

TREINAMENTO EM DIFERENTES INTENSIDADES E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DO METABOLISMO GLICÍDICO MUSCULOESQUELÉTICO DE RATOS

TRAINING AT DIFFERENT INTENSITIES AND BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND GLUCOSE METABOLISM IN SKELETAL MUSCLE OF RATS

Michel Barbosa de Araújo*
Fabrício Azevedo Voltarelli**
Fúlvia de Barros Manchado-Gobatto***
Leandro Pereira de Moura****
Maria Alice Rostom de Mello*****

RESUMO

Este estudo objetivou analisar os efeitos do treinamento físico sobre biomarcadores de estresse oxidativo e do metabolismo glicídico no músculo esquelético de ratos. Ratos Wistar adultos (90 dias) foram treinados por corrida em esteira na velocidade equivalente à transição metabólica aeróbio-anaeróbia (TT) e na velocidade 25% superior a esta (TS). Como controles foram utilizados ratos mantidos sedentários (S). Não houve diferença entre os grupos quanto aos biomarcadores de estresse oxidativos analisados (concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e atividade catalase). A captação de glicose e a produção de lactato foram reduzidas, enquanto a oxidação de glicose e a síntese de glicogênio não foram aumentadas no grupo TS em relação aos demais. O treinamento na intensidade 25% superior à transição metabólica aeróbio-anaeróbia induziu adaptações no metabolismo glicídico muscular na ausência de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Metabolismo. Treinamento físico.

INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não enzimáticos, e, cronicamente, causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Nas fibras musculares, as EROs, quando produzidas em baixas concentrações, exercem importantes papéis fisiológicos, como aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} (ANDRADE et al., 1998), aumento da força de contratibilidade (REID et al., 1992) e regulação da expressão gênica (SCHERECK et al., 1992) e metabolização da glicose (ROBERTS et al., 1997). As contrações musculares podem, também, aumentar a

formação de óxido nítrico (NO), uma vez que altos níveis de óxido nítrico sintase (NOS) foram encontrados em fibras musculares (KOBZIK et al. 1994). A excessiva produção de EROs e NO pelas fibras musculares durante o mecanismo de contração contribui significativamente para a redução da força contrátil (REID et al. 1992; REID et al. 2001), acelera os processos de fadiga (ANDRADE et al., 1998; GALLER et al., 1997) e concorre para o aumento de lesões musculares (ALESSIO et al. 1988; CLANTON et al., 1999).

Para se proteger contra os danos oxidativos causados pelas EROs, os organismos contam com mecanismos químicos e enzimáticos. O principal sistema de defesa antioxidante é

* Doutorando do Programa de Ciências da Motricidade da Universidade Estadual Paulista - Rio Claro.

** Doutor. Professor Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Mato Grosso.

*** Doutora. Professora Departamento de Educação Física, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, São Paulo.

**** Graduando. Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista - Unesp – Rio Claro

***** Doutora, Professora do Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista - Unesp – Rio Claro.

constituído por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase [SOD] (CuZn-SOD-Citosólica e extracelular e Mn-SOD-mitocondrial), a catalase [CAT] (CAT-heme-enzima) e a glutatona peroxidase [GR/GPX] (dependente e independente de selênio), para decomponem o ânion O_2^- , H_2O_2 e hidróxidos (YU, 1994).

Durante o exercício físico ocorrem várias reações químicas que implicam na formação das EROs e de NO. Para proteger os tecidos contra possíveis danos causados pelas EROs, as enzimas antioxidantes - como SOD, catalase e GPX/GR - parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados (AVULA; FERNANDES, 1999; PEREIRA et al., 1996), embora haja contradições (PRADA et al., 2004).

O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos do treinamento físico na intensidade equivalente à transição metabólica aeróbio-anaeróbia e naquela 25% superior a esta, sobre biomarcadores de condicionamento aeróbio, estresse oxidativo e metabolismo glicídico muscular em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

No início do experimento foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* com 90 dias de idade que tiveram livre acesso à água e ao alimento (ração comercial para roedores). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0cm, (cinco animais por gaiola) sob condições de temperatura de 25°C e ciclo claro/escuro controlado de 12 horas. Todos os experimentos envolvendo animais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética para Experiências com Animais da Universidade de Taubaté – UNITAU (registro CEEA/UNITAU nº 018/08).

Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram:

- Sedentários (S) – não submetidos ao exercício (n=12);

- Treinados na transição metabólica (TT) – submetidos ao treinamento de corrida em esteira rolante, na velocidade equivalente à transição metabólica aeróbio-anaeróbia, 40 min por dia, cinco dias por semana, durante oito semanas (n=12);
- Treinados acima da transição metabólica (TS) – submetidos ao treinamento em velocidade 25% superior à transição metabólica aeróbio-anaeróbia, 40 min por dia, cinco dias por semana, durante oito semanas (n=12).

Todos os protocolos desenvolvidos com os animais foram aplicados no período noturno, entre 19h00 e 20h00.

Seleção dos ratos corredores e adaptação à esteira rolante

Previamente ao experimento, foi feita uma seleção dos ratos naturalmente “corredores”. Nas três semanas que antecederam o período de treinamento, os animais foram adaptados à corrida em esteira, em velocidades e tempos progressivos para posteriormente terem a transição metabólica aeróbio-anaeróbia avaliada por meio da determinação da MFEL.

Determinação da transição metabólica aeróbio-anaeróbia

Foi efetuada através da detecção da máxima fase estável de lactato (MFEL). Para determinação da MFEL foram realizadas séries de exercícios de 25 minutos de corrida em esteira rolante, a diferentes velocidades fixas a cada série, com intervalos de 48 horas entre elas e coleta de sangue (25 μL) a cada cinco minutos, para dosagem de lactato. As coletas de sangue foram realizadas a partir de pequeno corte na extremidade da cauda do animal. Uma só incisão, efetuada antes do início do exercício, foi suficiente para a coleta de todas as amostras. A concentração sanguínea de lactato representativa da MFEL foi considerada na maior velocidade onde não ocorreu variação do lactato sanguíneo superior a 1,0mmol/L entre 10 e 25 min de exercício. A concentração de lactato sanguíneo foi determinada por método enzimático (ENGELS; JONES, 1978).

