

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: V Mostra de Iniciação Científica Júnior

PROJETO DE PESQUISA: O EFEITO DO TREINAMENTO INTENSO EM DIFERENTES MODALIDADES SOBRE O ESTOQUE DE GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO EM MODELO EXPERIMENTAL¹

João Schmidt Corso², Thiago Gomes Heck³, Mirna Stela Ludwig⁴, Analú Bender Dos Santos⁵.

¹ O resumo abaixo é um projeto, resultado do estudo de um bolsista PIBIC-CNP de Ensino Médio que participa do projeto “Iniciação Científica no Ensino Médio: um Modelo de Aproximação da Escola com a Universidade pelo Método Científico em pesquisa na área das ciências da saúde e biológicas”.

² Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Bolsista de Ensino Médio PIBIC/CNPq, Aluno da Escola Técnica Estadual 25 de Julho

³ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

⁴ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

Introdução: Toda energia é originária do sol sob a forma de energia luminosa. Reações químicas nas plantas (fotossíntese) convertem a luz em energia química armazenada. A energia é armazenada nos alimentos sob a forma de carboidratos, gorduras e proteínas. Esses macronutrientes podem ser clivados no interior de nossas células para liberar a energia armazenada. (WILMORE;COSTILL, 2001)

As ligações moleculares dos alimentos são relativamente fracas e produzem pouca energia quando rompidas. Conseqüentemente, os alimentos não são utilizados diretamente nos processos celulares. Em vez disso, a energia das ligações moleculares dos alimentos é liberada quimicamente no interior de nossas células e, em seguida, é armazenada sob a forma de um composto altamente energético denominado adenosina trifosfato (ATP). (WILMORE;COSTILL, 2001)

O ATP pode ser produzido de duas formas no nosso organismo, por meio do processo anaeróbico (sem uso de oxigênio) e o processo aeróbico (com uso de oxigênio), o processo anaeróbico é utilizado pelo sistema ATP-CP ou sistema glicolítico, já o processo aeróbico é utilizado pelo sistema oxidativo.

No sistema ATP-CP (creatina fosfato). O fosfato inorgânico (Pi) é separado da creatina fosfato através da ação da enzima creatina quinase. O Pi pode então se combinar com o ADP para formar ATP. Esse sistema é denominado de anaeróbico, uma vez que não utiliza oxigênio em suas reações, e sua principal função é manter concentrações de ATP.

O sistema glicolítico envolve o processo da glicólise, por meio da qual a glicose ou o glicogênio é degradado em ácido pirúvico pela ação de enzimas glicolíticas. Quando realizada sem presença do

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: V Mostra de Iniciação Científica Júnior

oxigênio, o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico. O sistema oxidativo envolve a degradação de substratos com o auxílio do oxigênio. Esse sistema produz mais energia do que o sistema ATP-CP ou glicolítico. A oxidação dos carboidratos envolve a glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons.

Em repouso, a energia que seu corpo necessita deriva tanto da degradação dos carboidratos quanto das gorduras. As proteínas são os tijolos do seu corpo, usualmente fornecendo pouca energia para a função celular.

Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar a de repouso em até 35 vezes, enquanto o consumo de oxigênio (O₂) pode aumentar de 10 a 15 vezes. No metabolismo energético celular ocorre a redução completa de aproximadamente 95% de O₂ no sistema de transporte de elétrons mitocondrial, enquanto que o restante pode ser reduzido pelo metabolismo celular formando espécies reativas de oxigênio (ERO). Todas essas mudanças estão relacionadas à intensidade do exercício.

Os sistemas ATP-CP e glicolítico são os principais fornecedores de energia durante os minutos iniciais do exercício de alta intensidade. (WILMORE;COSTILL, 2001). (WILMORE;COSTILL, 2001).

Durante o esforço muscular leve e severo, uma maior quantidade de carboidratos é utilizada, com menor dependência das gorduras. No exercício máximo de curta duração, a ATP é gerada quase exclusivamente a partir dos carboidratos (WILMORE;COSTILL, 2001).

A dependência dos músculos de carboidratos durante o exercício está relacionada à disponibilidade de glicose e do sistema bem desenvolvidos dos seus músculos para o seu metabolismo. Os carboidratos são convertidos em glicose, um monossacarídeo que é transportado através do sangue para todos os tecidos do organismo. Em condições de repouso, os carboidratos ingeridos são captados pelos músculos e pelo fígado e, em seguida, são convertidos numa molécula mais complexa de açúcar: o glicogênio. Este é armazenado no citoplasma até as células utilizarem-no para formar ATP. Quando necessário, o glicogênio armazenado no fígado é reconvertido em glicose e esta é então transportada pelo sangue aos tecidos ativos, onde ela é metabolizada.

