U N I V E R S I D A D E DE S A O P A U L O

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

RESISTÊNCIA AO ESFORÇO FÍSICO:

EFEITO DA SUPLEMENTAÇAO NUTRICIONAL DE CARNITINA, ASPARTATO E ASPARAGINA.

ANTONIO HERBERT LANCHA JUNIOR

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr.Sérgio Miguel Zucas

São Paulo
1991

A minha família, em especial à meu Pai e minha Avó, que assistiram ao início deste trabalho, mas que a "dureza" da vida me privou compartilhar os resultados. Aonde quer que vocês estejam ... com muito amor e saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr.Sérgio Miguel Zucas - Pessoa que nos iniciou na vida acadêmico-científica, a quem devemos o lugar que hoje ocupamos.

Ao Professor Dr. Rui Curi - Pela amizade nos momentos mais difíceis, atenção, disponibilidade de seu laboratório, e sobretudo, pela orientação deste trabalho sem a qual não seria possível sua execução.

Ao professor Dr. Eduardo Kokubun - Amigo inestimável pela discussão dos resultados e sugestões ao trabalho.

Ao Marcos Barbosa Recco - O amigo com quem dividimos a autoria deste trabalho.

A Ivette de Almeida Dirani - Pela ajuda fundamental na coleta de dados.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Celular - Pela discussão do trabalho e pelas "risadas" necessárias para o desenvolvimento de um estudo sério.

ÍNDICE

1- Introdução 1

2- Hipótese do Presente Estudo 15

3- Material e Métodos 20

4- Resultados 25

5- Discussão 35

6- Discussão Geral 55

7- Conclusões 61

Referências 62

Apêndice (Tabelas) 68

1-INTRODUÇÃO:

1.1 Fontes Energéticas

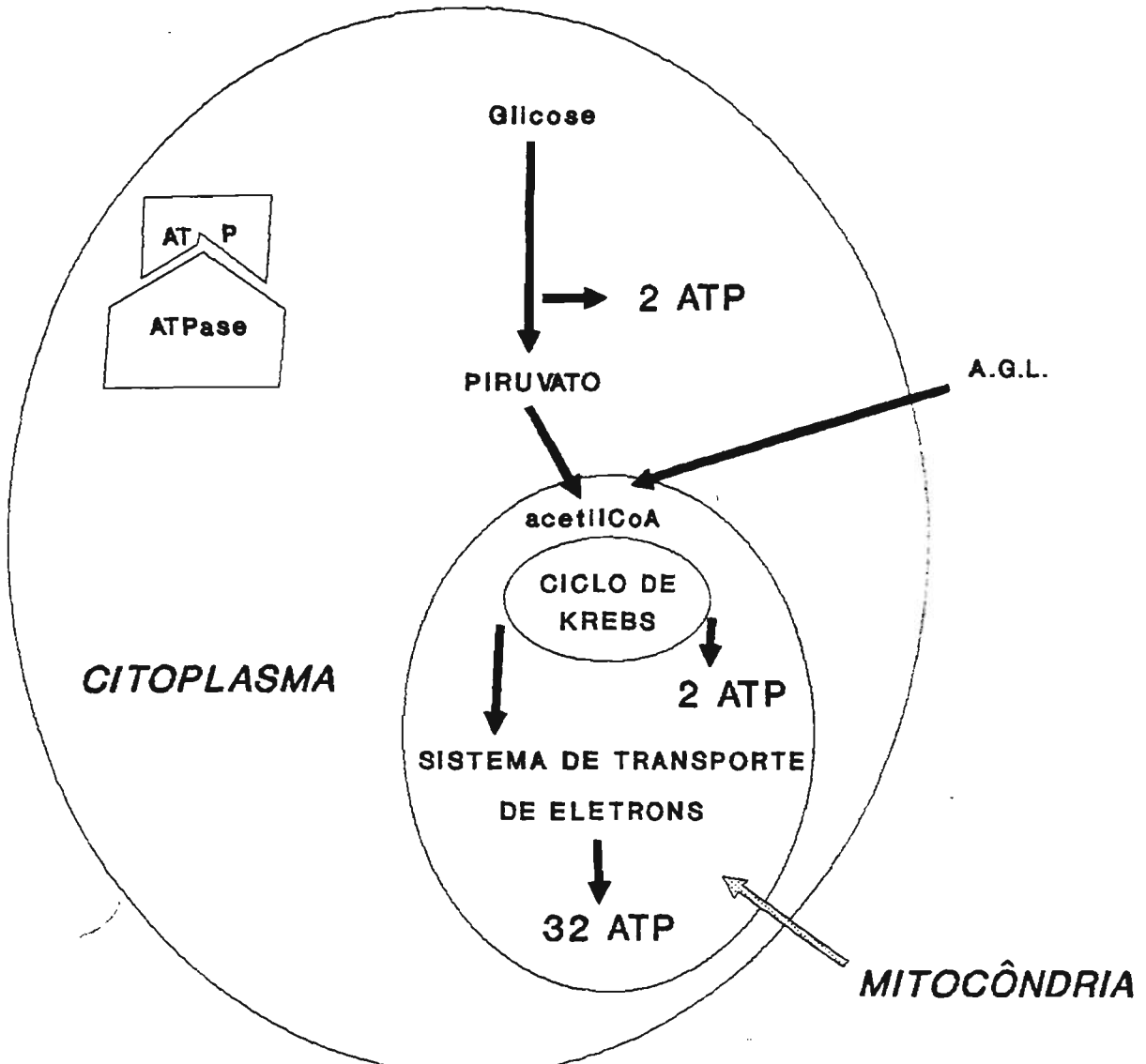
No organismo, varias são as fontes energéticas existentes para atender a demanda metabólica. Analisando o complexo orgânico pela sua menor estrutura, a célula, veremos que esta, possui diversas vias produtoras de energia para atender suas necessidades. A eficiência do organismo torna-se evidente quando requisição energética é feita de maneira rápida. Existe na célula pequenos estoques energéticos na forma de tri-fosfato de Adenosina (ATP). Esta substância é então fracionada, pela ação de enzimas (ATPase) espalhadas pelo citoplasma celular(vide figura-1). A quebra das ligações fosfato com a adenosina, promove a liberação de energia e a formação de dois compostos: difosfato de Adenosina(ADP) e fosfato inorgânico. Esta situação permite ao organismo imediata liberação energética, porém com pequeno rendimento; 1 mol de ATP fracionado rende 20.000 calorias (Junqueira & Carneiro 1987). Por sua vez, o ADP pode ser ressintetizado a ATP pela degradação do composto Creatina Fosfato (CP) que libera a energia necessária para que um fosfato inorgânico seja incorporado ao difosfato de Adenosina.

A ingesta alimentar promove liberação de nutrientes ao organismo. Por sua vez, estes chegam até as células onde ficam armazenados, para posterior fornecimento de energia, como os carboidratos (estocados como glicogênio)

e os lipídeos(sob a forma de triglicerídeos). Estes estoques representam acúmulo de energia sob forma estável e concentrada e acessível em condições de jejum e de demanda energética aumentada. O rendimento energético líquido da degradação de um mol de glicose(glicólise) a dois de piruvato fornece, igualmente, 40.000 calorias. Porém, este processo, denominado de glicólise anaeróbica, gera substratos para a "usina" celular(mitocondria). Os dois moles de piruvato formados são então degradados completamente a CO_2 e H_2O, gerando por mol de glicose aproximadamente 690.000 cal que corresponde a 36 moles de ATP (Lehninger 1988).

A utilização do piruvato como fonte energética ocorre no interior mitocondrial através da fosforilação oxidativa. Neste processo participam como precursores energéticos não apenas os carboidratos mas também os ácidos graxos e os aminoácidos. Pode-se dividir a fosforilação oxidativa em três etapas: 1)produção de Acetil Coenzima A (Acetil CoA) pela piruvato desidrogenase ou beta-oxidação 2)ciclo de Krebs e 3)sistema transportador de elétrons. O ciclo de Krebs apresenta um rendimento final líquido de 2 moles de ATP e a cadeia de transporte de eletrons de 32 moles de ATP(Stryer 1988)(vide figura-1).

Figura 1 - Vias de Fornecimento de Energia



1.2-Tipos de Exercício Físico e Demanda Energética

Durante a atividade física, as fontes energéticas utilizadas variam de acordo com a intensidade e duração do esforço. Nos momentos iniciais do exercício, ocorre metabolização das fontes energéticas primárias ATP e CP. Com o prosseguimento da atividade, passa a responder com maior suprimento energético a degradação dos carboidratos; glicogênio celular e glicose circulante (Hultman 1967). A conversão de um mol de glicose circulante em 2 de piruvato forma 2 de ATP, conforme já mencionado. Contudo, a conversão de 1 mol de glicose do glicogênio a piruvato forma 3 de ATP, pois esta glicose não precisa ser fosforilada, resultando em economia de 1 mol de ATP. Este piruvato ao ser convertido em acetil CoA, pela ação da piruvato desidrogenase, no interior da matriz mitocondrial, dá início ao processo oxidativo final da glicose.

Como descrito anteriormente, a degradação da glicose ou glicogênio a piruvato não constitui forma eficiente de produção de energia(ATP). Na fosforilação oxidativa, em função dos processos aeróbicos ocorre maior utilização dos ácidos graxos livres (A.G.L.) (Ahlborg et al 1974, Pirnay et al 1977; Ravussin et al 1979) que passam a responder pelo maior aporte energético nas atividades físicas de longa duração. Desta forma, as atividades de longa duração e baixa intensidade utilizam a via aeróbica como principal fonte energética. Esta via possui como fonte de substratos piruvato, aminoácidos e ácidos graxos livres

(Felig & Wahren 1975). Durante as atividades mais longas e menos intensas, a degradação dos ácidos graxos livres pela Beta-oxidação é preferível pela maior eficiência na formação de ATP (a degradação completa de um mol de palmitoil CoA até CO_2 fornece 131 moles de ATP no total). A Beta-oxidação ocorre no interior da mitocôndria e fornece acetilCoA que, através do ciclo de Krebs, libera CO_2. Entre os fatores que controlam a utilização dos ácidos graxos, o transporte através da membrana mitocondrial é de extrema importância. A carnitina atua ligando-se ao acilCoA formando o complexo acil-carnitina. Com a ação da carnitina palmitoil transferase, este complexo atravessa a membrana mitocondrial(Rebouche & Paulson 1986). Assim, o fornecimento reduzido de carnitina pode diminuir a utilização de ácidos graxos pelos tecidos.

As atividades de curta duração e alta intensidade apresentam, por sua vez, alterações metabólicas bem distintas que as de longa duração e baixa intensidade.Nessas atividades, a fonte energética predominante é a degradação do glicogênio muscular. O proceso glicolítico anaeróbico é a via preferencial pela rapidez com que conseguem fornecer energia e atender as solicitações energéticas imediatas da célula muscular.

1.3-Diferenciação dos Tecidos Musculares Esqueléticos.

Como citado por Keul et al(1972) já em 1678, Lorenzini diferenciou as fibras musculares de coelhos em

brancas e vermelhas. Mais tarde, cerca de dois séculos após, Ranvier em 1873 e Grutzner em 1884, demonstraram que os vertebrados possuem dois tipos extremos de fibras musculares que foram denominadas de fibras musculares escuras(tônicas) e pálidas(fásicas). Estas apresentariam adaptações metabólicas de acordo com o "treinamento" a que fossem submetidos. Mais recentemente, Saltin et al(1977) demonstraram existir três tipos distintos de fibras musculares. Estas fibras foram então classificadas como: 1)fibra do tipo I(contração lenta), 2)fibra do tipo IIA(contração rápida - oxidativa), 3)fibra do tipo IIB(contração rápida - glicolítica). Saltin descreve ainda as características metabólicas específicas de cada uma como demonstrado na tabela 1.

Como pode-se observar (vide tabela 1), as fibras musculares do tipo I possuem características fundamentais para a manutenção de esfórços de longa duração e baixa intensidade, devido a sua alta capacidade oxidativa e sua baixa velocidade de contração. Nessas as principais vias de geração de energia são as decorrentes dos processos oxidativos mitocondriais. Desta forma, estas fibras possuem grande capacidade de utilizar os ácidos graxos livres devido a sua elevada capilaridade e alto estoque de triglicerídeos. De modo oposto, as fibras do tipo IIB, que possuem uma alta capacidade glicolítica e também alta velocidade de contração, estão envolvidas em atividades de alta intensidade e curta duração. A glicólise é favorecida pela

alta capacidade glicolítica e alto estoque de glicogênio. Já as fibras do tipo IIA possuem alta resposta adaptativa ao esforço ou seja podem responder, quando solicitadas, de modo semelhante às fibras do tipoI ou tipoIIB.

TABELA 1 -CARACTERISTICAS DAS FIBRAS MUSCULARES HUMANAS

Propriedade	Tipo I	TipoIIA	TipoIIB
Velocidade de Contração	Lenta	Rápida	Rápida
Capacidade Glicolítica	Baixa	Moderada	Alta
Capacidade Oxidativa	Alta	Moderada	Baixa
Estoque de Glicogênio	Moderado Alto	Moderado Alto	Moderado Alto
Estoque de Triglicerídeos	Alto	Moderado	Baixo
Capilaridade	Boa	Moderada	Pobre

Modificado de Saltin et al(1977)

1.4-Fatores Metabólicos que Regulam a Fadiga ao Exercício Físico

A fadiga ao exercício pode ter sua ocorrência em vários pontos do organismo. Segundo Edwards (1983), a fadiga pode acontecer durante a atividade física a partir do sistema nervoso central pela redução da motivação e consequente alteração no recrutamento das unidades motoras. Na coluna espinhal pode ocorrer alteração da condução dos reflexos. Já nas inervações periféricas, a alteração na

condução neuro-muscular provocaria no sarcolema modificação do potencial de ação tendo como consequência, desbalanço de Na^+, K^+ e H_2O no sistema tubular transverso. Ainda, a alteração na excitação e a consequente modificação na ativação e no fornecimento de energia podem estar implicados. Como resultado disto, ocorreriam lesões na interação actina-miosina, nas pontes transversas e nos sarcômeros, provocadas pelo calor, com consequente redução da força. O efeito de todas estas alterações levaria à instalação do estado de fadiga. Desta forma, a fadiga pode ocorrer como consequência de eventos centrais e/ou periféricos.

Os mecanismos periféricos que levam à fadiga foram descritos por Sahlin (1986). Este autor descreve que a redução do pH intracelular causa redução da glicólise e consequente diminuição da regeneração do ATP. Isto provocaria aumento nas concentrações de ADP, redução da atividade da Na-K-ATPase, aumento da concentração de K^+ extracelular e finalmente fadiga muscular.