Obtenção de material biológico

Quarenta e oito horas após a realização da última sessão de exercícios (grupos treinados), os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) e, logo após, o sangue (8ml) foi coletado a partir da veia hepática. Foram também coletadas amostras da porção mista do músculo gastrocnêmio para avaliação dos seguintes biomarcadores: atividade da enzima catalase (CAT) e produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Fatias do músculo sóleo foram isoladas para avaliação das taxas de oxidação e captação de glicose, síntese de glicose, concentração de glicogênio e produção de lactato.

Biomarcador de peroxidação lipídica: concentração dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Para quantificar os produtos da peroxidação lipídica utilizou-se o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 5nm, ou por fluorescência a 515nm de excitação e 555nm de emissão (OKAWA et al., 1979).

Biomarcador do sistema de defesa antioxidante: atividade da enzima catalase (CAT)

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras dos tecidos a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10mM, (AEBI, 1984). A queda nos valores de absorvância do H₂O₂ é seguida espectrofotometricamente a 240nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde: a = volume de amostra na cubeta; b = volume total da cubeta; A₁ = valor da

absorvância em t=0 e A₂ = os valores da absorvância no tempo final que, em nosso caso, se deu aos 15 segundos após o início da reação (AEBI, 1984).

Indicadores do metabolismo glicídico muscular: oxidação e captação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo

O músculo sóleo direito foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais de peso entre 25 e 35 mg foram colocadas em frascos de cintilação com capacidade de 20mL siliconizados, contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato. Os frascos foram fechados com tampas de borracha, selados com anel plástico e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubnoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂/CO₂ (95%/15%). Após esse período, as fatias musculares foram transferidas para novos frascos de cintilação, em cujo interior foram instalados pequenos tubos em forma de concha com uma haste reta de aproximadamente três cm de comprimento inserida nas tampas de borracha do frasco externo.

Cada frasco externo continha 1,5 mL de tampão Krebs-ringer e cada frasco interno 700µl de hiamina10x. Após 60 minutos de incubação nesse sistema, com gaseamento durante os 15 primeiros minutos, foram adicionados 100µl de ácido tricloroacético (TCA) 25% ao frasco externo, visando à liberação de CO₂. Essa preparação foi mantida por mais três horas no sistema, porém, com a fatia do músculo fora do alcance da solução com TCA. Decorrido esse tempo, 200µl do líquido contido no frasco interno foram retirados para a determinação do CO₂ produzido. O meio de incubação acidificado, contido no frasco externo, foi armazenado para a determinação do lactato, e a fatia de músculo foi imediatamente digerida em 0,5 ml de KOH para extração (SJÖRGREEN et al., 1938) e dosagem (DUBOIS, et al., 1956) do glicogênio muscular. A temperatura na pré-incubação e incubação foi de 37°C.

O tampão Krebs-Ringer, base dos meios de pré-incubação e incubação, é constituído de: NaCl 06%, NaHCO₃ 019%, HEPES 6,64mM, KCl 0,032%, CaCl₂ 1,14nM, KH₂PO₄ 0,015%, MgSO₄ 0,03%. A solução assim preparada foi gaseada durante 20 a 30 minutos em O₂/CO₂ (95%/15%) e o pH ajustado a 7,4. A esta solução foram adicionados 20 volumes de albumina sérica bovina livre de gordura (BSA). Ao meio de pré-incubação foram adicionados piruvato de sódio para concentração de 5 mM e glicose (5,5mM) contendo [U-¹⁴C] glicose (0,25 µCi/ml), [³H] 2-deoxiglicose (2DG=0,5µCi/ml) e insulina (100µUI/ml). Feitas as adições, o pH foi ajustado a 7,4 e os meios transferidos para os frascos, os quais foram selados e equilibrados no banho a 37° C sob gaseamento em O₂/CO₂ (95%/15%) durante pelo menos 15 minutos. Fatias do mesmo músculo, com peso semelhante ao daquelas incubadas, foram utilizadas para determinação da concentração-controle de glicogênio.

Foram avaliadas a captação de glicose utilizando-se a 2 DG como marcador, e a incorporação do ¹⁴C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ³H da 2 DG ¹⁴C da glicose, respectivamente, através de contador de partícula beta. O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação

de metabólicos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma). Para a estimativa da glicose oxidada (produção de CO₂), foi determinada a radioatividade do ¹⁴C presente no líquido (hiamina) coletado do frasco interno do sistema de incubação (NUNES; MELLO, 2005).

Análise estatística

A análise estatística foi feita por ANOVA de duas entradas e aplicação do teste *post hoc* de Newman-Keuls e Tukey, adequado com nível de significância pré-fixada em 5%.

RESULTADOS

Indicador de condicionamento aeróbio

Os valores de lactato sanguíneo, durante o teste de esforço para determinação da MFEL dos animais encontrados no início do experimento encontram-se no Gráfico 1. Considerando-se todo o lote de animais avaliado, a maior parte (55%) deles obteve a MFEL na velocidade de 25m/min à concentração de 4,38±0,22mmol/L de lactato sanguíneo.

