

**ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ASSOCIADA AO TREINAMENTO DE FORÇA:  
EFEITOS SOBRE O MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS****Fabício Azevedo Voltarelli<sup>1</sup>, Michel Barbosa de Araújo<sup>1</sup>,  
Carla Ribeiro<sup>1</sup>, Clécia Soares de Alencar Mota<sup>1</sup>, Maria Alice Rostom de Mello<sup>1</sup>****RESUMO**

O presente estudo objetivou investigar os efeitos do treinamento de força, associado à administração de insulina, sobre o crescimento do músculo esquelético de ratos. Ratos machos, Wistar, foram separados em 4 grupos (n=10/grupo): Controle Sedentário (CS); Controle Treinado; Insulina Sedentário e Insulina Treinado. Insulina comercial simples, 30mU/100g por peso corporal, foi administrada 3 dias/semana (dias alternados), durante 12 semanas. Os animais dos grupos Insulina Treinado e Controle Treinado efetuaram programa de treinamento de força, consistido por saltos em tanques com água, suportando sobrecarga equivalente a 50% em relação ao peso corporal. A sessão de treinamento foi composta por 4 séries de 10 saltos, 1 min de repouso entre as séries, 5 dias/semana, durante 12 semanas. Ao final do experimento, determinamos os teores de proteína e DNA do músculo sóleo, bem como a razão entre eles e as taxas de síntese protéica no músculo sóleo dos animais. No que diz respeito aos níveis de síntese protéica muscular, o grupo Insulina Treinado apresentou valores mais elevados se comparado aos demais grupos, sendo Controle Treinado significativamente diferente em relação a Controle Sedentário e Insulina Sedentário. Ainda, um maior crescimento muscular foi demonstrado pelo grupo Insulina Treinado em relação aos demais grupos, o qual foi comprovado pelos valores da razão proteína/DNA. Tais resultados sugerem que o protocolo empregado foi eficiente em gerar efeitos hipertróficos na musculatura esquelética de ratos submetidos ao treinamento de força associado à administração de insulina.

**Palavras-chaves:** Insulina; Treinamento de força; Músculo esquelético; Ratos.

1- Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Campus Rio Claro - Departamento de Educação Física

**ABSTRACT**

Associated to insulin administration the strength training: Effects on skeletal muscle of rats

The present study aimed to investigate the strength training effects, associated to insulin administration, on skeletal muscle growth of rats. Male Wistar rats were separated into 4 groups (n=10/group): Sedentary Control; Trained Control; Sedentary Insulin and Trained Insulin. Simple commercial insulin, 30mU/100g of body weight, was administered 3 days/week (alternating days), during 12 weeks. The animals belong to TI and Trained Control groups performed a strength training program, consisted by jumps in tank with water, supporting overload equivalent to 50% of body weight. The training session was composed by 4 series of 10 jumps, 1 min of rest between the series, 5 days/week, during 12 weeks. At the end of the experiment, we determined the protein and DNA levels of the skeletal muscle, as well as the protein/DNA ratio and the protein synthesis rates in the soleus muscle of the animals. In relation to muscle protein synthesis rates, the Trained Insulin group presented higher values if compared to the other groups, being Trained Control significantly different if compared to Sedentary Control and Sedentary Insulin groups. In addition, a higher muscle growth was demonstrated by Trained Insulin group in relation to the other groups, which was proven by protein/DNA ratio values. These results suggest that the protocol employed was efficient to generate hypertrophic effects in the skeletal muscle of rats submitted to strength training associated to insulin administration.

**Key words:** Insulin; Strength training; Skeletal muscle; rats.

Endereço para correspondência:  
faunesp8@yahoo.com.br  
mbujo@ig.com.br - carla\_ef\_rc@yahoo.com.br  
cleciamota@yahoo.com.br-  
mellomar@rc.unesp.br

## INTRODUÇÃO

Sabe-se que um número considerável de *body builders*, amadores ou profissionais, tem feito uso de substâncias farmacológicas com o intuito de melhorar o seu perfil fisiológico e tornaram-se mais competitivos em suas áreas específicas de competição. Atletas são rotineiramente submetidos a testes anti-doping e, como o número de drogas ilícitas que são detectadas aumenta a cada dia, alguns atletas se aventuram a experimentarem novas substâncias com efeito não comprovado mas ainda indetectáveis, como ilustrado na década passada com o uso da eritropoietina e do hormônio do crescimento. Como os testes são desenvolvidos para detectarem o seu uso, há uma incansável busca por drogas alternativas, como por exemplo, a administração do hormônio insulina.

