 83, 115-131.

Lorentzen FV (1962). Lactic acid in blood after various combinations of exercise and hypoxia. *J Appl Physiol* 17, 661-664.

Louis-Sylvestre J (1987). [Insulin and physical exercise]. *Diabete Metab* 13, 152-156.

Manetta J, Brun JF, Fedou C, Maimoun L, Prefaut C & Mercier J (2003). Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-binding proteins-1 and -3 in

middle-aged and young athletes versus sedentary men: relationship with glucose disposal. *Metabolism* 52, 821-826.

Manetta J, Brun JF, Prefaut C & Mercier J (2005). Substrate oxidation during exercise at moderate and hard intensity in middle-aged and young athletes vs sedentary men. *Metabolism* 54, 1411-1419.

Marliss EB & Vranic M (2002). Intense exercise has unique effects on both insulin release and its roles in glucoregulation: implications for diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 1, S271-283.

Mastorakos G & Pavlatou M (2005). Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Horm Metab Res* 37, 577-584.

Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E & Chrousos GP (2005). Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)* 4, 73-89.

Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR, D'Ercole AJ, Bell GI, Brinster RL & Palmiter RD (1988). Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 123, 2827-2833.

Maughan RJ, Bethell LR & Leiper JB (1996). Effects of ingested fluids on exercise capacity and on cardiovascular and metabolic responses to prolonged exercise in man. *Exp Physiol* 81, 847-859.

Maughan RJ, Fenn CE & Leiper JB (1989). Effects of fluid, electrolyte and substrate ingestion on endurance capacity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 58, 481-486.

Maughan RJ & Leiper JB (1994). Fluid replacement requirements in soccer. *J Sports Sci* 12 Spec No, S29-34.

McAllister RM (1998). Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med Sci Sports Exerc* 30, 375-381.

McCartney N, Spriet LL, Heigenhauser GJ, Kowalchuk JM, Sutton JR & Jones NL (1986). Muscle power and metabolism in maximal intermittent exercise. *J Appl Physiol* 60, 1164-1169.

McFarlin BK, Flynn MG, Stewart LK & Timmerman KL (2004). Carbohydrate intake during endurance exercise increases natural killer cell responsiveness to IL-2. *J Appl Physiol* 96, 271-275.

McKenna MJ (1992). The roles of ionic processes in muscular fatigue during intense exercise. *Sports Med* 13, 134-145.

McMurray RG & Hackney AC (2005). Interactions of metabolic hormones, adipose tissue and exercise. *Sports Med* 35, 393-412.

ejri S, Bchir F, Ben Rayana MC, Ben Hamida J & Ben Slama C (2005). Effect of training on GH and IGF-1 responses to a submaximal exercise in football players. *Eur J Appl Physiol* 95, 496-503.

Melo RM, Martinho E, Jr. & Michelini LC (2003). Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 42, 851-857.

Merry TL & McConell GK (2009). Skeletal muscle glucose uptake during exercise: a focus on reactive oxygen species and nitric oxide signaling. *IUBMB Life* 61, 479-484.

Mitchell JB, Costill DL, Houmard JA, Fink WJ, Robergs RA & Davis JA (1989). Gastric emptying: influence of prolonged exercise and carbohydrate concentration. *Med Sci Sports Exerc* 21, 269-274.

Mohr M, Rasmussen P, Drust B, Nielsen B & Nybo L (2006). Environmental heat stress, hyperammonemia and nucleotide metabolism during intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol* 97, 89-95.

Mormede P, Courvoisier H, Ramos A, Marissal-Arvy N, Ousova O, Desautes C, Duclos M, Chaouloff F & Moisan MP (2002). Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 27, 563-583.

Morris JG, Nevill ME, Boobis LH, Macdonald IA & Williams C (2005). Muscle metabolism, temperature, and function during prolonged, intermittent, high-intensity running in air temperatures of 33 degrees and 17 degrees C. *Int J Sports Med* 26, 805-814.

Moses AC, Young SC, Morrow LA, O'Brien M & Clemmons DR (1996). Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes* 45, 91-100.

Moyer AE & Rodin J (1993). Fructose and behavior: does fructose influence food intake and macronutrient selection? *Am J Clin Nutr* 58, 810S-814S.

Nedic O, Masnikosa R & Lagundzin D (2010). Association between the Pattern of IGFBP-1 Alteration and the Glucose/Insulin Metabolic Control. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.

Noakes TD (1993). Fluid replacement during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 21, 297-330.

Norby FL, Wold LE, Duan J, Hintz KK & Ren J (2002). IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E658-666.

Nuutila P, Knuuti MJ, Heinonen OJ, Ruotsalainen U, Teras M, Bergman J, Solin O, Yki-Jarvinen H, Voipio-Pulkki LM, Wegelius U & et al. (1994). Different alterations in the insulin-stimulated glucose uptake in the athlete's heart and skeletal muscle. *J Clin Invest* 93, 2267-2274.

Pappenheimer JR (1990). Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: relation to body size. *Am J Physiol* 259, G290-299.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB & Saad MJ (2008). Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* 586, 659-671.

Pencek RR, Koyama Y, Lacy DB, James FD, Fueger PT, Jabbour K, Williams PE & Wasserman DH (2002). Transporter-mediated absorption is the primary route of entry and is required for passive absorption of intestinal glucose into the blood of conscious dogs. *J Nutr* 132, 1929-1934.

Perks CM & Holly JM (2008). IGF binding proteins (IGFBPs) and regulation of breast cancer biology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 455-469.

Philippou A, Maridaki M, Halapas A & Koutsilieris M (2007). The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In Vivo* 21, 45-54.

Piziak VK (1991). Medical management of obesity. *Compr Ther* 17, 54-59.

Ploeger HE, Takken T, de Greef MH & Timmons BW (2009). The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc Immunol Rev* 15, 6-41.

Pullen AH (1977a). The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat* 123, 467-486.

Pullen AH (1977b). The distribution and relative sizes of three histochemical fibre types in the rat tibialis anterior muscle. *J Anat* 123, 1-19.

Rasmussen P, Wyss MT & Lundby C (2010). Cerebral glucose and lactate consumption during cerebral activation by physical activity in humans. *FASEB J*.

Renaud JM (2002). Modulation of force development by Na⁺, K⁺, Na⁺ K⁺ pump and KATP channel during muscular activity. *Can J Appl Physiol* 27, 296-315.

Rengarajan S & Balasubramanian K (2007). Corticosterone has direct inhibitory effect on the expression of peptide hormone receptors, 11 beta-HSD and glucose oxidation in cultured adult rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 279, 52-62.

Riddell MC (2008). The endocrine response and substrate utilization during exercise in children and adolescents. *J Appl Physiol* 105, 725-733.

Robergs RA, Ghiasvand F & Parker D (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R502-516.

Roberts MD, Dalbo VJ, Sunderland KL, Poole CN, Hassell SE, Bembien D, Cramer J, Stout J & Kerksick CM (2010). IGF-1 splice variant and IGF-1 peptide expression patterns in young and old human skeletal muscle prior to and following sequential exercise bouts. *Eur J Appl Physiol* 110, 961-969.

Salvatori R, Fan X, Veldhuis JD & Couch R (2002). Serum GH response to pharmacological stimuli and physical exercise in two siblings with two new

inactivating mutations in the GH-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 147, 591-596.

Santos JM, Ribeiro SB, Gaya AR, Appell HJ & Duarte JA (2008). Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake. *Int J Sports Med* 29, 785-794.

Sasaki J, Shindo M, Tanaka H, Ando M & Arakawa K (1987). A long-term aerobic exercise program decreases the obesity index and increases the high density lipoprotein cholesterol concentration in obese children. *Int J Obes* 11, 339-345.

Schmitz KH, Ahmed RL & Yee D (2002). Effects of a 9-month strength training intervention on insulin, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein (IGFBP)-1, and IGFBP-3 in 30-50-year-old women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 1597-1604.

Schneider L, Branchini G, Cericatto R, Capp E & Brum IS (2009). Gene and protein expression of p53 and p21 in fibroadenomas and adjacent normal mammary tissue. *Endocrine* 35, 118-122.

Schott HC, 2nd, Bohart GV & Eberhart SW (2002). Potassium and lactate uptake by noncontracting tissue during strenuous exercise. *Equine Vet J Suppl*, 532-538.

Seki Y, Berggren JR, Houmard JA & Charron MJ (2006). Glucose transporter expression in skeletal muscle of endurance-trained individuals. *Med Sci Sports Exerc* 38, 1088-1092.

Shephard RJ & Leatt P (1987). Carbohydrate and fluid needs of the soccer player. *Sports Med* 4, 164-176.

Shepherd EJ, Helliwell PA, Mace OJ, Morgan EL, Patel N & Kellett GL (2004). Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. *J Physiol* 560, 281-290.

Sher J & Cardasis C (1976). Skeletal muscle fiber types in the adult mouse. *Acta Neurol Scand* 54, 45-56.

Skov-Jensen C, Skovbro M, Flint A, Helge JW & Dela F (2007). Contraction-mediated glucose uptake is increased in men with impaired glucose tolerance. *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 115-124.

Slentz CA, Aiken LB, Houmard JA, Bales CW, Johnson JL, Tanner CJ, Duscha BD & Kraus WE (2005). Inactivity, exercise, and visceral fat. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. *J Appl Physiol* 99, 1613-1618.

Sostaric SM, Skinner SL, Brown MJ, Sangkabuttra T, Medved I, Medley T, Selig SE, Fairweather I, Rutar D & McKenna MJ (2006). Alkalosis increases muscle K⁺ release, but lowers plasma [K⁺] and delays fatigue during dynamic forearm exercise. *J Physiol* 570, 185-205.

Sriwijitkamol A, Ivy JL, Christ-Roberts C, DeFronzo RA, Mandarino LJ & Musi N (2006). LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E925-932.

