



EFEITO DO EXERCÍCIO SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES GHR, IGF-1R, IGF-1 E PPAR NAS CÉLULAS BRANCAS DO SANGUE DE CAPRINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE ALIMENTAÇÃO¹

Rafaela Nunes Coelho², Marcella Cândia D'Oliveira⁴, Ibrahim Miranda Cortada Neto³, Marcelo Vedovatto³, Jaqueline Rodrigues Ferreira², Camila da Silva Pereira³, Carlos Alberto do Nascimento Ramos⁴, Gumercindo Lorian Franco⁴.

¹Parte da tese de doutorado do segundo autor;

²Aluna do curso de Zootecnia, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Bolsistas PET/CNPq; e-mail: rafanunec@gmail.com

⁴Professora da FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS; e-mail: marcellacandia@hotmail.com

³Aluno do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UFMS, e-mail: imcortadaneto@hotmail.com

³Aluno do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UFMS, e-mail: vedovatto@zootecnista.com.br

²Aluna do curso de Zootecnia, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Bolsistas PET/CNPq; e-mail: jaq.fr@hotmail.com

³Aluna do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UFMS, e-mail: camila.silvapereira@hotmail.com

⁴Professor da FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, e-mail: carlos.nascimento@ufms.br

⁴Professor da FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, e-mail: gumercindo.franco@ufms.br

Resumo: Objetivou-se avaliar o efeito do exercício de $7,5 \pm 0,4$ km sobre a concentração plasmática de hormônio do crescimento (GH) e a expressão gênica dos receptores de hormônio do crescimento (GHR), defator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1R) e receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), em caprinos submetidos a diferentes níveis de alimentação durante 50 dias. O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira, os animais foram distribuídos nos tratamentos: com exercício e restrição de 10% da exigência de manutenção de acordo com o NRC (2007) (EX+REST); sem exercício e restrição de 10% (S/EX+REST); com exercício e alimentados para ganho de 150 g/dia (EX+AD); e sem exercício e alimentados para ganho de 150 g/dia (S/EX+AD). Na segunda fase (recuperação), todos os animais receberam alimentação para atender à exigência de ganho de 150 g/d, por 35 dias, sem exercício físico. Para a mensuração da expressão gênica foram coletadas células sanguíneas brancas. Não houve efeito do nível de alimentação ou do exercício sobre a concentração plasmática do GH, assim como da expressão gênica do GHR, IGF-1R, IGF-1 e PPAR. A restrição alimentar e o exercício físico de caminhada de 7,5 km diário não ocasionam elevação do GH plasmático ou alteração na expressão gênica dos receptores de GHR, IGF-1R e PPAR, assim como do IGF-1 nas células sanguíneas brancas de caprinos.

Palavras-chave: ganho compensatório, gene, restrição alimentar, ruminante

EFFECT OF EXERCISE ON EXPRESSION OF GHR, IGF-1R, IGF-1 AND PPAR ON GENE WHITE BLOOD CELLS OF GOATS SUBMITTED AT DIFFERENT FEED LEVELS¹

Abstract: The objective of this study was to evaluate the exercise of 7.5 ± 0.4 km on the plasma concentration of growth hormone (GH) and the gene expression of growth hormone receptors (GHR), insulin-like growth factor-1 (IGF-1R) and proliferator-activated peroxisome-alpha (PPAR) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), in goats at different feeding levels for 50 days. The experiment was divided into two phases. In the first phase the treatments were: EX + REST - animals with exercise and fed with 90% of the maintenance requirement (n = 9); S / EX + REST - animals without exercise and fed with 90% of the maintenance requirement (n = 9); EX + AD - animals with exercise and fed with expectation of gain (n = 9); S / EX + AD - animals without exercise and fed with expectation of gain (n = 9). In the second phase (recovery), all animals received feed to meet the requirement of gain of 150 g / d, for 35 days without exercise. For the measurement of gene expression cells were collected white blood cells. There was no effect of feeding level or exercise on the concentration of GH, as well as the gene expression of GHR, IGF-1R, IGF-1 and PPAR. The daily dietary restriction and physical walking exercise of 7.5 km caused elevation of plasma GH or alteration in the gene expression of GHR, IGF-1R and PPAR, as well as IGF-1 in white blood cells of goats.

