



18º Congresso de Iniciação Científica

AÇÃO DO PICOLINATO DE CROMO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DESNERVADO

Autor(es)

CAMILA MILIANI CAPELINI

Orientador(es)

CARLOS ALBERTO DA SILVA

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

A homeostasia energética das fibras musculares decorre da constância no suprimento de substratos metabólicos, sendo o principal deles a glicose, e da integridade das vias metabólicas. A absorção da glicose depende da insulina, da atividade metabólica tecidual ou ainda da elevação na atividade contrátil das fibras (ANDERSEN et al., 1993), sendo que o suprimento da hexose decorre da translocação de transportadores de glicose tipo GLUT 4 de reservatórios citosólicos para a membrana, favorecendo a elevação das reservas celulares que podem ser direcionadas à oxidação, geração de energia ou formação de reservatórios de glicogênio (KLIP e PAQUET, 1990).

Há um consenso no sentido de que o músculo desnervado difere do músculo normal (CODERRE et al., 1992). Concomitantes à secção da inervação motora ocorrem expressivas modificações relacionadas ao metabolismo de carboidratos pelas fibras, sendo merecedor de destaque a resistência à insulina, além de outros eventos associados, como redução na atividade das vias reguladoras do metabolismo de glicose, redução na captação de glicose, redução na expressão gênica do transportador GLUT4, e redução do metabolismo muscular da glicose, fatores que podem desencadear o processo de hipotrofia (MAGNUSSON et al., 2005).

Dentre os suplementos utilizados no meio esportivo, destaca-se o mineral cromo, cuja função primária é potencializar os efeitos da insulina e, desse modo, alterar o metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos (GOMES, ROGERO e TIRAPEGUI, 2005).

O cromo foi caracterizado como componente participante do mecanismo de amplificação da sinalização celular de insulina, ou seja, um fator colaborador do aumento da sensibilidade de receptores insulínicos na membrana plasmática (VINCENT, 1999).

2. Objetivos

Avaliar a ação do picolinato de cromo sobre o perfil metabólico do músculo esquelético desnervado bem como a sensibilidade tecidual à insulina.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados 24 ratos da raça Wistar, com 3 meses de idade, que foram mantidos em ambiente controlado com temperatura de $23\text{°C}\pm 2\text{°C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada ad libitum.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle (C), Desnervado (D), Tratado com picolinato de cromo (T) e Desnervado Tratado com picolinato de cromo (DT).

Os grupos experimentais T e DT foram tratados com solução de picolinato de cromo, recebendo a substância na concentração $0,2\text{mg/Kg}$ diariamente por 7 dias, através da via oro-gástrica pelo método de gavagem.

Para o procedimento de desnervação, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg peso), sendo a parte posterior da coxa esquerda tricotomizada e uma porção do nervo ciático (1cm) foi seccionada e retirada (CODERRE et al., 1992).

Para determinação do glicogênio muscular, as amostras dos músculos foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000rpm durante 10 minutos e o glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a metodologia proposta de Siu, Russeau e Taylor (1970). Os valores foram expressos em $\text{mg}/100\text{mg}$ de peso úmido.

Para determinação da glicemia foi utilizado glicosímetro (Accu-check Roche?). A concentração de proteínas totais foi avaliada através do KIT (PRO-TOTAL) e a determinação da concentração de DNA muscular foi realizada através da metodologia proposta por Giles e Myers, (1965).

Para o Teste de Tolerância à Glicose (GTT), os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/Kg , ip) e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrada glicose (2g/Kg , ip) seguido de coleta de sangue nos tempos 10min, 20min, 30min, 60min e 120min e a glicemia novamente avaliada (RAFACHO, ROMA e TABORGA, 2007).

Para o Teste de Tolerância à Insulina (ITT), os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/Kg , ip) e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado insulina (2U/Kg , ip - Biohulin) seguida de coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada (RAFACHO, ROMA e TABORGA, 2007).

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA e teste de Tukey com nível crítico de 5%. Os dados estão apresentados com média \pm epm.

