UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área Nutrição Experimental

**PAPEL DA GERAÇÃO DE OXALOACETATO NO
EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO EM RATOS
CONSEQUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ASPARTATO,
ASPARAGINA E CARNITINA**

ANTONIO HERBERT LANCHÁ JÚNIOR

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Dr. RUI CURI**

**SÃO PAULO
1993**

ANTONIO HERBERT LANCHA JUNIOR

Papel da geração de oxaloacetato no exercício físico moderado em ratos

Consequências da suplementação de aspartato, asparagina e carnitina

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Presidente

Prof. Tit. Rui Curi

1º Examinador

Prof. Tit. Naomi Shinomiya Hell

2º Examinador

Prof. Assoc. José Eduardo Brucato

3º Examinador

Prof. Dr. Turibio Leite Barros Neto

4º Examinador

Prof. Tit. Sergio Miguel Lucas

São Paulo, 05 de novembro 1993

Ao meu Pai e minha Avó.

Na distância que parece intrasponível, vive a certeza de que um dia possamos nos encontrar. Com toda a minha força luto por isso, para quando chegar ter muitas histórias para vocês ... Saudades!

AGRADECIMENTOS

- Ao Rui Curi, antes de mais nada grande amigo, que possui a competência que o faz ser respeitado e que um dia todos queremos ter. Pessoa que sempre tem tempo, mesmo quando não tem. Querido, por toda atenção e interesse durante estes anos de convivência.
- À Marinilce (Mari) por toda a ajuda para tornar este sonho realidade.
- Aos meus alunos que colaboraram neste trabalho como bolsistas e amigos pela discussão desta tese. Este trabalho é nosso: Marquinhos, Malú, Márcia, Reinaldo (Tuba), Ronaldo (Piu) e Frank.
- Aos meus alunos que, apaixonados pelo trabalho de pesquisa, nos fortalecem para que possamos continuar lutando. Tenha certeza de que perpetuarão nossos pensamentos, pois só assim seremos eternos.
- Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Celular, pelas discussões e apoio ao trabalho (GG, Marília, Luizinho, PP, Anelisa, Cinthia, Paulo Ivo, Benê, Bob, Moa, Marilene, Carmem, Astrid, Semaan, Geraldina, Robertão).
- Ao pessoal da biblioteca do ICB, pela disposição para tornar este trabalho perfeito.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Classificação das Fibras Musculares Esqueléticas	1
1.2. Estrutura das Fibras Musculares Esqueléticas	2
1.3. Fontes Energéticas Para a Contração Muscular	4
1.4. Tipos de Exercício Físico e Demanda Energética	6
1.5. Glicogênio Muscular e Resistência ao Esforço Prolongado	8
1.6. Relação Entre Metabolismo de Glicogênio e dos A.G.L.	9
1.7. Metabolismo de Aminoácidos na Atividade Motora	11
1.8. Piruvato Carboxilase	13
1.9. Proposta do Possível Papel do Glicogênio no Fornecimento de Oxaloacetato	14
2. PROPOSIÇÃO DO PRESENTE TRABALHO	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Condições Experimentais	18
3.2. Determinações Referentes ao Estudo 1	22
3.3. Determinações Referentes ao Estudo 2	24
3.4. Determinações Referentes ao Estudo 3	26
3.5. Determinações Referentes ao Estudo 4	28
3.6. Análise Estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Estudo 1	30
4.2. Estudo 2	32
4.3. Estudo 3	38
4.4. Estudo 4	45
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1- INTRODUÇÃO

1.1 Classificação das Fibras Musculares Esqueléticas.

Como citado por Keul et al (1972), já em 1678 Lorenzini diferenciou pela primeira vez as fibras musculares de coelhos em brancas e vermelhas. Cerca de dois séculos após, Ranvier em 1873 e Grutzner em 1884 demonstraram que os vertebrados possuem dois tipos extremos de fibras musculares às quais denominaram de fibras musculares escuras (tônicas) e pálidas (fásicas), que responderiam com adaptações metabólicas de acordo com a solicitação a que fossem expostas. 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) e 3) fibra do tipo IIB (contração rápida - glicolítica). Saltin et al (1977) descreveram ainda as características metabólicas específicas de cada uma, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Características das Fibras Musculares

<i>Propriedades</i>	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Velocidade de Contração	Lenta	Rápida	Rápida
Capacidade Glicolítica	Baixa	Moderada	Alta
Capacidade Oxidativa	Alta	Moderada	Baixa
Estoque de Glicogênio	Moderado	Moderado	Alto
Estoque de Triglicerídeos	Alto	Moderado	Baixo
Capilaridade do Tecido	Elevada	Moderada	Reduzida

Modificado de Saltin et al (1977)

Como pode-se notar na Tabela 1, as fibras musculares do tipo I possuem características fundamentais para a manutenção de esforços de longa duração e baixa intensidade. Devido à sua alta capacidade oxidativa e baixa velocidade de contração, as principais vias de geração de ATP são decorrentes dos processos oxidativos mitocondriais. Estas fibras possuem grande capacidade de utilizar os ácidos graxos livres devido à elevada capilaridade do tecido e alto estoque de triglicerídeos. De modo oposto, as fibras do tipo IIB, que possuem uma alta capacidade glicolítica e também elevada velocidade de contração, estão envolvidas com atividades de alta intensidade e curta duração. Nessas fibras, o conteúdo elevado de glicogênio favorece a glicólise. Já as fibras do tipo IIA apresentam eficiente resposta adaptativa ao esforço, ou seja, podem responder, quando solicitadas, de forma similar às fibras do tipo I ou tipo IIB.

1.2 Estrutura das Fibras Musculares

Os músculos esqueléticos são constituídos por conjunto de diferentes tipos de fibras, sendo que o padrão de distribuição dessas reflete o tipo de contração que o músculo está apto a realizar.

As fibras diferem, por exemplo, quanto ao número de mitocôndrias, o qual tende a ser inversamente proporcional ao diâmetro da fibra. Fibras pequenas, ricas em mitocôndrias, predominam nos músculos vermelhos (ex. sóleo) e são denominadas fibras vermelhas (tipo I). As fibras de maior diâmetro apresentam número reduzido de mitocôndrias e pouca mioglobina (pigmento muscular avermelhado) e são abundantes nos músculos brancos (ex. gastrocnêmio) (tipo IIB). Outro tipo de fibra é a denominada mista (tipo IIA), que apresenta características intermediárias das fibras musculares vermelhas e brancas. Porém, a presença de mioglobina em sua

estrutura lhe confere características superficiais semelhantes às fibras vermelhas (Greep & Weiss, 1990).

Quando avaliadas em termos de ultraestrutura, verifica-se a grande distinção entre as fibras apresentadas. As vermelhas possuem número elevado de mitocôndrias, de tamanho maior, agregadas logo abaixo do sarcolema e em forma de colunas longitudinais entre as miofibrilas. As fibras brancas apresentam mitocôndrias escassas de forma elíptica que acumulam-se ao redor da banda I. A linha Z nessas fibras é mais estreita. Nas fibras intermediárias, o número de mitocôndrias é elevado como o das fibras vermelhas, porém a linha Z é estreita como nas fibras brancas. As características das fibras vermelhas são típicas de atividade metabólica oxidativa intensa.