Percebe-se nítidamente que o entendimento dos mecanismos causadores de fadiga é bastante complexo. Estudos de Bergstrom et al (1967) e Hermansen et al (1967) demonstraram que é possível, através de manipulação nutricional associada à atividade física, aumentar a quantidade de glicogênio acumulada no músculo esquelético e que este aumento causa elevação proporcional no tempo de resistência ao esforço. Esta manipulação nutricional

refere-se à utilização de dieta hiperproteica por período de dois dias associada à atividade física intensa e posterior oferta de dieta rica em carboidratos por dois dias. O intuito da primeira etapa, é promover a redução dos estoques de glicogênio muscular. Este fato, eleva a atividade da enzima glicogênio sintetase, que com a oferta aumentada de glicose passa a sintetizar glicogênio rapidamente. Isto ocorre na segunda etapa quando os indivíduos recebem a dieta hiperglicídica, com treinamento moderado. A resposta a esta manobra nutricional e de atividade física, é a elevação dos estoques de glicogênio em aproximadamente 100%, com proporcional elevação do tempo de resistência ao esforço, como já descrito anteriormente. Entretanto, os mecanismos precisos que envolvem este efeito não foram esclarecidos. Por exemplo, como o aumento do conteúdo de glicogênio muscular pode elevar a resistência ao esforço se este não é a principal fonte energética nas atividades físicas de longa duração? O conteúdo de glicogênio muscular é suficiente para a manutenção de esforço moderado por aproximadamente 71 minutos (Newsholme & Leech 1988). Quais seriam, então, os mecanismos de utilização do glicogênio que garantiriam o fornecimento energético por longo período de atividade? Como pode-se explicar os resultados obtidos por Lancha, Jr.et al(1986) que, utilizando a mesma manipulação nutricional proposta por Bergstrom et al(1967), demonstraram que os teores de A.G.L. plasmáticos estão elevados após dieta hiperglicídica, pré e pós-exercício,

comparativamente aos valores da dieta hiperproteica? E que isto ocorre sem alteração da glicemia (Simões et al 1986)? Se o aumento do glicogênio muscular promove maior resistência ao esforço pela sua conversão a acetil CoA, porque ocorreria elevação dos níveis de A.G.L. quando da dieta hiperglicídica?

1.5-Aspectos Envolvidos na Funcionalidade do Ciclo de Krebs no Músculo Esquelético.

O glicogênio é degradado à piruvato e este posteriormente a acetil CoA. O acetil CoA condensa-se ao oxaloacetato e forma citrato; reação catalisada pela citrato sintase. O citrato, se não for metabolizado através do ciclo de Krebs, inibe alostéricamente a citrato sintase (Smith & Williamson,1971; Johnson & Hansford, 1975) e fosfofrutoquinase (Underwood & Newsholme 1965; Dunaway & Weber 1974; Tornheim & Lowenstein 1976; Newsholme et al 1977; Uyeda 1979). Dessa forma, a geração de citrato poderia bloquear a utilização de glicose e ácidos graxos (Rennie & Holloszy, 1977). O músculo esquelético libera para a corrente sanguínea entre outras a glutamina que é produzida a partir de oxoglutarato (Newsholme & Leech 1988). Este fato provoca o "escape" de metabólitos do ciclo de Krebs e aumenta o consumo de citrato (vide figura-3). Assim, o consumo de acetilCoA e a eficiência do ciclo de Krebs depende do aporte de oxaloacetato.

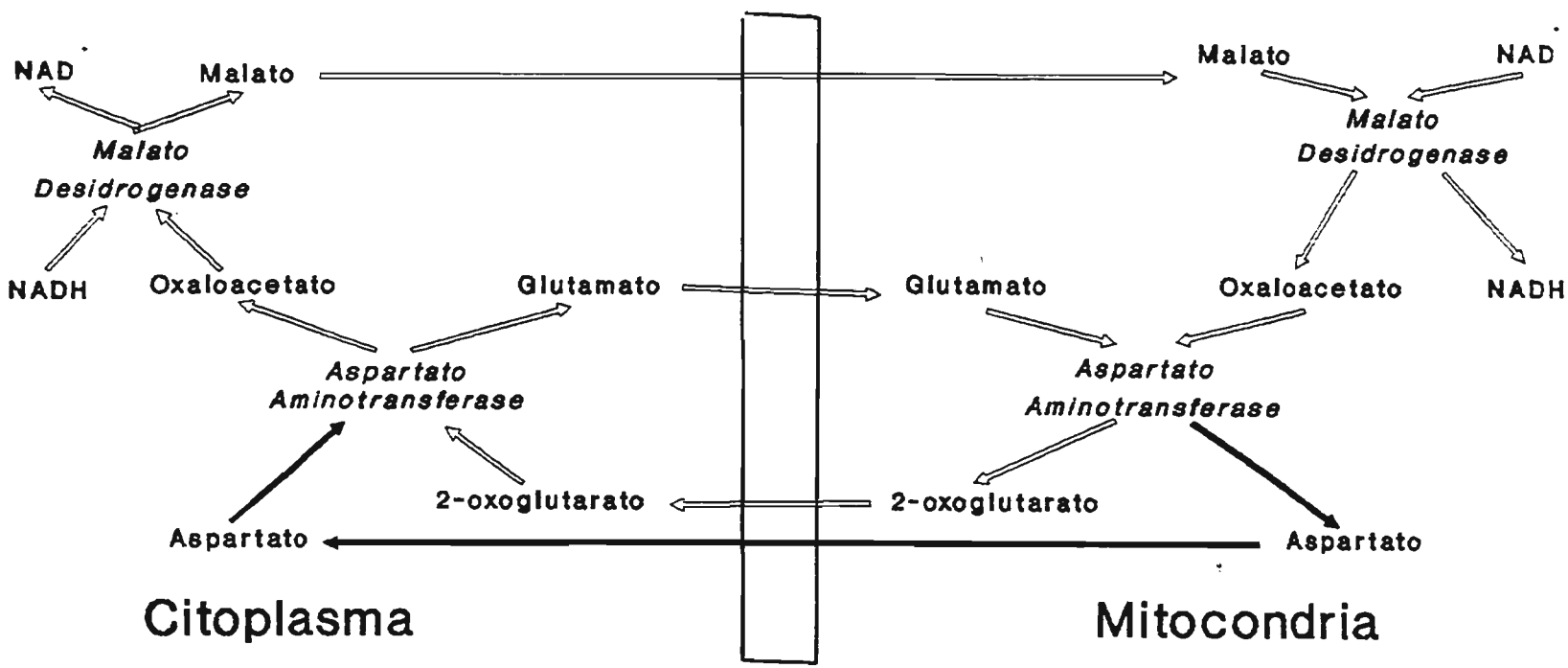
Durante a glicólise, ocorre a formação de piruvato no citoplasma celular, como já descrito anteriormente. Este pode ser convertido em acetil CoA pela ação da piruvato desidrogenase ou a lactato pela lactato desidrogenase. O piruvato pode também formar alanina pela alanina amino-transferase (Chang & Goldberg 1978) sendo que a produção hepática de glicose a partir da alanina, após quatro horas de exercício, pode chegar a 45% do total de glicose liberada pelo fígado(Felig & Wahren 1971). O piruvato pode ainda ser convertido a oxaloacetato pela ação da piruvato carboxilase (Ballard et al 1970). Assim, é possível que, durante a atividade de longa duração, a glicose degradada esteja alimentando o ciclo dos ácidos tricarboxílicos em dois pontos. Poderia ser convertida a acetil Coa através da piruvato desidrogenase ou gerar oxaloacetato pela ação da piruvato carboxilase . Este metabólito seria imprescindível para a remoção do excesso de acetil CoA, garantindo a atividade do ciclo de Krebs para produção de energia e de outros metabólitos como a glutamina. Sendo assim, torna-se possível entender porque a reserva de glicogênio aumentada promoveria maior resistência ao esforço. Sua função principal não seria manter o aporte energético via produção de piruvato e acetil CoA mas, sim, assegurar a atividade do ciclo de Krebs fornecendo oxaloacetato Este metabólito permitiria a remoção do acetilCoA e portanto a metabolização dos ácidos graxos, garantido a realização do esforço físico por períodos prolongados.

A atividade da piruvato carboxilase não é importante no músculo somente para a metabolização dos ácidos graxos livres. Já foi mencionado anteriormente que, em vários pontos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ocorre "escape" de seus produtos. Além daqueles descritos outros precisam ser mencionados. O citrato que pode permear a membrana mitocondrial reagindo com a CoA e ATP no citossol; catalisada pela citrato liase, formando acetil CoA. Este, por sua vez, pode-se constituir em precursor da biossíntese de lípides (ocorrência pouco provável durante o esforço). Outro ponto de "escape" é a conversão de oxaloacetato à fosfoenolpiruvato (catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase) que, sob a ação da piruvato quinase, será convertido a piruvato (Curi 1988); e este à alanina ou lactato. Existe também o escape do ciclo de Krebs na biossíntese de glutamina conforme já mencionado. Esta é formada a partir do 2-oxoglutarato e da transaminação com valina que forma o glutamato. Reagindo com a amonia, oriunda da desaminação de leucina, o glutamato é convertido à glutamina (Newsholme & Leech 1988). Este mecanismo é ativado durante a atividade física de baixa intensidade e longa duração (Rennie et al 1981;Millward et al 1982)

O sistema de lançadeira Aspartato/Malato representa ponto de "escape" do ciclo de Krebs (vide figura-2). Este mecanismo promove a remoção de aspartato e 2-oxoglutarato do interior mitocondrial . Estes, reagem, na região citoplasmática, pela ação da aspartato

aminotransferase dando origem ao oxaloacetato e glutamato. O glutamato, por sua vez, permeia a membrana mitocondrial e reage com o oxaloacetato, novamente pela ação da aspartato aminotransferase, gerando aspartato e 2-oxoglutarato que reiniciam o ciclo. O oxaloacetato, formado na região citossólica, é convertido a malato, pela ação da malato desidrogenase com consumo de NADH. O malato formado, atravessa a membrana mitocondrial e novamente pela ação da malato desidrogenase, é convertido a oxaloacetato gerando NADH. Este mecanismo é considerado de extrema importância para a oxidação do NADH citoplasmático(Crabtree & Newsholme 1972 ; Williamson et al. 1973). Acreditamos, particularmente, que este mecanismo deva ocorrer principalmente durante o estado de recuperação da atividade física. Entretanto, alguns autores sugerem sua ocorrência durante a atividade física de baixa intensidade (Wasserman et al 1986; Palma et al 1989).

Figura 2 - Lançadeira Aspartato - Malato



Modificado de Newsholme and Leech 1988

Como consequência dos "escapes" citados, a atividade do ciclo de Krebs é regulada pela quantidade de seus próprios substratos. Assim, a partir do momento em que ocorre redução de seus substratos/produtos, sua velocidade cai, diminuindo, com isto, o aporte energético muscular de origem oxidativa. Como consequência, o músculo passa a utilizar as fontes citoplasmáticas para atender a demanda energética da atividade física. A produção de energia pelo compartimento citoplasmático é basicamente representada pela glicólise anaeróbica gerando ácido lático. O ácido lático formado dissocia-se em lactato e H^+. O acúmulo de H^+ no citoplasma celular e portanto a redução do pH, inibe a atividade da fosfofrutoquinase reduzindo a atividade da via glicolítica. Este fato diminui o fornecimento energético celular provocando a interrupção da atividade física e fadiga (Sahlin 1986). Para se opor a isto, seria necessária a manutenção de grande quantidade de precursores metabólicos dos componentes do ciclo de Krebs. Como já mencionado anteriormente, é possível que o glicogênio alimente o ciclo via conversão de piruvato à oxaloacetato.

2.HIPOTESE DO PRESENTE ESTUDO

Os aminoácidos asparagina e aspartato são precursores de oxaloacetato (Newsholme e Leech 1988). Possivelmente, o aumento no aporte desses aminoácidos eleve as concentrações de oxaloacetato no interior da mitocondria. Assim, haveria substrato suficiente para metabolizar o

grande volume de acetil CoA oriundo da oxidação dos A.G.L. facilitada pela ação da carnitina. Reforçando esta idéia, sabe-se que, os níveis de asparagina, aspartato e carnitina circulantes são inferiores em ratos sedentários quando comparados com animais exercitados (Miller et al 1987), o que sugere estímulo da síntese destes no fígado. Reforçando este raciocínio, tem-se que os animais treinados e em repouso possuem valores de asparagina, aspartato e carnitina circulantes superiores aos seus pares treinados sacrificados após a atividade física (Miller et al 1987).

A atividade da enzima aspartato aminotransferase, que promove a síntese de oxaloacetato a partir de aspartato, está aumentada no tecido muscular, quando fatores como anêmia e atividade física de longa duração estão presentes (Ohira et al 1987). Evidentemente, o aumento da atividade das enzimas do sistema oxidativo, bem como da enzima aspartato amiotransferase quando do estado anêmico, difere em muito da elevação provocada pela atividade física. Esta caracteriza-se pela maior produção de ATP, via ciclo de Krebs, para suprir a reduzida capacidade do sitema de transporte de eletrons, prejudicado a nível de citocromo pela ausência de ferro (Johnson et al, 1990). Já durante a atividade física, o aumento das atividades das enzimas oxidativas da-se pelo aumento da biogenese de mitocondrias provocado pelos processos de esquemia e reperfusão resultantes da contração muscular (Ohira et al 1987 e Johnson et al 1990)

Em vista das evidências apresentadas, o fornecimento suplementar de asparagina e aspartato deve provocar aumento da quantidade de oxaloacetato no interior mitocondrial, garantindo a alta atividade do ciclo de Krebs. Por sua vez, o fornecimento adicional de carnitina promoveria elevação no conteúdo intramitocondrial de acetil CoA pelo aumento de transporte de A.G.L.. Assim, a associação destes fatores poderia contribuir para aumentar a eficiência do sistema fornecedor de energia e consequentemente da resistência ao esforço.

Para verificar se esta hipótese é verdadeira, o presente trabalho foi desenvolvido. O objetivo foi determinar se a administração crônica de uma solução contendo carnitina, asparagina e aspartato promove maior resistência ao esforço de longa duração e baixa intensidade. Os A.G.L. representam a mais importante fonte de energia no exercício de longa duração e baixa intensidade (Newsholme & Start 1973). Entretanto, que fatores limitariam a sua utilização pelo músculo, causando exaustão?