As reservas hepáticas e musculares de glicogênio são limitadas e podem ser depletadas, exceto se a dieta contiver uma quantidade razoável de carboidratos. Por isso, dependemos muito das fontes nutricionais de amidos e açúcares para repor as nossas reservas de carboidratos. Sem uma ingestão adequada de carboidratos, os músculos e o fígado podem apresentar privação de sua principal fonte de energia. (WILMORE;COSTILL, 2001).

Os principais agentes do controle de glicemia são a insulina e o glucagon, que trabalham juntos para aumentar a disponibilidade de glicose para a utilização celular (GUYTON & HALL, 2006).

A insulina e o glucagon são liberados por meio de estímulos diversos. A secreção de insulina é estimulada por nutrientes, neurotransmissores e hormônios. Quando ingerimos alimentos, os lipídios e a glicose são distribuídos pela corrente sanguínea. A glicose vai para o pâncreas e, precisamente nas células β , desencadeia a liberação de insulina. Desta forma, insulina e glicose seguem pela corrente sanguínea até às células do corpo, onde a glicose será absorvida e armazenada (NAOUM & NAOUM, 2011).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: V Mostra de Iniciação Científica Júnior

Para isso acontecer, entram em ação diferentes proteínas expressas pelas nossas células. O receptor de insulina recebe a insulina e o substrato do receptor de insulina (IRS) é fosforilado, ativando a translocação do transportador de glicose (GLUT 4) até a membrana (das células musculares e adiposas), que permitirá a entrada da glicose na célula. Quando estão dentro das células, as moléculas de glicose vão formar o glicogênio (NAOUM & NAOUM, 2011).

As reservas de carboidratos do fígado e do músculo esquelético são limitadas a menos de 2000 kcal de energia ou o equivalente da energia necessária para aproximadamente 32 km (20 milhas) de corrida. No entanto, as reservas de gorduras geralmente ultrapassam 70000 kcal de energia. (WILMORE;COSTILL, 2001)

Os carboidratos e as proteínas fornecem cerca de 4,1 kcal de energia por grama, comparadas com aproximadamente 9 kcal/g de gordura. No entanto, a energia derivada dos carboidratos é mais acessível do que a derivada das proteínas e das gorduras. (WILMORE;COSTILL, 2001).

A glicose é o principal carboidrato em nossa dieta e é o açúcar que circula pelo nosso sangue para fornecer a energia às células, sendo o principal combustível do nosso cérebro, o que justifica a importância do controle glicêmico, que é a manutenção da glicose sanguínea em níveis aceitáveis para que haja o bem-estar e a saúde.

Quando o limite máximo do estoque de glicogênio é atingido, o excesso de glicose é armazenado como gordura (NAOUM & NAOUM, 2011). Por outro lado, quando os níveis de glicose no sangue estão baixos, o pâncreas libera glucagon que aumenta a glicemia e ativa a liberação de glicogênio. Assim, o glucagon e a insulina regulam rigidamente a concentração de glicemia no nosso corpo.

O ácido láctico e o lactato não são o mesmo componente. O ácido láctico é um ácido com a fórmula química $C_3H_6O_3$. Lactato é qualquer sal do ácido láctico. Quando o ácido láctico libera H^+ , o componente remanescente une-se com Na^+ ou K^+ para formar um sal. A glicólise anaeróbica produz ácido láctico, mas ela rapidamente se dissocia e o sal -lactato- é formado. Por essa razão, os termos frequentemente são utilizados de forma intercambiável. (WILMORE;COSTILL, 2001)

O limiar de lactato é definido como o ponto no qual o lactato sérico começa a acumular além da concentração de repouso durante o exercício de intensidade crescente. (WILMORE;COSTILL, 2001).

O ácido láctico foi frequentemente acusado como responsável pela fadiga, mas, na realidade, é o H^+ gerado pelo ácido láctico que leva à fadiga. O acúmulo de H^+ reduz o pH muscular, o qual compromete os processos celulares que produzem energia e a contração muscular. (WILMORE;COSTILL, 2001).