Stallknecht B, Vissing J & Galbo H (1998). Lactate production and clearance in exercise. Effects of training. A mini-review. *Scand J Med Sci Sports* 8, 127-131.

Stein JM & Padykula HA (1962). Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am J Anat* 110, 103-123.

Talanian JL, Galloway SD, Heigenhauser GJ, Bonen A & Spriet LL (2007). Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J Appl Physiol* 102, 1439-1447.

Tanisho K & Hirakawa K (2009). Training effects on endurance capacity in maximal intermittent exercise: comparison between continuous and interval training. *J Strength Cond Res* 23, 2405-2410.

Tenan MS, McMurray RG, Troy Blackburn B, McGrath M & Leppert K (2010). The relationship between blood potassium, blood lactate, and electromyography signals related to fatigue in a progressive cycling exercise test. *J Electromyogr Kinesiol.*

Tomas FM, Knowles SE, Owens PC, Chandler CS, Francis GL, Read LC & Ballard FJ (1992). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochem J* 282 (Pt 1), 91-97.

Trapp EG, Chisholm DJ & Boutcher SH (2007). Metabolic response of trained and untrained women during high-intensity intermittent cycle exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R2370-2375.

Trapp EG, Chisholm DJ, Freund J & Boutcher SH (2008). The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women. *Int J Obes (Lond)* 32, 684-691.

Tsintzas K & Williams C (1998). Human muscle glycogen metabolism during exercise. Effect of carbohydrate supplementation. *Sports Med* 25, 7-23.

Tsintzas K, Williams C, Boobis L, Symington S, Moorehouse J, Garcia-Roves P & Nicholas C (2003). Effect of carbohydrate feeding during recovery from prolonged running on muscle glycogen metabolism during subsequent exercise. *Int J Sports Med* 24, 452-458.

Turner AI, Rivalland ET, Clarke IJ & Tilbrook AJ Stressor specificity of sex differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity: cortisol responses to exercise, endotoxin, wetting, and isolation/restraint stress in gonadectomized male and female sheep. *Endocrinology* 151, 4324-4331.

Turner AP, Cathcart AJ, Parker ME, Butterworth C, Wilson J & Ward SA (2006). Oxygen uptake and muscle desaturation kinetics during intermittent cycling. *Med Sci Sports Exerc* 38, 492-503.

Utter AC, Kang J, Nieman DC, Dumke CL, McAnulty SR & McAnulty LS (2007). Carbohydrate attenuates perceived exertion during intermittent exercise and recovery. *Med Sci Sports Exerc* 39, 880-885.

Van Hall G (2000). Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand* 168, 643-656.

Van Handel E (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem* 11, 256-265.

Viru A (1992). Plasma hormones and physical exercise. *Int J Sports Med* 13, 201-209.

Viru A & Smirnova T (1995). Health promotion and exercise training. *Sports Med* 19, 123-136.

Von Duvillard SP, Braun WA, Markofski M, Beneke R & Leithauser R (2004). Fluids and hydration in prolonged endurance performance. *Nutrition* 20, 651-656.

Wallman K, Plant LA, Rakimov B & Maiorana AJ (2009). The effects of two modes of exercise on aerobic fitness and fat mass in an overweight population. *Res Sports Med* 17, 156-170.

Wasserman DH & Cherrington AD (1991). Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. *Am J Physiol* 260, E811-824.

Watt MJ (2009). Triglyceride lipases alter fuel metabolism and mitochondrial gene expression. *Appl Physiol Nutr Metab* 34, 340-347.

Watt MJ, Howlett KF, Febbraio MA, Spriet LL & Hargreaves M (2001). Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J Physiol* 534, 269-278.

Webster BA, Vigna SR & Paquette T (1986). Acute exercise, epinephrine, and diabetes enhance insulin binding to skeletal muscle. *Am J Physiol* 250, E186-197.

Welsh RS, Davis JM, Burke JR & Williams HG (2002). Carbohydrates and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med Sci Sports Exerc* 34, 723-731.

Weltman A, Weltman JY, Watson Winfield DD, Frick K, Patrie J, Kok P, Keenan DM, Gaesser GA & Veldhuis JD (2008). Effects of continuous versus intermittent exercise, obesity, and gender on growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4711-4720.

Wood AW, Duan C & Bern HA (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol* 243, 215-285.

oods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO & Clark AJ (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335, 1363-1367.

Yakar S, Kim H, Zhao H, Toyoshima Y, Pennisi P, Gavrilova O & Leroith D (2005). The growth hormone-insulin like growth factor axis revisited: lessons from IGF-1 and IGF-1 receptor gene targeting. *Pediatr Nephrol* 20, 251-254.

Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, Chernausek SD, Mejia W & Le Roith D (2001). Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* 50, 1110-1118.

Yamamura H & Negami AI (1984). [The interaction of glycogen particle and its metabolic enzymes in the regulation of glycogen metabolism]. *Seikagaku* 56, 1280-1288.

Young AA, Gedulin BR & Rink TJ (1996). Dose-responses for the slowing of gastric emptying in a rodent model by glucagon-like peptide (7-36) NH₂, amylin, cholecystokinin, and other possible regulators of nutrient uptake. *Metabolism* 45, 1-3.

Zderic TW, Schenk S, Davidson CJ, Byerley LO & Coyle EF (2004). Manipulation of dietary carbohydrate and muscle glycogen affects glucose uptake during exercise when fat oxidation is impaired by beta-adrenergic blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E1195-1201.

Zehnder M, Ith M, Kreis R, Saris W, Boutellier U & Boesch C (2005). Gender-specific usage of intramyocellular lipids and glycogen during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 37, 1517-1524.

Zelasko CJ (1995). Exercise for weight loss: what are the facts? *J Am Diet Assoc* 95, 1414-1417.

Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausek SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA & Clemens TL (2000). Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 141, 2674-2682.

Zhu Z, Jiang W, McGinley J, Wolfe P & Thompson HJ (2005). Effects of dietary energy repletion and IGF-1 infusion on the inhibition of mammary carcinogenesis by dietary energy restriction. *Mol Carcinog* 42, 170-176.

10. ANEXOS

10.1 Artigo

EFFECTS OF INTERMITTENT HIGH-INTENSITY EXERCISE AND CARBOHYDRATE SUPPLEMENTATION ON THE METABOLISM OF TRAINED RATS

Giesel, Vivian Treichel^{1,3,4}, Branchini, Gisele^{1,3,4}, Vinagre, Ana Paula Sommer⁶, Scalco, Rosana⁷, Von Eye, Klaus Maillard^{8,9}, Brum, Ilma Simoni^{3,4}, Corleta, Helena Von Eye^{2,3,5}, Capp, Edison^{1,2,3,4,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), ²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ³Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, ICBS, UFRGS; ⁵Núcleo Gerar de Reprodução Humana, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁶Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS; ⁷Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; ⁸Departamento de Tênis, Grêmio Náutico União, Porto Alegre, Brazil; ⁹Curso de Educação Física – Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, Brazil.

Running title: Hormonal alterations in intermittent exercise

Address for correspondence:

Vivian Treichel Giesel

Rua Castro Alves, 570/204 CEP 93310270 – Novo Hamburgo, RS

viviannho@yahoo.com.br

FAX: 051 3308 6588

ABSTRACT

Introduction: Intermittent, high-intensity exercise and carbohydrate supplementation are nonpharmacological methods of hormonal alteration frequently used in the present day. **Objective:** To verify the effects of administering a 10% glucose solution during high-intensity intermittent exercise on gene expression and hormone serum concentrations in rats. **Methods:** 40 Male Wistar rats were divided into 8 groups: TEC (trained, exercised with carbohydrate supplementation), TES (trained, exercised without carbohydrate supplementation), TNC (trained, nonexercised with carbohydrate supplementation), TNS (trained, nonexercised without carbohydrate supplementation), SEC (sedentary, exercised with carbohydrate supplementation), SES (sedentary, exercised without carbohydrate supplementation), SNC (sedentary, nonexercised with carbohydrate supplementation), SNS (sedentary nonexercised without carbohydrate supplementation). The exercise and/or training protocol consists of 1 minute running on a treadmill at 110% of maximum test and 30 seconds at 40% of this rate, for a total of 60 minutes (90 days training). Blood was analyzed for glycemia, lactate, IGF-I, IGFBP-I, corticosterone and GH. Analyses of glycogen and gene expression were carried out on the liver tissue and the soleus and gastrocnemius muscles. **Results:** GH showed highest values in the non exercised groups. The gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle was higher in trained than in the trained animals. **Conclusion:** Acute exercise in rats may, in some hormones, produce different results from those expected, since the prolonged training tends to reverse these concentrations.

Key words: intermittent exercise; hormonal alterations; carbohydrates.

INTRODUCTION

Intermittent exercise is cyclic and relies on all energetic systems and is presently the type of exercise most practiced in fitness clubs and training centers. Carbohydrate supplementation is described in the literature as promoting improvement in physical performance for those who do exercise (Reznik Dolins *et al.*, 2003; Jeukendrup, 2004). It is important to know what effects physical training done with intermittent exercise and carbohydrate supplementation has on endocrine responses.

Growth hormone (GH) is a hormone produced in a pulsating flow by the anterior pituitary gland and is regulated by three peptides: GHRH (stimulus), somatostatin (inhibitor) and ghrelin (which acts synergistically with GHRH) . Synthesis and secretion of GH are also regulated by several factors, such as blood glucose, neurotransmitters, and gonadal steroids (Clayton *et al.*, 2010). Binding of GH to its receptor stimulates the synthesis and secretion of insulin-like growth factor-1 (IGF-I).

Both IGF-I and IGF-II are polypeptides structurally related to pro-insulin and are evolutionarily-conserved peptide structures (Roberts *et al.*, 2010). IGF-I is a polypeptide of 7.5 kDa that plays an important role in the regulation of somatic growth, metabolism, and cell proliferation, and in the deference and prevention of apoptosis. IGF-I is produced locally in a number of tissues; however, most synthesis and secretion occurs in the liver. The production of

IGF-I is controlled by GH and alterations in the expression of GH receptors in the target tissues may affect IGF-I synthesis.