Alguns estudos realizados anteriormente tentaram avaliar esta questão. Soop et al (1988), trabalhando com suplementação nutricional de carnitina (beta-hidroxy-gama-trimetilaminobutirato), demonstraram que não ocorre melhoria na performance nem alteração da fonte energética utilizada quando esta substância é administrada isoladamente. Da mesma forma, Negrão(1985) demonstrou não ocorrer aumento da mobilização de A.G.L. através da suplementação nutricional,

apenas, de carnitina. Assim, a carnitina não é o fator limitante para a oxidação dos ácidos graxos nessas condições. Sahlin (1990) demonstrou que, em exercícios de alta intensidade, o conteúdo muscular de acetilcarnitina aumenta proporcionalmente com o aumento dos teores de lactato e piruvato. Este fato sugere que a acetilcarnitina desempenha o papel de "sequestrador" de acetil CoA (Harris et al 1987). Desta forma, a razão acetilcarnitina/carnitina atuaria como reguladora das concentrações de acetilCoa/CoA (Bieber 1988) . Pelos fatos apresentados, acredita-se que o aumento no conteúdo de oxaloacetato no interior mitocondrial, provocado pelo fornecimento suplementar de seus precursores, promoveria elevação na atividade do ciclo de Krebs. Esta aumentaria o consumo de acetil CoA. Assim o fornecimento suplementar de carnitina com aspartato e asparagina garantiria que o aporte de acetil CoA fosse compatível com a atividade elevada do ciclo de Krebs. Esta é a proposição deste estudo. As informações bioquímicas descritas estão apresentadas na figura 3.

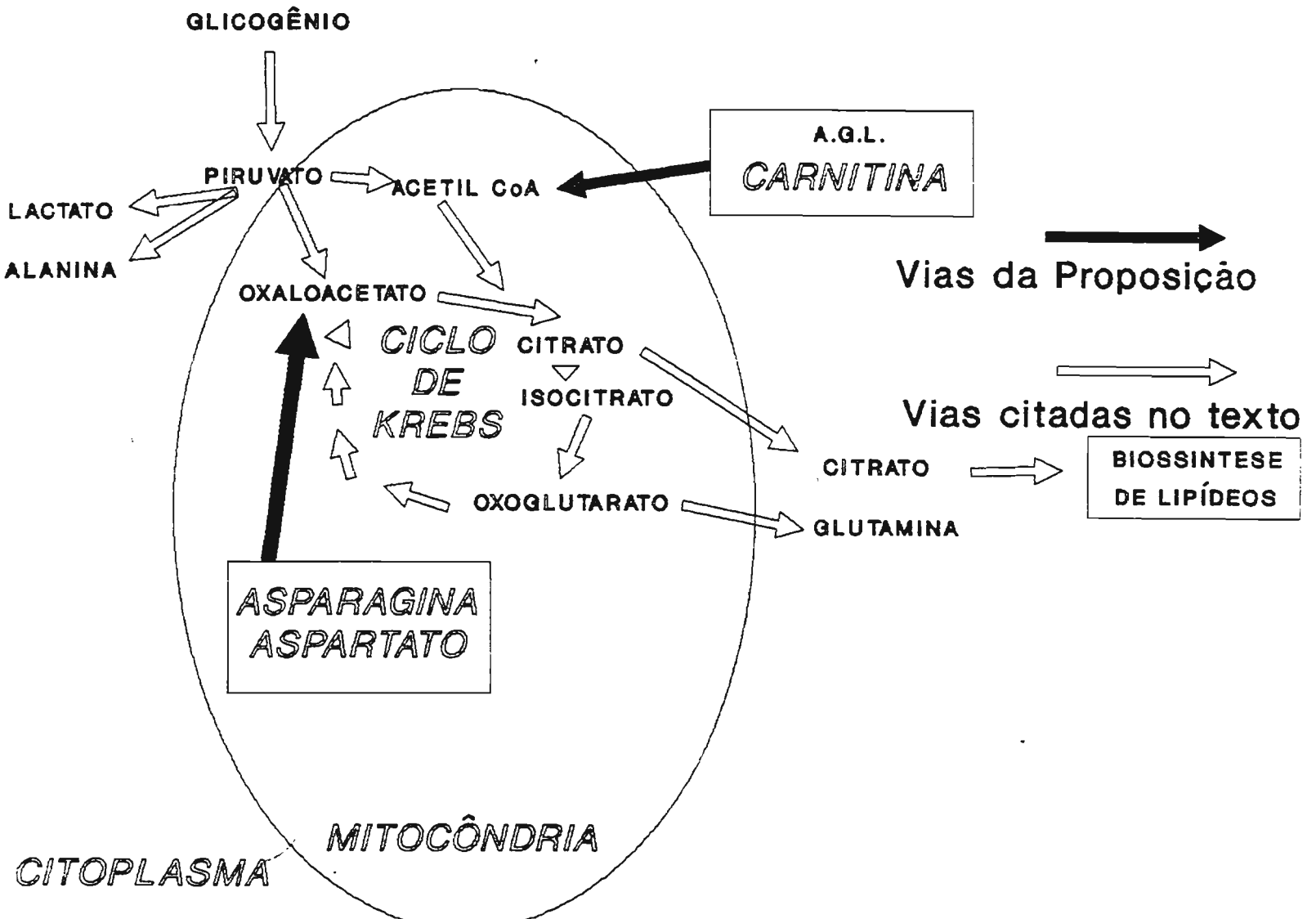


Figura 3 - Esquema do Estudo

3-MATERIAL e METODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos albinos pesando 250g provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas - USP. Os animais foram mantidos em grupos de cinco por gaiola (com exceção dos animais da atividade espontânea) mantidos a temperatura de 23°C e período claro/escuro de 12/12horas. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab CR 1,Nuvital Nutrientes LTDA. Estrada da Ribeira 3001, Km 3, Curitiba) de composição aproximada de 52% de carboidratos, 21% de proteinas e 4% de gorduras.

3.2 Reagentes

Os reagentes para a preparação dos tampões foram obtidos da Reagen, São Paulo. Lactato Desidrogenase, NAD, DTNB (5,5-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid), Triton X-100, Piruvato e Acetil CoA foram obtidos da Sigma Chemical, USA.

3.3 Suplementação da Dieta

O grupo controle(C) recebeu apenas a ração comercial e água, quantificada a cada dois dias. O grupo suplementação(S) recebeu também ração comercial e água contendo asparagina(45mg.Kg^{-1}.dia^{-1}), aspartato(45mg.Kg^{-1}.dia^{-1}) e carnitina(90mg.Kg^{-1}.dia^{-1}), quantificada também a cada dois dias. Ambos os grupos foram submetidos às seguintes condições:a) sem atividade (ratos sedentários), b) atividade física espontânea em gaiola rotatória, c) treinamento em natação por cinco semanas. O grupo treinado à natação foi sacrificado nas seguintes condições

experimentais: a) antes da natação para avaliar o efeito do treinamento, b) após uma hora de natação e c) no momento da exaustão.

3.4 Ratos Sedentários

Foram utilizados vinte animais, divididos em dois grupos (C) e (S).Os dez animais de cada grupo foram divididos em duas gaiolas. Cada gaiola(17cm de altura, 33cm de largura e 44cm de comprimento) contendo cinco animais. Estes animais foram mantidos nas condições experimentais durante cinco semanas sem serem submetidos a treinamento, apenas manuseados de modo semelhante aos animais treinados.

3.5 Atividade Espontânea

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas rotatórias (Vieira et al 1987) durante cinco semanas. Esta condição permitiu ao animal desenvolver atividade de baixa intensidade e duração prolongada.

3.6 Treinamento em Natação

Para adaptação ao meio líquido e ao sistema de natação (Vieira et al 1987), os animais foram exercitados por cinco dias com sobrecargas crescentes até 5% do peso corporal. Após a primeira semana de adaptação, os animais dos dois grupos(C e S) foram treinados por cinco semanas, cinco dias por semana, durante uma hora por dia com a sobrecarga de 5% do peso corporal. Os ratos treinados em

natação foram então sacrificados em repouso, após uma hora de natação e após exaustão. A natação foi realizada na temperatura de 32°C entre 11:00 e 13:00 horas.

3.7 Determinação do Tempo de Exaustão

Foi considerado como exausto o animal que não conseguia manter as narinas fora da água. Neste momento, o tempo de natação foi anotado e o animal sacrificado imediatamente.

3.8 Procedimento Experimental

Os animais foram sempre sacrificados entre 11:00 e 13:00 horas (com exeção dos animais do grupo exaustão). O sangue foi coletado para a determinação da glicose, ácidos graxos livres(A.G.L.) e lactato. O fígado, coração, e músculos sóleo e gastrocnêmio(porção branca) foram removidos para a determinação do glicogênio e atividade máxima das enzimas citrato sintase e piruvato carboxilase. Foi removido o tecido adiposo epididimal para se estabelecer a relação da massa adiposa com o peso corporal.

3.9 Tecido Adiposo Epididimal

O tecido adiposo epididimal foi removido e imediatamente pesado. Este tecido é utilizado como indicador do conteúdo total de lipides dos animais (Rodbell 1964). O peso deste tecido foi dividido pelo peso corporal do animal,

obtido antes do sacrifício, e multiplicado por 100 para se obter o valor relativo em percentagem.

3.10 Determinações Plasmáticas

A glicose plasmática foi determinada pelo método descrito por Dubowiski(1962), lactato pelo método de Engle e Jones(1978) e A.G.L. pelo método de Falholt et al(1973).

3.11 Glicogênio Muscular, Cardíaco e Hepático

O glicogênio muscular(sóleo e gastrocnemio-porção branca), hepático e cardíaco foi extraído pela digestão dos tecidos por 30 minutos em solução de KOH 30% em banho fervente. A extração final foi obtida através da precipitação com etanol 70% em duas etapas. O glicogênio foi então determinado com a mistura antrona e ácido sulfúrico pelo método descrito por Hassid e Abrahams(1957).

3.12 Atividades Máximas da Citrato Sintase e Piruvato Carboxilase.

Os tecidos (sóleo, gastrocnemio, cardíaco e hepático) foram dissecados e congelados. Estes foram estocados em nitrogênio líquido até as determinações enzimáticas serem processadas. Os tecidos

foram então homogeneizados utilizando equipamento desenvolvido por Vieira et al (1989). O meio de extração para a enzima citrato sintase(EC.4.1.3.7) consistiu de 50mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA com pH final de 7.4. Para a enzima piruvato carboxilase(E.C.6.4.1.1) o meio de extração consistiu de 50mM de Tris-HCl, 300mM de Sacarose e 1mM de EDTA com pH final de 7.4.

A mistura de ensaio para a citrato sintase consistiu de: 100mM de Tris-HCl, 0,4mM de DTNB, Triton X-100 1% e 15mM acetil CoA . A mistura de ensaio da piruvato carboxilase consistia de : 400mM de Tris-HCl, 100mM de $MgCl_2$, 4mM de DTNB, 50mM de ATP, 15mM de acetil CoA,200mM de $NaHCO_3$, 100mM de Creatina fosfato e Triton X-100 1%.

A atividade máxima da citrato sintase foi determinada baseada no fato de que a reação do acetil CoA com o oxaloacetato forma citrato e CoA. O DTNB reage com a CoA produzindo cor amarelada. A piruvato carboxilase foi medida da seguinte maneira. A carboxilação do piruvato forma oxaloacetato e este reage com acetil CoA, sob ação de excesso de citrato sintase, formando citrato e CoA. O DTNB reage com a CoA dando cor amarelada. O complexo amarelo formado pela reação do DTNB com a CoA é absorvido em 412nm.

3.13 Análise Estatistca

As diferenças estatísticas entre os grupos (C) e (S) foram calculadas utilizando o teste t de Student para $p<0,05$ ou $p<0,01$, conforme indicado nos resultados.

4. Resultados

Os resultados que serão apresentados, estão ao final deste capítulo expressos sob a forma de gráficos com as médias e devidas significâncias . O "Apêndice" apresenta os resultados em tabelas com as médias, desvios padrões e significâncias.

4.1 Plasmáticos

Os resultados encontrados demonstram que a glicemia dos animais submetidos as condições de: atividade espontânea, treinados, natação por uma hora e exaustão, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (C) e (S). Já os animais sedentários do grupo (C) apresentaram concentrações de glicose plasmáticas maiores que o grupo (S)($p<0,01$) .

Os A.G.L. do plasma apresentaram-se de maneira semelhante entre os grupos nas seguintes condições: atividade espontânea, treinados e natação por uma hora. Já os animais das condições sedentária e exaustos tiveram concentrações maiores de A.G.L. no grupo (S) em comparação com o grupo (C)($p<0,01$).

O lactato teve concentração plasmática semelhante entre os grupos (C) e (S) nas seguintes condições: atividade espontânea, natação por uma hora e exaustão. Nas condições sedentária e treinados, o grupo (S) apresentou valores maiores de lactato plasmático em comparação com o grupo (C) ($p<0,05$).

4.2 Glicogênio

4.2.1 Muscular Esquelético

O músculo sóleo apresentou a mesma concentração de glicogênio entre os grupos nas seguintes condições: atividade espontânea, treinados e natação por uma hora. Já os animais sedentários apresentaram maior conteúdo de glicogênio muscular no grupo (S) para os animais na condição sedentária($p<0,01$). Na exaustão, os animais do grupo (C) tiveram maior conteúdo de glicogênio que o grupo (S) ($p<0,05$).

No músculo gastrocnêmio, os animais treinados, após natação por uma hora e exaustão, não apresentaram diferenças entre os grupos. Por outro lado, nos animais sedentários e em atividade espontânea, o conteúdo de glicogênio foi maior no grupo (S) em comparação com o grupo (C) ($p<0,05$ e $p<0,01$ respectivamente).

4.2.2 Cardíaco e Hepático

O conteúdo de glicogênio hepático não foi diferente entre os grupos nas seguintes condições: sedentários, atividade espontânea, treinados e natação por uma hora. Nos animais exercitados até a exaustão, o grupo (S) apresentou maior conteúdo de glicogênio que o (C) ($p<0,05$).

No coração, os animais sedentários e exaustos, não apresentaram diferenças entre os grupos. Nos animais de atividade espontânea e treinados, o grupo (C) apresentou maior conteúdo de glicogênio cardíaco comparados ao grupo

(S) ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente). Já os animais exercitados por uma hora, o grupo (S) apresentou maior conteúdo de glicogênio que o (C)($p<0,01$).

4.3 Atividade da Citrato Sintase e Piruvato Carboxilase

4.3.1 Músculos Esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio)

A atividade da citrato sintase não foi diferente entre os grupo nas condições sedentária e exaustão para ambos os músculos. Também não foi observada diferença significativa, entre os grupos, no gastrocnêmio, nas condições treinado e após natação por uma hora. Já os animais do grupo (S), apresentaram maior atividade da citrato sintase no sóleo na condição de atividade espontânea ($p<0,01$). O treinamento e a natação por uma hora inverteram esta situação e o grupo (C) passou a apresentar maior atividade desta enzima que o grupo (S)($p<0,05$).

A atividade da piruvato carboxilase foi semelhante entre (C) e (S) no músculo sóleo dos animais mantidos nas condições atividade espontânea e natação por uma hora. Nos animais sedentarios, treinados e exaustos, a suplementação da dieta elevou a atividade desta enzima em relação ao controle ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,05$ respectivamente).