Nas junções neuromusculares, as diferenças ultraestruturais são também evidentes. O número de vesículas sinápticas e a complexidade das fendas juncionais são maiores nas fibras brancas quando comparadas às vermelhas (Greep & Weiss, 1990).

Fisiologicamente, os músculos vermelhos contraem mais lentamente que os brancos; assim, as fibras vermelhas são consideradas "fibras de contração lenta". No entanto, as propriedades fisiológicas atribuídas às fibras individuais divergem muito das propriedades do músculo como um todo e só agora o significado funcional das fibras começa a ser compreendido. As unidades motoras variam dentro de um mesmo músculo, além de apresentar certa heterogeneidade química entre as proteínas miofibrilares. Por exemplo, diferentes isoformas de miosina existem nos músculos individuais. Estas podem ser identificadas diretamente com relação ao tipo de fibra, através da imunocitoquímica. Desta forma, as propriedades químicas das fibras podem ser correlacionadas com suas características

microscópicas.

Em grande número de músculos, fibras brancas e intermediárias reagem com anticorpos (Ac) específicos para miosina "rápida". Por outro lado, fibras vermelhas reagem com Ac contra miosina lenta e um número significativo de fibras vermelhas reagem com Ac para miosina rápida. Assim, existem duas características das fibras vermelhas que só podem ser diferenciadas através desta metodologia. Estas fibras são definidas como fibras vermelhas lentas e rápidas, respectivamente (Greep & Weiss, 1990).

Outra observação recente é de que as fibras de uma mesma unidade motora podem ser identificadas pela ausência de glicogênio após estimulação do motoneurônio que as inerva. Pode-se detectar assim que fibras musculares pertencentes a uma unidade motora de contração rápida e fatigável, após estímulo, apresentam pouco glicogênio, elevada atividade ATPásica e resposta positiva para miosina de contração rápida e negativa para miosina lenta.

1.3. Fontes Energéticas Para a Contração Muscular

O processo de contração muscular ocorre às custas de energia fornecida pela quebra de ATP. Existe ressíntese rápida deste composto na célula. O ATP é então fracionado pela ação de enzimas (ATPases) presentes na miosina. A quebra das ligações fosfato promove a liberação de energia e a formação de dois compostos: difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico. Esta situação permite à célula liberação energética imediata, porém, com pequeno rendimento; 1 mol de ATP fracionado rende 20.000 calorias (Lehninger, 1988). Por sua vez, o ADP pode ser utilizado para síntese de ATP pela degradação do composto creatina-fosfato (CP), que libera a energia necessária para que um fosfato inorgânico seja incorporado

ao ADP. Com o aumento nas concentrações de ADP, ocorre estímulo da enzima fosfofrutoquinase (PFK), que regula o fornecimento de energia pela quebra do glicogênio muscular (glicogenólise). Estas vias, no entanto, apresentam capacidade limitada para o fornecimento de energia. Assim, quando a necessidade de energia persiste, outras fontes energéticas externas à célula são mobilizadas.

Os ácidos graxos (estocados como triglicerídeos no tecido adiposo e em pequenas quantidades no tecido muscular), a glicose (mobilizada a partir do glicogênio hepático) e os aminoácidos (especialmente a partir das proteínas lábeis) podem ser utilizados para atender às necessidades do tecido muscular. Esses metabólitos representam acúmulo de energia sob forma estável, permitindo ao organismo adaptar-se a situações de jejum e esforço físico prolongado. O rendimento energético líquido da degradação de 1 mol de glicose (glicólise) a dois de piruvato fornece 40.000 calorias. Este processo ocorre no citoplasma, sendo denominado glicólise anaeróbica. O piruvato formado na glicólise serve de substrato para os processos de geração de ATP mitocondriais. Os dois mols de piruvato formados são então degradados completamente a CO_2 e H_2O , gerando por Mol de glicose totalmente oxidada aproximadamente 720.000 cal, o que corresponde a 36 mols de ATP (Lehninger, 1988).

A utilização do piruvato como fonte energética ocorre na mitocôndria através da fosforilação oxidativa, sendo o transporte desse pela membrana mitocondrial dependente de ATP citoplasmático. Neste processo participam como precursores energéticos não apenas glicose (circulante e do glicogênio) mas também os ácidos graxos e os aminoácidos (Felig & Wahren, 1975). Para que o processo de fosforilação oxidativa ocorra, três etapas são necessárias: 1) produção de acetil coenzima A (acetil CoA) através da ação

do complexo enzimático piruvato desidrogenase (E.C. 1.1.1.27) ou pela beta-oxidação dos ácidos graxos, 2) ciclo de Krebs e 3) sistema transportador de elétrons. O ciclo de Krebs apresenta um rendimento final líquido de apenas 2 mols de ATP, porém fornece bases nitrogenadas reduzidas (NADH e FADH₂) para a cadeia de transporte de elétrons, que podem levar à produção de até 32 mols de ATP (Stryer, 1988).

1.4. Tipos de Exercício Físico e Demanda Energética

Durante a atividade física, as fontes energéticas utilizadas pelo tecido muscular variam de acordo com a intensidade e a duração do esforço. Nos momentos iniciais do exercício, ocorre consumo das fontes energéticas primárias celulares, ATP e CP. Com o prosseguimento da atividade, passa a responder com maior suprimento energético a degradação do glicogênio (muscular) e glicose (circulante) mobilizada a partir do glicogênio hepático (Hultman, 1967). Com a manutenção da atividade em intensidade que corresponda à grande utilização da glicose como fonte de energia, há geração de piruvato e de NADH citoplasmático (oriundos da glicólise). Esta situação é caracterizada pela produção de ATP insuficiente à demanda, promovendo elevação nas concentrações de ADP. Assim, o transporte do piruvato através da membrana mitocondrial ficará prejudicado pela baixa concentração de ATP e sua conversão a lactato facilitada pela elevação de NADH (Sahlin, 1986; Wasserman et al, 1986). Como consequência, a oxidação do piruvato pela mitocôndria só será possível quando o transporte pela membrana for reestabelecido. Isto ocorrerá quando houver redução da intensidade do esforço e o concomitante aumento na concentração de ATP citoplasmático. No interior mitocondrial, o piruvato, pela ação da piruvato desidrogenase, é convertido a acetil CoA, que passa a ser condensado com o oxaloacetato,

gerando citrato. Este poderá permear a membrana mitocondrial e, na presença de ATP, inibe a fosfofrutoquinase e, portanto, a glicólise.

Com o prosseguimento da atividade, em intensidade moderada, ocorrerá redução das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (Coggan, 1991; Costill & Hargreaves, 1992). Este fato atua como sinalizador entre as células musculares e o restante do organismo. A alteração glicêmica é detectada pelo sistema nervoso central, promovendo elevação na atividade simpático-adrenal. Com isto, há liberação dos hormônios adrenérgicos lipolíticos, que agem sobre o tecido adiposo, promovendo aumento dos ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos (Galbo et al 1977; Coggan, 1991).