4. Resultado e Discussão

A eficiência do processo contrátil da musculatura esquelética depende da integridade de suas estruturas para o perfeito funcionamento. Inicialmente avaliou-se o efeito da desnervação sobre o conteúdo muscular de glicogênio (Tabela 1). Pôde-se observar que o grupo D apresentou uma redução nas reservas quando comparado ao grupo C, atingindo valores 34,38% menores no músculo sóleo, 26,6% menores na porção branca do gastrocnêmio e 33,3% menores na porção vermelha do gastrocnêmio ($p<0,05$).

Uma consideração importante está ligada ao fato do músculo esquelético de rato possuir 3 tipos distintos de fibras que apresentam sensibilidade e responsividade à insulina diferenciadas, obedecendo a divisão em fibras I (vermelhas e lentas), fibras tipo IIa (vermelhas e rápidas) e fibras IIb (brancas e rápidas). Dentre elas, em condição de repouso, as fibras tipo I expressam a maior sensibilidade à insulina e o maior número de transportadores de glicose (MC DERMOT et al., 1990).

Ao avaliarmos o conteúdo de glicogênio dos músculos desnervados, observamos que houve uma expressiva redução das reservas do músculo sóleo, que é composto preferencialmente de fibras tipo I, não sendo expressiva a mudança nos demais músculos. Assim, o comprometimento na formação desta reserva energética decorre, em parte, de alterações nos mecanismos internos da cascata de reações químio-enzimáticas que culminam com a translocação da isoforma de transportadores de glicose GLUT 4 de reservatórios citosólicos em direção à membrana e ativação do sistema sinalizador insulínico (BURANT et al., 1991).

Segundo Wallis et al. (1999), no músculo desnervado há diminuição na atividade da enzima glicogênio sintetase concomitante à elevação na atividade da enzima glicogênio fosforilase, evento que ocorre em menor ou maior grau dependendo do tipo de fibra avaliado. Neste caso, o músculo sóleo foi o que apresentou o efeito mais significativo, corroborando com estudos que demonstraram que após 7 dias de desnervação, a captação de glicose é diminuída (NUNES e MELLO, 2005).

Avaliando a ação do picolinato de cromo sobre o conteúdo de glicogênio dos músculos normais (Tabela 1), verificou-se que no grupo T houve um aumento de 18,75% no conteúdo de glicogênio do músculo sóleo, 33,3% na porção branca do gastrocnêmio e 30% na porção vermelha do gastrocnêmio, quando comparado ao grupo C ($p<0,05$). Esses resultados apontam que o cromo, de maneira similar à insulina, afeta as reações de fosforilação- desfosforilação do receptor, elevando a sensibilidade à insulina, amplificando a sinalização celular de insulina e promovendo aumento na população de receptores (ALI et al., 2010).

Da mesma forma, foi avaliada a ação do picolinato de cromo sobre o conteúdo de glicogênio dos músculos desnervados (Tabela 1), e pôde-se verificar que o tratamento não promoveu diferença estatisticamente significativa no conteúdo de glicogênio dos três músculos

analisados do grupo DT ao comparar com o grupo D.

Analisando-se a concentração hepática de glicogênio (Tabela 1), o grupo T apresentou um aumento de 25,32% na concentração em relação ao C ($p < 0,05$). Comparou-se também o grupo D ao DT, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados.

No que se refere ao peso do músculo sóleo (Tabela 1) foi verificado que a desnervação promoveu uma diminuição significativa de 22,47% no peso desse músculo quando comparado ao grupo C.

Ressaltando a importância da integridade da inervação motora para a homeostasia das fibras musculares, observamos que o músculo sóleo submetido à desnervação apresentou redução no peso reforçando o comprometimento na sensibilidade à insulina e o desenvolvimento de hipotrofia. Esta hipotrofia é decorrente de um processo multifatorial afetando a atividade metabólica, a capacidade de absorver inúmeros substratos energéticos que dependem e estão associados à sensibilidade à insulina e redução no processo contrátil, uma vez que gera paralisia, fraqueza muscular e perda de massa (HUNTER et al., 2002).