4.3.2 Cardíaco e Hepático

No fígado, não foi observada diferença significativa, na atividade da citrato sintase, após exaustão, entre os grupos. Nos animais sedentários e

treinados, o grupo (C) apresentou maior atividade desta enzima em comparação ao (S)($p<0,01$ e $p<0,05$ respectivamente). Contudo, os animais em atividade espontânea e natação por uma hora quando apresentaram maior atividade da citrato sintase no grupo (S) ($p<0,01$ e $p<0,05$ respectivamente). No coração, a atividade desta enzima apresentou-se elevada no grupo (S) para os ratos sedentários, em atividade espontânea e exaustos ($p<0,01$, $p<0,05$ e $p<0,05$, respectivamente). O treinamento elevou essas diferenças no músculo cardíaco. A natação por uma hora, não apresentou diferenças entre os grupos com relação a citrato sintase.

A atividade da enzima piruvato carboxilase apresentou-se de maneira semelhante nos animais submetidos a natação por uma hora e exaustos em ambos os tecidos. No fígado, a atividade desta enzima não foi diferente entre (S) e (C) para as condições de atividade espontânea e após treinamento. Com relação aos sedentários, o grupo (C) apresentou maior atividade da piruvato carboxilase no tecido hepático ($p<0,05$).

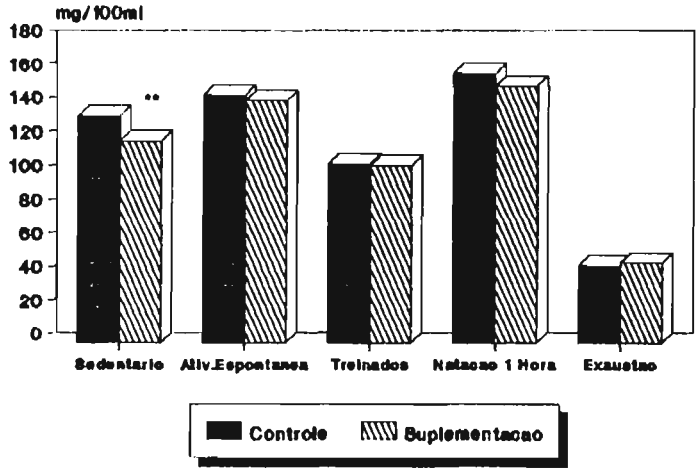
No coração observou-se maior atividade da piruvato carboxilase no grupo (S) para os ratos sedentários e em atividade espontânea ($p<0,01$). Nos animais treinados, resultados opostos foram obtidos.

4.4 Tecido Adiposo Epididimal

O peso relativo do depósito adiposo epididimal não foi diferente entre os grupos (S) e (C) nos ratos treinados,

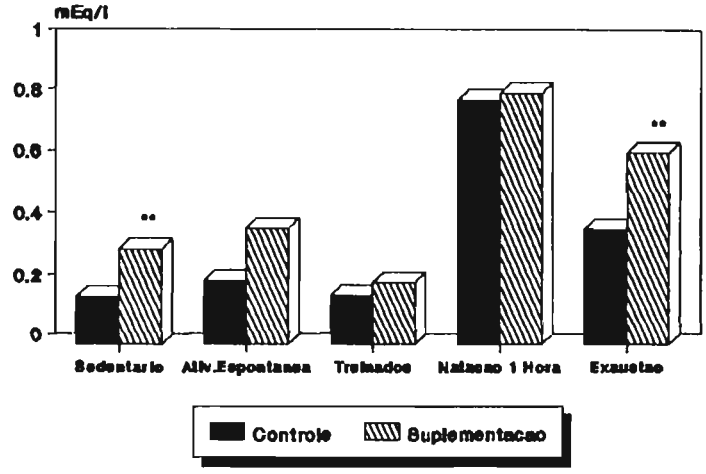
após natação por uma hora e exaustos. Já os animais submetidos à condição sedentária, o grupo (S) apresentou maior peso relativo deste tecido em comparação ao (C) ($p<0,01$).

Gráfico 1 - Glicemia



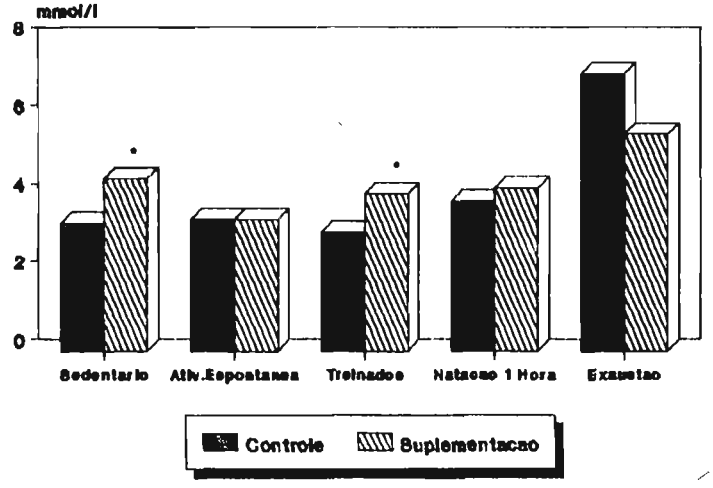
* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 2 - A.G.L.



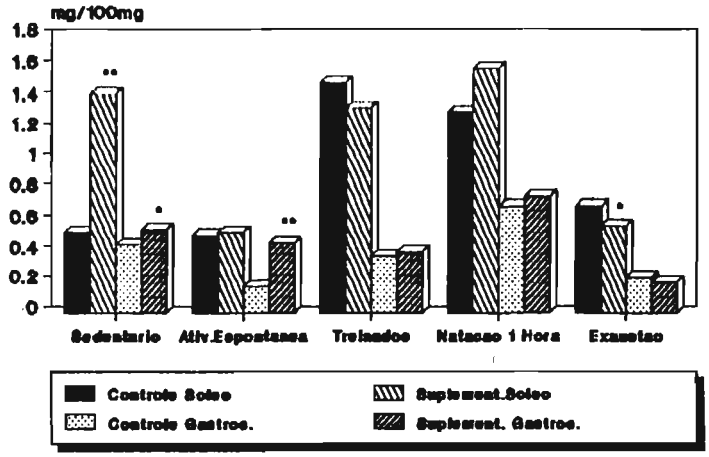
* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 3 - Lactato



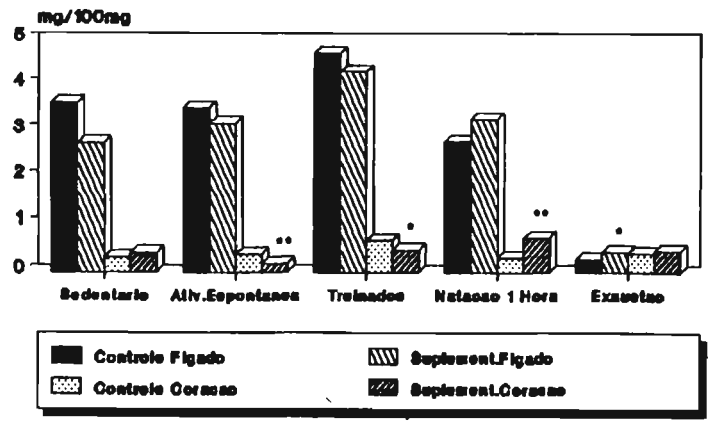
* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 4 - Glicogênio Muscular



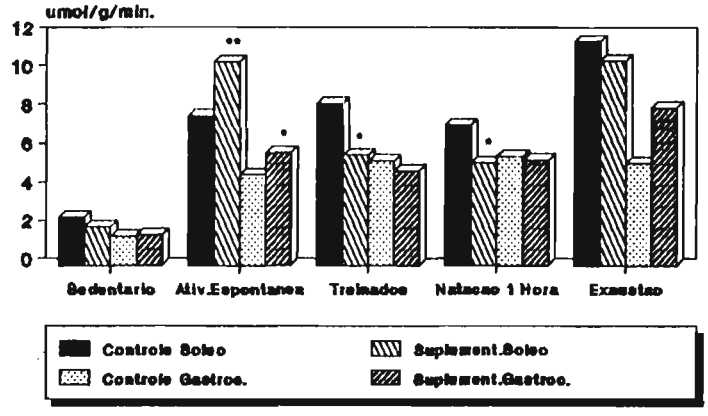
• p<0,05 •• p<0,01

Gráfico 5 - Glicogênio
Hepático e Cardíaco



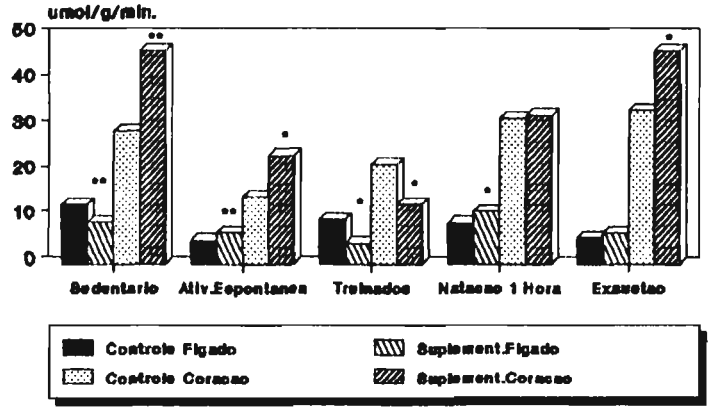
• p<0,05 •• p<0,01

Gráfico 6 - Citrato Sintase
Muscular



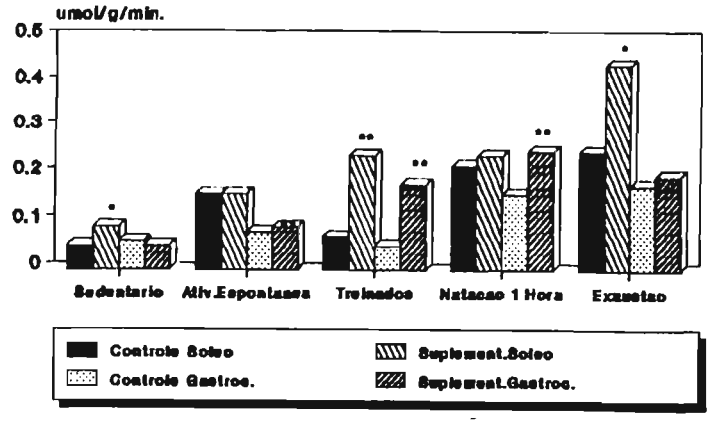
* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 7 - Citrato Sintase
Fígado e Coração



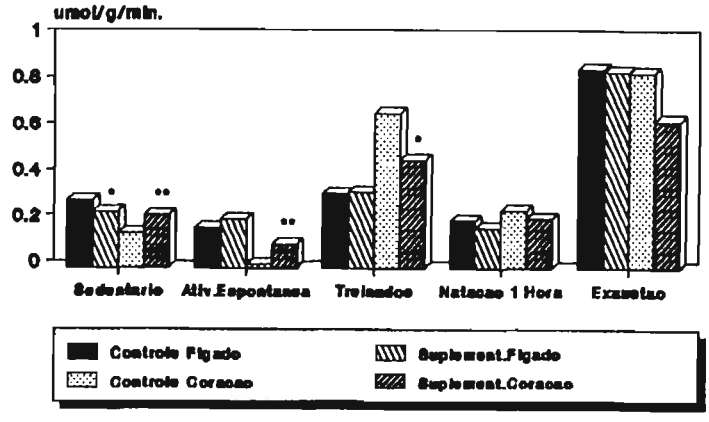
* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 8 - Piruvato Carboxilase
Muscular



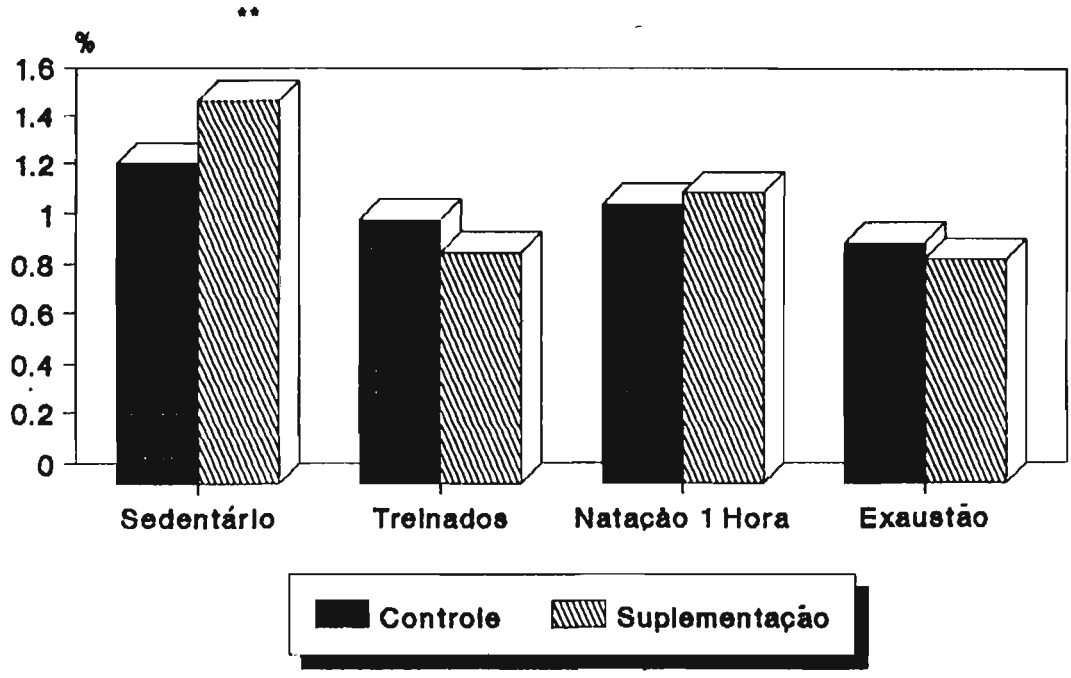
* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 9 - Piruvato Carboxilase
Fígado e Coração



* p<0,05 ** p<0,01

Gráfico 10- Tecido Adiposo
Epididimal



* p<0,05 ** p<0,01

5. Discussão

5.1 Grupo Sedentário

5.1.1 Determinações Plasmáticas

Como observado no capítulo anterior, o grupo (S) apresentou maior concentração plasmática de A.G.L. e lactato e menor de glicose que o grupo (C). Este fato sugere aumento da utilização dos A.G.L. pelos animais que receberam a suplementação. E sabido, que a glicose circulante aumentada, reduz a utilização dos A.G.L.(Bagby et al. 1978). Este fato demonstra que os animais que receberam aspartato, asparagina e carnitina apresentaram maior consumo de A.G.L. que o grupo (C). A utilização de piruvato pela via oxidativa é regulada pelo conteúdo de acetil CoA celular, pois este inibe a enzima piruvato desidrogenase (Newsholme & Leech 1988). A elevação plasmática dos A.G.L. indica grande utilização deste no fornecimento energético. Estes resultados sugerem que, devido ao grande aporte de acetil CoA oriundo dos A.G.L. nos animais do grupo (S), a piruvato desidrogenase foi inibida, favorecendo a formação de lactato que se apresentou em concentrações elevadas no plasma do grupo (S) (vide tabela 2).

