

Efeito do treinamento aeróbio sobre o conteúdo muscular de triglicérides e glicogênio em ratos

Effect of aerobic training on muscle tryglicerides and glycogen contents in rats

FIGUEIRA, T.R.; LIMA, M.C.S.; GURJÃO, A.L.D. RUAS, V.D.A.; LEME, J.A.C.A.; LUCIANO, E.
Efeito do treinamento aeróbio sobre o conteúdo muscular de triglicérides e glicogênio em ratos. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(2): 55-61.

RESUMO: Os aumentos das reservas de substratos energéticos são respostas importantes ao treinamento físico e diretamente influenciam a tolerância ao exercício. Recentemente, tem-se evidenciado a importância dos estoques intramusculares de triglicérides como fonte de energia durante o exercício físico. O objetivo deste estudo foi analisar a influência de quatro semanas de treinamento físico intenso no conteúdo hepático e muscular de triglicérides e glicogênio em ratos sob o uso de dieta padrão. Dezoito ratos machos foram divididos em grupo controle (GC) e grupo treinamento (GT). O protocolo de treinamento consistiu em natação, 5 vezes por semana (1h/dia) com sobrecarga de 5% da massa corporal durante 4 semanas. Após o sacrifício, foram coletadas amostras de sangue para determinação dos níveis séricos de glicose, AGL, lipídios totais, triglicérides e colesterol total. Amostras do tecido hepático e muscular foram coletados para determinação das concentrações de triglicérides e glicogênio. As concentrações de glicose e colesterol séricos não apresentaram diferenças entre os grupos, enquanto o AGL (GC: 604,9 e GT: 455 uEq.L-1) e TG (GS: 101,3 GT: 61,5 mg.dL-1) foram significativamente reduzidos pelo treinamento físico. Não houve diferença significante nas concentrações de triglicérides e glicogênio no fígado e no sóleo entre os grupos estudados. Conclui-se que dentre as variáveis estudadas, somente os níveis séricos de TG e AGL foram significativamente reduzidos em função do período de quatro semanas de treinamento físico intenso. Entretanto, os estoques de substratos teciduais (iMTG e glicogênio), não se alteraram significativamente durante o período treinamento.

Palavras-chave: Exercício físico, glicogênio, triglicérides, metabolismo e natação.

FIGUEIRA, T.R.; LIMA, M.C.S.; GURJÃO, A.L.D. RUAS, V.D.A.; LEME, J.A.C.A.; LUCIANO, E.
Effect of aerobic training on muscle tryglicerides and glycogen contents in rats. *R. bras. Ci e Mov.* 2007; 15(2): 55-61.

ABSTRACT: The objective of this study was to analyze the influence of four weeks of heavy-intensity exercise training on the hepatic and muscular contents of tryglicerides and glycogen in rats feed with standard diet. Eighteen male rats were divided in control group (GC) and training group (GT). Training protocol consisted of swimming, 5 times a week (1h/day) with overload of 5% of their bodymass during 4 weeks. After sacrifice, samples of blood were collected for determination of the serum glucose, AGL, total lipids, tryglicerides and total cholesterol. Samples of hepatic and muscular tissue were collected for determination of tryglicerides and glycogen concentrations. Serum glucose and cholesterol concentrations did not present differences among groups, while AGL (GC: 604,9 and GT: 455 uEq.L-1) and TG (GS: 101,3 GT: 61,5 mg.dL-1) were significantly reduced by physical training. There were not significant differences in tryglicerides and glycogen concentrations in the liver and soleum among the studied groups. We can conclude that among the studied variables, only the serum levels of TG and AGL were significantly reduced in function of four weeks of heavy-intensity exercise training. However, the storage of tissues substracts (iMTG and glycogen) were not significantly altered during the training period.

KEYWORDS: Physical exercise, glycogen, tryglicerides, metabolism and swimming.