Os AGL, em concentração elevada no plasma, são utilizados em maior proporção pelo músculo esquelético (Ahlborg et al, 1974; Pirnay et al, 1977; Ravussin et al, 1979). Assim, ocorre aumento no fornecimento de acetil CoA a partir dos AGL, o que inibe a atividade da piruvato desidrogenase, responsável pela conversão de piruvato a acetil CoA (Hagerman, 1992). Como consequência, a concentração intramitocondrial do piruvato eleva-se e, especula-se, a possível conversão deste a oxaloacetato, sob ação da enzima piruvato carboxilase. Esta é estimulada pelo aumento nas concentrações de piruvato, acetil CoA e CO_2 (Newsholme & Leech, 1988). Desta forma, ter-se-ia garantida a oxidação de acetil CoA oriundo da β -oxidação pelo fornecimento adicional de oxaloacetato de origem glicolítica. Isto faria com que o ciclo de Krebs tivesse sua atividade elevada quando da maior necessidade energética, devido à atividade física.

A β -oxidação ocorre no interior da mitocôndria e fornece acetil CoA que, através do ciclo de Krebs, libera CO_2 . Entre os fatores que controlam a utilização dos ácidos graxos, o transporte destes compostos

através da membrana mitocondrial é de extrema importância. O ácido graxo livre (acila), após atravessar a membrana celular, liga-se à coenzima A (CoA), em reação catalisada pela acil CoA sintetase. A CoA torna o ácido graxo impermeável às membranas (citoplasmática e mitocondrial). Assim, a carnitina atua complexando-se ao grupo acila, liberando a CoA no citoplasma (Bieber, 1987). O complexo acil carnitina é então identificado pelo mecanismo de transporte, presente na membrana mitocondrial (carnitina palmitoil-CoA transferase), que promove a entrada desses na organela (Harris et al, 1987). No interior mitocondrial, a carnitina dissocia-se do grupo acila e retorna ao citoplasma, onde inicia novo processo de transporte de ácido graxo. O grupo acila, no interior mitocondrial, é novamente associado à CoA (pela ação da acil CoA sintetase mitocondrial), não podendo retornar ao citoplasma devido à impermeabilidade gerada pela CoA. Em seguida, o ácido graxo sofre fracionamento sucessivo liberando acetil CoA (Rebouche & Paulson, 1986). Assim, o fornecimento reduzido de carnitina pode ser fator limitante na utilização de ácidos graxos pelos tecidos.

1.5. Glicogênio Muscular e a Resistência ao Esforço Prolongado.

Durante os últimos trinta anos, o conteúdo de glicogênio muscular tem sido relacionado com a capacidade de resistência ao esforço físico prolongado de baixa intensidade. Os experimentos conduzidos por Bergstrom e seu grupo (1967) e Hermansen et al (1967) demonstraram que dieta rica em proteínas e lipídeos, associada à atividade física intensa, promove a redução do conteúdo de glicogênio muscular. As baixas concentrações de glicogênio favorecem, na presença de concentrações elevadas de glicose, a glicogenogênese. Bergstrom demonstrou então que o fornecimento de carboidratos na dieta, após a redução do glicogênio,

promove elevação dos estoques musculares desse polissacarídeo. O conteúdo aumentado de glicogênio no músculo determinou, por sua vez, aumento proporcional da resistência ao esforço físico moderado. As explicações para estes fatos estão ainda incertas. Como poderia a elevação do glicogênio muscular determinar aumento no tempo de resistência ao esforço, se a principal fonte energética nas atividades prolongadas é oriunda da oxidação dos ácidos graxos livres?

Os conhecimentos adquiridos sobre os requerimentos energéticos do tecido muscular durante a atividade física prolongada não explicam o fenômeno demonstrado por Bergstrom et al (1967). Ao avaliar o conteúdo de glicogênio muscular em todo o organismo, constata-se que este é capaz de manter o requerimento energético de uma atividade física prolongada durante aproximadamente 71 minutos (Newsholme & Leech, 1988). Esta análise simples demonstra que a energia requisitada pelo maratonista para a manutenção de seu esforço, por exemplo, não pode ser proveniente, exclusivamente, do glicogênio muscular. Além disso, apenas alguns músculos são exigidos para a atividade física e o tecido muscular não apresenta a atividade da enzima glicose-6-fosfatase (E.C. 3.1.3.9), que remove o fosfato da glicose deixando-a permeável à membrana. Desta forma, a liberação de glicose para a circulação sanguínea é impedida. Baseado nesses fatos, como pode o conteúdo de glicogênio muscular relacionar-se ao grau de resistência ao esforço?

1.6. Relação Entre Metabolismo de Glicogênio e dos AGL

O conceito do ciclo glicose/AGL foi estabelecido em 1963 por Randle e colaboradores, que demonstraram inibição recíproca no consumo de AGL e glicose no tecido muscular cardíaco (Bagby et al, 1978).

O aumento nas concentrações de AGL promove maior geração de acetil CoA pela β -oxidação que, no ciclo de Krebs, condensa-se com o oxaloacetato gerando citrato. Este, por sua vez, atravessa a membrana mitocondrial e, na presença de ATP, inibe a glicólise (Randle, 1981; Newsholme & Leech, 1988). Muitos trabalhos demonstraram que baixas concentrações de glicogênio hepático determinam maior lipólise (Newsholme & Leech, 1988). Recentemente, Li et al (1993) evidenciaram que as concentrações de ácidos graxos e glicogênio no interior da célula muscular podem mascarar o fenômeno descrito por Randle et al (1963).

Na atividade física prolongada, os ácidos graxos livres penetram na membrana celular até atingir a mitocôndria. Nesta organela, ocorre o processo de beta-oxidação que passa a atender ao requerimento de acetil CoA necessário para a atividade do ciclo de Krebs. Ocorre então a condensação do acetil CoA com o oxaloacetato, formando o citrato, pela atividade da citrato sintetase (E.C. 4.1.3.7). Esta reação de condensação do Acetil CoA com o oxaloacetato ocorre preferencialmente nos músculos que apresentam fibras com grande quantidade de mitocôndrias, denominadas fibras de contração lenta (Saltin et al, 1977). Desta forma, nas atividades prolongadas, o ciclo de Krebs passa a atuar como ponto determinante na produção energética muscular e a condensação do acetil CoA com o oxaloacetato representa o início do ciclo do ácido cítrico (Underwood & Newsholme, 1965; Dunaway & Weber, 1974; Tornhein & Lowenstein, 1976). Krebs propôs que o ciclo deveria manter constantes as concentrações de oxaloacetato, a fim de preservar a capacidade de oxidar acetil CoA (Krebs & Johnson, 1937; Newsholme et al, 1977; Uyeda, 1979). Entretanto, estudos recentes demonstraram que alguns intermediários do ciclo de Krebs podem ser precursores da síntese de aminoácidos, os quais seriam exportados pelo

músculo. Em particular, salienta-se a síntese de glutamina:

Oxaloacetato + AcetilCoA -> Citrato -> Aconitato -> Isocitrato ->

Oxoglutarato -> Glutamato -> GLUTAMINA

(Newsholme et al, 1987; Curi et al, 1986).