5.1.2 Glicogênio

5.1.2.1 Muscular Esquelético

Os resultados encontrados de glicogênio muscular demonstram que os animais do grupo (S) apresentaram maior concentração deste em comparação ao grupo (C) em ambos os tecidos (gastrocnêmio e sóleo). A diferença em favor do

grupo (S) foi da ordem de 160% para o músculo sóleo e de 20% para o gastrocnêmio. Esta diferença observada entre os tecidos nos animais do grupo (S) e justifica-se por ser o sóleo composto de fibras do tipo I(vide tabela 1) e consequentemente alvo mais efetivo para a ação dos aminoácidos e carnitina suplementados. Este aumento no conteúdo de glicogenio reforça a hipótese levantada no ítem anterior de maior consumo de A.G.L e redução da glicólise. Na condição sedentária, sabe-se que a principal via energética utilizada é a oxidativa (Passmore & Eastwood 1986). Isto favorece a utilização dos A.G.L. nesta condição. O aumento no conteúdo de acetil CoA reduz a quebra de glicogênio. Este fato foi demonstrado por Stanko et al (1990) que suplementaram a alimentação de atletas com precursores de acetil CoA e verificaram aumento do conteúdo de glicogênio muscular. Assim, acredita-se que o aumento na utilização de A.G.L tenha, nos animais do grupo (S), elevado o conteúdo de acetil CoA inibindo a degradação do glicogênio muscular para este fim. (vide tabela 3).

5.1.2.2 Cardíaco e Hepático

Nos tecidos cardíaco e hepático não foi observada diferença no conteúdo de glicogênio entre os grupos. O tecido cardíaco utiliza predominantemente os A.G.L. para o fornecimento enrgético. Nos animais suplementados a utilização dos A.G.L. pelo coração foi provavelmente elevada, reduzindo o consumo de lactato por esse tecido causando também aumento na concentração de lactato

plasmático neste grupo. É sabido que o coração constitui um dos principais orgãos que utilizam lactato circulante para o fornecimento de energia. Este orgão possui a enzima lactato desidrogenase sob a forma de sua isoenzima H, que converte o lactato à piruvato para posterior oxidação (Kaplan & Everse 1972). Com o aumento da utilização dos A.G.L. nas células cardíacas nos animais do grupo (S), o consumo de lactato como fonte de acetil CoA ficaria inibido. Desta forma, o lactato circulante estaria ainda mais elevado e, no interior celular, restaria a sua possível utilização para o fornecimento de oxaloacetato, pela ação da piruvato carboxilase nos tecidos oxidativos.

5.1.3 Atividade Enzimática

5.1.3.1 Muscular Esquelético

Não foi observada diferença significativa entre os grupos na atividade máxima da citrato sintase nos tecidos musculares dos animais sedentários(vide tabela 5). Provavelmente, o estado sedentário não tenha induzido alterações quantitativas do sistema oxidativo nas células musculares. Entretanto, a atividade da enzima piruvato carboxilase apresentou-se elevada em 80% no músculo sóleo dos animais do grupo (S) em comparação ao grupo (C)(Tabela 7). Este fato reforça a hipótese levantada no item 5.1.2.2 onde pressupõe-se que o lactato formado no interior das células de capacidade oxidativa elevada, foi possivelmente

utlizado para a síntese de oxaloacetato, pois o fornecimento de acetilCoA deve ter sido suprido pelo aporte de A.G.L..

5.1.3.2 Hepático e Cardíaco - A atividade da enzima citrato sintase apresentou-se reduzida no tecido hepático dos animais do grupo (S). Acredita-se que isto ocorreu pela redução, observada, da piruvato carboxilase para o mesmo tecido destes animais(tabelas 6 e 8). Os resultados das atividades enzimáticas para o tecido cardíaco confirmam a hipótese levantada nos ítens anteriores. A enzima citrato sintase apresentou-se elevada, em aproximadamente 60% no coração dos animais do grupo (S), em comparação com o grupo (C)(Tabela 6). Este fato, juntamente com a atividade aumentada da piruvato carboxilase em 52%(Tabela 8), também no grupo(S), sugerem que os animais deste grupo passaram a metabolizar acentuadamente os A.G.L. como fonte de acetil CoA, deslocando assim o piruvato para a síntese de oxaloacetato. A enzima piruvato carboxilase é estimulada pelo aumento de piruvato e de acetil CoA (Newsholme & Start 1976). Desta forma, pode-se acreditar que o fornecimento suplementar de asparagina, aspartato e carnitina tenha sido eficiente no fornecimento de oxaloacetato garantindo o aumento da atividade da citrato sintase nestes animais. Por sua vez, o maior aporte de acetil CoA, favorecido pelo consumo de A.G.L., bem como a disponibilidade de piruvato à celula cardíaca, favoreceriam o aumento da atividade da enzima piruvato carboxilase encontrada neste tecido. Estes fatos conflitam-se com os

relatos de Randle et al (1963) e Randle (1981).Estes autores sugeriram que, com o aumento do consumo de A.G.L., ocorre redução da utilização dos carboidratos(glicose e glicogênio) pela célula cardíaca. Se neste caso isto ocorresse, seria de se esperar que o conteúdo de glicogênio estivesse mais elevado no coração dos animais do grupo (S), o que não foi observado em nossos resultados(Tabela 4). Acredita-se que o aumento no consumo de A.G.L. pela célula cardíaca, faz com que ocorra elevação no conteúdo de acetil CoA, provocando inibição da atividade da enzima piruvato desidrogenase (Newsholme & Leach 1988), causando acúmulo de piruvato. Estes dois fatores, como já mencionado, promovem o estímulo da enzima piruvato carboxilase, garantindo a elevação da atividade da citrato sintase pela formação de oxaloacetato. Desta maneira, o ciclo glicose-ácidos graxos teria a sua funcionalidade alterada quando o suprimento de oxaloacetato para a célula estivesse elevado como no grupo (S). O maior aporte de oxaloacetato remove acetil CoA com mais eficiência e reduz o efeito inibitório sobre a piruvato desidrogenase Assim, como conseqência, ocorre degradação de A.G.L. juntamente com a glicídica, provocando fornecimento suplementar de energia pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Isto faz com que aumente as concentrações de precursores para os "escapes" deste ciclo. Na condição sedentária isto poderia ocorrer, por exemplo, no sentido da biossíntese de lípides.

5.1.4 Tecido Adiposo Epididimal

O peso relativo do tecido adiposo epididimal(Tabela-9) encontrados nos animais sedentários, apresentou-se 20% superior nos animais do grupo (S) em comparação com (C). Este fato reforça a idéia levantada no item anterior de que, pelo aumento das atividades da citrato sintase(Tabela 6) e piruvato carboxilase(Tabela 8) no coração dos animais do grupo (S), estes animais estariam metabolizando conjuntamente A.G.L. (elevado no plasma dos animais do grupo (S)) e glicogênio, gerando maior produção energética e de precursores para síntese de outros metabólitos como os triglicerídeos do tecido adiposo.

5.2 Atividade Espontânea

5.2.1 Determinações Plasmáticas

Os resultados obtidos das dosagens de lactato, A.G.L. e glicose mostraram-se semelhantes nos grupos (C) e (S)(Tabela 2). A atividade física de intensidade moderada a elevada (50 a 70% VO_2max.)promove euglicemia, não ocorrendo o mesmo com os A.G.L. (Weber et al 1990). Desta forma, quando os animais foram submetidos a atividade física, a glicemia alterada do estado sedentário tornou-se semelhante entre os grupos (C) e (S). Este fato deve ter contribuido para os resultados de lactato e A.G.L. encontrados.

5.2.2 Glicogênio

5.2.2.1 Muscular - O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou diferença significativa entre os

animais dos grupo (C) e (S) no músculo sóleo(Tabela 3). No músculo gastrocnemio, entretanto, o glicogênio apresentou-se elevado em 170% aproximadamente nos animais do grupo (S), em comparação aos do grupo (C)(Tabela 3). Esta elevação pode ser entendida por ser a atividade espontânea mobilizadora das vias oxidativas. Isto promoveria maior atividade do ciclo de Krebs e consequentemente maior produção de citrato e ATP pelas células musculares. Como já discutido anteriormente, o aumento de citrato e ATP, promoveria inibição da enzima chave da glicólise; PFK. Esta inibição provocaria diminuição da degradação glicídica e, consequentemente, aumento dos estoques de glicogênio. Segundo Saltin (1977) os músculos compostos de fibras do tipo IIB (como o gastrocnêmio porção branca) possuem maior capacidade para a síntese de glicogênio e seriam menos exigidos nesse tipo de esforço físico. Assim, seria de se esperar que neste tecido, o aumento da atividade oxidativa produtora de citrato, causasse a resposta inibitória da degradação glicídica. Esta proposição foi comprovada pelos resultados encontrados(Tabela 3).

5.2.2.2 - Hepático e Cardíaco - O conteúdo de glicogênio hepático foi semelhante nos dois grupos(Tabela 4). Já, no músculo cardíaco, os animais do grupo (C) tiveram o conteúdo de glicogênio elevado em 116% comparado ao grupo (S)(Tabela 4). Pode-se analisar estes resultados da seguinte maneira. Os animais do grupo (S) possuíam maior

fornecimento de substratos para a síntese de oxaloacetato. Com o conteúdo de oxaloacetato elevado, o ciclo de Krebs possui condições favoráveis para o aumento de sua atividade(Rowan & Newsholme 1979), garantida pelo aumento das concentrações de acetil CoA mitocondrial, devido ao efeito da carnitina, que favoreceria a beta-oxidação dos ácidos graxos. O aumento do conteúdo de acetil CoA passaria a atuar como ativador da via de síntese de oxaloacetato pela enzima piruvato carboxilase(Newsholme & Leech 1988). Pode-se então concluir que a redução dos estoques de glicogênio no músculo cardíaco deve-se possivelmente ao intenso "escape" de piruvato para formar oxaloacetato, exigido pelo tecido, na manutenção de alta atividade do ciclo de Krebs. Este fato confirma a hipótese levantada no ítem 5.1.3.2 onde se discute a operacionalidade do modelo proposto por Randle et al (1963) e Randle (1981) para o ciclo glicose-ácidos graxos, que causaria inibição da degradação de glicogênio quando o consumo de ácidos graxos estivesse elevado.

5.2.3 Atividade Enzimática

5.2.3.1 Muscular - A atividade da enzima citrato sintase apresentou-se 36% superior nos animais do grupo (S) em comparação com os animais do grupo (C) no músculo sóleo(Tabela 5). No músculo gastrocnêmio, este aumento foi da ordem de 24% em favor dos animais do grupo (S)(Tabela 5). Os dados demonstram estar correta a hipótese levantada no ítem 5.1.3.1 onde se afirma que a semelhança na atividade

enzimática entre os grupos deve-se pela não existência de estímulos externos(atividade física) suficientes para aumentar a atividade oxidativa. Nos animais da atividade espontânea, o aumento verificado demonstra que, quando a atividade motora torna-se efetiva, ocorre a mobilização dos aminoácidos para a ativação do ciclo de Krebs. A atividade física de baixa intensidade e longa duração promove aumento da atividade das enzimas oxidativas bem como da enzima aspartato aminotransferase responsável pela síntese de oxaloacetato a partir de aspartato (Cadefau et al 1990). No músculo gastrocnêmio, o aumento da atividade da citrato sintase nos animais do grupo (S)(Tabela 5) confirma a hipótese de que a produção de citrato e inibição da via glicolítica, justificaria a elevação do glicogênio neste tecidos.

Já a enzima piruvato carboxilase apresentou-se semelhante em ambos os grupos(Tabela 6). Provavelmente, o aporte energético exigido, pela atividade imposta, não exigiu, destes tecidos, maior quantidade de oxaloacetato oriundo de glicose.

5.2.3.2 Cardíaco e Hepático - No tecido hepático, a atividade da enzima piruvato carboxilase foi semelhante em ambos os grupos(Tabela 8). Provavelmente pelo fato de que a atividade física imposta não foi suficiente para estimular a formação de oxaloacetato a partir de piruvato neste tecido. Nos animais do grupo (S), provavelmente ocorreu elevação no

conteúdo de oxaloacetato, pela conversão a partir de piruvato além da produção deste pela desaminação da asparagina e aspartato suplementado. Assim, o conteúdo aumentado deste intermediário do ciclo de Krebs estimularia a atividade oxidativa.

No músculo cardíaco, a atividade da enzima piruvato carboxilase apresentou-se reduzida em 560% nos animais do grupo (C) em relação ao grupo (S)(Tabela 8). Este fato reforça a hipótese levantada anteriormente de que, o fornecimento adicional de precursores de oxaloacetato iriam estimular a degradação das fontes energéticas(A.G.L. e Glicogênio), confirmada pela redução do glicogênio cardíaco (Tabela 4), aumentando assim o conteúdo de acetil CoA disponível na mitocondria. O aumento da acetil CoA eleva a relação acetil CoA/CoA que por sua vez inibiria a atividade da piruvato desidrogenase (Newsholme e Leech 1988). O aumento de acetil CoA, bem como a disponibilidade de piruvato, estimulariam a atividade da piruvato carboxilase(Tabela 8), que, reciprocamente, estimulariam a reação catalisada pela citrato sintase que apresentou-se elevada em 34% no fígado e 63% no coração dos animais do grupo (S), em comparação ao (C)(Tabela 6).

5.3 Treinados

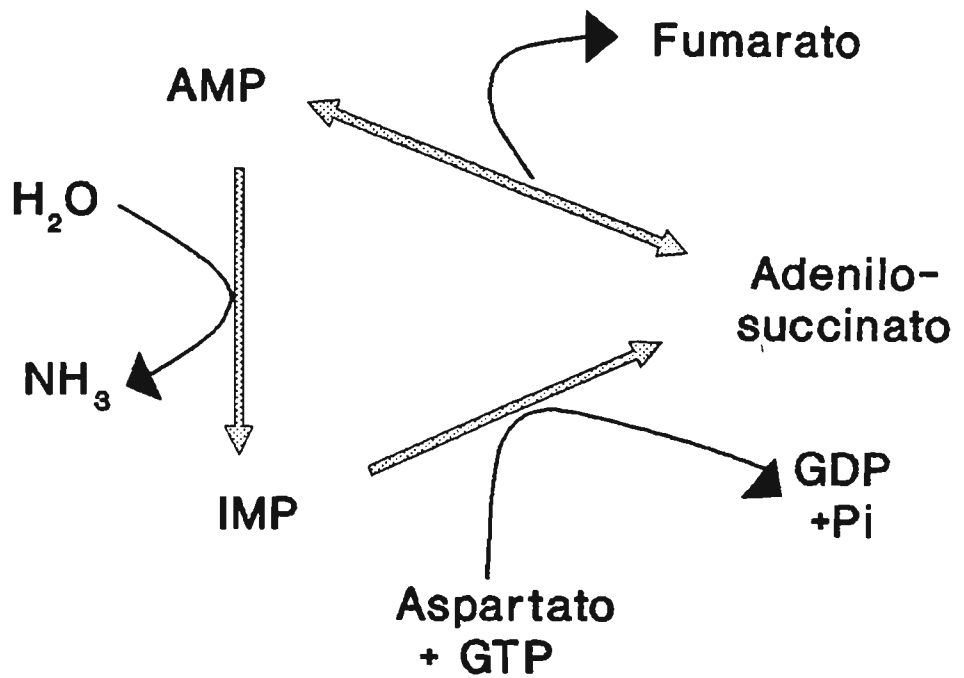
Este grupo difere dos demais exercitados(atividade espontânea, natação por uma hora e exaustão) por ter sido sacrificado durante o periodo de recuperação, ou seja,

aproximadamente 20 horas da ultima seção de atividade física.