Tiago Rezende Figueira

Manoel Carlos Spiguel Lima

André Luiz Demantova Gurjão

Vinicius Daniel de Araújo Ruas

José Alexandre Curiacos de Almeida
Leme

Eliete Luciano

Programa de Pós Graduação em Ciências da Motricidade Humana
Departamento de Educação Física – I.B. -UNESP
Campus Rio Claro
Av. 24A, 1515, Rio Claro – SP, Brasil CEP: 13.506-900

Recebimento: 02/05/2006

Aceite: 07/03/2007

Correspondência: T. R. Figueira – Av. 24A, 1515, Rio Claro – SP, Brasil, CEP: 13506-900 – E-mail: figueirat@yahoo.com.br

R. bras. Ci. e Mov. 2007; 15(2): 55-61

Introdução

Um dos maiores desafios promovidos pelo exercício físico sobre os órgãos e sistemas orgânicos é alta demanda por trifosfato de adenosina -ATP pelos músculos ativos. As altas taxas de renovação de ATP no músculo ativo impõem elevados níveis de estresse sobre as reservas de substratos energéticos musculares e hepáticos. O carboidrato é o principal substrato energético utilizado durante exercícios de alta intensidade e sua disponibilidade endógena é acreditada limitar a performance humana em atividades de média a longa duração⁵. Apesar do glicogênio hepático ser insuficiente para manter a glicose sanguínea durante o exercício físico de longa duração, a suplementação com carboidratos tem se mostrado eficaz na manutenção da glicemia e do conteúdo hepático de glicogênio¹⁷. No entanto, o glicogênio muscular é uma fonte limitada de energia que é pouco poupada com a ingestão de carboidratos durante o exercício intenso¹⁷. Desta forma é altamente desejável que estes estoques estejam elevados previamente ao exercício físico. Para maximizar os níveis destes substratos, vários estudos analisaram treinamentos específicos juntamente com estratégias nutricionais a fim de encontrar a melhor forma de aumentar a concentração de glicogênio muscular e, em potencial, a performance durante o exercício. Porém, em geral, o treinamento de *endurance* por si próprio pode levar a supercompensação dos estoques endógenos de carboidratos¹⁶.

Recentemente, alguns pesquisadores tem analisado a importância do triglicérides intramuscular (iMTG) como fonte de energia durante o exercício⁹. O fato dos iMTG serem armazenados no citoplasma, perto das miofibrilas, provem uma fonte prontamente disponível de ácidos graxos para serem oxidados na mitocôndria¹. Adicionalmente, a quantidade de energia destas reservas é tão alta quanto as contidas nas reservas de glicogênio⁸. Reforçando estas evidências do iMTG como fonte de energia, Schrauwen-Hinderling et al¹⁸ (2003) mostraram que a quantidade de iMTG aumenta muito precocemente em reposta ao treinamento físico e que, após o treinamento, a utilização deste substrato como fonte de energia durante o exercício é diminuída, indicando que a manutenção de um nível elevado de iMTG é uma importante adaptação bioenergética ao exercício físico.

A composição da dieta tem-se mostrado um importante modulador da dinâmica dos estoques musculares de glicogênio e iMTG frente ao exercício físico crônico. No entanto, as condições requeridas (em especial a dieta) para maximizar o estoque de um destes substratos parecem inibir a estocagem do outro⁹. O conteúdo de iMTG parece aumentar frente ao incremento em seu uso e/ou a disponibilidade de lipídios circulantes^{2,20}. No entanto os estoques de glicogênio são mais sensíveis a ingestão adequada de carboidratos e energia total, que em geral podem ser conseguidas com dietas comuns.