The transcription of the IGF-I gene has considerable variability. Nutritional factors are important regulators in the synthesis of IGF-I (Cannata *et al.*, 2010) and this regulation could be the key factor in studies relating IGF-I to supplementation.

Most IGF-I actions are mediated by the IGF-I bound to a single receptor with high affinity, called receptor type I or an IGF-I receptor (IGF-Ir) (Cannata *et al.*, 2010). In addition, IGF-I in tissues and in the serum is linked to insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), which modulate the action of IGF-I. IGFBP-I is a low molecular weight protein (approximately 30 kDa) produced by the liver. It is a local modulator and is the only one capable of rapid fluctuation and marked changes in the plasma, responding to changes in the concentrations of insulin and glucose. It has been proposed that IGFBP-I exerts an effect on glucose regulation through the control of bioactivity of free IGFs in the circulation (Frystyk, 2000; Nedic *et al.*, 2010).

Physical exercise produces hormonal alterations responsible for various organic modifications. However, some suggested modifications to the endocrine system resulting from exercise remain controversial. Some studies show an increase, others a reduction, and some no changes in IGF-I after chronic exercise (Mejri *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005; Karatay *et al.*, 2007). These

findings are consistent with the idea that IGF-I produced locally takes a predominant role and could also have greater relevance than circulating IGF-I.

However, recent studies have shown that circulating IGF-I is related to growth and bone density, as well as the progression and development of diseases. These findings reflect the physiological significance of circulating IGF-I as a biomarker of changes in health and physical fitness profiles (Stuart & Page, 2010).

The distinct effects of exercise on the circulating IGF-I could be attributed to the diverse variations in food intake and level of physical fitness. It is currently suggested that rather than just responding to the total energy balance, the IGF-I system is responsive to the energy flux of the metabolic system, defined as the absolute level of energy intake and expenditure under conditions of energy balance (Zhu *et al.*, 2005; Haspolat *et al.*, 2007).

The objective of this study is to assess the effect of intermittent exercise with carbohydrate supplementation on endocrine responses related to the metabolism of glucose, GH, IGF-I, and their binding proteins.

METHODS

Ethical and Biosafety aspects

This study was approved by the research ethics committee at the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* and carried out according to the

recommendations of the International Norms for the Protection of Animals and of COBEA (*Código Brasileiro de Experimentação Animal* – Brazilian Code on Animal Experimentation)–1988 and in accordance with the Guide for Care and Use of Lab Animals of the National Institutes of Health.

Study population

Forty (40) Male Wistar rats (60 days old) were acquired from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (the State Foundation for Production and Research in Health) (FEPPS) and acclimatized for 2 weeks in an ambient temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The rats were kept in cages with five rats in each cage, and exposed to an inverted light cycle (light/dark for 12 hours each cycle) and fed daily with Nuvilab commercial dried food with water *ad libitum*.

Experimental protocols

The rats were divided into eight groups of five rats each, based on training, acute exercise, and carbohydrate (glucose 10%) supplementation. The groups were as follows: trained, exercised, and given carbohydrate supplementation (TEC); trained and exercised but with no carbohydrate supplementation (TES); trained but not exercised and given carbohydrate supplementation (TNC); (trained, but not exercised and no carbohydrate

supplementation (TNS); sedentary (no training), exercised and given carbohydrate supplementation (SEC); sedentary and exercised but with no carbohydrate supplementation (SES); sedentary with no exercise but given carbohydrate supplementation (SNC); and sedentary, with no exercise or carbohydrate supplementation (SNS) (Figure 1).

All rats were put through a 3-month adaptation protocol and were kept on dried food and water ad libitum. Trained rats were subjected to a training protocol during which they were exercised daily (5 times per week) for 3 months. Exercised rats were put through an acute exercise regimen (the maximum test) on the day of the experiment. Carbohydrate supplementation consisted of water and glucose 10%; those given no carbohydrate supplementation received only water.

Adaptation protocol: The adaptation protocol consists of running on a treadmill intermittently at low speeds (3 m/min) for 5 consecutive days for 10, 20, 30, 40 and 50 minutes per day of training.

Training protocol: Training was done 5 times a week (Monday to Friday) for 60 minutes a day intermittently for 3 months. Training was always conducted in the dark. Half of the rats were exercised on the treadmill, 5 times a week. The intermittent training sessions consisted of 1 minute of exercise (with a load equivalent to 110% of their maximum speeds as detected by the maximum test) and 30 seconds of lower speeds (40%) for a total of 60 minutes and were carried out in the morning. The maximum test was performed on a

monthly basis, and the speeds were readjusted according to the level of training. The rats belonging to the sedentary group went through a similar protocol, but were placed on the treadmill while it was turned off .

Maximum Test Protocol: The maximum test protocol consisted of graduated exercise on the treadmill with an increase in speed of 5 m per minute every 3 minutes. The starting speed was 5 m per minute, and the limit was the maximum intensity for each animal.

On the day of the experiment, all food was removed from the cages at 6:00 a.m., and the tests were carried out between 9:00 a.m. and 12:00 noon. All the rats were weighed before the exercise (T0) and a drop of blood was collected from the tail of the animal to determine lactate and glucose concentrations. Immediately after measuring the blood glucose and lactate, glucose was administered orally using a gavage syringe. The rats that were in the groups without carbohydrate supplementation were given the same volume (1 mL) of water only.

The protocol for exercise on this day consisted of 1 minute of running on the treadmill at 110% of the final maximum test speed and 30 seconds at 40% of this speed for a total of 60 minutes, conducted in the morning. Immediately following exercise, the rats were taken off the treadmill and immobilized. A sample of blood was taken once again, using a lancet, to measure blood glucose and lactate (T60). Following that, the rats were sacrificed by cervical displacement. The abdominal cavity was opened and

blood collected by cardiac puncture in 500 μ L tubes. A fragment of the left lobe of the liver, followed by samples of gastrocnemius and soleus muscle tissue were removed, identified, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The blood was centrifuged and the serum stored for hormone testing.

Determination of glucose and serum Lactate levels

Glucose concentrations were determined using a glucometer Advantage II. A lactate analyzer (Accusport) was used to determine lactate levels. The glycogen extraction was done following the method of Van Handel (Van Handel, 1965). The values were determined by means of equivalents of glucose (glucose oxidase method) after acid hydrolysis (using HCl) and neutralization (Na_2CO_3) and were done using the methods of Geary et al (Geary *et al.*, 1981). The results were expressed as milligrams per gram of tissue.

Assays for insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor binding protein, growth hormone, and corticosterone

Serum IGF-I was measured after acid-ethanol extraction (40 μ L of serum and 160 μ L acid-ethanol). The mixture was incubated for 30 minutes at room temperature and centrifuged; 100 μ L of the supernatant was neutralized 1:6 before the analysis. The serum IGF-I was determined by radioimmunoassay (RIA) using an IGF-I RIA DSL-2900 Kit, as previously described. The IGF-I

binding protein (IGFBP-I) was tested using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Active®Total IGFBP-I ELISA, DSL, Diagnostic Systems Laboratories, INC, USA), as previously described. Growth hormone was tested with Linco's Research Rat Growth Hormone radioimmunoassay kit (RGH- 45 HK), as previously described. Corticosterone was tested with a Coat-a-Count Rat Corticosterone In-vitro Diagnostic test kit (DPC- Diagnostic Products Corporation, USA), as previously described.

Extraction of total RNA to determine gene expression of insulin-like growth factor-1 and its receptor

Samples of skeletal and liver muscle were homogenized and smoothed with 1 mL Trizol® (Invitrogen, Life Technologies) reagent, following the manufacturer's instructions. Total RNA of the homogenate was separated from DNA and other proteins by centrifuging (12000 times gravity) with chloroform for 15 minutes at 4°C, precipitated overnight with propanol, and then centrifuged again (12000 times gravity) for 15 minutes at 4°C. RNA was washed with ethanol 75% (at 8000 times gravity for 10 minutes at 4°C). The precipitate was dried at room temperature and was redissolved in water treated with diethylprocarbonate (DEPC) for 10 minutes at 60°C. Total RNA was stored at -20°C until the synthesis of complementary DNA (cDNA) was complete. The quantification was done using an absorption of 260 nm on the GeneQuant

apparatus (Pharmacia). The purity of the RNA was considered satisfactory when the ratio of absorbance at 260 and 280 nm was higher than 1.6.

Reaction in polymerase chain from reverse transcription to determine the gene expression of insulin-like growth factor-1 and its receptor

Synthesis of cDNA

The synthesis of cDNA was done from 1 µg of total RNA, using a Super Script First-Strand Synthesis System kit for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR; Invitrogen, Life Technologies) following the manufacturer's instructions. The RNA was denatured at 65°C for 5 minutes with Oligo(DT)12-18 primer and deoxyribonucleotides (dNTPs). Then a mixture of Tris-HCl 200 mmol/L (pH 8.4) buffer with potassium chloride (KCl) 50 mmol/L, magnesium chloride (MgCl₂) 25 mmol/L, dithiothreitol 0.1mol/L, and 40 units of recombinant ribonuclease inhibitor (RNaseOUT) and incubated for 2 minutes at 42°C. After that, 50 units of reverse transcriptase enzyme was added and incubated at 42°C for 50 minutes. After denaturing again at 70°C for 15 minutes to inhibit enzyme activity, the mixture was incubated with 2 units of ribonuclease H (isolated from *Escherichia coli*) for 20 minutes at 37°C. For the reaction, there was a total volume of 21 µL, which was stored at -20°C until amplification by PCR was complete.