Foram avaliados também a responsividade do pâncreas e do tecido muscular ao tratamento com picolinato de cromo. A sensibilidade periférica, avaliada através do ITT e expressa através da constante de decaimento da glicemia (KITT), mostra que o grupo T apresentou um KITT 35,38% maior que a constante do grupo C ($p < 0,05$). No que se refere à responsividade pancreática avaliada através do GTT, representada através da área sob a curva, foi observado que o grupo T apresentou redução de 5,96% na área sob a curva, comparado ao grupo C ($p < 0,05$).

Um fato adicional se refere à capacidade do picolinato de cromo em elevar a secreção de insulina. Esta característica da molécula pode indicar uma ação auxiliar na sinalização e formação das reservas glicogênicas como sugerido por Davis (1996). Observou-se também que após sobrecarga de glicose, durante o teste de tolerância a glicose, foram verificadas menores áreas sob a curva, indicando ação de secretagogo (WANG, DONG e YAO, 2009). Foi observado também que, após o teste de tolerância à insulina, a constante de decaimento da glicemia foi maior no grupo T indicando sensibilização dos tecidos periféricos. Assim, dentro de uma análise mais primorosa, podemos sugerir que a ação do cromo se deve a integração de sinais entre o sistema secretor de insulina e a responsividade dos tecidos periféricos.

Para dirimir a dúvida quanto a alterações na quantidade de miofilamentos, foi avaliada a relação proteínas totais/DNA (Tabela 2). Pôde ser verificado que a desnervação promoveu uma redução na razão proteína total/DNA, sendo essa redução igual a 23% na do músculo sóleo, 44,57% no músculo gastrocnêmio porção branca, e 10,21% no músculo gastrocnêmio porção vermelha, quando comparados ao grupo C. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa ao comparar o grupo T com o C, assim como quando comparado o grupo D com o DT.

Com relação ao comportamento das fibras musculares esqueléticas, diversos estudos têm demonstrado que a atrofia gerada pela desnervação é causada pelo balanço negativo protéico cuja taxa de catabolismo supera o anabolismo, sendo este fato o principal efeito responsável pela perda de peso (ZDANOWICK e TEIHERG, 2003).

Qiao et al. (2009) estudaram o efeito do picolinato de cromo no metabolismo protéico em cultura de células musculares *in vitro* e verificaram aumento na síntese protéica e redução no catabolismo. No que se refere aos resultados aqui apresentados não se observa diferença entre os grupos tratados com picolinato, quer seja normais ou desnervados. Assim, não acompanhamos os resultados descritos na literatura, porém, merece considerar que este estudo difere do supra-citado, uma vez que as observações foram realizadas *in vivo*.

5. Considerações Finais

Os resultados mostram redução na eficiência das vias insulínicas em decorrência da desnervação e ressalta que o picolinato de cromo eleva as respostas glicogênicas, sem apresentar ação significativa sobre a proteólise.

Referências Bibliográficas

- ALI, A.; MA, Y.; REYNOLDS, J.; WISE, J.P.; INZUCCHI, S.E.; KATZ, D.L. Chromium Effects on Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in People at Risk for Diabetes. *Endocr Pract*, v.14: p.1-21, 2010.
- BURANT, C.F.; LEMMON, S.K.; TREUTELAAR, M.K; BUSE, M.G. Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. *American Journal Physiology*, v.247, n.5, pt.1, p.657-666, 1991.
- CODERRE, L.; MONFAR, M.M.; CHEN, K.S.; HEYDRICK, S.J.; KUROWSKI, T.G.; RUDERMAN, N.B. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol.*, v.131, n.4, p.1821-1825, 1992.
- DAVIS, C.M.; SUMRALL, K.H.; VINCENT, J.B. A biologically active form of chromium may activate a membrane phosphotyrosine phosphatase (PTP). *Biochemistry*, v.35, p.12963-12969, 1996.
- GILES, K.W.; MYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*. v.206, n.93,

1965.