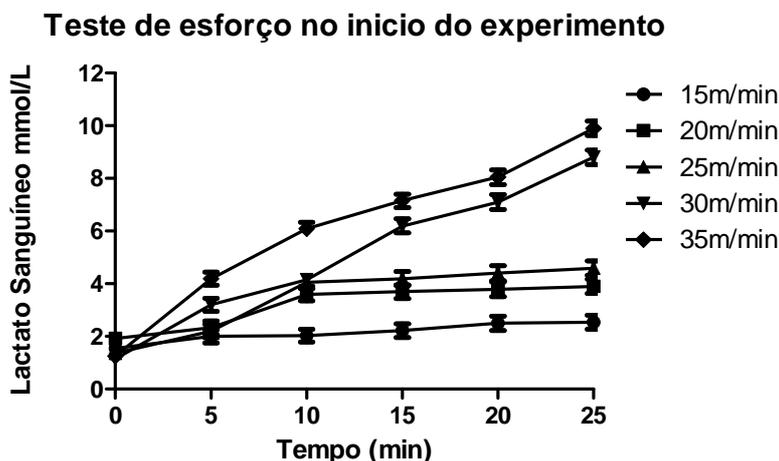


Gráfico 1 - Concentração de lactato sanguíneo (mmol /L) dos animais, a título de exemplo, durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato no início do experimento. A MFEL ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração de 4,38 ± 0,22 mmol /L de lactato sanguíneo.

Os valores de lactato sanguíneo durante o teste de esforço para determinar a MFEL ao final do experimento encontram-se no Gráfico 2. Considerando-se todo o lote de animais sedentários avaliados ao final do experimento, a maioria (73%) obteve a MFEL na velocidade de

20m/min à concentração de 4,83 ± 0,67 mmol /L de lactato sanguíneo. No que se refere aos animais treinados na intensidade equivalente à transição metabólica (TT), a maior parte deles (64%) obteve a MFEL na velocidade de 25m/min à concentração de 3,10 ± 0,27 mmol /L

de lactato sanguíneo. Em relação aos animais treinados na intensidade superior à transição metabólica (TS), a maior parte deles (55%)

obteve a MFEL na velocidade de 25m/min à concentração de $3,36 \pm 0,62$ mmol /L de lactato sanguíneo.

Teste de esforço ao final do experimento

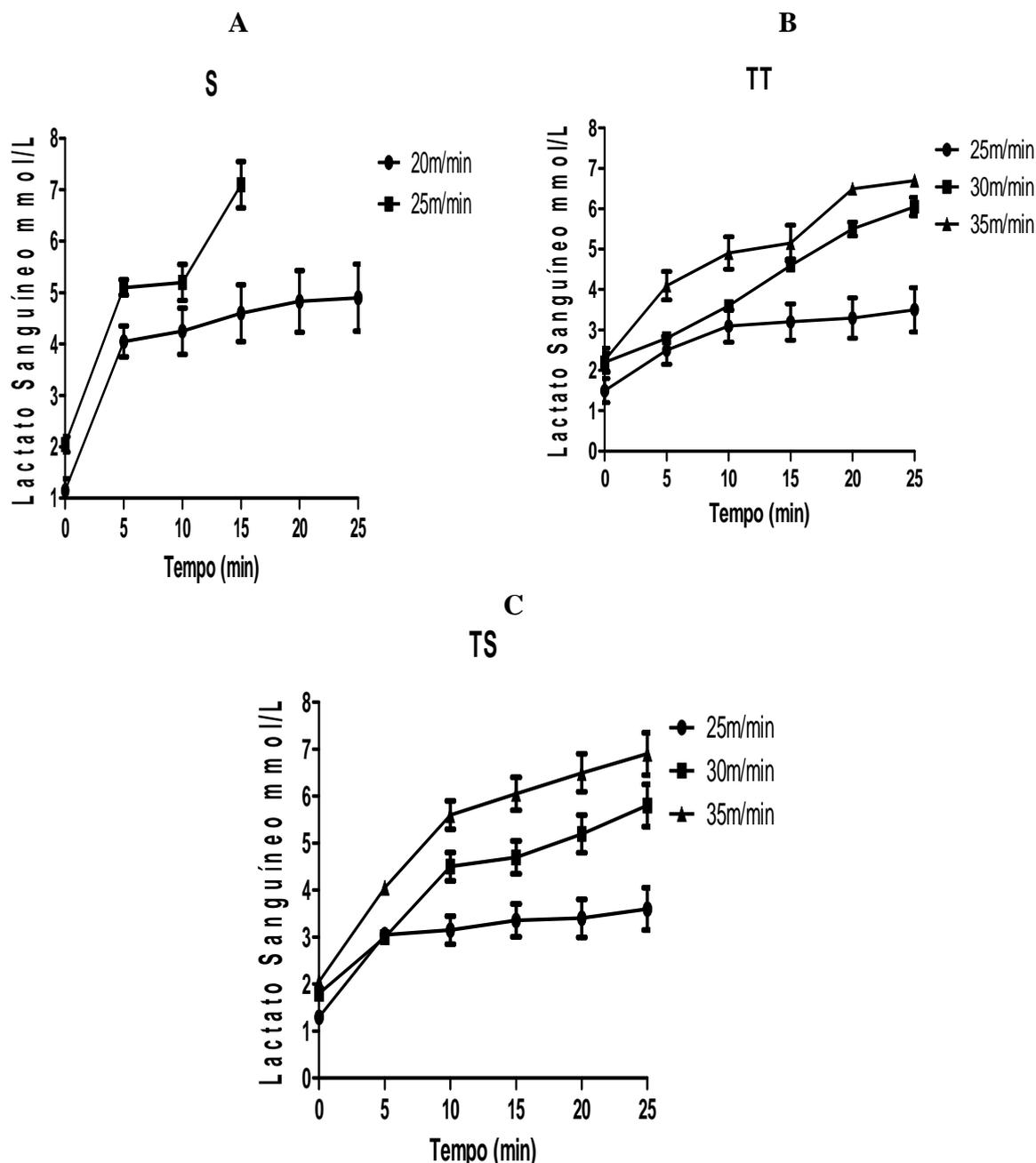


Gráfico 2 - Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) dos animais durante teste de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato ao final do experimento. **A)** Grupo S; **B)** Grupo TT e **C)** Grupo TS. Para o rato pertencente ao grupo S, a MFEL ocorreu na velocidade de 20m/min à concentração sanguínea de lactato de $4,83 \pm 0,67$ mmol/ L. Para o rato do grupo TT, a MFEL ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração sanguínea de lactato de $3,10 \pm 0,27$ mmol /L. Para o animal do grupo TS, a MFEL ocorreu na velocidade de 25m/min à concentração sanguínea de lactato de $3,36 \pm 0,62$ mmol /L.