Em humanos, há evidências que um curto período de treinamento pode afetar positivamente os conteúdos de iMTG e glicogênio muscular mesmo sem o uso de uma dieta específica^{11,18}. Porém, em ratos não está claro se um curto período de treinamento sem o uso concomitante de dieta específica altera o conteúdo muscular de iMTG e ao mesmo tempo o de glicogênio. Neste cenário, o objetivo deste estudo é analisar a influência de quatro semanas de treinamento físico intenso no conteúdo hepático e muscular de triglicérides e glicogênio em ratos sob o uso de dieta padrão.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados neste estudo 18 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, com idade de 120 dias e massa corporal $435,41 \pm 9,67$ gramas (Média $\pm$ EP) medidos ao término do experimento. Destes, nove foram aleatoriamente separados para o grupo controle (GC) e nove para o grupo de treinamento (GT). Todos os animais foram obtidos no Biotério Central da UNESP, Campus Botucatu-SP, mantidos em gaiolas coletivas com no máximo 5 animais por gaiola e temperatura ambiente de 25°C. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão Labina (Purina®) e água *ad libitum* durante todo o período do estudo. Também foi mantido um ciclo de claro/escuro de 12 horas (7:00/19:00hs). O animais do GC foram mantidos em gaiola, sem nenhum treinamento físico. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as resoluções brasileiras de Bioética em experimentos com animais, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Protocolo de treinamento

Os animais do grupo GT foram submetidos a quatro semanas de um programa de natação (tanque coletivo com a água sendo mantida entre 30 e 32° C). O protocolo de treinamento consistia em uma sessão diária de exercício com período de duração de uma hora, com sobrepeso de 5% da massa corporal presos ao tronco, cinco vezes por semana. Todas as sessões de treinamento foram realizadas no mesmo período do dia (16:00hs).

Análises bioquímicas

Após 48 horas da última sessão de treinamento todos os animais (GC e GT) foram sacrificados por decapitação em situação de repouso. Imediatamente após o sacrifício foram coletadas amostras de sangue para separação do soro, no qual foram determinados os teores de ácidos graxos livres (AGL), triglicérides (TG), glicose e colesterol total.

Os teores de glicose no soro foram determinados pelo método da glicose oxidase, os de AGL pelo dietiltiocarbonato, e os lipídios totais pela anilina, todos descritas detalhadamente por Nogueira et al.¹⁴, 1990. Os triglicérides foram obtidos pelo processo da lipase, e o colesterol total através da técnica da colesterol oxidase/peroxidase, conforme Howald et al.⁷, 2002.

Foram analisados os conteúdos hepático e muscular (sóleo) de glicogênio e triglicérides. Para o glicogênio, as amostras do tecido hepático e muscular foram digeridas em KOH aquecido, a precipitação do glicogênio foi feita pelo etanol e sua hidrólise com ácido sulfúrico. A determinação da glicose hidrolisada foi feita através da antrona,

conforme descrito por Hassid e Abraham⁶, 1957.

Para a determinação do conteúdo de triglicerídeos tecidual foram retirados de 100 a 200mg. As amostras foram colocadas em tubos do tipo eppendorf de 1,5ml, contendo 0,5ml de TritonX-100 a 0,1%. As amostras foram sonicadas por 45 segundos de forma pulsátil, após este procedimento as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi extraído para a determinação do TG através do método fotoespectrometria¹.

Análise Estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($M \pm EP$). A normalidade e a homogeneidade dos dados foram verificadas através do teste de Shapiro-Wilk's e Levene's, respectivamente. Uma vez verificado a distribuição normal dos dados foi empregado o teste *t* para amostras independentes para verificar possíveis diferenças entre os grupos. Foi adotado nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

Na Tabela 1 estão expressos os valores das concentrações séricas de glicose, ácidos graxos livres (A.G.L.), colesterol e triglicérides (T.G.) dos grupos Controle (GC) e Treinado (GT). A concentração de glicose não foi diferente para os grupos. A concentração de A.G.L. foi significativamente maior ($p < 0,01$) para o GC comparado ao GT. A concentração de colesterol não diferiu significativamente entre os dois grupos. A concentração de T.G. foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo GC do que no grupo GT.