O hormônio insulina tem sua prescrição autorizada, somente por médicos, desde 1998 e o seu uso é proibido, em atletas não-diabético, pelo Comitê Olímpico Internacional (COI). No entanto, pouco se pode fazer sobre a possibilidade de pessoas diabéticas doarem ou venderem sua insulina comercial para tanto para atletas como para *body builders*.

A insulina atua em sinergia com os hormônios esteróides. Os hormônios esteróides estimulam a síntese proteica com consequente geração de novas fibras musculares, ao passo que a insulina age inibindo os catabolismos hepático e muscular por meio do aumento das sínteses de glicogênio e proteína, promovendo, assim, a entrada de glicogênio e aminoácidos nas fibras musculares antes de um evento (Coghlan, 2001).

As propriedades anabólicas da insulina administrada em situação de hipoinsulinemia (diabéticos) são bem reconhecidas; no entanto, o conceito de "estado anabólico" induzido por concentrações elevadas de insulina (hiperinsulinemia) é bem menos suportado. A hiperinsulinemia fisiológica reportadamente estimula o transporte de aminoácidos no músculo esquelético humano (Banadonna e colaboradores 1993).

Banadonna e colaboradores (1993) postularam que tal fato caracteriza-se como uma resposta do metabolismo de aminoácidos/proteínas do músculo à presença

exacerbada da insulina. Embora a insulina iniba a degradação proteica, a estimulação da síntese proteica durante a hiperinsulinemia é observada somente quando ocorre, de forma concomitante, a hiperaminoacidemia (Banadonna e colaboradores 1993).

O uso abusivo da insulina em *body builders* é um problema real e crescente, mas estudos envolvendo modelos animais (especialmente o rato) e o treinamento de força para se verificar importantes parâmetros fisiológicos invasivos, impossibilitados em estudos com seres humanos por razões óbvias, são escassos na literatura específica.

Portanto o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do treinamento físico de força (saltos na água suportando intensidade elevada) associado à administração de insulina sobre o crescimento e proteína muscular de ratos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Todos os experimentos envolvendo animais, no presente estudo, seguiram as resoluções específicas Brasileiras de Bioética de Experimentos com Animais (Lei número 6.638 de 8 de Maio de 1979; Decreto número 24.645 de 10 de Julho de 1934, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, jovens (90 dias de idade, no início do experimento), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP.

### Grupos Experimentais

Os animais foram separados em 4 grupos:

- Insulina Treinado (IT; n=10): administração de insulina dos 90 aos 180 dias de idade;
- Controle Treinado (CT; n=10): não recebeu tratamento durante todo o experimento;
- Insulina Sedentário (IS; n=10): administração de insulina dos 90 aos 180 dias de idade;
- Controle Sedentário (CS; n=10): não recebeu tratamento durante todo o experimento;

Durante todo o experimento, os ratos tiveram livre acesso à comida (ração comercial Purina®) e à água e foram mantidos sob o ciclo claro-escuro de 12 horas à temperatura

de 25°C. O peso corporal dos animais foi mensurado uma vez por semana.

### **Administração de Insulina**

A administração foi efetuada por meio de injeção de insulina (30mU/100g de peso corporal) via subcutânea, 3 vezes/semana (dias alternados), durante 12 semanas, realizada no período da manhã, prevenindo, assim, a hipoglicemia no momento da sessão de treinamento, a qual foi efetuada no período vespertino. O intuito de se administrar a insulina 3 vezes/semana foi de prevenir a inflamação da área injetada e de minimizar o efeito estressor causado por esse procedimento invasivo.

### **Adaptação ao meio líquido**

A adaptação consistiu em manter os animais em água rasa à temperatura de 32±2°C durante 3 semanas, 5 dias/semana por 45 minutos. Ao final das 2ª e 3ª semanas de adaptação, os animais suportaram sobrecargas equivalentes a 5% do peso corporal. O objetivo deste procedimento foi reduzir o estresse do animal frente ao exercício realizado na água (Voltarelli e colaboradores 2002).