Durante este processo existe, portanto, redução substancial de intermediários do ciclo de Krebs, o que resulta em retorno diminuído de oxaloacetato após completar uma volta deste (Johnson & Hansford, 1975). Sendo assim, como poderia o oxaloacetato ser repostado para garantir a atividade normal do ciclo do ácido cítrico, como postulado por Krebs?

1.7. Metabolismo de Aminoácidos na Atividade Motora

A utilização dos aminoácidos como fonte de energia durante a atividade motora foi durante muito tempo negligenciada. Estudos de Viru (1987) apontam que os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) (leucina, Isoleucina e valina) são liberados pelo fígado durante a atividade motora. O "pool" de aminoácidos circulantes é resultado da liberação hepática (efeito da redução do aporte sanguíneo), do catabolismo de proteínas do restante do organismo pela elevação dos glicocorticóides (catabólicos) e redução da insulina (anabólico). Este fato é mais pronunciado quanto mais prolongado for o esforço.

A liberação de aminoácidos pelo fígado é diretamente proporcional à intensidade do esforço (Hood & Terjung, 1990). A ação dos glicocorticóides é evidente; porém, processos intracelulares determinam mudanças metabólicas como consequência da redução do aporte sanguíneo ao fígado. Esta promove diminuição do aporte energético à célula hepática, estimulando a glicólise e a liberação de glicose à circulação sanguínea (Newsholme & Leech, 1988). A redução do aporte energético para as células

do fígado faz com que estas passem a degradar suas fontes de energia intensamente ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{IMP} + \text{Adenosina} \rightarrow \text{Inosina} \rightarrow \text{Hipoxantina} \rightarrow \text{Xantina} \rightarrow \text{Ácido Úrico}$). Ao final do processo, tem-se a quebra da adenosina monofosfato (AMP), gerando inosina monofosfato (IMP) e adenosina (Rowan & Newsholme, 1979; Simpson & Phillis, 1993; Hellsten-Westing et al, 1993). A adenosina formada, livre da ligação com o fosfato, é permeável à membrana, podendo chegar à circulação sanguínea facilmente (Arch & Newsholme, 1978). A adenosina é apontada como responsável pela captação elevada de glicose pelo músculo cardíaco (Law & Raymond, 1988) e aumento da glicólise e proteólise hepáticas (Buxton et al, 1987).

Os aminoácidos liberados para a circulação sanguínea podem atingir vários tecidos. Com a atividade motora, ocorre aumento do fluxo sanguíneo à musculatura exercitada. No músculo, os aminoácidos, principalmente os ACR, são consumidos, gerando intermediários do ciclo de Krebs e fornecendo seu grupamento aminico ao piruvato, convertendo-o à alanina (Chang & Goldberg, 1978; Miller et al, 1987; Hood & Terjung, 1990). Este mecanismo, de síntese de alanina, ocorre quando o esforço é intenso (Felig & Wahren, 1971; Viru, 1987). Quando a atividade ocorre de forma moderada, os ACR seguem para a mitocôndria, fornecendo intermediários ao ciclo de Krebs e cedendo seus grupamentos aminicos à síntese de glutamina (Millward et al, 1982; Viru, 1987). Nessa situação, a leucina é degradada a acetilCoA e seu nitrogênio segue até o glutamato, oriundo da condensação de α -cetoglutarato com a amônia (NH_3) da valina. A fração de carbonos da valina forma succinato (Newsholme & Leech, 1988). Assim, percebe-se que a utilização dos aminoácidos durante a atividade motora ocorre paralelamente à redução das concentrações de

glicogênio muscular. O consumo de aminoácidos pelo músculo pode ocorrer na tentativa de manter a funcionalidade do ciclo de Krebs. A redução do conteúdo de glicogênio poderia determinar diminuição da capacidade geradora de oxaloacetato e, conseqüentemente, redução do fluxo de substratos pelo ciclo de Krebs.

1.8. Piruvato Carboxilase (E.C. 6.4.1.1)

Como descrito anteriormente, a glicólise é mais importante no início da atividade física, fornecendo energia e gerando piruvato. Este, por sua vez, pode ser convertido a lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (E.C. 1.1.1.27) ou à alanina pela atividade da enzima alanina aminotransferase (E.C. 2.6.1.2) no citoplasma. Penetrando na mitocôndria, o piruvato pode sofrer ação do complexo enzimático piruvato desidrogenase ou da enzima piruvato carboxilase (E.C. 6.4.1.1). Esta última enzima carboxila o piruvato à oxaloacetato, em reação dependente de ATP, fornecendo substrato para a neoglicogênese hepática e renal (Newsholme & Start, 1976; Newsholme & Leech 1988; Curi, 1988). A síntese ocorre em duas etapas, a primeira caracterizada pela carboxilação da biotina e recebendo um grupamento alfa-amínico, oriundo da lisina, formando o complexo enzima-biotina-CO₂. Este complexo transfere ao piruvato o CO₂, convertendo-o em oxaloacetato (veja esquema abaixo).

A atividade desta enzima em baixas concentrações de piruvato é praticamente dependente da presença de acetilCoA. Potencialmente, esta enzima pode ser regulada pela relação ATP/ADP, visto que o ADP-Mg é um inibidor competitivo em relação ao ATP-Mg (Ballard et al, 1970).

Recentemente, tem sido sugerido que este efeito é potencializado quando da redução nas concentrações de glutamato, pois este age como potente inibidor da enzima (Denton & Halestrap, 1979). A atividade da piruvato carboxilase no músculo esquelético foi primeiramente descrita por Crabtree et al (1972), porém a significância desta para o metabolismo muscular ainda não está esclarecida. Contudo, Newsholme & Leech, no livro Biochemistry for the Medical Sciences página 322 (1988), propõem que a enzima piruvato carboxilase possa ter atividade elevada durante a atividade motora.

1.9. Proposta do Possível Papel do Glicogênio no Fornecimento de Oxaloacetato.

Conforme já mencionado, o piruvato é gerado a partir de glicogênio/glicose. Após ser transportado para o interior mitocondrial, o piruvato pode ser convertido a oxaloacetato pela ação da piruvato carboxilase. Durante o exercício prolongado, a beta-oxidação dos ácidos graxos é a principal fonte de acetil CoA. Sabidamente, acetil CoA e ATP estimulam a atividade da piruvato carboxilase (E.C. 6.4.1.1), aumentando a geração de oxaloacetato a partir de piruvato. Este fenômeno poderia desempenhar um papel importante no fornecimento de oxaloacetato para o ciclo de Krebs durante o exercício, garantindo o consumo de acetil CoA oriundo dos A.G.L.. Consequentemente, o funcionamento deste ciclo seria garantido, fornecendo a energia necessária para que a atividade física fosse mantida nessa condição.