- GOMES, M.R.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. Rev Bras Med Esporte, v.11, n.5, p.262-266, 2005.
- HUNTER, N.; FOSTER, J.; CHONG, A.; MCCUTCHEON, S.; PARNHAM, D.; EATON, S. Transmission of prion diseases by blood transfusion. Journal of General Virology, v.83, p.2897-2905, 2002.
- KLIP, A.; PAQUET, M.R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. Diabetes Care. v.13, p.228-243, 1990.
- MAGNUSSON, C. et al. Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. Eur J Neurosci, v.21, n.2, p.577-580, 2005.
- MCDERMOTT, E.W.; BARRON, E.T.; SMYTH, P.P.; O'HIGGINS, N.J. Premorphological metabolic changes in human breast carcinogenesis. Br J Surg, v.77, n.10, p.1179-1182, 1990.
- NUNES, W.M.S.; MELLO, M.A.R. Glucose Metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.48, n.4, p.541-548, 2005.
- QIAO, W.; PENG, Z.; WANG, Z.; WEI, J.; ZHOU, A. Chromium improves glucose uptake and metabolism through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells. Biol Trace Elem Res, v.131, n.2, p.133-142, 2009.
- RAFACHO, A.; ROMA, L.P.; TABORGA, S.R. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increase connexin 36mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. Can J Physiol Pharmacol, v.85, p.536-545, 2007.
- SIU, L.O.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. J Appl Physiol, v.28, n.2, p.234-236, 1970.
- VINCENT, J.B. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. J Am Coll Nutr, v.18, p.6-12, 1999.
- WALLIS, M.G.; APPLEBY, G.J.; YOUD, J.M.; CLARCK, M.G.; PENSCHOW, J.D. Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated hindlimb muscles of rats is related to muscle atrophy and fibre type. Live Sciences, v.64, n.4, p.221-228, 1999.
- WANG, Y.Q.; DONG, Y.; YAO, M.H. Chromium picolinate inhibits resistin secretion in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes via activation of amp-activated protein kinase. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.36, n.8, p.843-849, 2009.
- ZDANOWICZ, M.M.; TEICHBERG, S. Effects on insulin-like growth factor-1/binding protein-3 complex on muscle atrophy in rats. Exp Biol Med, v.228, n.8, p.9891-9897, 2003.

Anexos

Tabela 2. Razão Proteínas totais/DNA (mg/100mg) nos músculos Sóleo, Gastrocnêmio porção vermelha (V) e Gastrocnêmio porção branca (B) dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Tratado com picolinato de cromo (T) e Desnervado + Tratado com picolinato de cromo (DT). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6.

	C	D	T	DT
Sóleo	137,82 \pm 14,5	106,03 \pm 3,0	135,84 \pm 5,6	107,54 \pm 9
Gastrocnêmio (V)	121,38 \pm 10,6	108,99 \pm 1,6	133,81 \pm 2,4	107,13 \pm 10
Gastrocnêmio (B)	181,04 \pm 9,79	100,36 \pm 1,3	191,55 \pm 3,2	105,36 \pm 11

Tabela 1. Concentração de glicogênio nos músculos Sóleo, Gastrocnêmio porção branca, Gastrocnêmio porção vermelha, glicogênio hepático e peso do músculo sóleo dos grupos Controle (C), Desnervado (D), Tratado com picolinato de cromo (T) e Desnervado + Tratado com picolinato de cromo (DT). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. *P<0,05 quando comparado ao grupo C.

	<i>Contração de glicogênio</i>				<i>Peso do sóleo</i>
	<i>Sóleo</i>	<i>Gastrocnêmio Branco</i>	<i>Gastrocnêmio Vermelho</i>	<i>Fígado</i>	
C	0,32 \pm 0,007	0,30 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03	3,08 \pm 0,1	140,00 \pm 5,8
D	0,21 \pm 0,02*	0,22 \pm 0,02*	0,20 \pm 0,03*	3,10 \pm 0,1	108,55 \pm 2,8*
T	0,38 \pm 0,02*	0,40 \pm 0,02*	0,39 \pm 0,01*	3,86 \pm 0,2*	134,70 \pm 4,8
DT	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	3,65 \pm 0,2	112,30 \pm 3,1