General protocol for the PCR

The reactions were performed in a final volume of 50 μL following an adaptation of the protocol suggested by Invitrogen (Life Technologies). Two μL of the sample of cDNA (corresponding to 2 ng of cDNA) were initially denatured at 94°C for 2 minutes in the presence of Tris-HCl 20 mmol/L (pH 8.4) with KCl 50 mmol/L and MgCl_2 50 mmol/L. After receiving 10 μL of a mixture containing the same concentrations as the buffer and MgCl_2 , specific sense and antisense oligonucleotides (100 nmol/L), of the deoxynucleotide triphosphates (dNTPs, 0.2 mmol/L) and of the Taq DNA polymerase enzyme (30 $\mu\text{U}/\mu\text{L}$) mixture were added.

The primers used for the amplification of fragments of cDNA specific for each mRNA in the study were designed using the Primer 3 program and tested in relation to the identity of its sequence with the sequence of the gene sequence in question. Table 1 summarizes the placement and sequence of the oligonucleotides used in this study, as well as the size of the fragments of amplified cDNA. The oligonucleotides for the β -actin gene (normalizer gene used) were synthesized by Invitrogen, Life Technologies, and those for the IGF-I and IGF-Ir (receptor) genes, by Gene Link.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare sample means between groups. The student t-test was used post hoc for the parametric variables and the Mann Whitney test for nonparametric variables. Pearson's correlation was calculated to determine the association between variables. The different values at time zero were adjusted for an analysis of covariance (ANCOVA). Data were analyzed using PEPI 3.0 and SPSS 17.0 programs. Results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

All the rats gained weight during the training, as experiments were conducted over several months. The values presented in table 2 refer to the last day of training protocol (pre-acute exercise).

Glycogen

Liver glycogen concentrations were greater in trained rats (T) when compared to sedentary rats (S) ($P = 0.002$) after 60 minutes of high intensity, intermittent exercise (table 2 and figure 3). This difference remained when only rats that exercised were compared. Liver glycogen was greater in the trained and exercised groups (TE) than in the sedentary and exercised groups (SE) ($P = 0.001$). When carbohydrate supplementation was also taken into consideration, the TEC group had a higher liver glycogen concentration than the

SEC group ($P = 0.002$). However, supplementation did not appear to be a determining factor for glycogen concentration, as the nonsupplemented TES group had more glycogen in the liver than the rats in the SES group ($P = 0.005$). Glycogen concentrations in both liver and muscle tissue were greater in the nonexercised group compared with the exercised groups, both sedentary and trained ($P = 0.001$).

Blood glucose

Pre-exercise blood glucose concentrations (T0) were different among the sedentary groups and the trained groups, and were significantly higher in the trained groups (table 3; $P = 0.025$). Considering the rats had still not been submitted to gavage with exogenous glucose, this difference had not been expected and could produce an error in the analysis of the results at 60 minutes (T60). To account for this finding, an ANCOVA was carried out and the means corrected by time zero. After the correction, there was no difference at time zero (T0), nor at 60 minutes (T60) nor in the variation (delta, i.e. T60 -T0).

Lactate

The serum lactate concentrations measured pre-exercise showed no difference between the groups (table 3). After 60 minutes of exercise, considering the whole sample, only the sedentary groups had a different serum

lactate concentration compared with the trained groups. When sedentary and trained exercised groups and nonexercised groups were compared, there was greater lactate variation (delta) ($P = 0.013$) in those exercised (Figure 2).

Reverse transcription polymerase chain reaction

The gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle of trained rats was greater than that in the sedentary rats ($P = 0.002$; Figure 4). This relationship seemed to be due to training and not to isolated acute exercise, since the gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle was greater in the trained exercised groups than in the sedentary exercised groups ($P = 0.001$). This difference seemed to be driven by the groups with no glucose supplementation, since there was greater gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle of the TES group compared with the SES group ($P < 0.001$). In addition, among all trained rats, those with no glucose supplementation had greater gene expression of IGF-Ir and IGF-I in the gastrocnemius muscle ($P = 0.037$ and $P = 0.004$, respectively). In the sedentary group, this relationship was inverted and there was greater gene expression of IGF-I in the gastrocnemius in the SNC group than in the SNS group ($P = 0.007$).

In the liver tissue, gene expression of IGF-I in sedentary rats was greater ($P = 0.024$) when compared to trained rats. This relationship was maintained when only those rats that were subjected to acute exercise were

considered. There was greater gene expression of IGF-I in the sedentary exercised rats than in the trained exercised groups ($P = 0.03$; Figure 5). However, this difference was not apparent when glucose supplementation was given, but persisted in the group with no supplementation. There was greater gene expression of IGF-I in the liver in the SES group than in the TES group ($P = 0.012$). Supplementation of the sedentary nonexercised rats resulted in greater IGF-I and IGF-Ir expression in the SNC than in the SNS group ($P = 0.026$ and $P = 0.023$, respectively). Pearson's correlation showed that as the gene expression of IGF-I in the liver increased, it also increased in its receptor ($r = 0.52$ and $P = 0.001$).

Insulin-like growth factor-I in soleus muscle tissue

Gene expression of IGF-I in soleus muscle tissue was greater in the sedentary exercised groups compared with the trained exercised groups ($P = 0.049$), which was consistent with gene expression in the liver tissue. These findings appear to be due primarily to the non-supplemented groups, since the rats in the SES group had greater gene expression of IGF-I in the soleus muscle than in the TES group ($P = 0.047$).

When comparing nonexercised groups (either sedentary or trained) with exercised groups (either sedentary or trained) on the day of the experiment, there was a significant difference in IGF-I and IGF-Ir gene expression in the

soleus muscle tissue (Figure 6; $P = 0.010$. $P = 0.021$). No differences in serum IGF-I were seen between any of the treatment groups (Table 2).

Growth hormone (GH)

Total GH concentrations were significantly different between groups that did no exercise on the day of the experiment (sedentary or trained) and groups that exercised (sedentary or trained) (table 3; Figure 7; $P = 0.028$). In addition, there was a positive correlation between GH and both IGF-1r ($r = 0.45$, $P < 0.005$) and IGF-I ($r = 0.41$, $P = 0.009$) gene expression in the liver; the correlation with corticosterone, however, was negative ($r = 0.32$ $P < 0.05$).

Corticosterone

Corticosterone, a stress-related hormone, was present at higher levels in sedentary rats ($P = 0.030$) than trained rats. These higher values were also seen in rats subjected to acute exercise, since this was a type of stress both in trained and sedentary groups (S+T) ($P = 0.005$). Corticosterone serum concentrations were 23% higher (680.436 ng/mL) in the sedentary rats (S) compared with trained rats (T) (550.926 ng/mL).

Insulin-like growth factor binding protein-1

The protein transporter IGFBP-I serum concentration was different only when comparing the TNS and SNS groups. The IGFBP-I concentrations in the TNS group (1.1064 ng/mL) were approximately 36% greater than that seen in the SNS group (0.8104 ng/mL).

DISCUSSION

The main focus of the present study was the analysis of endocrine responses relative to the type of physical exercise most practiced in clubs, gyms, and training centers. The GH/IGF-I axis modulates or alters several metabolic responses in organisms. For example, a reduction in IGF-I levels is associated with type I diabetes. Treatment with IGF-I and improvement in the metabolism of proteins and glucose may lessen the severity of diabetic cardiomyopathy (Carroll *et al.*, 2000; Norby *et al.*, 2002). An increase in IGF-I expression in the pancreatic beta cells improves type I diabetes (George *et al.*, 2002), with an increase in insulin sensitivity and improvement in glycemic control seen in patients with type II diabetes (Moses *et al.*, 1996). The cyclic manner in which the metabolic routes are stimulated during intermittent exercise must exert differentiated effects on those observed when each metabolic route is considered individually.

An important feature about the present study is the use of an inverted light/dark cycle. It is known that rats have a biological cycle that makes their

metabolism more intense at night (in the dark). Therefore, at a time when the rats would normally be sleeping, forcing them to exercise in a light environment is aggressive and would be expected to produce a reduction in performance and hormone alterations in keeping with the night period, as is seen in similar research with human subjects. However, the hormone alterations present in this study seem to be more in keeping with the reality of the practice of physical exercise, and this is why we were able to obtain answers which are possibly more apt for extrapolation.

The results of this present study support data from previous literature showing that intermittent training increases the basal concentration of liver and muscle glycogen (Ivy, 1991; Fournier *et al.*, 2002; Hargreaves, 2004). The increase in concentration of this glucose polymer is independent from acute supplementation and was seen in the trained rats whether or not carbohydrate supplementation was given, which agrees with previously reported studies (Tsintzas *et al.*, 2003). However, the physiological stimulus of intense exercise induces a mechanism for fast and marked stimulation of oxidation of the exogenous substrates, which come from supplementation (Welsh *et al.*, 2002). For this reason, the intake of carbohydrates in liquid form enables constant efficiency in high level athletes during tests that involve several consecutive hours of intense muscle work (Glaister, 2005). Also, less use of muscle glycogen, accomplished by the use of orally administered glucose, is particularly important for the performance of short repetitive and fatiguing exercise cycles, such as soccer and basketball (Glaister, 2005).

For serum lactate concentrations, comparisons between exercised and nonexercised sedentary or trained rats showed greater lactate variation (delta) in exercised rats, which is in contrast to data from earlier studies. Our study showed a prevention of surges of lactate during intermittent exercise in trained rats (Giesel *et al.*, 2009). However, there seems to be a trend in these findings, since when all the sedentary groups and trained groups are considered, the sedentary rats had higher concentrations of serum lactate. Other studies confirm higher values of lactate in high intensity sessions alternating with periods for recuperation, where the presence of plasma catecholamines is the most probable factor in the increase in these concentrations (McAllister, 1998; Watt *et al.*, 2001).