2. PROPOSIÇÃO DO PRESENTE TRABALHO

O metabolismo oxidativo depende da atividade do ciclo de Krebs. Este, por sua vez, como descrito pelo próprio Krebs, necessita da manutenção das concentrações de oxaloacetato para que possa manter o fornecimento energético. As atividades motoras prolongadas dependem da capacidade do músculo em consumir os ácidos graxos livres, que fornecem acetil CoA e dependem do oxaloacetato mitocondrial para serem oxidados.

A possibilidade do piruvato ser importante na geração de oxaloacetato leva-nos a sugerir que o aumento no conteúdo de glicogênio possa estar diretamente envolvido com o mecanismo de manutenção das concentrações mitocondriais de oxaloacetato.

Estratégias alternativas podem ser utilizadas para a geração de oxaloacetato nessas condições, como a suplementação nutricional de seus precursores. Durante a dissertação de mestrado, estudou-se o efeito da suplementação nutricional de aspartato, asparagina e carnitina sobre a resistência ao esforço físico. Aspartato e asparagina são precursores de oxaloacetato no tecido muscular, segundo Newsholme & Leech, 1988. A carnitina, por sua vez, participa do mecanismo de transporte dos ácidos graxos através da membrana mitocondrial. Assim, o fornecimento adicional destes aminoácidos poderia determinar a manutenção do conteúdo de oxaloacetato e maior eficiência na utilização dos A.G.L. como fonte de acetilCoA. Os dados obtidos indicam elevação na resistência ao esforço físico moderado e prolongado (Lancha Jr, 1991). Este fato mostra que a geração de oxaloacetato desempenha papel fundamental na resistência a este tipo de esforço. Desta forma, neste estudo, investigamos de modo sistemático o efeito do exercício físico e do treinamento sobre a atividade da piruvato carboxilase nos músculos esqueléticos e cardíaco e as consequências da

suplementação nutricional de aspartato, asparagina e carnitina no metabolismo muscular, performance ao exercício e na ultraestrutura celular. Para isto, dividimos o estudo em 4 etapas que estão apresentadas abaixo.

Estudo 1

Caracterizar o papel da geração fisiológica de oxaloacetato a partir do piruvato em diferentes condições de atividade física, através da avaliação da atividade máxima da enzima piruvato carboxilase nos tecidos musculares cardíaco e esquelético (gastrocnêmio e sóleo). Nesse estudo, os ratos sedentários e treinados (treinados durante cinco semanas, cinco dias por semana, uma hora por dia) foram sacrificados em repouso, 1 hora após a natação e em exaustão. A atividade da citrato sintetase foi determinada como forma de avaliar a eficiência do programa de treinamento físico imposto (Baldwin et al, 1973; Soar et al, 1983).

Estudo 2

Avaliar as alterações provocadas pela suplementação aguda e crônica (aspartato, asparagina e carnitina) no conteúdo de glicogênio muscular, lactato, glicose e A.G.L. plasmáticos em ratos sedentários e treinados (5 semanas, 5 dias por semana, 20 minutos por dia) em atividade física moderada e de curta duração. Este estudo teve como objetivo verificar as consequências da suplementação em animais com grau de solicitação motora reduzida.

Estudo 3

Verificar as alterações metabólicas do músculo de animais suplementados com os aminoácidos (aspartato, asparagina e carnitina)

treinados durante 1 hora por dia (5 semanas, 5 dias por semana, 1 hora por dia). Nessa condição, a suplementação de aspartato, asparagina e carnitina efetivamente elevou o tempo de exaustão (Lancha Jr., 1991). Os músculos foram incubados durante 1 hora com [U- ^{14}C] glicose na presença de 100 μU de insulina e avaliou-se: a) conteúdo de glicogênio muscular, b) síntese de glicogênio, c) lactato total e d) lactato radioativo do meio de incubação. O sangue dos animais utilizados nesse estudo foi coletado para a determinação do aminograma.

Estudo 4

Verificar possíveis alterações morfológicas ultraestruturais na musculatura esquelética (gastrocnêmio e sóleo), provocadas pela suplementação nutricional (aspartato, asparagina e carnitina) e pelo treinamento físico.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

3.1.1. Animais

Foram utilizados 183 ratos machos albinos, pesando aproximadamente 250g, provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas - USP. Os animais foram agrupados em cinco por gaiola (17cm de altura, 33cm de largura e 44cm de comprimento) e mantidos a temperatura de 23°C e ciclo claro/escuro invertido de 12/12 horas. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab CR 1, Nuvital Nutrientes LTDA. Estrada da Ribeira 3001, Km 3, Curitiba) com composição aproximada de 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de gorduras.

3.1.2. 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.

3.1.3. Grupos Experimentais

Estudo 1

Dois grupos experimentais foram estudados: a) sedentários (36 ratos) e b) treinados (36 ratos). Ambos os grupos foram sacrificados em três condições (cada uma composta de 12 animais treinados e 12 animais sedentários): em repouso, após uma hora de atividade (natação com sobrecarga de 5% do peso corporal) e exaustão (realizada também em natação com sobrecarga de 5% do peso corporal). O treinamento dos animais foi realizado durante cinco semanas, cinco dias por semana, uma hora por

dia, com sobrecarga de 5% do peso corporal preso à cauda. Esta sobrecarga de peso foi corrigida semanalmente conforme o ganho de peso corporal dos animais. Este procedimento foi caracterizado como treinamento de baixa intensidade e longa duração e o período de treinamento de cinco semanas foi efetivo em aumentar a capacidade oxidativa muscular (Lancha Jr. 1991). A ingestão alimentar (ração comercial) foi oferecida *ad libitum*.

Estudo 2

Os ratos deste estudo (72) foram divididos em controle (CC), suplementado agudo (SA) e suplementado crônico (SC). Todos receberam ração comercial (*ad libitum*). O grupo controle ingeriu água enquanto que os suplementados ingeriram solução aquosa de aspartato (0,15%), asparagina (0,15%) e carnitina (0,30%), resultando em ingestão média desses aminoácidos de $45\text{mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para os dois primeiros e $90\text{mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para o último. O grupo suplementado agudo teve ingestão de suplementação (carnitina, aspartato e asparagina) por cinco dias, enquanto que o suplementado crônico ingeriu a suplementação descrita acima por cinco semanas, 7 dias por semana. Os animais suplementados e controle foram divididos em: a) ratos sedentários (sem atividade física), b) ratos treinados (treinamento em natação por cinco semanas, com sobrecarga de 5% do peso preso à cauda, cinco dias por semana, durante vinte minutos diariamente). Os grupos treinados em natação foram sacrificados nas seguintes etapas: a) em repouso (antes da natação, para avaliar o efeito do treinamento) e b) no momento da exaustão.

Estudo 3

Os animais deste estudo (36) foram divididos em (CC), (SA) e

(SC) como descrito no estudo anterior. Estes grupos foram subdivididos em sedentários e treinados. Os animais sedentários permaneciam nas gaiolas o mesmo período de tempo que os animais treinados (cinco semanas), sendo então sacrificados para a incubação de fatias do músculo sóleo. Os ratos treinados foram submetidos ao treinamento de modo semelhante ao estudo 1 (cinco semanas, cinco dias por semana, uma hora por dia com sobrecarga de 5% do peso preso à cauda), quando então foram sacrificados para a realização da incubação das fatias de músculo sóleo, como os animais sedentários. A ingestão alimentar (ração comercial) foi oferecida *ad libitum*.