Keywords: compensatory growth, feed restriction, gene, ruminant



Introdução

Para atingir o maior potencial de crescimento do animal é necessário o suprimento adequado dos nutrientes para que as taxas de crescimento sejam mantidas. Logo, quando as taxas de crescimento são reduzidas como consequência da restrição alimentar são observadas na literatura redução no ganho de peso, na eficiência alimentar (Abouheifet al., 2013) e no crescimento em dimensões do corpo. Ainda associado a estas alterações, há um aumento do hormônio do crescimento (GH) e a concentração de ácidos graxos nãoesterificados (AGNES) (Yambayambaet al., 1996). Da mesma forma como há alteração na concentração dos hormônios relacionados ao metabolismo basal, proteico e lipídico, há mudanças na expressão gênica dos receptores e genes relacionados ao crescimento corporal como o GH, IGF-I e seus receptores. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos do exercício associado à restrição alimentar na expressão gênica dos genes e receptores relacionados ao metabolismo energético em ruminantes. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito do exercício sobre a concentração sérica de GH e a expressão gênica dos receptores de hormônio do crescimento (GHR), de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-IR) e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR) e fator do crescimento semelhante a insulina (IGF-I), em caprinos submetidos a diferentes níveis de alimentação durante 50 dias, e as implicações no período de recuperação do exercício e realimentação de 35 dias.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 36 caprinos machos inteiros, com peso corporal (PC) inicial de $21 \pm 0,3$ kg. O experimento consistiu em duas fases. Na primeira, os animais foram distribuídos nos tratamentos: com exercício e restrição de 10% da exigência de manutenção de acordo com o NRC (2007) (**EX+REST**); sem exercício e restrição de 10% (**S/EX+REST**); com exercício e alimentados para ganho de 150 g/dia (**EX+AD**); e sem exercício e alimentados para ganho de 150 g/dia (**S/EX+AD**). Os grupos com exercício percorreram um trajeto diário de $7,5 \pm 0,4$ km utilizando máscaras faciais. Após estes 50 dias iniciou-se a fase de recuperação, de 35 dias, na qual os animais receberam alimentação para ganho de 150 g/d e não foram submetidos ao exercício.

Os animais receberam feno de Massai (*Panicum maximum cv. Massai*), e suplemento proteico-energético. O consumo foi ajustado quinzenalmente ao peso corporal dos animais para manter a proporção de volumoso: concentrado de 1,0% e 2,3% do PC em base de matéria seca (MS) de feno e 3,0% a 0,7% do PC de suplemento, respectivamente para os tratamentos sem restrição alimentar e com restrição alimentar.

Ao final da fase de caminhada (dia 50, 50d) e da fase de recuperação (dia 35 após o final da caminhada, 85d) foram realizadas colheitas de sangue antes da alimentação e do exercício dos animais. As amostras de sangue foram colhidas por venopunção jugular. As amostras para a análise de expressão gênica foram processadas imediatamente após a colheita do sangue no laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde removeu-se o plasma, e recuperou-se as células brancas do sangue por aspersão, as quais foram acondicionadas em microtubo contendo 1,2 mL de RNA later (Ambion AM 7020, Life Technologies) e armazenadas a -80°C até o momento da análise.

Os procedimentos para a quantificação da expressão gênica dos GHR, IGF-1R, IGF-1 e PPAR, assim como a mensuração da concentração plasmática do GH foram realizados no Laboratório de Fisiologia Animal Básica da USP, Campus de Pirassununga. Para a extração do RNA das amostras de sangue armazenadas em RNA later, de acordo com as recomendações do Kit PureLink RNA Mini Kit (Ambion®, Life Technologies™). Após a purificação do RNA foi realizado o tratamento do RNA com DNase, segundo recomendações do manual do fabricante (RQ1 RNA-free DNase, Promega Corporation). Desta forma, foi sintetizado cDNA de cada uma das amostras de RNA, as quais foram utilizadas na reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. Inicialmente, foi realizada a PCR em tempo real para verificar a presença dos genes nos leucócitos e síntese do cDNA. Os primers PPAR, GHR, IGF-1R, IGF-1 e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram desenhados utilizando informações do código no GenBank. A reação para cada um dos genes em estudo foi realizada em 20 μL de mistura, a qual foi constituída por 10 μL de Mix Sybr Green; 8,2 μL de água livre de RNA; 0,4 μL de primer direto; 0,4 μL de primer e 1 μL de cDNA. As condições de amplificação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C , sendo cada amostra analisada em duplicata. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Os dados foram analisados usando o