There were differences in GH concentrations only when the exercised and nonexercised groups were compared. This suggests that GH is affected only by acute or intense periods of exercise, and not by chronic exercise. Also when groups were compared based on exercise (sedentary/trained with no exercise vs. sedentary/trained with exercise), a difference in gene expression of IGF-I and IGF-Ir in the soleus muscle tissue was seen.

A positive correlation was seen between GH and the gene expression of IGF-Ir and IGF-I in the liver, with a negative correlation between GH and corticosterone found. However, these correlations, although present, are somewhat dependent on other factors (Pascual *et al.*, 1995; Robson *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2009), which could make it difficult to visualize these results with greater clarity. More extensive studies on this single aspect are

necessary to be able to detect to what degree this correlation is due specifically to GH.

In this experiment, the gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle of trained rats was greater than that of the sedentary rats. This effect may be related to acute exercise rather than training alone. This suggestion is supported by that fact that the difference in the gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle was greater in training/exercised groups than in the sedentary/exercised groups; but no differences were seen when training/nonexercised and sedentary/nonexercised groups were compared. Data such as this demonstrate that, similar to other physiological parameters, expression of IGF-I is expectedly affected by acute exercise, which is a stress factor for any organism. However, training appears to modify this effect of a stressor and return values closer to what would be expected without the stress factor. These findings agree with recent studies that show a large gap in knowledge regarding the implications of acute exercise on quality of life (Ploeger *et al.*, 2009) and emphasizes, once more, the need for a long-term exercise program.

Looking at the previous statement and looking at the findings for liver tissue, the gene expression of IGF-I in sedentary rats was greater. The long-term effects of increased systemic IGF-I should be taking into consideration. Insulin-like growth factor-1 is essential for the development and growth of all vertebrates (Wood *et al.*, 2005). In addition, IGF-I is important for the development and maturation of the central nervous system, skeletal tissues and

reproductive organs. However, abnormally high levels of IGF-I are also found in certain tumor cells (LeRoith & Roberts, 2003). Epidemiological studies have suggested that high levels of IGF-I are a risk factor for breast, prostate, colon, and lung cancers (LeRoith & Roberts, 2003). The gene expression of IGF-I in the soleus muscle tissue was greater in the sedentary/exercised group compared with the trained/exercised group, which is in agreement with the findings in other tissues.

The changes in gene expression in the liver seem to be related to chronic training since there was greater gene expression of IGF-I in the sedentary/exercised group compared with the trained/exercised group. This difference was not evident when the rats were supplemented with carbohydrates, but was very apparent in the groups with no supplementation. This shows a possible relationship with the energy intake by local IGF-I. In the SES group there was greater gene expression of IGF-I in the liver than in the TES group.

This difference was significant in the groups with no carbohydrate supplementation; carbohydrate supplementation did not appear to affect the results when sedentary and trained rats were compared, since the TES group showed greater gene expression of IGF-I in the gastrocnemius muscle than the SES group. Nevertheless, among the trained rats, there was greater gene expression of IGF-Ir and IGF-I in the gastrocnemius muscle in the rats with no supplementation, which demonstrates possible mitigation of gene expression by carbohydrates.

In the sedentary group this relationship was inverted. In the SNC group the gene expression of IGF-I in the gastrocnemius was greater than in the SNS group. Such a relationship shows that carbohydrates also seem to have an important relationship with the gene expression of IGF-I. However, training may negate this relationship, since it only appeared when dealing with groups of sedentary rats. All these findings show that, based on results from other studies, there likely exists a need to increase local production of IGF-I in the muscle tissue. This increase reflects the need to increase local production to improve the autocrine activity of this hormone.

For circulating IGF-I, outcomes of studies have varied, with some studies showing an increase, others a reduction, and some even no alteration in IGF-I after chronic exercise. This latter effect is consistent with the results of this present study, which only showed alterations in gene expression, but not with IGF-I serum concentrations (Mejri *et al.*, 2005; Karatay *et al.*, 2007; Bouhlel *et al.*, 2008). These findings support the idea that IGF-I produced locally has a predominant role and could possibly have greater relevance than circulating IGF-I.

Circulating IGF-I, as already described, is related to the continuation and appearance of diseases, in addition to its classic functions on bone growth and density. Circulating IGF-I is also a marker of health and physical aptitude (Cannata *et al.*, 2010). This all explains possible responses of this hormone to the total energy balance and/or the energy flux of the metabolic system, defined as the absolute level of energy intake and expenditure under conditions of

energy balance (Zhu *et al.*, 2005; Haspolat *et al.*, 2007). This statement could explain several IGF-I responses to acute exercise and to training with carbohydrate supplementation, since the energy flux and intake are somewhat different between the study groups and also in comparison to several related studies. The variations in metabolism seen with intermittent exercise may show still greater discrepancies to the protocols most studied.

In liver tissue, carbohydrate supplementation to sedentary nonexercised rats seems to produce greater IGF-I and IGF-Ir expression. A correlation was seen that shows that as the gene expression of IGF-I increases, that of its receptor also increases. This relationship between gene expression of the hormone and the receptor only became evident in liver tissue, probably due to the importance of autocrine and paracrine actions of this hormone in the tissue under analysis (Yakar *et al.*, 2001; Economou *et al.*, 2008).

Corticosterone was high in all of the exercised groups. When the two conditions of sedentary and acute exercise are taken into account and associated (stress in the sedentary group plus acute exercise), the effect of being sedentary enhances the increase of corticosterone concentrations, since among those subjected to acute exercise, the sedentary group had greater concentrations of this hormone (SEC > TEC).

Discrepancies observed between the results of various studies on IGF-I and its binding proteins may be explained, in part, by the different levels of training, physical fitness, body composition, sex, experiment protocol, and age

of the people and/or animals included in the trials (Manetta *et al.*, 2003). These differences make it difficult to compare results to other research already described. For example, this current research could be cited as the first experiment to assess responses of the GH/IGF-I axis with intermittent exercise under an inverted light cycle. It is known that rats have accelerated night metabolism, which makes it possible that all research conducted on trained rats in the light may have had a negative influence on this effect.

The transporter protein IGFBP-I was present at higher values in the TNS group than in the SNS group. Such a finding might be due to the fact that the plasma half-life of IGF-I is increased in trained rats (Hopkins *et al.*, 1994; Frystyk, 2000). This would imply less of a need to produce the hormone (low gene expression) and with no alteration in the plasma concentration of this hormone in free form.

The principal conclusion of this study is that physical exercise, when practiced inconsistently, may, from some metabolic aspects, be harmful. Physical training, however, appears to be a requirement for the improvement of physical fitness variables. More studies are needed so that it can be finally proven that, physical exercise (although a form of stress when the exercise is intense) may, in the long run, establish changes in the GH/IGF-I axis that allow the prevention and/or treatment of chronic degenerative diseases. Understanding the metabolism of carbohydrates during exercise will also aid in the development of strategies for the improvement of muscle performance.

Bibliography

- Bouhlef E, Zaouali M, Miled A, Tabka Z, Bigard X & Shephard R (2008). Ramadan fasting and the GH/IGF-1 axis of trained men during submaximal exercise. *Ann Nutr Metab* **52**, 261-266.
- Cannata D, Vijayakumar A, Fierz Y & LeRoith D (2010). The GH/IGF-1 axis in growth and development: new insights derived from animal models. *Adv Pediatr* **57**, 331-351.
- Carroll PV, Christ ER, Umpleby AM, Gowrie I, Jackson N, Bowes SB, Hovorka R, Croos P, Sonksen PH & Russell-Jones DL (2000). IGF-I treatment in adults with type 1 diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. *Diabetes* **49**, 789-796.
- Clayton PE, Banerjee I, Murray PG & Renehan AG (2010). Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nat Rev Endocrinol*.
- Economou MA, All-Ericsson C, Bykov V, Girnita L, Bartolazzi A, Larsson O & Seregard S (2008). Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: intercorrelation and prognostic implications. *Acta Ophthalmol* **86 Thesis 4**, 20-25.
- Fournier PA, Brau L, Ferreira LD, Fairchild T, Raja G, James A & Palmer TN (2002). Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 755-763.
- Frystyk J (2000). Role of IGFBP-1 in glucose regulation? *Acta Paediatr* **89**, 1025-1027.
- Geary N, Langhans W & Scharrer E (1981). Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am J Physiol* **241**, R330-335.
- George M, Ayuso E, Casellas A, Costa C, Devedjian JC & Bosch F (2002). Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* **109**, 1153-1163.
- Giesel VT, Reche M, Schneider L, Araujo LC, Scalco R, von Eye Corleta H & Capp E (2009). Effects of intermittent high-intensity exercise and

- carbohydrate supplementation on IGF-1 and glycogen of Wistar rats. *Growth Horm IGF Res* **19**, 156-161.
- Glaister M (2005). Multiple sprint work : physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness. *Sports Med* **35**, 757-777.
- Hargreaves M (2004). Muscle glycogen and metabolic regulation. *Proc Nutr Soc* **63**, 217-220.
- Haspolat K, Ece A, Gurkan F, Atamer Y, Tutanc M & Yolbas I (2007). Relationships between leptin, insulin, IGF-1 and IGFBP-3 in children with energy malnutrition. *Clin Biochem* **40**, 201-205.
- Hopkins NJ, Jakeman PM, Hughes SC & Holly JM (1994). Changes in circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) during prolonged exercise: effect of carbohydrate feeding. *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 1887-1890.
- Ivy JL (1991). Muscle glycogen synthesis before and after exercise. *Sports Med* **11**, 6-19.
- Jeukendrup AE (2004). Carbohydrate intake during exercise and performance. *Nutrition* **20**, 669-677.
- Karatay S, Yildirim K, Melikoglu MA, Akcay F & Senel K (2007). Effects of dynamic exercise on circulating IGF-1 and IGFBP-3 levels in patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* **26**, 1635-1639.
- LeRoith D & Roberts CT, Jr. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* **195**, 127-137.
- Manetta J, Brun JF, Fedou C, Maimoun L, Prefaut C & Mercier J (2003). Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-binding proteins-1 and -3 in middle-aged and young athletes versus sedentary men: relationship with glucose disposal. *Metabolism* **52**, 821-826.
- McAllister RM (1998). Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med Sci Sports Exerc* **30**, 375-381.
- Mejri S, Bchir F, Ben Rayana MC, Ben Hamida J & Ben Slama C (2005). Effect of training on GH and IGF-1 responses to a submaximal exercise in football players. *Eur J Appl Physiol* **95**, 496-503.
- Moses AC, Young SC, Morrow LA, O'Brien M & Clemmons DR (1996). Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes* **45**, 91-100.