Estudo 4

Os animais deste estudo (3 por grupo) obedeceram às mesmas condições descritas para o estudo 3. Ao final da quinta semana, os animais sedentários e treinados, controle e suplementados (aguda e cronicamente), foram anestesiados com éter para remoção dos músculos sóleo e gastrocnêmio - porção branca. Posteriormente procedeu-se o sacrifício. Os tecidos removidos foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão, descrita a seguir no item 3.5.1.

3.1.4. Etapas do Treinamento

Todos os estudos tiveram o treinamento dividido em: a) fase de adaptação ao sistema de natação (Vieira et al, 1988)(1ª semana) e b) fase de treinamento (cinco semanas). Nas duas fases, os animais foram submetidos à natação diariamente (5 dias na semana), sendo que, durante a adaptação, o tempo e a carga foram elevados diariamente até chegar a 5% do peso corpóreo no último dia. O tempo de natação foi elevado gradativamente até 20 minutos (grupo de atividade moderada de curta duração - Estudo 2)

ou 60 minutos (grupo de atividade moderada de longa duração - Estudos 1, 3 e 4) .

3.1.5. Etapas do Sacrifício dos Animais Treinados e Não

Treinados

Os animais foram sacrificados no último dia (5^o dia) da última semana (5^a semana nas seguintes situações: a) antes da atividade (em repouso) (Estudos 1, 2, 3 e 4), b) logo após a atividade de 1 hora (Estudo 1) e c) em exaustão (Estudos 1 e 2).

3.1.6. Ratos Sedentários

Os animais sedentários (Estudos 1, 2, 3 e 4) permaneceram agrupados em 5 por gaiola. Estes foram mantidos durante cinco semanas, sem serem submetidos ao treinamento, apenas manuseados de forma semelhante aos animais treinados.

3.1.7. Treinamento em Natação

Para a adaptação à água e ao sistema de natação (Vieira et al., 1987), os animais (Estudos 1, 2, 3 e 4) foram exercitados durante cinco dias com sobrecargas crescentes até 5% do peso corporal, a qual seria a carga de treinamento. A natação foi realizada em temperatura da água de 32°C, entre 11:00 e 13:00 horas. Esta temperatura foi escolhida por promover menor estresse nos animais (Lancha Jr., 1991)

3.1.8. Determinação do Tempo de Exaustão

Foi considerado 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.

3.1.9. Procedimento Experimental

Todos os animais foram sacrificados entre 11:00 e 13:00 horas (com exceção dos animais avaliados em exaustão). O sangue foi coletado para a determinação de glicose, ácidos graxos livres (A.G.L.) e lactato. Fígado, coração e músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca) foram removidos e congelados em nitrogênio líquido para posterior determinação do conteúdo de glicogênio (Estudos 2 e 3) ou atividade máxima das enzimas citrato sintetase e piruvato carboxilase (Estudo 1). No Estudo 3 o congelamento do tecido muscular foi feito logo após o término da incubação. Apenas no Estudo 4 os tecidos foram imediatamente fixados para verificação morfológica.

3.2. DETERMINAÇÕES REFERENTES AO ESTUDO 1

3.2.1. Atividade Máxima da Piruvato Carboxilase

Este método, descrito por Crabtree et al. (1972), avalia a atividade da enzima piruvato carboxilase (E.C.6.4.1.1) pelo grau de aparecimento de coenzima A, quando o piruvato, ATP e acetil CoA foram adicionados ao meio de reação. O oxaloacetato formado a partir da atividade da piruvato carboxilase reage com o acetil CoA, formando citrato e CoA pela atividade da citrato sintetase, presente no homogeneizado. A concentração de CoA formada foi avaliada pelo aparecimento do complexo DTNB-CoA, em 412 nm.

Os tecidos muscular esquelético (sóleo e gastrocnêmio) e muscular cardíaco foram dissecados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido até as determinações enzimáticas serem realizadas. Os

tecidos foram então homogeneizados utilizando-se equipamento descrito por Vieira et al (1989). O meio de extração consistiu de Tris-HCl 50mM, sacarose 300 mM e EDTA 1mM, com pH final de 7.4. A mistura de ensaio da piruvato carboxilase consistiu de: Tris-HCl 400mM, $MgCl_2$ 100 mM, DTNB 4mM, ATP 50mM, acetil CoA 15mM, $NaHCO_3$ 200mM, Creatina fosfato 100mM e Triton X-100 0,05%. Como substrato da reação foi adicionado ao meio piruvato 200 mM. O volume final de ensaio foi de 1 ml (20 μ l de amostra, 50 μ l de substrato - piruvato e o restante de mistura de ensaio) e a reação foi monitorada durante 10 minutos à 25°C. Para impedir interferência de substrato endógeno ou de outras enzimas, como a acetil CoA hidrolase, a mistura de ensaio contendo amostra permaneceu por 5 minutos no espectrofotômetro até estabilização da absorbância. Somente após este período é que foi adicionado o substrato (piruvato), dando início à reação.

3.2.2. Determinação do K_m da Piruvato Carboxilase

Para a avaliação do K_m da piruvato carboxilase, nos músculos esqueléticos e no coração, utilizou-se o mesmo procedimento de extração e determinação da atividade máxima da enzima (descrito anteriormente). Entretanto, a atividade da enzima foi medida em diferentes concentrações de piruvato (em mM): 0,05; 0,10; 0,50; 0,25; 0,50; 1,00 e 10,00.

3.2.3. Atividade Máxima da Citrato Sintetase

O método de determinação da atividade máxima da citrato sintetase (E.C. 4.1.3.7) foi descrito por Alp et al. (1976) e baseia-se na reação de acetil CoA com oxaloacetato dando citrato e CoA. O DTNB reage com a CoA dando um composto de cor amarelada (DTNB - CoA). Assim, a formação deste complexo é proporcional à atividade máxima da enzima, pois

no meio de ensaio são adicionados em excesso oxaloacetato e acetil CoA. O meio de extração para a determinação da atividade da citrato sintetase consistiu de Tris-HCl 50mM e de EDTA 1mM, com pH final 7.4.

A mistura de ensaio foi composta de tampão de ensaio (Tris-HCl 100mM e DTNB 0,4mM), Triton X-100 0,05% e acetil CoA 15mM. Como substrato à reação, 1 mM de oxaloacetato foi adicionado ao meio de ensaio.

O volume final do ensaio foi de 1 ml. Após a adição do substrato, a quantidade de DTNB - CoA formada foi medida durante 10 minutos, à temperatura de 25 °C, em espectrofotômetro Gilford a 412 nm.