### **Protocolo de treinamento de força para ratos**

Os animais pertencentes aos grupos insulina treinado e controle treinado foram submetidos a um programa de treinamento físico de força, consistido de saltos na água, suportando sobrecargas (chumbos inserido em mochilas fechadas com Velcro® e atadas ao tórax com auxílio de um elástico) equivalentes a 50% do peso corporal de cada animal. A sessão de treinamento foi composta por 4 séries de 10 saltos na água com 1 minuto de intervalo entre as séries. Os ratos foram submetidos a 12 semanas de treinamento físico, sem interrupção, 5 dias/semana. A temperatura da água foi mantida em 32±2°C.

Esta temperatura é considerada neutra em relação à temperatura corporal do rato (Santiago e colaboradores, 2008). Os saltos foram efetuados em um tubo de PVC (250mm de diâmetro), o qual limita as alternativas dos animais de seguirem pra outra direção, assim, favorecendo o salto. Os tubos foram colocados

em tanques de amianto medindo 100cm de comprimento, 20cm de largura e com a profundidade correspondente a 150% do comprimento corporal dos ratos (Rogatto e Luciano, 2001).

### **Sacrifício dos animais**

Ao final do experimento, os ratos foram sacrificados por decapitação para a coleta do material biológico:

### **Proteína e DNA muscular**

Os teores de proteína no músculo sóleo foram determinados pelo método folin-fenol (Lowry e colaboradores 1951), enquanto que as taxas de DNA no mesmo músculo foram avaliadas pelo método da difenilamina (Giles e Meyers, 1965). A razão proteína/DNA foi calculada visando inferir sobre o crescimento muscular (hipertrofia) (Winick e colaboradores 1990).

### **Síntese de proteína muscular**

Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina [100u/ml], saturado com mistura gasosa (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo 14C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloro acético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel será lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em (SDS) 10% à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (Lowry e colaboradores, 1951) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como picomoles de

fenilalanina por miligrama de proteína por 2 horas.

### Análise estatística

Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. O procedimento estatístico incluiu Análise de Variância (ANOVA) de duas entradas, seguida de Bonferroni post-hoc, onde apropriado. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

### RESULTADOS

O ganho de peso corporal (g) foi menor no grupo controle sedentário se comparado aos grupos controle treinado e insulina treinado. Não houve diferença entre os grupos controle sedentário e insulina sedentário, ao passo que entre controle treinado e insulina treinado a mesma foi observada de forma significativa (Tabela 1).

No que diz respeito aos conteúdos de proteína total e DNA (g/100mg), os animais pertencentes ao grupo insulina treinado apresentaram maiores valores em relação aos demais grupos. O mesmo foi observado em relação aos valores da razão proteína/DNA. Os valores obtidos pelo grupo controle treinado, tanto em relação aos conteúdos de proteína e DNA, bem como à sua razão, foram mais elevados se comparados aos grupos controle sedentário e insulina sedentário (Tabela 2).

Em relação aos níveis de síntese protéica muscular (pmol/mg.h), o grupo insulina treinado apresentou valores mais elevados ( $8,4 \pm 1,4$ ) se comparado aos demais grupos (controle sedentário:  $3,8 \pm 0,6$ ; insulina sedentário:  $3,7 \pm 0,4$ ; controle treinado:  $6,8 \pm 1,3$ ), sendo controle treinado significativamente diferente em relação a controle sedentário e insulina sedentário (Figura 1).

**Tabela 1:** Ganho de peso corporal (g) ao final do experimento

	CS	IS	CT	IT
Ganho de peso corporal	$44,3 \pm 2,1$	$45,2 \pm 1,6$	$62,3 \pm 2,5^{\#}$	$71,3 \pm 3,6^*$

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 ratos por grupo.

\* Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ; ANOVA de duas entradas) em relação aos demais grupos;

# Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ; ANOVA de duas entradas) em relação aos grupos controle sedentário e insulina sedentário.

**Tabela 2:** Conteúdos de proteína total e DNA (g/100g) e razão proteína/DNA do músculo sóleo dos animais ao final do experimento.

	CS	IS	CT	IT
Conteúdo Total proteína	$3,3 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,3^{\#}$	$5,9 \pm 0,3^*$
Conteúdo de DNA	$0,148 \pm 0,03$	$0,147 \pm 0,04$	$0,153 \pm 0,02^{\#}$	$0,169 \pm 0,05^*$
Proteína/DNA	$22,3 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,3$	$30,7 \pm 0,2^{\#}$	$35,0 \pm 0,4^*$

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 ratos por grupo.

\* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ; ANOVA de duas entradas) em relação aos demais grupos;

# Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ; ANOVA de duas entradas) em relação aos grupos controle sedentário e insulina sedentário.