5.3.1 Determinações plasmáticas

Os animais treinados não apresentaram diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de glicose e A.G.L., apesar de uma tendência a aumento nos A.G.L. dos animais do grupo (S) em comparação com (C)(Tabela 2). Por outro lado, ocorreu elevação na concentração de lactato nos animais (S) de aproximadamente 31% em relação aos (C)(Tabela 2). Isto indica que os animais treinados, do grupo (S), mobilizaram seus estoques de glicogênio para o fornecimento de lactato ao invés de oxaloacetato ou acetil CoA nos tecidos musculares. Contudo não se pode descartar a possibilidade do envolvimento do aspartato no ciclo dos nucleotideos(vide fig.4), durante a recuperação de esforços intensos e moderadamente intensos (Mommsen & Hochachka 1988). Ou ainda pelo sistema de lançadeira aspartato/malato (vide fig.2) também envolvido na recuperação da atividade física. Estes mecanismos diminuiriam a disponibilidade de oxaloacetato para o ciclo de krebs reduzindo a capacidade oxidativa celular resultando em aumento da glicólise e por consequência aumento do lactato circulante.

Figura 4 - Ciclo dos Nucleotídeos



Modificado de Lowenstein 1972

5.3.2 Glicogênio

5.3.2.1 Muscular Esquelético - O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou diferença entre (S) e (C) em ambos os tecidos nos animais treinados(Tabela 3). O estado de recuperação da atividade motora não causou a mobilização deste.

5.3.2.2 Cardíaco e Hepático - O conteúdo de glicogênio hepático não apresentou diferença entre os grupos (S) e (C).(Tabela 4) Esta ocorrência pode ser devida à atuação dos aminoácidos suplementados no ciclo dos nucleotídeos, tornando a disponibilidade destes, para o sistema oxidativo, semelhante nos dois grupos. Já o glicogênio cardíaco, apresentou-se reduzido em 142% nos animais do grupo (S) em comparação ao grupo (C)(Tabela 4). E sabido que, o tecido muscular cardíaco possui alta atividade oxidativa. Desta forma pode-se acreditar que a ocorrência do deslocamento dos aminoácidos suplementados para o ciclo dos nucleotídeos ou sistema de lançadeira aspartato/malato provocaria, drástica redução do conteúdo de oxaloacetato para o grupo (S). Este sistema, promoveria ainda, aumento de NAD reduzido no interior mitocondrial(vide figura 2). A conversão de piruvato a acetil CoA é dependente de NAD oxidado(Garland & Randle 1964 e Tsai et al 1973) . Assim pode-se entender que os animais (S) passaram a utilizar efetivamente as fontes citoplasmáticas para o fornecimento de energia pois, a formação de acetil CoA oriundo de glicose estava reduzida pela maior concentração de NADH no interior

mitocondrial. Este sistema atuaria reduzindo a concentração de oxaloacetato mitocondrial e consequentemente a capacidade de consumo de acetil CoA oriundo de A.G.L. resultando em intensa degradação do glicogênio cardíaco.

5.3.3 Atividade Enzimática

5.3.3.1 Muscular Esquelética - A enzima citrato sintase apresentou atividade semelhante em ambos os grupos no músculo gastrocnêmio(Tabela 5), isto pode ser devido ao envolvimento dos aminoácidos suplementados, como já comentado, no ciclo dos nucleotídeos, mais evidente nas fibras do tipo IIB. A diferença de 30% na atividade da citrato sintase nos animais do grupo (C) em comparação ao grupo (S), no músculo sóleo, pode ter ocorrido pela quantidade aumentada de citrato formado e consequente inibição desta enzima por acúmulo de produto da reação de condensação(Rowan & Newsholme 1979) (vide tabela 5).

Outra hipótese é o desvio ocorrido em ambos os músculos do grupo (S) dos aminoácidos suplementados para o sistema lançadeira aspartato/malato. Reforçando esta hipótese tem-se que o aumento substancial da atividade da enzima piruvato carboxilase no músculo sóleo(242%) e no gastrocnêmio(260%) nos animais do grupo (S) (Tabela 7). Isto sugere a necessidade do músculo em sintetizar oxaloacetato a partir de piruvato, provavelmente para compensar a redução do conteúdo de aspartato e asparagina diponível para este fim.

5.3.3.2 Hepática e Cardíaca - A atividade da enzima piruvato carboxilase não foi diferente entre os grupos no tecido hepático(Tabela 8). Já no tecido cardíaco, esta enzima apresentou sua atividade reduzida em 43% no grupo (S), em comparação ao grupo (C)(Tabela 8). Este fato, juntamente com a atividade reduzida da citrato sintase neste grupo, favoreceu a possibilidade de que o músculo cardíaco mobilizaria o glicogênio como fonte energética no estado de repouso.

5.4 Natação Uma Hora

5.4.1 Medidas Plasmáticas

Os animais treinados submetidos a natação por uma hora e sacrificados após o esforço tiveram os resultados de A.G.L., glicose e lactato, semelhantes, não apresentando diferenças significativas entre os grupos (S) e (C)(Tabela 2). Nota-se com estes resultados que os animais que receberam a suplementação tiveram a concentração de lactato circulante semelhante ao dos animais do grupo controle. No ítem 5.3.1 foi discutido o conteúdo de lactato elevado nos animais treinados do grupo (S) comparado ao grupo (C)(Tabela 2). A concentração elevada de lactato no grupo (C), nos animais treinados em repouso, desapareceu quando estes foram submetidos à natação por uma hora(Tabela 2). Por sua vez, não ocorreu alteração da concentração plasmática de lactato nos animais do grupo (S), do estado de repouso para o

exercício por uma hora (vide tabela 2). Pode-se então sugerir que os animais do grupo (S) possuiriam maior capacidade mobilizadora de piruvato, tanto para acetil CoA como para oxaloacetato, que o grupo (C).

5.4.2 Glicogênio

5.4.2.1 Muscular Esquelético - Acredita-se que o tempo de esforço a que foram submetidos os animais não tenha sido suficiente para provocar alterações substânciais no conteúdo de glicogênio dos musculos sóleo e gastrocnêmio. Desta forma, o conteúdo de glicogênio encontrado foi mantido similar ao dos animais treinados(ítem 5.3.2.1).

5.4.2.2 Cardíaco e Hepático - O conteúdo de glicogênio hepático não apresentou diferença significativa entre os grupos (S) e (C)(Tabela 4). No entanto, no músculo cardíaco, o grupo (S), apresentou elevação de 130% no conteúdo de glicogênio (Tabela 4). Este fato reverte os resultados obtidos para os animais treinados(ítem 5.3.2.2) onde, os animais do grupo (S) tiveram seu conteúdo de glicogênio, cardíaco, inferior em 43% comparado ao grupo (C)(Tabela 4). Pode-se entender esta alteração da seguinte maneira. Com a atividade física imposta (natação), passou a ocorrer aumento na síntese de oxaloacetato a partir dos aminoácidos suplementados e, consequentemente, inibição da glicólise(a nível de PFK) resultando em aumento do conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco dos animais do grupo (S)(Tabela 4).

5.4.3 Atividade Enzimática

5.4.3.1 Muscular - A atividade da enzima citrato sintase apresentou-se similar, para o músculo gastrocnêmio, em ambos os grupos de animais treinados e, sacrificados após uma hora de atividade física(Tabela 5). O mesmo foi verificado para a atividade da piruvato carboxilase no músculo sóleo onde, não foi encontrada diferença significativa para os dois grupos (S) e (C)(Tabela 7). Já no músculo gastrocnêmio, a enzima piruvato carboxilase apresentou atividade 56% superior nos animais do grupo (S) em comparação ao (C)(Tabela 7). Apesar dos valores encontrados nos animais suplementados serem superiores, nota-se elevação de 220% na atividade desta enzima no (C), quando comparados aos animais treinados do mesmo grupo, contra a elevação de apenas 38% para os animais (S), comparados a seus pares treinados (Tabela 7). Este fato demonstra que o tecido em questão, nos animais do grupo (S), metabolizou acenduadamente os aminoácidos suplementados para a síntese de oxaloacetato, limitando a sua síntese a partir de glicose e através da piruvato carboxilase. Já a atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo apresentou-se 35% superior nos animais do grupo (C) em comparação ao grupo (S)(Tabela 5). Este fato mantém a diferença observada no músculo sóleo para a citrato sintase nos animais treinados, . Como demonstrado na tabela 7, os animais do grupo (C), após uma hora de natação, aumentaram em 214% a atividade da enzima piruvato carboxilase. Este

fato não ocorreu nos animais do grupo (S) que apresentaram a mesma atividade em ambos os casos(Tabela 7). Desta maneira, acredita-se que a natação por uma hora não tenha solicitado, do músculo sóleo, aumento da atividade oxidativa em ambos os grupos, quando comparados com os animais treinados. Entretanto, nota-se, um aumento da atividade da piruvato carboxilase, quando compara-se os animais após uma hora de natação com seus pares treinados do grupo (C)(Tabela 7). Isto nos leva a crer que os animais deste grupo recorreram em maior proporção a via de síntese de oxaloacetato oriunda de glicídeos, fato não observado nos animais do grupo (S)(Tabela 7) que, provavelmente, utilizaram a via de síntese a partir dos aminoácidos suplementados.

5.4.3.2 Cardíaco e Hepático - O músculo cardíaco não apresentou diferença significativa na atividade das enzimas citrato sintase e piruvato carboxilase entre os grupos (C) e (S)(Tabela 6 e 8). Este fato pode ser devido a não alteração da atividade oxidativa deste tecido, como consequência da atividade imposta(natação por uma hora). No tecido hepático, a enzima piruvato carboxilase não apresentou diferença entre os grupos(Tabela 8). No entanto, nota-se uma elevação da atividade da enzima citrato sintase no fígado dos animais do grupo (S) em torno de 30%(Tabela 6). Para explicar este resultado, outros estudos precisam ser desenvolvidos.

5.5 Exaustão

5.5.1 Determinações plasmáticas

Os animais submetidos a exaustão apresentaram valores glicêmicos e de lactato semelhantes entre os grupos (C) e (S)(Tabela 2). Por outro lado, os valores encontrados para os A.G.L. plasmáticos dos animais do grupo (S) estão elevados em 65% em comparação com o grupo (C)(Tabela 2). Este fato demonstra que os animais suplementados apresentaram maior capacidade mobilizadora dos A.G.L.. Assim a hipótese levantada no ítem 2(Hipótese do presente estudo), quando salienta-se que o aumento do conteúdo de oxaloacetato provocaria aumento da capacidade oxidativa da célula, resultando em maior mobilização dos A.G.L. e por consequência maior resistência ao esforço, foi reforçada.

5.5.2 Glicogênio

5.5.2.1 Muscular Esquelético - Os valores de glicogênio do músculo gstrocnemio foram semelhantes em ambos os grupos(Tabela 3). No entanto, foi encontrado no músculo sóleo maior conteúdo de glicogênio nos animais do grupo (C), da ordem de 22%, quando comparados ao do (S)(Tabela 3). Estes resultados sugerem que os animais do grupo (S) apresentaram maior utilização dos carboidratos, provavelmente para a síntese de oxaloacetato, garantindo assim maior eficiência na utilização dos A.G.L.(ítem 5.5.1)(Tabel 2) e consequentemente maior resistência ao esforço físico.

5.5.2.2 Cardíaco e Hepático - O conteúdo de glicogênio cardíaco não apresentou diferença entre os grupos (C) e (S)(Tabela 4). Esta ocorrência deu-se, provavelmente, por ser o estado exausto semelhante nos dois grupos, diferindo apenas pelo mecanismo de instalação e, consequentemente, o tempo de resistência a este esforço (Edwards 1983). Já no tecido hepático, os animais do grupo (S) apresentaram o conteúdo de glicogênio, ao final da exaustão, elevado em aproximadamente 60 % comparado ao dos animais do grupo (C)(Tabel 4), demonstrando maior capacidade de manutenção do glicogênio hepático nessa condição.

5.5.3 Atividade Enzimática

5.5.3.1 Muscular Esquelético - Os animais submetidos a exaustão não apresentaram diferenças significativas na atividade das enzimas citrato sintase e piruvato carboxilase no músculo gastrocnêmio(Tabelas 5 e 7). No músculo sóleo, não ocorreu diferença significativa na atividade da enzima citrato sintase entre os grupos (C) e (S)(Tabela 5). Já a atividade da enzima piruvato carboxilase, apresentou-se 76% superior nos animais do grupo (S).(Tabela 7). Este fato, reforça a hipótese levantada no ítem 5.5.2.1 de que a redução do conteúdo de glicogênio, no músculo sóleo(Tabela 3), dos animais do grupo (S) comparados ao grupo (C) e que esta é devida a maior utilização dos glicídeos musculares para a síntese de oxaloacetato. Este fato seria favorecido pelo aumento da atividade da piruvato

carboxilase. Provavelmente, o aumento na atividade da piruvato carboxilase permitiu, aos animais do grupo (S),a manutenção da capacidade oxidativa por maior tempo o que possibilitaria ao grupo suplementado suportar, por tempo prolongado, a atividade física.

5.5.3.2 Cardíaca e Hepática - A enzima piruvato carboxilase não apresentou diferença significativa nos tecidos cardíaco e hepático entre ambos os grupos(Tabela 8). No fígado, não foi observada diferença significativa na atividade da enzima citrato sintase entre os animais do grupo(C) e (S)(Tabela 6). Já no coração, a atividade desta enzima apresentou-se elevada em 38% no grupo (S)(Tabela 6). Este fato demonstra que os animais (S) tiveram maior capacidade de ativação da citrato sintase no processo de exaustão, provavelmente, pelo maior aporte de oxaloacetato favorecido pelo fornecimento suplementar de seus precursores.