Tabela 1.
Concentrações séricas de glicose, A.G.L., colesterol e T.G. dos grupos de ratos controle (GC) e treinados (GT). Resultados expressos como Média $\pm$ EP.

	Glicose (ml.dL ⁻¹)	A.G.L. (uEq.L ⁻¹)	Colesterol (mg.dL ⁻¹)	T.G (mg.dL ⁻¹)
Grupo Controle (GC) n = 9	98,5 $\pm$ 19,6	604,9 $\pm$ 115,1	46,6 $\pm$ 7,4	101,3 $\pm$ 34,0
Grupo Treinado (GT) n = 9	101,5 $\pm$ 11,0	455,0 $\pm$ 15,9 **	51,8 $\pm$ 13,6	61,5 $\pm$ 28,8 *

** Diferença significativa $p < 0,01$

* Diferença significativa $p < 0,05$

A Figura 1 expressa os valores de triglicérides no fígado e no músculo sóleo dos grupos GC e GT. Podemos notar que não houve diferença significativa no conteúdo de triglicérides entre os grupos GC e GT tanto no fígado quanto no músculo sóleo, respectivamente.

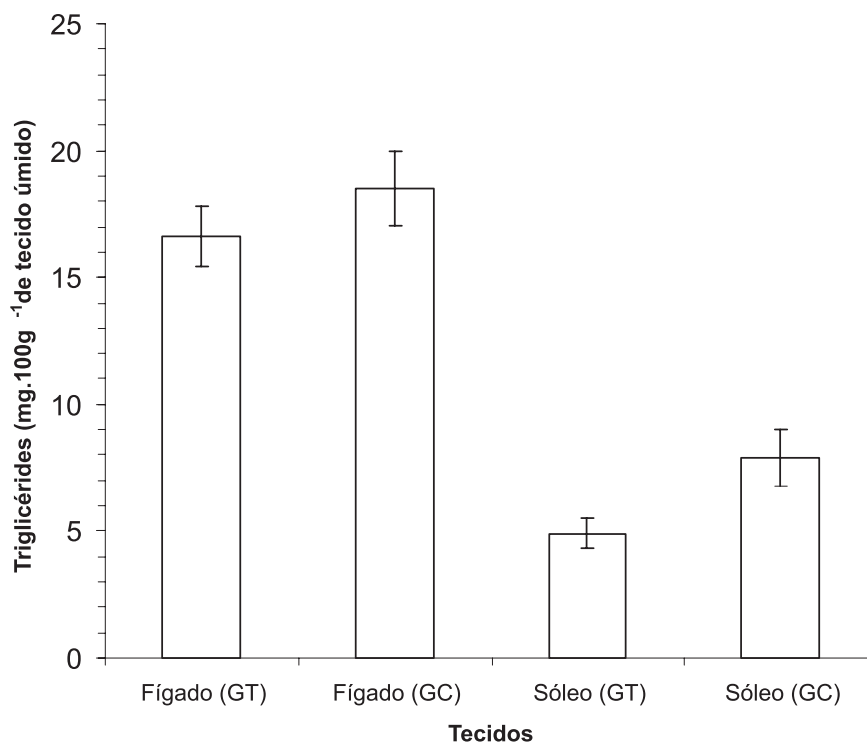


Figura 1 – Concentração de triglicérides do fígado (n = 9) e sóleo (n = 7) dos grupos de ratos treinado (GT) e controle (GC). Resultados expressos como Média $\pm$ EP.

A Figura 2 expressa os valores de glicogênio no fígado e no músculo sóleo dos grupos CG e GT. Seguindo o mesmo

comportamento da análise dos triglicérides, não houve diferença significativa no conteúdo de glicogênio entre os grupos GC e GT tanto para o fígado quanto para o músculo sóleo.