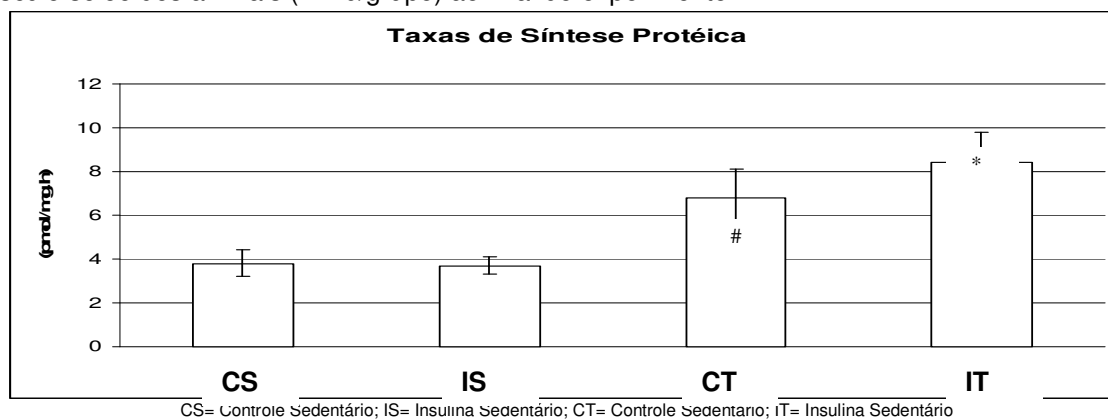
### DISCUSSÃO

Uma extensiva revisão da literatura identificou pouquíssimos casos de abuso da insulina (Tricker e colaboradores 1989; Coghlan, 2001; Rich e colaboradores 1998; Elkin e colaboradores 1997). Portanto, no que se refere a esse problema, torna-se importante a divulgação do mesmo por parte da

comunidade científica. Uma pesquisa com um grupo de praticantes de musculação revelou que pelo menos 10% de um total de 450 sujeitos admitiu fazer uso indiscriminado da insulina. Além disso, os mesmos relataram que a insulina foi obtida junto a seus amigos diabéticos. Como a insulina possui meia vida de quatro minutos no corpo humano, a mesma desaparece rapidamente e, assim, torna-se

impossível distingui-la da insulina secretada pelas células beta pancreáticas do atleta.

**Figura 1:** Efeitos da administração de insulina sobre as taxas de síntese proteica (pmol/mg.h) no músculo sóleo dos animais (n=10/grupo) ao final do experimento.



- \* Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ; ANOVA de duas entradas) em relação aos demais grupos;  
 # Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ; ANOVA de duas entradas) em relação aos grupos controle sedentário e insulina sedentário.

## Discussão

Este aspecto é um atrativo em potencial para o abuso da droga, uma vez que se sabe que esse hormônio possui propriedades anabólicas, o qual inibe a degradação protéica e estimula a síntese protéica, principalmente na musculatura esquelética. No entanto, informações quanto à ação da insulina exógena administrada para animais submetidos ao exercício de força, especialmente o rato, bem como seus efeitos comprovados sobre o crescimento e proteína muscular são escassas na literatura. Dessa forma, os animais do presente estudo receberam doses de insulina (3 vezes por semana) e efetuaram exercício de força (saltos na água suportando sobrecarga de 50% do peso corporal; 4 séries de 10 saltos com um minuto de intervalo entre as séries) durante um período de 12 semanas ininterruptas, 5 vezes por semana.

No presente estudo, os animais que receberam injeção de insulina e efetuaram o protocolo de treinamento de força apresentaram maior ganho de peso corporal em relação aos demais grupos (Tabela 1), indicando que o protocolo de exercício empregado, associado à administração de insulina, foi capaz de gerar efeitos somatotróficos na musculatura esquelética dos animais, uma vez que esse maior ganho pode ser devido, pelo menos em parte, ao

crescimento muscular. Isso pode ser comprovado tanto pelos maiores níveis de DNA (indicador de hiperplasia) quanto pela razão proteína/DNA (indicador de hipertrofia) musculares observados nos animais pertencentes ao grupo IS se comparados aos demais (Tabela 2). Ainda, o protocolo de treinamento aplicado no presente estudo, para o grupo que não recebeu insulina (controle treinado), mostrou-se eficiente no sentido de elevar o ganho de peso dos animais em relação aos grupos sedentários (controle e insulina).