3.3. DETERMINAÇÕES REFERENTES AO ESTUDO 2

3.3.1. Determinações Plasmáticas, do conteúdo de glicogênio e peso lipídico relativo

3.3.1.1. Aminograma plasmático

O aminograma plasmático foi realizado nos animais sedentários e treinados, controle e suplementados (agudo e crônico). O sangue foi coletado em tubos heparinizados. Após a extração plasmática, foi elaborado um "pool" de plasma de 6 ratos para cada grupo. Este foi tratado com ácido sulfossalicílico (50mg por ml de plasma), homogeneizado e posteriormente centrifugado a 2500 rpm. O sobrenadante foi coletado, filtrado (filtro de 22 µm) e injetado em auto analisador Beckman modelo 7200.

3.3.1.2. Glicose plasmática

A glicose plasmática foi determinada pelo método descrito por Bergmeyer (1974) que consiste nas seguintes reações:

A concentração de glicose foi inferida pela concentração de quinonimina formada, medida a 505 nm de absorbância (Kit LABTEST - Glicose GOD-ANA).

3.3.1.3. Lactato plasmático

O lactato plasmático foi determinado pelo método de Engle e Jones (1978). O lactato, por ação da lactato desidrogenase, é convertido em piruvato e transforma o NAD em NADH. A quantidade de NADH formada é determinada em 340 nm de absorbância, sendo proporcional à concentração inicial de lactato da amostra.

3.3.1.4. Ácidos Graxos Livres (AGL)

Os A.G.L. plasmáticos foram determinados pelo método de Falholt et al (1973). Inicialmente, fez-se a extração desses pela mistura de solventes (clorofórmio, metanol e heptano) sob agitação vigorosa, coletando o sobrenadante. O extrato foi tratado com nitrato de cobre, formando sabão de cobre. O metal ligado ao A.G.L. reage com o dietilditilcarbamato, produzindo coloração amarelada, medida a 435 nm.

3.3.1.5. Determinação do Conteúdo de Glicogênio Muscular, Cardíaco e Hepático

O conteúdo de glicogênio muscular (sóleo e gastrocnêmio

porção branca), hepático e cardíaco foi determinado pelo método de Hassid & Abrahams (1957). Os tecidos foram digeridos durante 30 minutos para a extração de glicogênio em solução de KOH 5,5M em banho fervente. A extração final foi feita em duas etapas através da precipitação com etanol 70% em banho fervente. O glicogênio foi então determinado utilizando solução de antrona 1 M em ácido sulfúrico (que hidrolisa o glicogênio à glicose). A antrona reage com a glicose produzida pela quebra de glicogênio, dando cor verde. O produto da reação foi determinado a 540 nm de absorbância.

3.3.1.6. Conteúdo Lipídico Relativo

O tecido adiposo epididimal foi removido e imediatamente pesado. Este tecido é utilizado como parâmetro da massa adiposa dos animais (Rodbell, 1964). O peso deste tecido foi dividido pelo peso corporal do animal, obtido antes do sacrifício, e multiplicado por 100 para obtermos o valor relativo deste por animal.

3.4 DETERMINAÇÕES REFERENTES AO ESTUDO 3

3.4.1. Incubação do Músculo Sóleo

Para incubação do músculo sóleo, foram utilizados frascos (erlenmeyers) de 25 ml, siliconizados previamente por solução de silicone em acetona (1%).

Imediatamente após o sacrifício dos animais, o músculo sóleo foi dissecado. Em seguida, foram retiradas fatias que pesavam no máximo 40 mg. Cada fatia foi amarrada pelos tendões e em seguida presa a um grampo para manter a tensão de repouso. O conjunto "músculo e grampo" foi submetido à pré-incubação durante 30 minutos, com o objetivo de adaptar o

tecido à nova condição *in vitro* e em seguida foi feita a incubação durante 1 hora, na presença de [U-¹⁴C]-glicose, como descrito por Leighton & Cooper (1988).

Os tecidos foram pré-incubados em meio composto de: 3,0 ml de solução Krebs-Ringer (HEPES 10 mM; CaCl₂ 0,11 mM; adicionada de KH₂PO₄ 0,15M; MgSO₄ 0,15M; KCl 1, 0,15M; NaHCO₃ 0,15M; NaCl 0,15M) e glicose 5 mM. Os frascos foram selados com tampas de borracha e gaseados (O₂/CO₂ - 19:1) por trinta minutos durante a pré-incubação (etapa fundamental para adaptação do músculo às condições *in vitro*). Após esta etapa, os tecidos foram transferidos para outros frascos com meio semelhante ao anterior adicionado de [U-¹⁴C]-glicose (0,5 µCi.ml⁻¹) e insulina (100 uU.ml⁻¹). Durante o período de incubação (1 hora), os frascos foram selados e gaseados por 15 minutos do período total. Ao término da incubação, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para posterior determinação do conteúdo total de glicogênio (frio) e glicogênio radioativo. O meio foi separado para as determinações de lactato total e radioativo.

3.4.1.1. Determinações no Meio de Incubação

O lactato total do meio de incubação foi determinado pelo método de Engle & Jones (1978) (item 3.3.1.3). O lactato radioativo foi determinado pelo método descrito por Leighton & Cooper (1988), que consiste na filtração do meio de incubação utilizando colunas de resina DOWEX (DOWEX-2 forma iônica - Sigma cod.9049-11-0) preparadas em meio contendo NaOH 1 M. Posteriormente, as colunas foram lavadas com ácido fórmico 98% (PA). Para neutralizar a resina, foram feitas lavagens seguidas com água destilada até a obtenção de pH neutro por esta (avaliado

com indicador universal). As colunas foram então montadas em seringas contendo 2 ml de Dowex, utilizando pequena camada de lã de vidro ao fundo para impedir a passagem da resina. Os meios de incubação (1 ml) foram filtrados nas colunas. Em seguida, as colunas foram lavadas com solução de glicose ($5 \mu\text{moles.ml}^{-1}$) para eluir a glicose radioativa. Para remover a glicose, foram utilizados 4 ml de água bidestilada. Finalmente, para a remoção do lactato radioativo, foram utilizados 6 ml de ácido fórmico 0,5 M, uma alíquota de 1 ml foi adicionada a 5 ml de solução Brays (constituída de naftaleno 0.47M, PPO 8 mM, POPOP 0.5 mM, metanol 10% e etileno glicol 2% em p-dioxano) para leitura em cintilador (Beckman LS 6000 IC).

3.4.1.2. Determinações no Tecido Muscular Após a Incubação

A incorporação da $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi avaliada após a digestão do tecido e extração do glicogênio como descrito por Hassid & Abrahams (1957) (item 3.3.1.5). O glicogênio extraído foi quantificado em cintilador pela adição de solução Brays (5ml) (composição descrita no item 3.4.1.1).