método comparativo Ct, onde a quantidade do gene alvo foi normalizada para o gene GAPDH e comparada em relação a um calibrador (amostra controle) e, então, calculado o 2^{-Ct} , conforme Livak e Schmittgen, (2001). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 2×2 (2 tipos de atividade física \times 2 níveis de alimentação) com nove repetições, e o peso inicial como bloco. As médias de quadrados mínimos foram comparadas por meio do teste tipo Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussões

As concentrações plasmáticas de GH não foram afetadas significativamente pelos tratamentos. Foi verificado efeito apenas de data de colheita, na qual a menor concentração sérica de GH foi observada no final da recuperação (85d; $0,03 \pm 0,004$ ng/mL), seguido pelo final da caminhada (50d; $0,05 \pm 0,004$ ng/mL) e início do experimento (0d; $0,06 \pm 0,004$ ng/mL).

Da mesma forma, não houve efeito do nível de alimentação ($p=0,79$; $0,77$; $0,63$ e $0,92$); exercício físico de caminhada ($p=0,85$; $0,87$; $0,55$ e $0,90$) ou interação entre nível de alimentação e exercício físico ($p=0,10$; $0,54$; $0,89$ e $0,65$) sobre a expressão gênica dos receptores de GHR, IGF-I, IGF1R e PPAR, respectivamente.

Além de possuir um papel central nos processos de anabolismo, tem sido sugerido que o IGF-I participa do mecanismo de recuperação muscular após o exercício em humanos (Fragala et al., 2014). Estes autores encontraram aumento na expressão de IGF-IR em monócitos e granulócitos de humanos submetidos ao exercício de resistência por uma hora diária. Porém, no presente experimento, apesar dos animais terem sido submetidos ao exercício físico da caminhada não houve diferença significativa quanto à expressão gênica de IGF-IR e IGF-I.

No presente experimento não houve efeito de tratamento sobre a expressão gênica de PPAR; possivelmente a restrição alimentar não foi suficiente para alterar a expressão do gene nas células brancas, pois, segundo Bionaz et al. (2013), o gene PPAR nos leucócitos expressa-se de forma moderada a baixa, porém sua expressão é alta nos rins e fígado.

Conclusão

A restrição alimentar e o exercício físico de caminhada de 7,5 km diário não acarretam em elevação do GH plasmático ou alteração na expressão gênica dos receptores GHR, IGF1R e PPAR, assim como do IGF-1 nas células sanguíneas brancas de caprinos.

Referências

- Abouheif, M., Al-Owaimer, A., Kraidees, M., Metwally, H., Shafey, T., 2013. Effect of restricted feeding and re-feeding on feed performance and carcass characteristics of growing lambs. *Rev. Bras. Zootec.* 42, 95–101. doi:10.1590/S1516-35982013000200003
- Bionaz, M., Chen, S., Khan, M.J., Looor, J.J., 2013. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Res.* 2013, 1-28. doi:10.1155/2013/684159
- Fragala, M.S., Jajtner, A.R., Townsend, J.R., Gonzalez, A.M., Wells, A.J., Oliveira, L.P., Hoffman, J.A.Y.R., Stout, J.R., Fukuda, D.H., 2014. Leukocyte IGF-1 Receptor Expression during Muscle Recovery. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 47, 92–99.
- Keogh, K., Waters, S.M., Kelly, A.K., Wylie, A.R.G., Kenny, D.A., 2015a. Effect of feed restriction and subsequent re-feeding on hormones and genes of the somatotrophic axis in cattle. *Physiol. Genomics* 47, 264–73. doi:10.1152/physiolgenomics.00134.2014
- NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. National Academy of Science, Washington, D.C. 2007. 347p.
- Yambayamba, E.S., Price, M. A., Foxcroft, G.R., 1996. Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *J. Anim. Sci.* 74, 57-69. doi: /1996.74157x