6 - Discussão Geral dos Resultados

6.1 Determinações plasmáticas

Como demonstrado na Tabela 1, os animais do grupo (S) apresentaram aumento do lactato e dos A.G.L. plasmáticos e redução da glicemia comparado com o (C) na condição sedentária. Esta diferença foi abolida nos ratos em atividade espontânea, treinados e natação por uma hora. Entretanto, durante a exaustão, os níveis de A.G.L. no plasma voltam a ser superiores no grupo (S).

A captação dos A.G.L. pelos músculos e pelo fígado depende da sua concentração plasmática (Newsholme & Start 1976). Desta forma, nossos resultados sugerem que a suplementação favoreceu a utilização de A.G.L..

Na condição sedentária, o aumento no fornecimento de acetil CoA, possivelmente, inibiu a atividade da piruvato desidrogenase, aumentando a conversão de piruvato à lactato. Como consequência houve redução da glicose sanguínea e aumento do lactato. Com a imposição da atividade física, entretanto, a capacidade do músculo em utilizar acetil CoA foi aumentada, como demonstrado pelo aumento da atividade da citrato sintase,que converte acetil CoA + oxaloacetato à citrato, e a diferença observada desapareceu. Os animais do grupo (S), entretanto, aumentaram o tempo de resistência ao esforço, através da maior mobilização de A.G.L.. A importância deste fato na manutenção da atividade física por períodos mais prolongados precisa ser investigada.

6.2 Glicogênio

A suplementação de asparagina, aspartato e carnitina marcadamente aumentara o conteúdo de glicogênio muscular na condição sedentária. A atividade espontânea anulou o efeito da dieta no músculo sóleo, reduziu no coração e manteve no gastrocnêmio. O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou diferença entre os grupos nos animais treinados, após natação por uma hora e exaustão. Desta forma, apesar da suplementação aumentar o conteúdo de

glicogênio nos músculos, a degradação deste durante o exercício foi semelhante entre (C) e (S). No coração, o glicogênio não apresentou diferença entre os grupos nas condições de sedentarismo e de exaustão. Durante a atividade espontânea e nos animais treinados, o glicogênio cardíaco esteve elevado para o grupo (C). Estes dados permite-nos acreditar que a suplementação alimentar provavelmente tenha alterado o comportamento do ciclo glicose-A.G.L descrito por Randle et al (1963). Os dados sugerem que o fornecimento extra de oxaloacetato ao tecido cardíaco mobilize acentuadamente o glicogênio nos animais da atividade espontânea e treinados. Quando estes animais foram submetidos a esforço mais intenso(natação uma hora), a resposta do glicogênio cardíaco foi alterada, passando este a ser armazenado no miocárdio e desta forma voltando a responder de acordo com o modelo proposto por Randle (1963). Esta hipótese requer um estudo mais detalhado e suas estapas esclarecidas. Já o conteúdo de glicogênio no fígado apresentou-se de maneira semelhante em todas as condições para ambos os grupos.

O aumento do glicogênio no músculo esquelético do grupo (S) na condição sedentaria deve ter ocorrido devido ao ciclo glicose-A.G.L.. O aumento da utilização dos A.G.L. pelo músculo, provavelmente, elevou a produção de ATP e citrato pelo ciclo de Krebs. Estes produtos da oxidação dos ácidos graxos livres podem ter inibido a atividade da PFK,

aumentando o disponibilidade de glicose-6 fosfato para a síntese de glicogênio.

6.3 Citrato Sintase

A atividade espontânea elevou a atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo dos animais do grupo (S). Entretanto, nos animais treinados e após uma hora de natação, esta enzima teve sua atividade reduzida comparada ao controle. A atividade máxima da citrato sintase no fígado foi reduzida nos animais sedentários e treinados e aumentada nos animais mantidos na atividade espontânea e nos ratos da natação por uma hora. Estes resultados da citrato sintase atividade máxima no figado não podem ser esclarecidos no presente trabalho.

A suplementação de asparagina aspartato e carnitina aumentou a capacidade de síntese de citrato no músculo sóleo sob condições aeróbicas (atividade espontânea) mas não foi efetiva em atividades mais intensas (natação com 5% do peso corporal de sobrecarga).

No coração a atividade da citrato sintase apresentou-se mais elevada no grupo (S) nos ratos sedentários, em atividade espontânea e exaustão. Estes dados refletem a eficiência do aporte elevado dos precursores de oxaloacetato para o miocárdio na ativação do sistema oxidativo. Os animais em natação por uma hora não apresentaram diferença na atividade máxima da citrato sintase entre os grupos (S) e (C). Já nos animais treinados ocorreu redução da atividade da citrato sintase no grupo

(S). Possivelmente esta ocorrência deve-se à redução do aporte de oxaloacetato pela diminuição da atividade da piruvato carboxilase e possível deslocamento dos aminoácidos suplementados para o ciclo dos nucleotídeos (Mommsen & Hochachka 1988).

A atividade da citrato sintase é utilizada como indicativo de treinamento ao exercício de longa duração(Baldwin et al 1973, Soar et al 1983). A atividade espontânea elevou a atividade da citrato sintase nos músculos gastrocnêmio ((S) - 3.8 e (C) - 3.2 vezes) e no sóleo (grupo (S) 5.4 vezes e grupo (C) 3.1 vezes) comparadas com os respectivos sedentários. O treinamento em natação elevou a atividade da citrato sintase em ambos os grupos e tecidos na mesma proporção (3.3 vezes). Estes dados apontam que a suplementação de asparagina, aspartato e carnitina é efetiva para exercícios de baixa intensidade(atividade espontânea) e não apresenta efeito significativo nos esforços mais intensos(natação com 5% do peso corporal de sobrecarga).

6.4 Piruvato Carboxilase

A atividade da piruvato carboxilase foi maior nos animais (S), comparados aos (C), no sóleo (sedentário e exaustão), no gastrocnêmio (natação por uma hora) e em ambos os músculos (treinados). No coração, os animais treinados apresentaram redução da atividade máxima da piruvato carboxilase no (S), provavelmente, pela redução do conteúdo de glicogênio deste tecido e consequente redução da

glicólise. A atividade da piruvato carboxilase foi maior no coração do (S) para os animais sedentários e atividade espontânea. Desta forma, o fornecimento adicional de precursores de oxaloacetato aumentou a capacidade do músculo de produção de oxaloacetato como é indicado pela atividade da piruvato carboxilase. É possível que a geração aumentada de oxaloacetato estimule a atividade do ciclo de krebs e a produção de ATP; e isto, é sabido, aumenta a atividade da piruvato carboxilase (Rowan & Newsholme 1979). Estas afirmações requerem ainda mais investigações para serem comprovadas.

6.5 Tempo de Exaustão

Os animais (S) nadaram por um período superior que o grupo (C) até a exaustão. Os valores obtidos em minutos foram: 423.8 ± 27.7 e 297.8 ± 42.2 (média e erro padrão) para (S) e (C), respectivamente. Isto representou um aumento de 42% em favor do grupo (S) com diferença significativa de $p<0.05$. Estes resultados apontam que a suplementação de asparagina, aspartato e carnitina demonstrou-se apta a elevar a resistência ao esforço de longa duração.

7. Conclusões

A suplementação de asparagina, aspartato e carnitina eleva a capacidade do músculo em utilizar os A.G.L. e poupar o glicogênio; como indicam os resultados de glicemia, A.G.L., lactato e glicogênio muscular. O conteúdo de glicogênio muscular apresenta-se estritamente relacionado com a resistência ao esforço de longa duração (Bergstrom et al 1967 e Hermansen et al 1967). Assim, este resultado do glicogênio muscular, por si só demonstra que os animais (S) possuem maior capacidade de resistência ao esforço comparados ao controle.

A importância do oxaloacetato para os resultados da exaustão descritos, foi enfatizada pelo fato de, apesar da suplementação de seus precursores(asparagina e aspartato), ocorreu também aumento da atividade da enzima produtora de oxaloactato a partir de piruvato; piruvato carboxilase. Acredita-se que a resistência ao esforço aumentada pela elevação do glicogênio muscular dá-se pelo maior fornecimento de oxaloacetato oriundo do glicogênio para a oxidação dos A.G.L.. Desta forma, a redução do glicogênio torna o músculo inapto para metabolizar o acetilCoA oriundo dos A.G.L. levando à exaustão.

Outros experimentos precisam ser realizados para detalhar alguns pontos levantados neste estudo. Certamente, entretanto, os resultados aqui reportados contribuem para o entendimento do controle do metabolismo periférico para o estabelecimento da exaustão no exercício físico.

*REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AHLBORG, G.; FELIG, P.; HAGENFELDT, L. HENDLER, R.; WAHREN, J. Substrate turnover during prolonged exercise in man: Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. J.Clin.Invest., 53:1080-90, 1974.

BAGBY, G.J.; GREEN, H.J.; KATSUTA, S.; GOLLNICK, P.D. Glycogen depletion in exercising rats infused with glucose, lactate, or pyruvate. J.Appl.Physiol., 45:425-29, 1978.

BALDWIN, K.M.; WINDER, W.W.; TERJUNG, R.L. Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle in adaptation to exercise. Am.J.Physiol., 225:962-6, 1973.

BALLARD, F.J.; HANSON, R.W.; RESHEF, L. Immunochemical studies with soluble and mitocondrial pyruvate carboxylase activities from rat tissues. Biochem.J., 119:735-42, 1970.

BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E. AND SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. Acta Physiol. Scand., 71:140-50, 1967.

BIEBER, L.L. Carnitine. Ann.Rev.Biochem., 57:261-283, 1987.

CADEFAU, J.; CASADEMONT, J; GRAU, J.M.; FERNANDEZ, J.; BALAGUER, A.; VERNET, M.; CUSSO, R.; MARQUEZ, U. Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes. Acta.Physiol.Scand., 140:341-51, 1990.

CHANG, T.W. & GOLDBERG, A.L. The origin of alanine produced in skeletal muscle. J.Biol.Chem., 253:3677-84, 1978.

CRABTREE, B, & NEWSHOLME, E.A. The activities of phosphorilase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in muscles from vertebrates and invertebrates. Biochem J., 126:49-58, 1972.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Intracelular distribution of same enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. Biochem.Biophys.Res.Com., 138:318-22, 1986.

* De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas, Referências bibliográficas. In:---. Normas brasileira em documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-29. Serial Sources for the Biosis Data Base. Phyladelphia Biosis, 1989.

CURI, R. Does PEPCK play a key role in amino acid oxidation? Brazilian J.Med.Biol.Res., 21:27-30, 1988.

CURI,R.; WILLIAMS, F.; NEWSHOLME, E.A. Formation of ketone bodies by resting lynphocyties. Int.J.Biochem., 21:1133-6, 1989a.

CURI,R.; WILLIAMS, F.; NEWSHOLME, E.A. Pyruvate metabolism by lymphocyties: Evidence for an additional Ketogenic tissue. Biochem.Int., 19:755-767, 1989b.

DUBOWISKI, K.H. An O-toluidine method for body fluid glucose determination. Clin.Chem., 8:215-35, 1962.

EDWARDS, R.H.T. Biochemical bases of fatigue in exercise performance: Catastrofe theory of muscular fatigue. In:Biochemistry of exercise. Ed.J.Poortmans, G. Niset. Baltimore Univ. Park Press, 1983 p:3-28.

ENGLE, P.C. & JONES, J.B. Causes and elemination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkalyne hidrazine buffers: improved conditions for the assay for L-glutamate, L-lactate and other metabolites. Anal.Biochem., 88:475-484, 1978.

DUNAWAY, G.A. & WEBER, G. Rat liver phosphpfrutokuinase isoenzymes. Arch.Biochem.Biophys., 162:620-35, 1974.

FELIG, P. & WAHREN, J. Amino acid metabolism in exercising man. J.Clin.Invest., 50:2703-12, 1971.

FELIG, P.; WAHREN, J. Fuel homeostasis in exercise. N.Engl.J.Med. 293:1078-84, 1975.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. Clin.Chim.Acta., 46:105-11, 1973.

GARLAND, P.B.; RANDLE, P.J. Control of pyruvate dehydrogenase in perfused heart by the intracellular concentration of acetyl CoA. Biochem.J., 91:6-7C, 1964.

GRUTZNER, P. Uber physiologishe Verschiedenheiten der Skelettmuskeln. Zentralbl.Med.Wiss., 22:375-379, 1884.

HARRIS, R.C.; FOSTER, C.V.L. E HULTMAN, E. Acetylcarnitine formation during intense muscular contraction in humans. J.Appl.Physiol., 63:440-442, 1987.

HASSID, W.Z. & ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polisaccarides. Methods Enzymol., 3:34-50. 1957.

HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; E SALTIN, B. Muscle glycogen during prolonged sever exercise. Acta Physiol.Scand. 71:129-39, 1967.

HULTMAN, E. Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with special reference to exercise and diet. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 19 (suppl.94):1-63, 1967.

JOHNSON, R.N. & HANSFORD, R.G. The control of tricarboxylate-cycle oxidations in blowfly flight muscle Biochem.J., 146:527-35, 1975.

JOHNSON, J.A.; WILLIS, W.T.; DALLMAN, P.R.; BROOKS, G.A. Muscle mitochondrial ultrastructure in exercise-trained iron-deficient rats. J.Appl.Physiol. 68:113-8, 1990.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1987.

KAPLAN, N.O. & EVERSE, J. Regulatory characteristics of lactate dehydrogenases. Adv.Enz.Regul., 10:323-336, 1972.

LANCHA, JR., A.H.; AMIL, A.M.; TAVARES, M.S.; HIRATA, M.; ZUCAS, S.M. Influência da dieta no teor de A.G.L. e triglicerídeos. In: SIMPOSIO DE CIENCIAS DO ESPORTE 14. São Caetano do Sul, 1986. ANAIS. FEC do ABC. 1986 p.61.

LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. São Paulo. Sarvier. 1988.

LOWENSTEIN, J.M. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. Physiol.Rev., 52:382-414, 1972.

MARTIN, B.R. & DENTON, R.M. The intracelular localisation of enzymes in white adipose tissue fat cells and permeability properties of fat cell mitochondria. Biochem.J., 117:861-77, 1970.

MILLER, R.H.; NAGLE, F.J.; LARDY,H.A.; STRATMAN, F.W. Amino acid metabolism in trained rats: The potential role of carnitine in the metabolic fate of branched-chain amino-acids. Metabolism, 36:748-752, 1987.

MILLWARD, D.J.; DAVIES, C.T.M.; HALLIDAY, D.; WOLMAN, S.L.; MATTHEWS, D.; RENNIE, M.J. The effect of exercise on protein metabolism in man as explored with stable isotopes. Fed.Proc., 41:2686-91, 1982.

MOMMSEN, T.; HOCHACHKA, P.W. The purine nucleotide cycle as two temporally separated metabolic units: A study on trout muscle. Metabolism. 37:552-556, 1988.