Os resultados acima têm sua hipótese reforçada (insulina + exercício de força = hipertrofia da musculatura esquelética de ratos) por meio dos resultados referentes às taxas de síntese protéica no músculo esquelético dos animais do grupo insulina treinado. Esses animais apresentaram níveis de síntese protéica muscular mais elevados se comparado aos demais grupos (controle sedentário, IS e controle treinado) (Figura 1). Nós temos como hipótese que esse aumento observado no grupo IS pode ser consequência de uma alteração nas cascatas de sinalização responsáveis pela estimulação de síntese protéica muscular via insulina e/ou aminoácidos de cadeia ramificada. Assim, um interessante passo a ser investigado no futuro é o papel da proteína mTOR (sensível aos micro-nutrientes, como os aminoácidos, e pertencente à uma das vias principais de



síntese protéica) como mediadora dos efeitos por nós observados no presente estudo.

Vale ressaltar aqui que o presente estudo é o primeiro a relacionar exercício de força e administração regular de insulina, utilizando-se o modelo animal, e verificar os seus efeitos sobre o crescimento e proteína muscular.

Tomados em conjunto, os resultados de nosso estudo sugerem que o protocolo empregado foi eficiente em gerar efeitos hipertróficos na musculatura esquelética de ratos submetidos ao treinamento de força associado à administração de insulina. No entanto, alguns cuidados quanto ao uso da insulina associado ao exercício físico, em sujeitos humanos, devem ser levados em consideração, principalmente quando o seu uso é feito sem maiores conhecimentos. Tal situação potencializa o risco de o usuário desenvolver condição de hipoglicemia por períodos prolongados, podendo resultar, em alguns casos, em coma e até mesmo em óbito (Elkin e colaboradores 1997).

Mais estudos são necessários a fim de melhor elucidar os efeitos da administração de insulina em ratos submetidos ao treinamento de força não só sob o ponto de vista fisiológico mas, também, sob a ótica dos efeitos deletérios dessa prática a longo prazo.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o indispensável apoio dos técnicos do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da Unesp Campus Rio Claro: Clarice Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto Rodrigues.

### REFERÊNCIAS

- 1- Banadonna, R.C.; Saccomani, M.P.; Cobelli, C. Effect of insulin on system A amino acid transport in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91:514–21.
- 2- Coghlan, A. Athletes may be increasingly abusing insulin. <http://www.newscientist.com/news/news.jsp?id=ns99991129>, 2001.
- 3- Elkin, S.L.; Brady, S.; Williams, I.P. Bodybuilders find it easy to obtain insulin to

help them in training [letter]. *BMJ* 1997; 314:1280.

4- Giles, A.; Meyers, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965; 206 (1 n. 4975): 93.

5- International Olympic Committee and Medical Commission. Olympic movement antidoping code. Prohibited classes of substances and prohibited methods 2001–2002. [www.olympic.org/uk/organisation/commissions/medical/antidoping](http://www.olympic.org/uk/organisation/commissions/medical/antidoping)

6- Lowry, O.H.; Rosebroug, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 1951; 193: 265-275.

7- Rich, J.D.; Dickinson, B.P.; Merriman, N.A. Insulin use by bodybuilders. *JAMA* 1998; 279: 1613.

8- Rogatto G.P.; Luciano E. Influência do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de proteínas. *Motriz (UNESP)* 2001; 7 (2): 75-82.

9- Santiago, V.; Voltarelli, F.A.; Silva, A.S.; Pauli J.R.; Romero, C.; Ferreira, L; Machado, C.P.; Leme, J.A.C.; Gomes, R.J.; Soares, A.R.; Luciano, E. Respostas fisiológicas em ratos wistar submetidos ao estresse térmico durante treinamento aeróbio de natação. *Lecturas Educación Física y Deportes* 2008; 13: 1-5.

10- Tricker, R.; O'Neill, M.R.; Cook, D. The incidence of anabolic steroid use among competitive bodybuilders. *Journal of Drug and Education* 1989; 19: 313-325.

11- Voltarelli, F.A.; Gobatto, C.A.; Mello, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35(11):1389-94.

12- Winick, M.; Basel, J.A.; Rosso, P.A. Nutrition and cell growth. In: Winick M. *Nutrition and development* 1990. John Wiley & Sons, New York, p. 49-97.

Recebido para publicação em 15/10/2008

Aceito em 02/12/2008