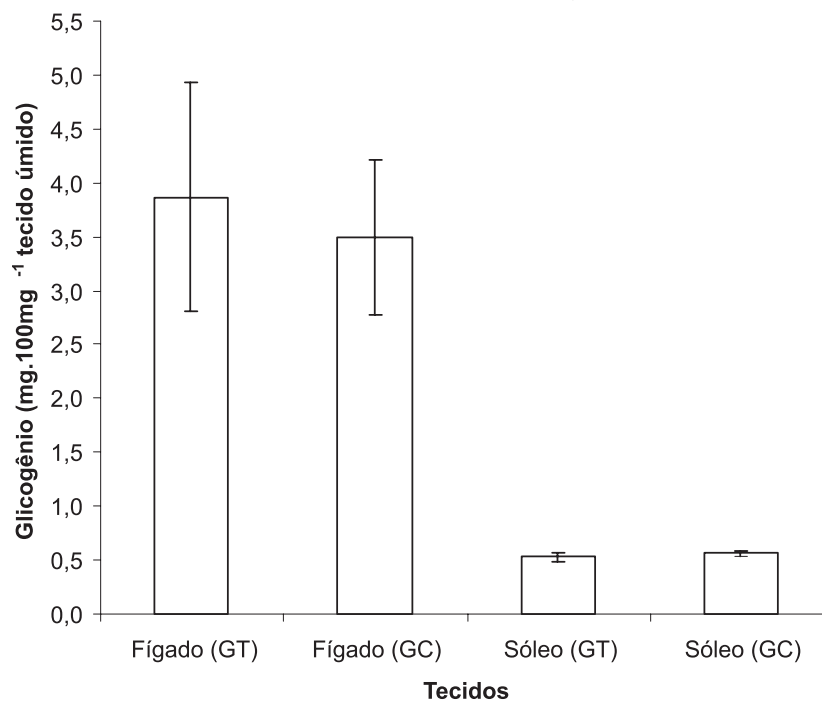


Figura 2 – Concentração de glicogênio do fígado e sóleo dos grupos de ratos treinado (GT) e controle (GC; n=9). Resultados expressos como média $\pm$ EP.

Discussão

O principal achado deste estudo é que quatro semanas do treinamento proposto não alterou significativamente os conteúdos de triglicérides e glicogênio no fígado e no músculo esquelético analisado. A intensidade de treinamento utilizada neste estudo foi potencialmente correspondente a máxima fase estável de lactato sanguíneo⁴, que representa o limite superior do domínio pesado de exercício. Em um curto período de tempo como o de quatro semanas aqui utilizado, esta intensidade é capaz de induzir adaptações aeróbias ao treinamento⁴. Em ratos sedentários, intensidades menores que esta já são efetivas em promover adaptações fisiológicas ao treinamento físico¹³. Desta forma, a não alteração das reservas energéticas teciduais parece não ser devida a um protocolo de treinamento insuficiente em promover adaptações aeróbias.

É bem reconhecido que o treinamento aeróbio eleva a taxa de ressíntese muscular de triglicérides e glicogênio. A composição da dieta é outro importante fator que pode modular as taxas de ressínteses destes substratos¹¹. Entretanto, a composição nutricional (alta ingestão de carboidrato ou gordura) que pode otimizar os estoques de uma destas fontes de energia parece inibir a estocagem da outra⁹. Desta forma nós optamos por uma dieta padrão que acreditamos não limitar a ressíntese de glicogênio e não induzir a um aumento dos iMTGs independente ao treinamento. Isto em tese não favoreceria em especial um ou outro estoque energético, permitindo analisar os efeitos do treinamento físico em um quadro nutricional mais isento. Em humanos sem o uso de dieta específica, foi recentemente demonstrado que um período de treinamento tão curto quanto duas semanas é capaz de aumentar o conteúdo de iMTG e glicogênio muscular^{11,18}. No entanto nós não encontramos tais alterações em ratos que treinaram o dobro deste período. Outros estudos em ratos com períodos maiores de treinamento, 6 a 8 semanas, mostram resultados divergentes em relação a supercompensação do glicogênio^{8,19}. As concentrações de glicogênio muscular e hepático encontradas em ambos os grupos em nosso estudo (gráfico 2) são bem semelhantes aos valores reportados para ratos sedentários no estudo de Rogatto¹⁶ (2001), que aplicou 6