Qual é exatamente o sentido da fadiga durante o exercício? As sensações de fadiga são acentuadamente diferentes quando o indivíduo se exercita até a exaustão em eventos que duram de 45 a 60 segundos, como uma corrida de 400 metros, do que quando ele realiza um esforço muscular exaustivo prolongado (como numa maratona). Normalmente, utilizamos o termo fadiga para descrever as sensações gerais de cansaço e a concomitante redução do desempenho muscular. (WILMORE;COSTILL, 2001).

As concentrações musculares de ATP também são mantidos pela degradação aeróbica e anaeróbica do glicogênio muscular. Em eventos com duração superior a alguns segundos, o glicogênio muscular

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: V Mostra de Iniciação Científica Júnior

torna-se a principal fonte de energia para a síntese de ATP. Infelizmente, as reservas de glicogênio são limitadas e são rapidamente depletadas.

Como no uso da creatina fosfato, a taxa de depleção do glicogênio muscular é controlada pela intensidade da atividade. O aumento da taxa de trabalho resulta numa diminuição desproporcional do glicogênio muscular. Durante a corrida de curta distância, por exemplo, o glicogênio muscular pode ser utilizado de 35 a 40 vezes mais rapidamente do que durante a caminhada. O glicogênio muscular pode ser um fator limitante mesmo durante o esforço leve. O músculo depende de um suprimento constante de glicogênio para satisfazer as altas demandas energéticas do exercício.

O glicogênio muscular é utilizado mais rapidamente durante os primeiros minutos do exercício do que nos estágios finais [...] Portanto, a sensação de fadiga no exercício prolongado coincide com a diminuição do glicogênio muscular. Os maratonistas comumente descrevem o início súbito da fadiga que eles apresentam entre 29º e o 35º km (18 a 22 milhas) como “bater contra a parede”. Pelo menos parte dessa sensação pode ser atribuída à depleção do glicogênio muscular. (WILMORE; COSTILL, 2001).

Este trabalho apresenta um projeto de pesquisa que visa analisar os efeitos gerados pelo exercício físico intenso sobre o estoque de glicogênio hepático e muscular em duas diferentes modalidades, natação e corrida.

Materiais e métodos

Animais: Serão utilizados 32 ratos Wistar machos ($229,5g \pm 5,4g$) com 12 semanas, mantidos em gaiolas semi-metabólicas provenientes do Biotério da UNIJUI. Em ambiente com temperatura e umidade relativa do ar controlada ($22 \pm 2^\circ C$; 50%-60%) e iluminação artificial com ciclos de 12 horas claro/escuro. Os animais receberão ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) e água potável ad libitum. Os animais serão divididos em quatro grupos nas duas modalidades: corrida e natação. São estes: Natação-alta intensidade; Natação-reposo; Corrida-alta intensidade; Corrida-reposo.

Adaptação (natação): Os animais serão submetidos a um período de adaptação a natação durante cinco dias consecutivos. A adaptação consiste em manter os animais nadando sem carga por 10 minutos em tanque de vidro ($55 \times 55 \times 56 \text{cm}$) com capacidade para quatro animais nadarem simultânea e individualmente ($25 \times 25 \times 56 \text{cm}$ para cada animal), preenchidos com 45cm de água a $30 \pm 1^\circ C$. O procedimento tem como objetivo adaptar os animais ao meio líquido para reduzir a ocorrência de comportamentos de natação relacionados com estresse durante o experimento, sem promover adaptações físicas relacionadas ao treinamento físico. Após adaptação, os animais serão mantidos sem nenhuma manipulação por 48hs (Heck, 2011).

Teste de Esforço (natação): Após a adaptação, todos os animais serão submetidos ao teste de esforço. Este teste consiste da mensuração dos níveis de lactato sanguíneo em repouso (R) e após 5 minutos de natação respectivamente com as cargas de 0%, 2%, 4%, 6% e 8% do peso corporal do animal, com um intervalo médio de 45 segundos para a aferição de lactato e troca da carga. A aferição do lactato será realizada por meio punção na parte distal da cauda do animal, feita no início da sessão de natação. Desta punção foram coletados, a cada intervalo, $25 \mu L$ de sangue para análise

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: V Mostra de Iniciação Científica Junior

em lactímetro (Accutrend® Plus, Roche), sendo o resultado expresso em mMol/L de sangue. Será registrado o tempo total de esforço realizado por cada animal (Heck, 2011).