NEGRÃO, C.E. Metabolic consequences of D- and L-Carnitine administration in cronically trained and untrained rats.Madison, 1985. (PhD Thesis Univ. of Wisconsin).

NEWSHOLME, E.A. & START, C. Regulation in metabolism. New York. John Willey. 1976.

NEWSHOLME, E.A.;SUGDEN, P.H.; WILLIAMS, T. Effect of citrate on the activities of 6 phosphofrutokinase from different animals and its relantionship to the regulation of glycolysis. Biochem.J. 166:123-34, 1977.

NEWSHOLME, E.A.; LEACH, A.R. Biochemistry for the medical sciences. New York. John Willey. 1988.

OHIRA, Y.; CARTIER, L.J.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J.O. Induction of an increase mitochondrial matrix enzymes in muscle of iron-deficient rats. Am.J.Physiol., 253:C639-44, 1987.

PASSMORE, R.; EASTWOOD, M.W. Davidson and Passmore Human nutrition and dietetics. 8ed. New York., Churchill Livingstone. 1986. 21p.

PALMA, M.S.; KOKUBUN, E.; SIBUYA,C.Y.; SANTOS,J.W.; FREIRE, P.M. Regulatory mechanisms of blood lactate production during exercise in man. Braz.J.Med.Biol.Res., 22:1329-32, 1989.

PIRNAY, F.; LACROIX, M.; MOSORA, F.; LUYCKX, A.; LEFEBVRE, P. Effect of glucose ingestion on energy substrate utilization during prolonged muscular exercise Eur.J.Appl.Physiol., 36:247-54, 1977.

RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N. The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet i:785-9, 1963.

RANDLE, P.J. Molecular mechanisms regulating fuel selection in muscle. In:Biochemistry of exercise, ed.J.Poortmans, G Niset, Baltimore Univ. Park Press, 1981, p:13 -32.

RANVIER, L. Prorpiétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. C.R.Acad.Sci., 77:1030-33, 1873.

RAVUSSIN, E,; PAHUD, P.; DORNER, A.; ARNAUD, M.S.; JEQUIER, E. Substrate utilization during prolonged exercise preceded by ingestion of ^{13}C glucose in glycogen depleted and control subjects. Pflugers Arch., 383:197-202, 1979.

REBOUCHE, C.J.; PAULSON, D.J. Carnitin metabolism and function in humans. Ann.Rev.Nutr., 6:41-66, 1986.

RENNIE, M.J.; HOLLOSZY, J.O. Inhibition of glucose uptake and glycogenolysis by availiability of oleate in well-oxygenated perfused skeletal muscle. Biochem. J., 168:161-70, 1977

RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.T.; KRYWAWYCH, S.; DAVIES, C.T.M.; HLLIDAY, D.; WATERLOW, J.C.; MILLWARD, D.J. Effect of exercise on protein turnover in man. Clinical Science, 61:627-39, 1981.

ROWAN, A.N.; NEWSHOLME, E.A.; SCRUTTON, M.C. Partial purification and some proporties of pyruvate carboxylasefrom the flight muscle of the locust (Schistocerca Gregaria) Biochem.Biophis.Acta., 552:270-5, 1978.

ROWAN, A.N.; NEWSHOLME, E.A. Changes of contents of adenine nucleotides and intermediates of glycolysis and citric acid cycle in flight muscle of the locust upon flight and their relationship to the control of the cycle. Biochem.J., 178:209-16, 1979.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. J.Biol.Chem., 239:375-80, 1964.

SAHLIN, K. Muscle fatigue and lactic acid accumulation. Acta.Physiol.Scand. 128:82-91, 1986.

SAHLIN, K. Muscle carnitine metabolism during incremental dynamic exercise in humans. Acta Physiol.Scand. 138:259-62, 1990.

SALTIN,B.; HENRIKSSON,J.; NYGAARD,E. Fibre types and metabolic potencials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. Ann.N.Y.Acad.Sci., 301:3-29, 1977.

SIMOES,A.J.B.; LANCHA, JR.,A.H.; SILVA, F., CANCILLIERO, R. HIRATA,M., ZUCAS, S.M. Alterações da taxa de glicose sanguinea antes e após a atividade física com a utilização de três dietas. In: SIMPOSIO DE CIENCIAS DO ESPORTE, 14. São Caetano do Sul, SP 1986. ANAIS. FEC do ABC. p.32.

SOAR, K.; DAVIES, M.; FENTEM, H.; NEWSHOLME, E.A. The effect of endurance training on the maximum activities of hexokinase, 6-phosphofurctokinase, citrate synthase, and oxoglutarate dehydrogenase in red and white muscles of the rat. Bioscience Reports, 3:831-35, 1983.

SOOP, M.; BJORKMAN, G.; CEDERBLAD, G.; HAGENFELDT, L. AND WAHREN, J. Influence of carnitine supplementation on muscle substrate and carnitine metabolism during exercise. J.Appl.Physiol, 64:2394-9, 1988.

STRYER, L. Biochemistry. New York. W.H. Freeman. 1988.

SUDGEN, P.H. & NEWSHOLME, E.A. Effects of ammonium, inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofrutokinases from muscle and nervous tissue of vertebrates and invertebrates. Biochem.J., 150:113-22, 1975.

TORNHEIM, K.; LOWENSTEIN, J.M. Control of phosphofrutokinase from rat skeletal muscle. J.Biol.Chem., 251:7322-36, 1976.

TSAI, C.S.; BURGETT, M.W.; REED, L.J. Alfa-Keto acid dehydrogenase complexes. A kinetic study of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine kidney. J.Biol.Chem., 248:8348-52, 1973.

UNDERWOOD, A.H. & NEWSHOLME, E.A. Properties of phosphofrutokinase from rat liver and their relation to the control of glycolisis and gluconeogenesis. Biochem.J. 95:868-81, 1965.

UYEDA, K. Phosphofrutokinase. Adv.Enzimol., 48:193-224. 1979.

WASSERMAN, K.; BEAVER, W.L.; WHIPP, B.J. Mechanisms and patterns of blood lactate increase during exercise in man. Med.Sci. Sports Exercise. 18:344-52, 1986.

WILLIAMSON, D.H. Tissue-specific direction of blood metabolites. Symp.Soc.Expt.Biol., 27:283-98, 1973.

VIEIRA, R.; DUARTE, A.M.; CURI, R.; VILLELA, F.G.; MACHADO, U.F.; CARPINELLI, A. A rotating wheel cage for rats allowing free movement, feeding and drinking. Braz. J.Med.Biol.Res., 20:825-8, 1987.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, H.; KOKUBUN, E.; HELL, N.S.; CURI, R. Swimming system for physical exercise of rats. Arq.Biol.Tecnol., 31:387-94, 1988.

VIEIRA, R.; VECCHIA, M.G.; BITTENCOURT JR.,P.I.H.; ALMEIDA, A.F.; FERNANDES, L.C.; CURI,R. Desenvolvimento de homogenizador de alta velocidade para tecidos. Arq.Biol.Tecnol. 32:495-05,1989.

WEBER, J.M.; KLEIN, S.; WOLFE, R.R. Role of the glucose cycle in control of net glucose flux in exercising humans. J.Appl.Physiol., 68:1815-9, 1990.

APÊNDICE

Tabelas

Tabela 2 - Determinações plasmáticas dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *(p<0,05) e **(p<0,01) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Glicemia (mg/100ml)	A.G.L (mEq/l)	Lactato (mmol/l)
Sedentários	-C	134.7 ± 17.8	0.158 ± 0.059	3.28 ± 0.79
	S	**120.1 ± 7.8	**0.315 ± 0.142	*4.39 ± 1.37
Atividade Espontânea	-C	147.0 ± 25.6	0.211 ± 0.163	3.37 ± 0.74
	-S	143.8 ± 20.6	0.382 ± 0.247	3.38 ± 0.70
Treinados	-C	107.7 ± 8.9	0.161 ± 0.103	3.05 ± 0.79
	-S	105.8 ± 6.2	0.207 + 0.196	*4.02 + 1.06
Natação 1 Hora	-C	159.9 ± 27.8	0.798 ± 0.388	3.83 ± 0.90
	-S	152.4 ± 36.9	0.821 ± 0.471	4.15 ± 1.15
Exaustão	-C	46.1 ± 27.8	0.379 ± 0.173	7.07 ± 2.73
	-S	48.0 ± 37.9	**0.626 ± 0.381	5.53 ± 2.35

Tabela 3 - Conteúdo de glicogênio muscular - gastrocnêmio e sóleo dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *(p<0,05) e **(p<0,01) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Sóleo (mg/100mg)	Gastrocnêmio (mg/100mg)
Sedentário	-C	0.53 ± 0.11	0.46 ± 0.11
	-S	** 1.43 ± 0.30	* 0.55 ± 0.08
Atividade Espontânea	-C	0.51 ± 0.39	0.17 ± 0.04
	-S	0.53 ± 0.39	** 0.46 ± 0.23
Treinados	-C	1.50 ± 0.52	0.37 ± 0.18
	-S	1.34 ± 0.36	0.40 ± 0.26
Natação 1 Hora	-C	1.32 ± 0.49	0.70 ± 0.36
	-S	1.59 ± 0.85	0.76 ± 0.38
Exaustão	-C	0.70 ± 0.20	0.23 ± 0.15
	-S	* 0.57 ± 0.08	0.20 ± 0.09

Tabela 4 Conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *(p<0,05) e **(p<0,01) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Fígado (mg/100mg)	Coração (mg/100mg)
Sedentários	-C	3.62 ± 1.88	0.309 ± 0.082
	-S	2.74 ± 0.72	0.410 ± 0.189
Atividade Espontânea	-C	3.50 ± 1.79	0.376 ± 0.170
	-S	3.17 ± 1.39	** 0.174 ± 0.017
Treinados	-C	4.70 ± 1.99	0.669 ± 0.261
	-S	4.29 ± 0.51	* 0.468 ± 0.119
Natação 1 Hora	-C	2.77 ± 1.07	0.310 ± 0.191
	-S	3.26 ± 1.06	** 0.726 ± 0.140
Exaustão	-C	0.27 ± 0.11	0.398 ± 0.173
	-S	* 0.43 ± 0.21	0.455 ± 0.172

Tabela 5 - Atividade máxima da enzima citrato sintase no tecido muscular - gastrocnêmio e sóleo dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *(p<0,05) e **(p<0,01) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Sóleo	Gastrocnêmio
		($umol.g^{-1}.minuto^{-1}$)	
Sedentario	-C	2.50 ± 1.41	1.47 ± 0.39
	-S	1.97 ± 0.90	1.55 ± 0.36
Atividade Espontânea	-C	7.71 ± 0.72	4.73 ± 1.42
	-S	** 10.53 ± 3.55	* 5.87 ± 1.22
Treinados	-C	8.36 ± 2.74	5.45 ± 2.45
	-S	* 5.72 ± 1.45	4.94 ± 1.39
Natação 1 Hora	-C	7.25 ± 2.47	5.68 ± 2.30
	-S	* 5.35 ± 1.11	5.49 ± 1.53
Exaustão	-C	11.61 ± 4.54	5.34 ± 1.03
	-S	10.58 ± 5.70	8.16 ± 5.59

Tabela 6 - Atividade máxima da enzima citrato sintase nos tecidos hepático e cardíaco dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *($p<0,05$) e **($p<0,01$) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Fígado	Coração
		($umol.g^{-1}.minuto^{-1}$)	
Sedentários	-C	12.96 ± 3.80	29.13 ± 2.86
	-S	** 8.80 ± 0.92	** 46.53 ± 10.73
Atividade Espontânea	-C	4.87 ± 1.01	14.53 ± 4.38
	-S	** 6.53 ± 0.84	* 23.73 ± 11.33
Treinados	-C	9.42 ± 0.99	21.81 ± 3.73
	-S	* 4.28 ± 0.51	* 12.91 + 3.21
Natação 1 Hora	-C	8.58 ± 1.07	31.88 ± 6.14
	-S	*11.19 ± 3.01	32.50 ± 4.81
Exaustão	-C	5.33 ± 1.03	33.60 ± 7.93
	-S	6.27 ± 1.36	* 46.55 ± 15.47

Tabela 7 - Atividade máxima da enzima piruvato carboxilase nos tecidos musculares - gastrocnêmio e sóleo dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *(p<0,05) e **(p<0,01) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Sóleo	Gastrocnêmio
		($umol.g^{-1}.minuto^{-1}$)	
Sedentário	-C	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03
	-S	* 0.09 ± 0.04	0.05 ± 0.03
Atividade Espontânea	-C	0.16 ± 0.07	0.08 ± 0.01
	-S	0.16 ± 0.07	0.09 ± 0.01
Treinados	-C	0.07 + 0.03	0.05 + 0.01
	-S	** 0.24 ± 0.05	** 0.18 ± 0.06
Natação 1 Hora	-C	0.22 ± 0.07	0.16 ± 0.05
	-S	0.24 ± 0.09	** 0.25 ± 0.03
Exaustão	-C	0.25 ± 0.10	0.18 ± 0.10
	-S	* 0.44 ± 0.22	0.20 ± 0.04

Tabela 8 - Atividade máxima da enzima piruvato carboxilase nos tecidos hepático e cardíaco dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *($p<0,05$) e **($p<0,01$) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Fígado	Coração
		($umol.g^{-1}.minuto^{-1}$)	
Sedentários	-C	0.29 ± 0.04	0.147 ± 0.027
	-S	* 0.24 ± 0.07	** 0.224 ± 0.037
Atividade Espontânea	-C	0.17 ± 0.05	0.015 ± 0.007
	-S	0.21 ± 0.10	** 0.100 ± 0.016
Treinados	-C	0.32 ± 0.05	0.669 ± 0.261
	-S	0.33 ± 0.05	* 0.468 ± 0.119
Natação 1 Hora	-C	0.20 ± 0.05	0.248 ± 0.073
	-S	0.17 ± 0.04	0.214 ± 0.065
Exaustão	-C	0.86 ± 0.22	0.845 ± 0.372
	-S	0.85 ± 0.26	0.638 ± 0.317

Tabela 9 - Peso relativo do tecido adiposo epididimal dos grupos controle(C) e suplementação(S) submetidos as seguintes condições: sedentário, atividade espontânea, treinados, natação 1 hora e exaustão. Os valores são apresentados por media ± desvio padrão de 10 animais por grupo *(p<0,05) e **(p<0,01) para comparação entre grupos.

Condição dos Grupos		Peso Relativo (%)
Sedentários	-C	1,283 ± 0,234
	-S	** 1,548 ± 0,217
Atividade Espontânea	-C	---- ± ----
	-S	---- ± ----
Treinados	-C	1,059 ± 0,169
	-S	0,928 ± 0,173
Natação 1 Hora	-C	1,120 ± 0,252
	-S	1,165 ± 0,225
Exaustão	-C	0,968 ± 0,167
	-S	0,903 ± 0,105