semanas de treinamento aeróbio e encontrou aumento significativo na concentração de glicogênio muscular, no entanto o conteúdo hepático se manteve inalterado. Em geral, os protocolos de treinamentos (intensidade, duração e frequência) são bastante diferentes entre estes estudos e isto pode explicar em parte os diferentes resultados. Deste modo é bastante importante restringir a extensão dos nossos resultados em relação ao protocolo de treinamento e não só a duração do período de intervenção.

Muitos estudos têm analisado os efeitos agudo e crônico da atividade física sobre o conteúdo de iMTG, em geral há uma discrepância de resultados que tem sido especulada ser um efeito da pouca sensibilidade do método ou de outras limitações inerentes as técnicas usadas, como a de ressonância nuclear magnética (alterações no conteúdo hídrico corporal), a de morfometria (pequenas amostragens do tecido) e a bioquímica (influência dos adipócitos inter-miocelulares)⁹. Estas técnicas também têm real interferência sobre o valor absoluto de iMTG medido¹. Adicionalmente outras variáveis também interferem, como o músculo analisado e a composição de fibras da amostra retirada^{1,22}. Isto implica que as comparações devem se restringir a dados da literatura que foram obtidos a partir dos mesmos tecidos e através da mesma técnica.

Belmonte et al.¹ (2004) utilizando-se de técnica morfométrica, que possibilita a análise separadamente do conteúdo intramiocelular e perimisial de triglicérides, encontrou que o treinamento de *endurance* afeta diferentemente a dinâmica da estocagem de triglicérides nestes dois compartimentos no músculo sóleo. Estes dados sugerem que as alterações que podem ser encontradas no conteúdo de iMTG do músculo sóleo em função do treinamento físico medida pela técnica bioquímica, seja realmente reflexos de alterações dos estoques intramiocelular deste substrato, visto que o conteúdo perimisial de triglicérides não se modificou em função do treinamento.

Dentre os efeitos esperados do treinamento físico sobre as variáveis analisadas, somente houve modificações nos níveis de AGL e TG circulantes (tabela 1), isto é um comportamento bastante descrito e pode ser atribuído em parte ao aumentado consumo de ambos pela musculatura esquelética

durante o exercício¹². Outro fator que pode ter contribuído para os menores valores de AGL e TG circulantes nos ratos treinados é a provável maior sensibilidade periférica a insulina, isto diminui os níveis circulantes de insulina que tem sido mostrada ser relacionada aos níveis séricos de TG e AGL¹².

Apesar da técnica bioquímica de medida dos iMTGs ser bastante utilizada tanto em animais quanto em humano, sua validade em detectar alterações deste estoque energético ainda tem que ser melhor investigada. Também não há consenso de qual entre os métodos bastante utilizados (bioquímico, morfometria e ressonância

nuclear magnética) seria o padrão ouro para se medir tal variável, visto que cada um deles apresenta limitações que em potencial comprometem as análises em determinadas situações^{1,9,8}.

Nós podemos concluir que dentre todas as variáveis analisadas que são esperadas serem alteradas pelo treinamento aeróbio, somente os níveis séricos de TG e AGL foram significativamente reduzidos em função do período de quatro semanas de treinamento físico intenso. Entretanto, os estoques de substratos teciduais (iMTG e glicogênio), não se alteraram significativamente durante o período treinamento.