Biomarcadores de peroxidação lipídica e defesas antioxidantes musculares

No Gráfico 3 são apresentados os valores da concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do

TBARs

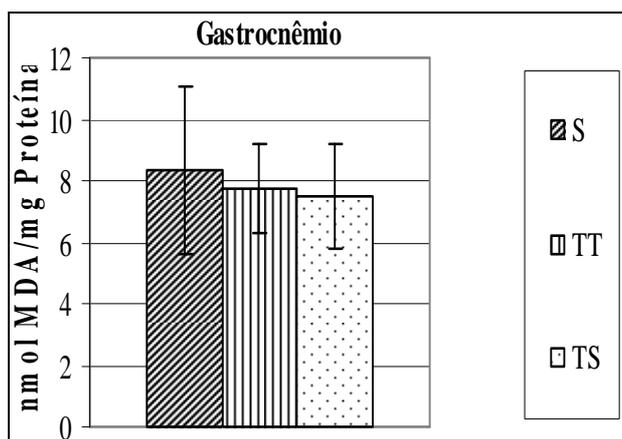


Gráfico 3 - Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de 6 a 10 animais por grupo.

Catalase

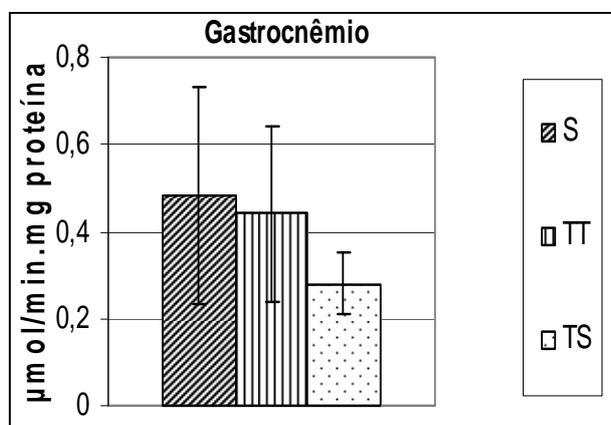


Gráfico 4 - Atividade da enzima catalase (CAT) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de 6 a 10 animais por grupo. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ / *post hoc* de Newman-Keuls).

Indicadores do metabolismo glicídico muscular

O Gráfico 5 apresenta os valores da captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato no músculo sóleo dos animais ao final do experimento. Houve aumento significativo na oxidação muscular de glicose dos animais TS em relação aos grupos TT e S. A

experimento. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

O Gráfico 4 mostra os valores referentes à atividade da enzima catalase no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

síntese de glicogênio apresentou aumento no grupo TS se comparado ao grupo TT. A captação de glicose apresentou diminuição no grupo TS quando comparado ao grupo S. A produção de lactato apresentou diminuição no grupo TS em relação ao grupo TT. A concentração de glicogênio não apresentou diferenças significativas entre os grupos avaliados.