- Nedic O, Masnikosa R & Lagundzin D (2010). Association between the Pattern of IGFBP-1 Alteration and the Glucose/Insulin Metabolic Control. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.
- Norby FL, Wold LE, Duan J, Hintz KK & Ren J (2002). IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E658-666.
- Pascual M, Larralde J & Martinez JA (1995). Organ-specific effects and interactions of acute insulin-like growth factor I (IGF-I) and growth hormone (GH). *Growth Dev Aging* **59**, 181-191.
- Ploeger HE, Takken T, de Greef MH & Timmons BW (2009). The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc Immunol Rev* **15**, 6-41.
- Reznik Dolins K, Boozer CN, Stoler F, Bartels M, DeMeersmane R & Contento I (2003). Effect of variable carbohydrate intake on exercise performance in female endurance cyclists. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **13**, 422-435.
- Roberts MD, Dalbo VJ, Sunderland KL, Poole CN, Hassell SE, Bemben D, Cramer J, Stout J & Kerksick CM (2010). IGF-1 splice variant and IGF-1 peptide expression patterns in young and old human skeletal muscle prior to and following sequential exercise bouts. *Eur J Appl Physiol* **110**, 961-969.
- Robson H, Siebler T, Shalet SM & Williams GR (2002). Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatr Res* **52**, 137-147.
- Stuart JA & Page MM (2010). Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species. *Mech Ageing Dev* **131**, 591-598.
- Tsintzas K, Williams C, Boobis L, Symington S, Moorehouse J, Garcia-Roves P & Nicholas C (2003). Effect of carbohydrate feeding during recovery from prolonged running on muscle glycogen metabolism during subsequent exercise. *Int J Sports Med* **24**, 452-458.
- Van Handel E (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem* **11**, 256-265.
- Wagner C, Caplan SR & Tannenbaum GS (2009). Interactions of ghrelin signaling pathways with the GH neuroendocrine axis: a new and experimentally tested model. *J Mol Endocrinol* **43**, 105-119.

- Watt MJ, Howlett KF, Febbraio MA, Spriet LL & Hargreaves M (2001). Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J Physiol* **534**, 269-278.
- Welsh RS, Davis JM, Burke JR & Williams HG (2002). Carbohydrates and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 723-731.
- Wood AW, Duan C & Bern HA (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol* **243**, 215-285.
- Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, Chernausek SD, Mejia W & Le Roith D (2001). Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* **50**, 1110-1118.
- Zhu Z, Jiang W, McGinley J, Wolfe P & Thompson HJ (2005). Effects of dietary energy repletion and IGF-1 infusion on the inhibition of mammary carcinogenesis by dietary energy restriction. *Mol Carcinog* **42**, 170-176.

Tables

Table 1. Characteristics of the primers used for the enlargement of specific cDNA fragments.

Gene		Nucleotides	Sequence	Fragment
β-actin	Sense	457 - 477	5' ACCTTCAACACCCCAGCCATG 3'	309 pb
	Antisense	765 - 745	5' GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC 3'	
IGF-I	Sense	49 – 68	5' TGCTTGCTCACCTTTACCA 3'	212 pb
	Antisense	260 - 241	5' TACATCTCCAGCCTCCTCA 3'	
IGF-Ir	Sense	3238 - 3258	5' CGGTTGCTGGGTGTAGTATC 3'	201pb
	Antisense	3438 - 3418	5' CTTGTTGGCATTGAGGTAGG 3'	

Table 2. Body mass and glycogen concentration

Group	Body Mass (g)	Hepatic Glycogen (mg/g)	Gastrocnemius glycogen (mg/g)	Soleus Glycogen (mg/g)
SNS	336.4 ± 29.90	3.06 ± 1.68	0.07 ± 0.05	0.47 ± 0.11
SNC	359.8 ± 48.94	2.66 ± 1.64	0.08 ± 0.04	0.28 ± 0.01
SEC	375 ± 29.86	1.71 ± 1.44	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.11
SES	362.4 ± 33.09	0.44 ± 0.41	0.04 ± 0.04	0.14 ± 0.07
TNS	359 ± 33.81	2.44 ± 1.13	0.11 ± 0.06	0.47 ± 0.13
TNC	342.8 ± 51.49	3.75 ± 1.93	0.05 ± 0.03	0.43 ± 0.17
TES	323.8 ± 7.6	3.53 ± 1.78	0.04 ± 0.02	0.18 ± 0.17
TEC	324.2 ± 21.22	5.77 ± 1.39	0.04 ± 0.02	0.37 ± 0.23

Values are means ± S.D. of n = 5/group

Group legends:

TEC - trained, exercised with carbohydrate supplementation

TES - trained, exercised without carbohydrate supplementation

TNC - trained, nonexercised with carbohydrate supplementation

TNS - trained, nonexercised without carbohydrate supplementation

SEC - sedentary, exercised with carbohydrate supplementation

SES - sedentary, exercised without carbohydrate supplementation

SNC - sedentary, nonexercised with carbohydrate supplementation

SNS - sedentary nonexercised without carbohydrate supplementation

Table 3. Blood Concentrations of Glucose, Lactate, IGF-I and GH

Group	Glicemia (T0) (mg/dL)	Glicemia (T60) (mg/dL)	Lactate (T0) (mmol/L)	Lactate (T60) (mmol/L)	IGF-I (ng/mL)	GH (ng/mL)
SNS	96.2 ± 13.1	90.2 ± 7.29	1.86 ± 0.56	1.58 ± 0.38	3457.78 ± 1128.9	22.37 ± 39.33
SNC	104.2 ± 18.45	96.2 ± 15.4	1.68 ± 0.45	1.38 ± 0.16	2732.62 ± 891.73	86.62 ± 132.28
SEC	110 ± 23.45	137.6 ± 32.65	1.62 ± 0.41	1.42 ± 0.65	2800 ± 469.17	2.25 ± 0.72
SES	93.4 ± 10.46	134.2 ± 22.55	1.72 ± 0.74	1.9 ± 1.1	3628.26 ± 1619.87	2.55 ± 0.88
TNS	127 ± 34.46	127 ± 34.46	1.86 ± 0.47	1.62 ± 0.51	2977.64 ± 1441.42	14.49 ± 15.77
TNC	116.2 ± 23.77	151.6 ± 59.31	1.86 ± 0.35	1.48 ± 0.43	2277.48 ± 897.35	10.75 ± 12.77
TES	102.2 ± 13.61	167.8 ± 51.98	1.26 ± 0.25	2.04 ± 1.02	3146.76 ± 993.17	2.68 ± 1.74
TEC	134.8 ± 48.24	159 ± 35.5	2.18 ± 0.46	2.26 ± 0.6	3134.34 ± 1177.1	8.35 ± 12.47

Values are means ± S.D. of n = 5/group

T0 – before exercise

T60 – after exercise

Group legends:

TEC - trained, exercised with carbohydrate supplementation

TES - trained, exercised without carbohydrate supplementation

TNC - trained, nonexercised with carbohydrate supplementation

TNS - trained, nonexercised without carbohydrate supplementation

SEC - sedentary, exercised with carbohydrate supplementation

SES - sedentary, exercised without carbohydrate supplementation

SNC - sedentary, nonexercised with carbohydrate supplementation

SNS - sedentary nonexercised without carbohydrate supplementation

Figure legends

Figure 1. Division of the experimental groups.

Figure 2. Lactate Variation (T60 – T0). Results presented in mmol/L.

Figure 3. Liver Glycogen (Sedentary X Trained). Results are presented in mg/g of tissue.

Figure 4. *IGF-1* gene expression in gastrocnemius (Sedentary X Trained). *Upper*: representative gel showing the amplified products by RT-PCR of *IGF-1* and β -*actin* (left = molecular weight marker). *Lower*: Medians and interquartile range of ratio *IGF-1*/ β -*actin* (arbitrary units).

Figure 5. *IGF-1* gene expression in liver of exercised rats. *Upper*: representative gel showing the amplified products by RT-PCR of *IGF-1* and β -*actin* (left = molecular weight marker). *Lower*: Medians and interquartile range of ratio *IGF-1*/ β -*actin* (arbitrary units).

Figure 6. *IGF-1* and *IGF-1r* gene expression in soleus. *Upper panel*: representative gel showing the amplified products by RT-PCR of *IGF-1*, *IGF-1r* and β -*actin* (left = molecular weight marker). *Lower*: Medians and interquartile range of ratio *IGF-1*/ β -*actin* and *IGF-1r*/ β -*actin* (arbitrary units).

Figure 7. Serum growth hormone (GH). Results are presented in μ g/L.