Referências Bibliográficas

1. Belmonte M, Aoki M, Tavares F, Seelaender M. Rat myocellular and perimysial intramuscular triacylglycerol: a histological approach. **Med Sci Sports Exerc.** 2004; 36 (1): 60-67.
2. Boden G, Lebed B, Schatz M, Homko C, Lemieux S. Effects of acute changes of plasma free-fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. **Diabetes.** 2001; 50: 1612-1617.
3. Boesch C, Slotboom J, Hoppeler, et al. In vivo determination of intra-celular lipids in human muscle by means of localized 1H-MR-spectroscopy. **Magn Reson Med.** 1997; 37(4): 484-93.
4. Gobatto C, Mello M, Sibuya C, Azevedo J, Santos L, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol.** 2001; 130: 21-27.
5. Hargreaves M, Hawley J, Jeukendrup A. Pre-exercise carbohydrate and fat ingestion: effects on metabolism and performance. **J Sports Sci.** 2004; 22: 31-38.
6. Hassid WZ, Abraham S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods in Enzymology**, 1957; v.3, p.34-6.
7. Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Wilkeman, J. **Clinical chemistry, principles and techniques.** 2 ed. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.
8. Howald H et al. Boesch C, Kreis R, Matter S, Billeter R, Essen-Gustavsson B, Hoppeler H. Content of intramyocellular lipids derived by electron microscopy, biochemical assays, and 1H-MR spectroscopy. **J Appl Physiol.** 2002; 92: 2264-2272.
9. Johnson N, Stannard S, Thompson M. Muscle triglyceride and glycogen in endurance exercise. **Sports Med.** 2004; 34(3): 151-164.
10. Kimber N, Heigenhauser G, Spriet L, Dyck K. Skeletal muscle fat and carbohydrate metabolism during recovery from glycogen-depleting exercise in humans. **J Physiol.** 2003; 548: 919-27.
11. Kraniou G, Cameron-Smith D, Hargreaves M. Effect of short-term training on GLUT-4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle. **Exp Physiol.** 2004; 89: 559-63.
12. Mondon C, Dolkas C, Tobey T, Reaven G. Causes of the triglyceride-lowering effect of exercise training in rats. **J Appl Physiol.** 1984; 57: 1466-71.
13. Nikolaidis M, Petridou A, Matsakas A, Schulz T, Michna H, Mougios V. Effect of chronic wheel running on the fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerol in rat serum, skeletal muscle and heart. **Acta Physiol Scand.** 2004; 181: 199-208.
14. Nogueira, D.M.; Strufaldi, B.; Hirata, M.H.; Abdalla, D.S.P.; Hirata, R.D.C. **Métodos de Bioquímica Clínica: técnica-interpretação.** São Paulo: Pancasat, 1990, 465p.
15. Putman C, Jones N, Hultman E, Hollidge-Horvat M, Bonen A, McConachie D, Heigenhauser J. Effects of short-term submaximal training in humans on muscle metabolism in exercise. **Am J Physiol.** 1998; 275: 132-9.
16. Rogatto, G.P. **Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar.** Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual Paulista – UNESP – Rio Claro, 2001.
17. Roy L, Jentjens A, Jeukendrup A. High oxidation rates from combined carbohydrate during exercise. **Med Sci Sports Exerc.** 2004; 36: 9: 1551-1558.

18. Schrauwen-Hinderling V, Schrauwen P, Hesselink M, van Engelshoven J, Nicolay K, Saris W, Kessels A, Kooi M. The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88(4): 1610-1616.
19. van Breda E, Keizer H, Geurten P, van Kranenburg G, Menheere P, Kuipers H, Glatz J. Modulation of glycogen metabolism of rat skeletal muscles by endurance training and testosterone treatment. **Pflugers Arch.** 1993; 424: 294-300.
20. Wietek B, Machann J, Mader I, Thamer C, Haring H, Claussen C, Stumvoll M, Schick F. Muscle type dependent increase in intramyocellular lipids during prolonged fasting of human subjects: a proton MRS study. **Horm Metab Res.** 2004; 36(9): 639-44.