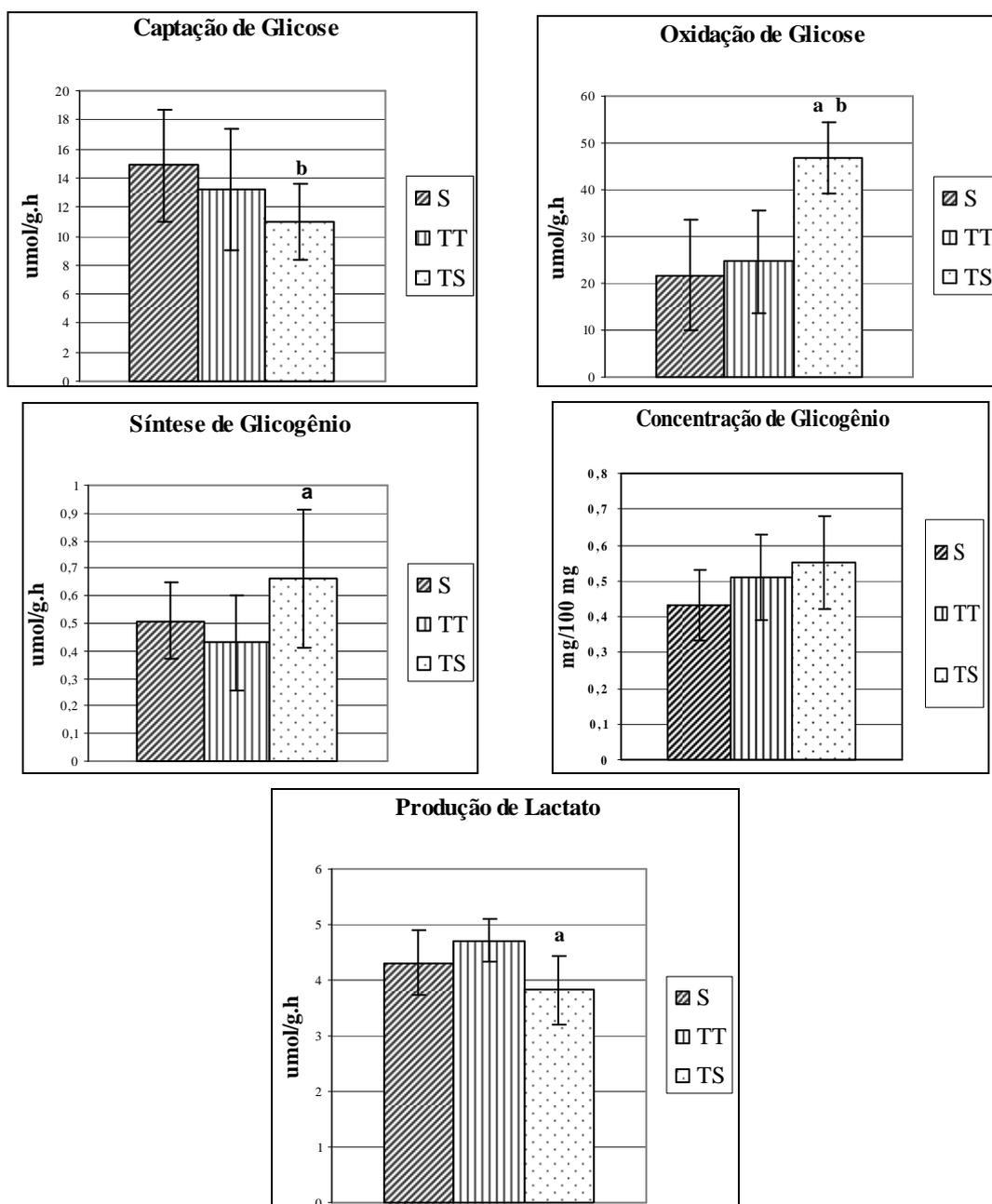


Gráfico 5 - Capturação e oxidação de glicose, síntese de glicose, concentração de glicogênio e produção de lactato no músculo sóleo dos animais ao final do experimento. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$ /teste de *Newman-Keuls*) a – TS x TT, b – S x TS.

DISCUSSÃO

Modelos animais fornecem condições apropriadas para pesquisas referentes a mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas adaptações metabólicas ao exercício, as quais não seriam viáveis de outra forma. São escassos na literatura estudos que relacionem metabolismo muscular,

mecanismos de estresse oxidativo e intensidade do esforço durante o exercício em modelos experimentais. No presente estudo foram averiguados os efeitos do treinamento físico em duas intensidades sobre o metabolismo glicídico e marcadores de estresse oxidativo musculares em modelos utilizando ratos.

A maior parte dos ratos avaliados no início do experimento apresentou a transição metabólica aeróbio-anaeróbia na velocidade de 25m/min, à concentração média de lactato sanguíneo de 4,38mmol/L. Tal resultado mostrou-se semelhante aos obtidos em estudos anteriores, os quais utilizaram o teste da MFEL de corrida em esteira rolante em animais sedentários e eutróficos (GOBATTO et al., 1991).

Para avaliar a eficácia do protocolo de treinamento como ferramenta para a melhoria do condicionamento aeróbio dos animais, ao final do experimento analisou-se a concentração de lactato sanguíneo dos animais pertencentes aos grupos S, TT e TS durante a realização de um segundo teste, para identificação da transição metabólica. Os valores de lactato sanguíneo obtidos nesse teste mostraram-se mais elevados no grupo S quando comparados aos grupos treinados TT e TS. Não houve diferenças entre os dois últimos. No que diz respeito às velocidades de corrida, estas se mostraram inferiores no grupo S em relação aos grupos TT e TS e sem diferenças entre os dois últimos.

Durante o exercício, a concentração sanguínea de lactato é dependente da razão entre a velocidade em que esse substrato é produzido pelo músculo esquelético e a velocidade com que ele é removido da corrente sanguínea (WASSERMAN, 1986). Os mecanismos envolvidos no acúmulo de lactato durante o exercício são diversos, sendo o aumento da intensidade do exercício uma de suas principais causas (MCARDLE et al., 2002).

Os resultados dos testes de esforço efetuados imediatamente após o final do período de treinamento mostraram que os protocolos utilizados no presente estudo levaram a uma redução do acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício. Isso indica que os protocolos de corrida por nós utilizados foram eficazes em melhorar o condicionamento aeróbio dos animais. Acreditamos que a melhora no condicionamento aeróbio observada no presente estudo deveu-se, além de adaptações do protocolo, ao fato de os ratos terem sido treinados no período noturno, aproveitando-se seus hábitos naturais. Manchado (2007), evidenciou que o ciclo de luminosidade promoveu alterações na avaliação de *performance* física de ratos, especialmente nas respostas aeróbias, sendo o período de escuridão associado a valores elevados de capacidade aeróbia.

Sabe-se que níveis excessivos de EROs promovem efeitos deletérios sobre a função celular, como, por exemplo, peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989), enquanto níveis fisiológicos dessas substâncias são requisitos para diferentes vias de sinalização celular (MURRANT; REID, 2001; GOLDSTEIN et al., 2005). Em estudos experimentais, a peroxidação lipídica pode ser aferida por meio da dosagem dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Resultados de inúmeros estudos envolvendo a mensuração de TBARs gerada pelo exercício em órgãos e tecidos de diferentes modelos animais são ainda7 contraditórios (PRADA et al., 2004; GALLER et al., 1997). As concentrações de TBARs não apresentaram diferenças significativas quando analisadas no músculo gastrocnêmio de todos os grupos do presente estudo.

Aumentos tanto na atividade celular como no ataque oxidativo, ocasionados pelo exercício, são menos deletérios quando são compensados por uma elevação da atividade dos mecanismos celulares de defesa antioxidante. As EROs são removidas por uma série de enzimas, iniciando-se pela superóxido dismutase (SOD), seguida pela catalase (CAT) e pela glutathione peroxidase (GP) (SILVEIRA, 2003). No presente estudo não foram observadas alterações significativas na atividade da enzima CAT no músculo gastrocnêmio dos grupos treinados se comparados ao grupo sedentário. Analisados em conjunto, os dados referentes à TBARs e à atividade de CAT indicam que ambos os protocolos de treinamento não interferiram na relação ataque oxidativo / sistemas de defesa antioxidante muscular.