Figure 1

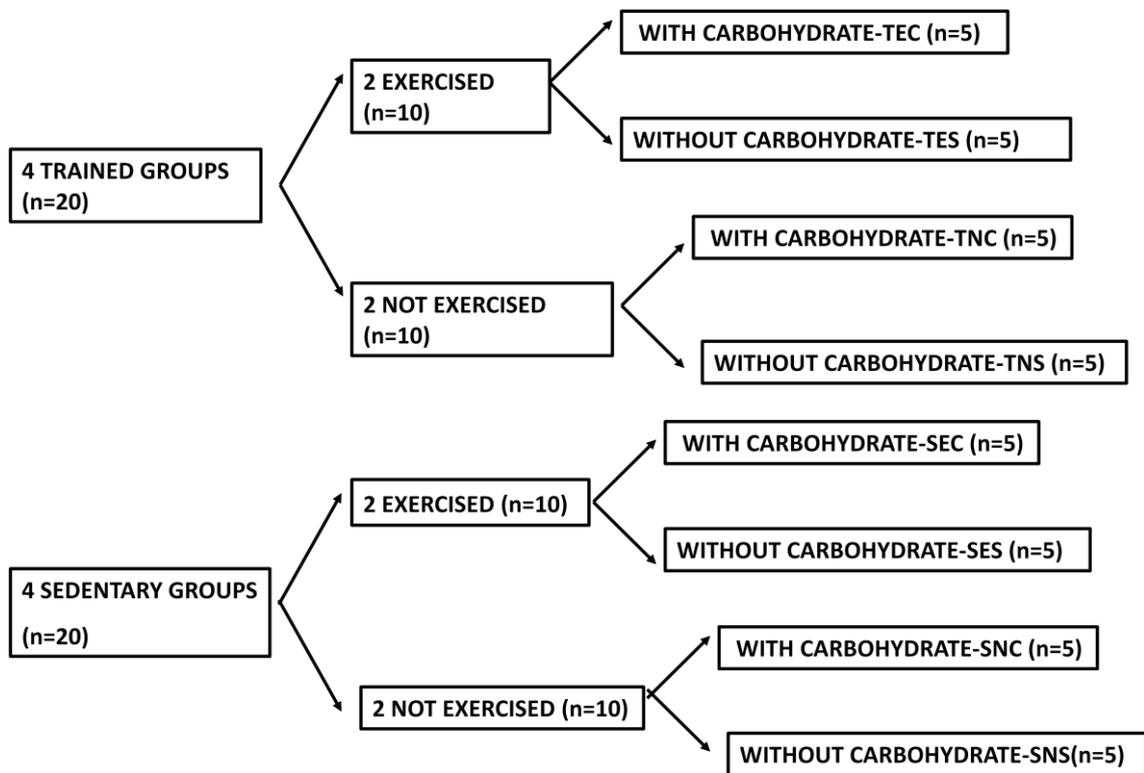
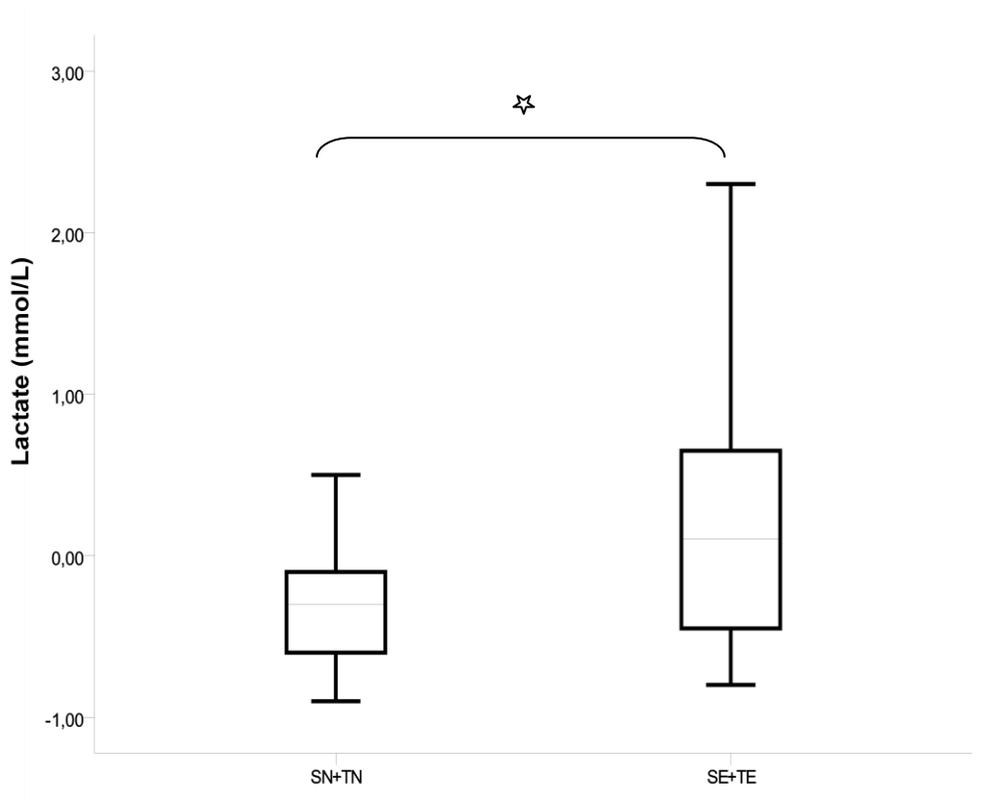