Treinamento (natação): Os animais que realizarão treinamento físico intenso (TI) de natação (temperatura da água = 30°C+1°C) iniciarão o esforço com duração de 20 minutos na 1ª semana, com carga equivalente a 2% do peso corporal adicionada à cauda de cada animal. A partir da segunda semana a carga sofrerá incremento de 2% a cada semana até atingir a carga de trabalho de 8% na 4ª semana de treinamento, permanecendo com essa duração (20 minutos) e intensidade de esforço (8%) até a 8ª semana (Heck, 2011).

Adaptação (corrida): Durante a primeira semana será feita a familiarização dos animais na esteira, com a velocidade de 0,3 km/h por 5 minutos diariamente, já na segunda semana será realizado o período de adaptação na esteira rolante, com velocidades de 0,3 a 0,7 km/h durante 5 minutos por dia. Logo depois os animais iniciarão o período de treinamento físico, onde serão submetidos a uma velocidade inicial de 0,3 km/h, a qual aumentará progressivamente atingindo a velocidade 1,7 km/h onde permanecerá até o final do exercício, que durará 20 minutos.

Teste de esforço (corrida): A capacidade máxima do esforço físico foi obtida através do teste progressivo até a exaustão na esteira. Com velocidade inicial de 0,3 km/h, a 0° de inclinação, a cada 3 minutos a esteira sofria um acréscimo de 0,2km/h até a exaustão do animal. As medidas consideradas foram: velocidade final, tempo total e distância total percorrida durante o teste. Serão utilizados 16 animais, no final da avaliação os 8 animais que corresponderem ao teste serão escolhidos para o grupo da corrida-alta intensidade, os 8 animais que sobraem serão escolhidos para o grupo corrida-reposo.

Treinamento (corrida): Os animais que realizarão a corrida serão submetidos a treinamento físico em esteira adaptada para roedores. Este grupo realizará sessões com intensidade de 85% do teste de esforço em relação ao limiar anaeróbico, com duração de 20 minutos, 5 dias por semana.

Teste de Tolerância à Glicose (GTT): Antes de qualquer intervenção alimentar, no final da quarta semana e no final da última semana de exercícios, os animais serão submetidos ao Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Após jejum de 12 horas, será verificada a glicemia no tempo zero (tzero). Posteriormente, será administrada solução de glicose via intraperitoneal (i.p.), na dose de 1g/Kg e realizado monitoramento da glicemia nos tempos 30 e 120 minutos. A resposta glicêmica durante o GTT será avaliada pelo cálculo da área sob a curva (AUC) e área incremental sob a curva (IAUC) de glicose pelo método do trapézio (Matthews et al., 1990) (Heck, 2011).

Extração e dosagem de glicogênio: Após o término do período de treinamento, os animais serão mortos com o uso da guilhotina, após isso serão coletadas as amostras de glicogênio muscular e hepático. Essas amostras serão colocadas em tubos de ensaio de parede grossa contendo KOH 30% (m/v). Os tubos serão fechados e colocados em banho fervente a 85°C até dissolver o tecido. As amostras serão ressuspensas em etanol 70% e colocadas em gelo para precipitação das moléculas de glicogênio. Em seguida, centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Será preparada uma curva padrão a partir da solução estoque de glicogênio 1 mg / mL diluída em água milliQ. As amostras e a curva serão ressuspensas em ácido clorídrico 4 N e aquecidas em banho fervente a 100°C para induzir a hidrólise das moléculas de glicogênio. A solução será neutralizada com carbonato de sódio 2 M para dosagem por kit de glicose a partir da formação de peróxido de hidrogênio e ácido

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: V Mostra de Iniciação Científica Júnior

glicônico por ação da glicose oxidase (método enzimático ou de ponto final). A placa será incubada por 10 min a 37°C e a leitura realizada a 490 nm em leitora de microplacas de ELISA (Bio-Rad, modelo Benchmark).

Referências

GUYTON, A. C. ; HALL, J. E. (2002) - Tratado de fisiologia médica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

HECK, Thiago Gomes. HSP70 como Marcador de Intensidade de Exercício: Razão entre o Conteúdo Extracelular e Intracelular de HSP70 como um Sinal de Alerta Imunológico. 2011. 143f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2011.

NAOUM e NAOUM. Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto, 2011. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=nyvu2euX8tM>

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. Fisiologia do Esporte e do Exercício, São Paulo, Ed. Manole, Segunda edição, 2001.