A questão de interferência do treinamento na atividade das enzimas do sistema antioxidante ainda não foi totalmente elucidada. Enquanto alguns autores demonstraram aumento na atividade enzimática antioxidante (CAT, SOD e GP) em músculo esquelético induzida pelo treinamento físico (KINNUNEN et al., 2005; OKAWA et al., 1979), outros não constataram alterações significativas na atividade das mesmas enzimas (ALESSIO et al., 1988). As respostas das enzimas antioxidantes musculoesqueléticas parecem ser dependentes do ergômetro utilizado: natação (KINNUNEN et

al. 2005), corrida em esteira (ALESSIO, 2000; OKAWA et al. 1979) ou corrida em roda de atividade espontânea (MANCHADO et al. 2005); do protocolo de exercício contínuo (ALESSIO et al., 1988) ou intermitente (ANDRADE et al., 1998; OKAWA et al., 1979), assim como do tipo de fibra muscular (ANDRADE et al., 1998) e da espécie estudada: ratos (ALESSIO, 2000; OKAWA et al., 1979), camundongos (ATALAY et al., 1996) ou outros mamíferos (MANCHADO et al., 2005). Além disso, as respostas das enzimas antioxidantes ao treinamento parecem **ser tecido dependente**. Em estudo realizado por Avula e Fernandes (1999) foi demonstrado que o treinamento físico elevou a atividade da enzima glutatona peroxidase no fígado, rim, coração e musculatura esquelética, assim como a atividade da glutatona peroxidase no fígado e glândulas salivares. O músculo esquelético não foi alterado quanto a estes aspectos nas condições do presente estudo.

Foi proposto que o aumento na produção de EROs e de NO gerado pelo exercício estimula o transporte de glicose no músculo esquelético (ROBERTS et al. 1997). Há evidências de que o óxido nítrico (NO) favorece o transporte de glicose por uma via diferente da via mediada pela contração muscular (HIGAKI et al., 2001; ROBERTS et al., 1997). A ideia de que EROs e NO produzido pela contração muscular favorecem o transporte de glicose não pode ser considerada uma regra, uma vez que o aumento excessivo na produção de agentes oxidantes, que leva ao estresse oxidativo das fibras musculares, pode gerar consequências negativas, tais como a resistência à insulina e diabetes mellitus (HOUSTIS et al. 2006). Dessa forma, para ampliar a compreensão dos efeitos do treinamento físico efetuado na intensidade equivalente à transição metabólica e em intensidades 25% superior a esta avaliou-se o metabolismo da glicose no músculo esquelético dos animais.

Os animais do grupo TS apresentaram valores inferiores de captação de glicose muscular, se comparados aos demais grupos.

Sabe-se que a contração muscular aumenta a captação de glicose independentemente de insulina, devido, provavelmente, à ação da AMPK e do Ca²⁺ (via ativação de proteínas

calcio-dependentes como proteína quinase calmodulina-dependente (CAMPK), proteína quinase C (PKC) e neuregulina), que aumenta a translocação de glut-4 para a membrana muscular (CANTÓ et al., 2006; JESSEN; GOODYEAR, 2005). A quantidade de glut-4 no sarcoplasma permanece elevada por até duas horas após o fim do exercício, independentemente da presença do hormônio pancreático, mas os efeitos de uma única sessão de atividade física permanecem por pelo menos 16 horas, com maior sensibilidade à insulina e maior expressão de RNA mensageiro para GLUT4 e da própria proteína GLUT4 (BORGHOUTS; KEIZER, 2000). Dessa forma, esperar-se-ia um aumento da captação de glicose nos ratos treinados em relação aos sedentários, o que não ocorreu no presente estudo. Por outro lado, as taxas de oxidação de glicose e de síntese de glicogênio no músculo sóleo desses animais mostraram-se elevadas em relação aos animais pertencentes aos grupos TT e S.

Maior síntese de glicogênio em músculos exercitados cronicamente tem sido reportada e parece envolver processos complexos, incluindo diversos eventos regulatórios. O incremento da atividade da hexoquinase e da glicogênio sintetase (BRAU, 1997) e o aumento no número de transportadores de glicose do tipo GLUT4, associados à sua maior eficiência para translocar-se até a membrana após o exercício, podem ser a causa destas alterações (DELA et al., 1994). Também parece contribuir para esse fenômeno o aumento da capilarização dos músculos esqueléticos (HOUMARD et al., 1995; HUGHES et al., 1993). Além disso, foi relatado que o acúmulo das reservas de glicogênio observado com o treinamento físico pode estar relacionado ao aumento da glicogênese e ao maior transporte de glicose por mecanismos insulino-independentes (HENRIKSEN, 1996)

No presente estudo, o treinamento realizado em intensidade superior à transição metabólica aeróbio-anaeróbia promoveu redução da produção de lactato pelo músculo sóleo isolado. Estudos envolvendo seres humanos relataram que indivíduos treinados apresentaram aumento na capacidade de transporte de lactato da fibra muscular para a circulação sanguínea (JACOBS et al., 1986). Essas observações foram também descritas por OYONO-ENGUELLE et al. (1990)

em seres humanos e por Gobatto et al. (2001) em ratos, os quais associaram o aumento da concentração de lactato sanguíneo, bem como menor concentração de lactato no músculo, ao maior efluxo muscular desse substrato durante o exercício físico agudo envolvendo indivíduos e animais bem-condicionados.

ROTH (1991), em estudo realizado com ratos submetidos a diferentes velocidades de treinamento e resistência muscular, verificou aumento no transporte de lactato para o exterior do tecido muscular. PILEGAARD et al. (1993) submeteram animais a programas de treinamento de sete semanas, com aumento progressivo da intensidade do treinamento. Esses autores verificaram, em vesículas de sarcolema gigantes, que a elevação no transporte de lactato do músculo para a corrente sanguínea correlaciona-se positivamente com a intensidade do treinamento. BONEN; McCULLAGH (1994) submeteram camundongos ao exercício agudo em esteira rolante durante 60 minutos, com posterior retirada de amostras de músculos para procedimentos de incubação. Nesse trabalho, os autores verificaram aumento no transporte de lactato pelos músculos sóleos anteriormente exercitados; porém os reais mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não foram totalmente elucidados. Estes autores, assim como PILEGAARD et al. (1993), sugeriram que o treinamento físico pode aumentar a atividade do carreador de lactatos intracelulares ou, ainda, que o trabalho físico regular induz à síntese de mais proteínas carreadoras.