Figure 2

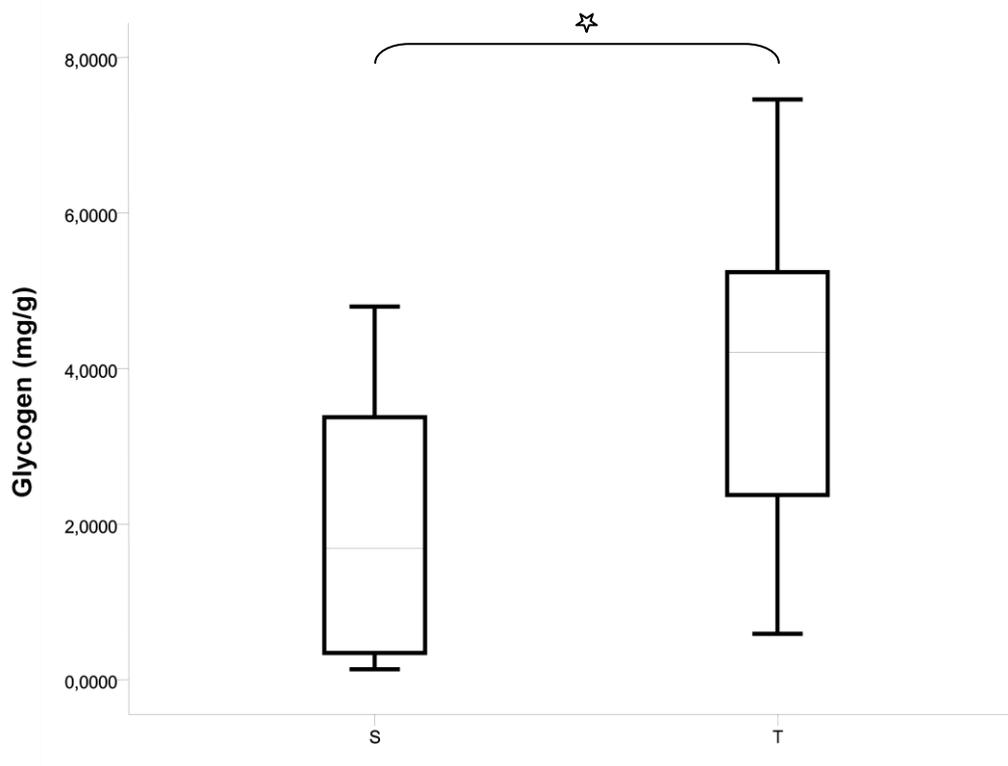


☆ $P = 0.013$

SN + TN: Trained and sedentary rats that did not exercised

SE + TE: Trained and sedentary rats that did acute exercise

Figure 3

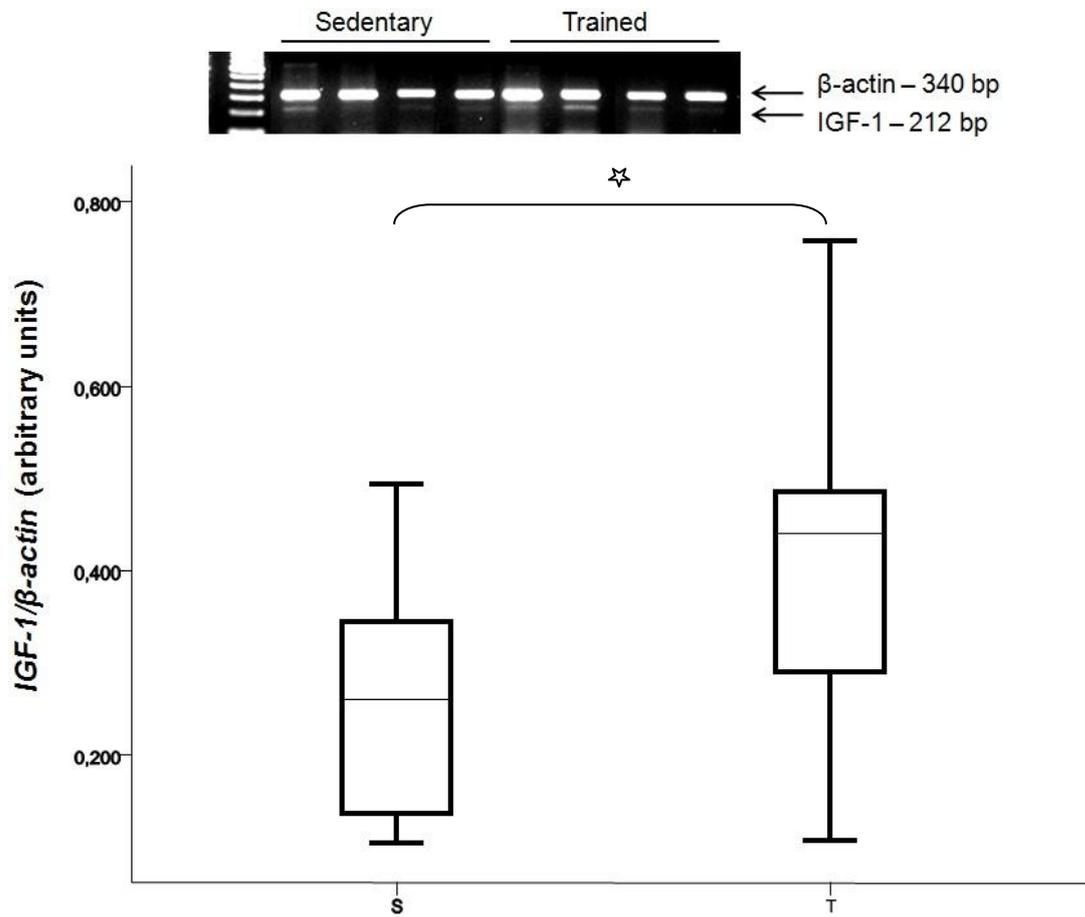


☆ $P = 0.002$

S: Sedentary rats

T: Trained rats

Figure 4

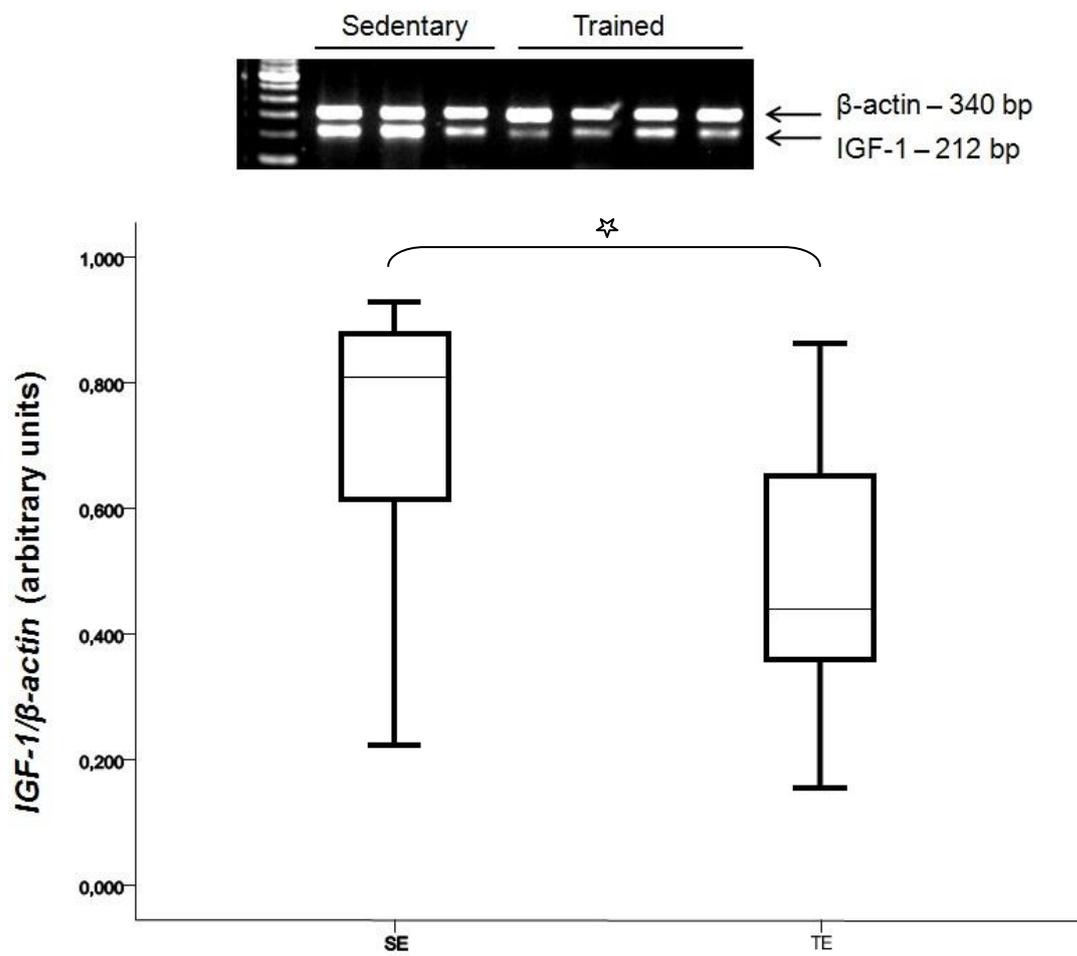


☆ $P = 0.002$

S: Sedentary rats

T: Trained rats

Figure 5

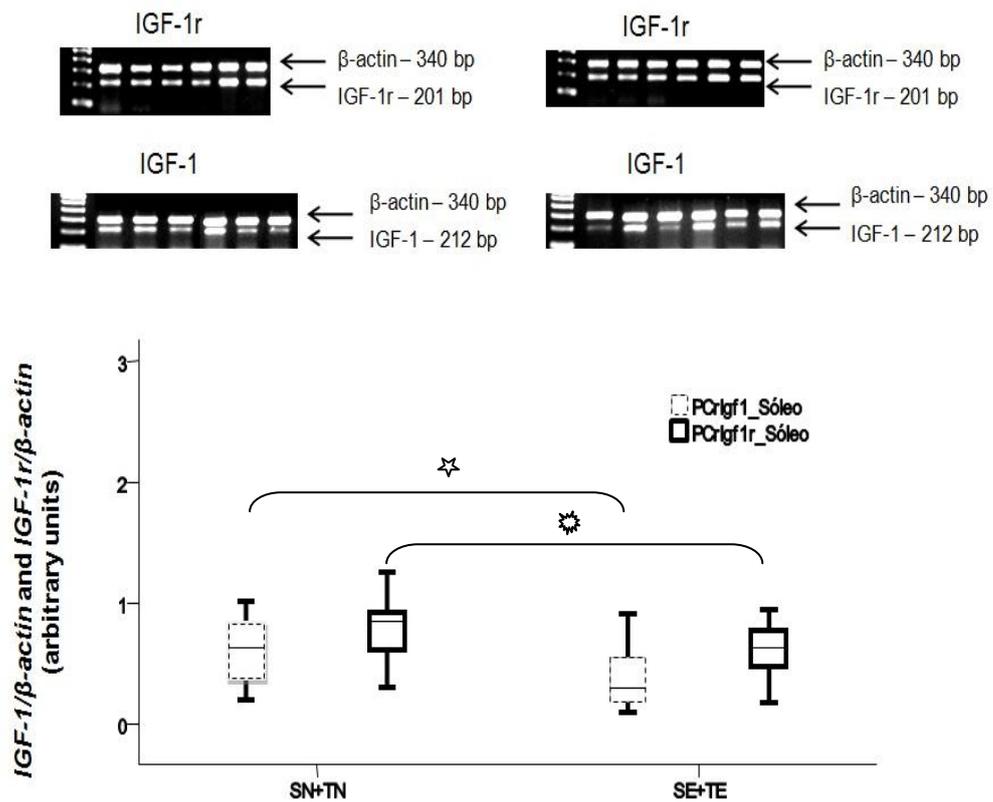


☆ $P = 0,03$

SE: Sedentary, exercised rats

TE: Trained, exercised rats

Figure 6



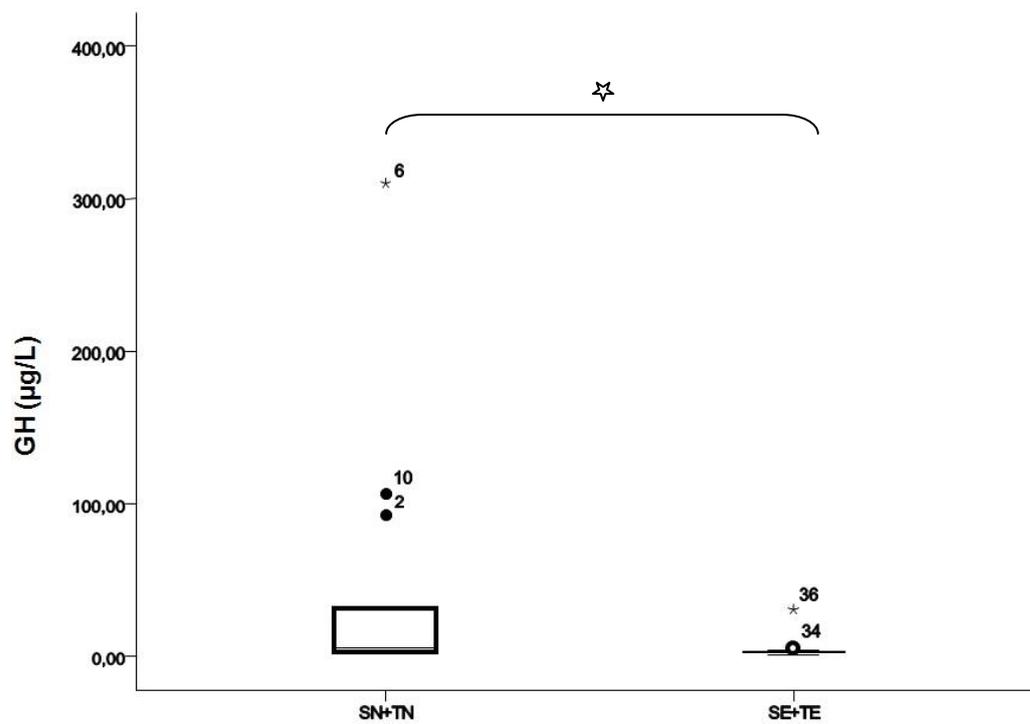
☆ $P = 0.010$

✨ $P = 0.021$

SN + TN: Trained and sedentary rats that did not exercised

SE + TE: Trained and sedentary rats that did acute exercise

Figure 7



☆ $P = 0.028$

SN + TN: Trained and sedentary rats that did not exercised

SE + TE: Trained and sedentary rats that did acute exercise