McCULLAGH et al. (1996) verificaram, também em vesículas de sarcolema gigantes, que a estimulação elétrica muscular crônica é capaz de aumentar o transporte de lactato no músculo tibial anterior de ratos. Os autores também sugeriram a existência de proteínas transportadoras de lactato, MCTs (transportadores de monocarboxilato), as quais foram previamente encontradas em ovários de hamsters chineses e fígados de hamsters sírios, respectivamente. Não obstante, existem, descritos na literatura, 14 isoformas de MCTs, das quais grande parte ainda não apresenta função determinada e específica, ao passo que outras já estão bem descritas (HALESTRAP; MEREDITH, 2004; BONEN; HEYNEN; HATTA, 2006). No músculo esquelético, as

isoformas MCT1 e MCT4 são dominantes (HASHIMOTO et al., 2005). A isoforma MCT1 tem sido correlacionada com o conteúdo mitocondrial muscular, sendo encontrada em maior proporção na membrana sarcolemal das fibras oxidativas (HASHIMOTO; HUSSIEN; BROOKS, 2006). Antagonicamente, a isoforma MCT4 encontra-se predominantemente expressa na membrana sarcolemal das fibras glicolíticas (HASHIMOTO et al., 2005). Essas isoformas na musculatura já haviam sido mencionadas por GARCIA et al. (1994), os quais verificaram a presença do MCT₁ nas fibras musculares oxidativas. Sendo assim, era de esperar que houvesse um aumento dos valores do lactato liberado para o meio durante a incubação do músculo sóleo, fato que não foi observado no presente estudo. Em nosso estudo, a produção de lactato pelo músculo sóleo isolado foi inferior no grupo TS em comparação com os grupos TT e S. Uma vez que os animais treinados na intensidade equivalente à transição metabólica (TT) apresentaram respostas semelhantes aos animais do grupo sedentário, nesse mesmo parâmetro, podemos sugerir que apenas o treinamento físico na intensidade superior à máxima fase estável de lactato influenciou o metabolismo glicídico dos animais. Isso pode indicar diminuição da metabolização da glicose pela via anaeróbia láctica no grupo TS ou, ainda, um possível redirecionamento desse substrato para a ressíntese de glicose e, conseqüentemente, de glicogênio muscular.

CONCLUSÃO

Tomados em conjunto os resultados do presente estudo, pode-se concluir que o treinamento físico realizado nas intensidades equivalente à transição metabólica aeróbia - anaeróbia e 25% superior a esta melhorou o condicionamento aeróbio dos animais, uma vez que, durante o teste de esforço ao final do experimento, as concentrações sanguíneas de lactato foram obtidas em valores menores nos grupos treinados em relação aos animais sedentários, demonstrando que o treinamento evitou a deterioração do condicionamento aeróbio imposta pelo avanço da idade. Os ratos treinados mantiveram constante a intensidade de esforço (velocidade) equivalente à transição

metabólica no decorrer do experimento. É importante salientar que o treinamento na intensidade superior à transição metabólica induziu adaptações no metabolismo muscular da glicose na ausência de estresse oxidativo, uma vez que outros mecanismos podem estar envolvidos, como aumento da atividade da hexoquinase e da glicogênio sintetase, aumento no número de transportadores de glicose do tipo GLUT4, aumento da capilarização dos músculos esqueléticos e o acúmulo das reservas de glicogênio. De qualquer forma, estudos adicionais são necessários para verificar os

mecanismos envolvidos na formação de EROs induzida pelo treinamento físico e sua implicação no metabolismo muscular e no condicionamento aeróbio.

Outra questão que se deve ser levada em consideração é que as discrepâncias observadas entre os resultados do presente estudo e aqueles relatados na literatura podem ser devidas, pelo menos em parte, às diferenças nos protocolos de treinamento aplicados nos diferentes estudos. Análises em nível molecular tornam-se necessárias para elucidar tais respostas com mais exatidão.

TRAINING AT DIFFERENT INTENSITIES AND BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND GLUCOSE METABOLISM IN SKELETAL MUSCLE OF RATS

ABSTRACT

This study aimed to analyze the effects of physical training on biomarkers of oxidative stress and glucose metabolism in skeletal muscle of rats. Wistar rats (90 days) were trained by treadmill running at the speed equivalent to the metabolic transition aerobic-anaerobic (MT) and 25% above it (AT). As controls, rats maintained as sedentary (S) were used. There was no difference between the groups regarding the analyzed biomarkers of oxidative stress (amount of substances that react with thiobarbituric acid and catalase activity). Glucose uptake and Lactate production were reduced and Glucose oxidation and Synthesis of Glycogen were increased in the AT group compared to the others. The training at 25% above the aerobic-anaerobic transition intensity induced adaptations in muscle glucose metabolism in the absence of oxidative stress.

Keywords: Oxidative stress. Metabolism. Physical training.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, Orlando, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALESSIO, H. M. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 32, p. 1576-1581, 2000.
- ALESSIO, H. M.; GOLFARB, A. H. Lipid Peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive responses to training. **Journal Applied Physiology**, Bethesda, v. 64, p. 1333-1336, 1988.
- ANDRADE, F. H. et al. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. **Journal of Physiology**, London, v. 509, p. 565-575, 1998.
- ATALAY, M.I. et al. Skeletal muscle and heart antioxidant differences in response to sprint training. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v.158, p.129-139, 1996.
- AVULA, R. C. P.; FERNANDES, G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. **Aging**, Milan, v. 11, no. 4, p. 246-252, 1999.
- BONEN, A. et al. Chronic exercise increases insulin binding in muscle but not liver. **American Journal Physiology**, Bethesda v. 251, p. E193-E203, 1994.
- BONEN, A.; HEYNEN, M.; HATTA, H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and humans skeletal muscle. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, Ottawa, v. 31, no. 1, p. 31-39, 2006.
- BORGHOUTS, L. B.; KEIZER, H. A. Exercise and insulin sensitivity: a review.
- BRAU, L. Regulation of glycogen synthase and phosphorylase during recovery from high - intensity exercise in rat. **Biochemistry Journal**, Washington, DC, v. 322, p. 303-308, 1997.
- CANTÓ, C. et al. Neuregulins mediate calcium-induced glucose transport during muscle contraction. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, no. 31, p. 21690-21697, 2006.
- CLANTON, T. L. et al. Oxidants and skeletal muscle function: Physiologic and pathophysiologic implications. **Proceedings of the Society of Experimental Biology Medicine**, New York, v. 222, p. 253-262, 1999.
- DELA, F. et al. Effect of training on interaction between insulin and exercise in human muscle. **Journal Applied Physiology**, Bethesda, v. 76, p. 2386-2393, 1994.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ENGELS, R. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 88, p. 475-484, 1978.
- GALLER, S. et al. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, Berlin, v. 434, p. 242-245, 1997.

- GOBATTO, C. A. et al. Efeitos da desnutrição protéico – calórico e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após testes de cargas progressivas. Resultados preliminares. **Ciência e Cultura**, Campinas, SP, v. 43, p. 725-736, 1991.
- GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry Physiology**, London, v. 2001, n. 1, p. 21-27, 2001.
- GOLDSTEIN, B. J. et al. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. **Diabetes**, Los Angeles, v. 54, p. 311–321, 2005.
- HALESTRAP, A. P.; MEREDITH, D. The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, Springer, v. 447, no. 5, p. 619-628, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. v. 87.
- HASHIMOTO, T. et al. Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. **Journal of Physiology**, London, v. 567, no. 1, p. 121-129, 2005.
- HENRIKSEN, E. J. et al. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. **American Journal of Applied Physiology**, Washington, DC, v. 80, p. 1540-1546, 1996.
- HIGAKI, Y. et al. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. **Diabetes**, Los Angeles, v. 50, p. 241-247, 2001.
- HOUMARD, J. A. et al. Seven days of exercise increase GLUT – 4 protein content in human skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**, Washington, DC, v. 79, p. 1936-1938, 1995.
- HOUSTIS, N. et al. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, London, v. 440, p. 944-948, 2006.
- HUGHES, V. A. et al. Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. **American Journal of Applied Physiology**, Washington, DC, v. 264, p. E855-E862, 1993.
- International Journal of Sports Medicine**, New York, v. 21, no. 1, p. 1-12, 2000.
- JACOBS, I. Blood lactate. Implications for training and sports performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 3, p. 10-25, 1986.
- JESSEN, N.; GOODYEAR, L. J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, Washington, DC, v. 99, p. 330-337, 2005.
- JORGENSEN, S. B. et al. Knockout of the $\alpha 2$ but not $\alpha 1$ 5 - AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5- aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside- but not contraction induced glucose uptake in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 1070-1079, 2004.
- KINNUNEN, S. et al. Exercise: induce oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. **European Journal Applied Physiology**, Berlin, v. 93, p. 498-501, 2005.
- KOBZIK, L. et al. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature**, London, v. 372, p. 546-548, 1994.
- LUND, S. et al. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, California, v. 92, p. 5817-5821, 1995.
- MANCHADO, F. B. et al. Maximal lactate steady in running rats. **Journal of Exercise Physiology-online**, Dayton, v. 8, p. 4-11, 2005.
- MANCHADO, F. B. **Protocolos invasivos e não invasivos para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos wistar**. 2007. Tese (Doutorado)-Instituto de Biociências, Universidade do Estado de São Paulo, 2007.
- McARDLE, W. D. et al. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. v. 2.
- MCCULLAGH, K. J. A. et al. Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Amsterdã, v. 156, p. 51-57, 1996.
- MURRANT, C. L.; REID, M. B. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. **Microscopy Research Technique**, New Hampshire, v. 55, p. 236-248, 2001.
- NUNES, W. W. S.; MELLO, M. A. R. Glucose metabolism in rats submitted to skeletal denervation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 541-548, 2005.
- OKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 95, p. 351-358, 1979.
- OYONO-ENGUELLE, S. et al. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, Washington, DC, v. 68, p. 905-911, 1990.
- PEREIRA, B. et al. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. **Ciência e Cultura**, Campinas, SP, v. 48, p. 43-46, 1996.
- PILEGAARD, H. et al. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: effect of training. **American Journal Physiological**, Bethesda, v. 264, p. E156-E160, 1993.
- PRADA, F. J. A. et al. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 12, p. 29-34, 2004.
- REID, M. B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. **Journal of Applied Physiology**, Washington, DC, v. 73, p. 1797-1804, 1992.
- REID, M. B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 33, p. 371-376, 2001.
- ROBERTS, C. K. et al. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. **American Journal Physiological**, Bethesda, v. 273, p. E220-E225, 1997.
- ROSE, A. J.; RICHTER, E. A. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? **Physiology**, Dayton, v. 20, p. 260-270, 2005.
- ROTH, D. A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants or lactate flux. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 23, p. 925-934, 1991.

SAKAMOTO, K. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. **EMBO Journal**, London, v. 24, p. 1810-1820, 2005.

SCHREK, R. Nuclear factor κ B: in oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Radical Research Communications**, California, v. 17, p. 221-237, 1992.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 48, p. 15-23, 2003.

SJORGREEN, B. Et al. Bertrag zur kenthis des le berrhythmik. Pflügers. **Archives Gesante Physiology**, Menscen Tiere, p.240-247, 1938.

VOLTARELLI, F. A. et al. Determination of aerobic threshold in rats rising the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, p. 1389-1394, 2000.

WASSERMAN, K. The anaerobic threshold: definition, physiological significance and identification. **Advances Cardiology**, Berne, v. 35, p. 1-23, 1986.

Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology Reviews**, Bethesda, v. 74, p. 139-161, 1994.

Recebido em 20/10/09

Revisado em 25/08/10

Aceito em 19/09/10

Endereço para correspondência: Michel Barbosa de Araújo. Departamento de Educação Física – UNESP. Avenida 24 A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro-SP, Brasil. E-mail: mbujo@ig.com.br