3.5. DETERMINAÇÕES REFERENTES AO ESTUDO 4

3.5.1. Análise Ultraestrutural

Os músculos foram expostos e fixados *in situ* com solução Karnowsky (glutaraldeído 2,0% e paraformaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M). Logo após a remoção, foram mergulhados na mesma solução fixadora e, em seu comprimento de repouso, foi seccionada uma porção superficial. Fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 foram fixados durante 24 horas em solução Karnowsky. A lavagem foi feita com

tampão cacodilato de sódio 0,1 M (três trocas de cinco minutos). A pós-fixação foi realizada durante duas horas em solução de tetróxido de ósmio 1% (em tampão cacodilato de sódio 0,1 M). Após a lavagem, os tecidos musculares foram desidratados da seguinte maneira: etanol 70% e 95% (2 trocas de 10 minutos cada) e etanol absoluto (4 trocas de 15 minutos) e óxido de propileno (2 trocas de 10 minutos).

Os fragmentos permaneceram em mistura de óxido de propileno e resina epóxi (Spurr A.R., 26.31 - SIGMA) 1:1 "over night" à temperatura ambiente sob agitação lenta e durante seis horas em resina pura, antes da inclusão. Logo após a inclusão, as formas permaneceram em estufa a 70°C durante 72 horas para polimerização da resina.

Os cortes semifinos (0,5 µm de espessura) foram corados com azul de toluidina e observados em microscópio ótico para escolha dos blocos e regiões a serem analisadas. Os cortes ultrafinos (40 - 60 nm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo (Sorval MT-1), utilizando-se faca de diamante (Diatome). Foram posicionados em telas de cobre de 200 mesh. A impregnação com metais pesados foi feita com acetato de uranila 2% (em etanol) e citrato de chumbo (5 minutos cada). A observação foi feita em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol-JEM-100 CX II e Zeiss EM 9S-2).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de teste "t" de Student para amostras não pareadas. As diferenças estão indicadas em resultados apresentados nas tabelas.

4- RESULTADOS

Como indicativo de que os animais estavam treinados ao programa de exercício imposto, verificou-se elevação superior a 3 vezes na atividade da citrato sintetase no músculo sóleo: de 2.5 ± 1.41 na condição sedentária para $8.36 \pm 2.74 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ de peso fresco após o treinamento.

4.1 Estudo 1 Determinação da Atividade da Piruvato Carboxilase nos Músculos Esqueléticos e Cardíacos dos Ratos Sedentários e Treinados Durante a Atividade Física.

A atividade da enzima piruvato carboxilase apresentou-se 2,5 vezes maior no tecido cardíaco que nos músculos esqueléticos dos ratos sedentários (tabela 2).

O Km da piruvato carboxilase foi determinado nos músculos cardíaco, sóleo e gastrocnêmio, e os resultados apresentados demonstram existir apenas uma forma da enzima nos 3 tecidos, apesar das diferenças em sua atividade (tabela 3).

Na condição de repouso, os animais treinados elevaram a atividade da enzima 4,5 vezes no músculo cardíaco, porém não alteraram no sóleo e no gastrocnêmio quando comparados com o grupo sedentário (Tabela 2).

Nos músculos gastrocnêmio e sóleo, a natação por uma hora nos ratos sedentários provocou elevação pronunciada da atividade da piruvato carboxilase, sendo 2,6 vezes maior no gastrocnêmio, 12,4 vezes no sóleo, ficando o músculo cardíaco com aumento de 5,2 vezes (Tabela 2).

Com a continuidade do exercício até a exaustão, o aumento da atividade da piruvato carboxilase, descrito acima, foi basicamente

mantido. Esta elevação foi acentuada no coração (9,1 vezes), sóleo (9 vezes) e ligeiramente elevada no gastrocnêmio (70%) quando comparada à atividade no grupo sedentário em repouso (tabela 2).

Nos animais treinados submetidos à exaustão, a atividade da enzima piruvato carboxilase não se apresentou diferente em relação aos animais treinados após uma hora de natação nos músculos esqueléticos (gastrocnêmio e sóleo). Entretanto, sob estas condições, foi observada elevação na atividade da enzima no músculo cardíaco (0,845 contra 0,248 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por g de tecido fresco após uma hora de natação).

Tabela 2- Atividade da enzima Piruvato Carboxilase ($\mu\text{mol}/\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) nos grupos sedentários e treinados nas seguintes condições: em repouso, exercitados em natação por uma hora e exaustão.

Grupos e Condições	Músculo Cardíaco	Músculo Gastrocnêmio	Músculo Sóleo
Sedentários			
Em Repouso	0.147 ± 0.030	0.060 ± 0.030	0.050 ± 0.030
Natação Uma Hora	$0.778 \pm 0.330\bullet$	$0.160 \pm 0.110\bullet$	$0.620 \pm 0.220\bullet$
Natação Exaustão	$1.343 \pm 0.530^{+o}$	$0.102 \pm 0.002^{+o}$	$0.450 \pm 0.030^{+o}$
Treinados			
Em Repouso	$0.669 \pm 0.261^*$	0.050 ± 0.010	0.070 ± 0.030
Natação Uma Hora	$0.248 \pm 0.073\bullet^*$	$0.160 \pm 0.050\bullet$	$0.220 \pm 0.070\bullet^*$
Natação Exaustão	$0.845 \pm 0.372^{+o*}$	$0.180 \pm 0.100^{+*}$	$0.250 \pm 0.100^{+*}$

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. A diferenças significativas indicadas pelo teste t de Student estão apresentadas pelos símbolos: (•) para a comparação entre natação uma hora e repouso nos grupos sedentários e treinados; (+) para a comparação entre exaustão e repouso; (o) para a comparação entre exaustão e uma hora de natação e (*) para a comparação entre treinados e sedentários. O nível de significância foi de ($p < 0.05$).

Tabela 3- Km da piruvato carboxilase nos músculos esqueléticos e cardíaco em mM de piruvato.

Tecido	Km (mM)
Gastrocnêmio	0,330
Sóleo	0,250
Cardíaco	0,125

4.2. Estudo 2- Suplementação Nutricional de Apartato, Asparagina e Carnitina em Ratos Sedentários e Treinados ao Exercício Durante 20 Minutos.

4.2.1 Parâmetros Plasmáticos

Conforme os resultados apresentados na tabela 4, verificou-se que, na condição sedentária, a glicemia foi cerca de 10% menor no grupo SC em relação ao CC e SA. Já para os treinados, não houve diferença significativa entre os grupos.

A concentração de A.G.L. no grupo SC sedentário teve resultados diferentes quando comparada com os outros dois grupos, sendo 4 vezes maior que SA e 2 vezes maior que CC. Comparando-se os ratos treinados, verificou-se que o grupo SA foi 44% inferior em relação ao controle em repouso. Os animais do grupo SC não apresentaram diferença em relação aos outros dois grupos.

O treinamento físico de 5 semanas (5 dias por semana durante 20 minutos por dia) diminuiu os valores de repouso dos A.G.L. no plasma (em 2 vezes no SC) e elevou os de lactato (15%). Como consequência da exaustão ao esforço físico imposto, nos animais treinados ocorreu diminuição da glicemia (em cerca de 80%) e elevação das concentrações plasmáticas de

A.G.L. (cerca de 5 vezes) e do lactato (cerca de 2 vezes). Essas respostas não foram diferentes entre os grupos CC, SA e SC.

Os sedentários SA apresentaram concentrações de lactato plasmático inferiores ao controle. Por outro lado, o grupo SC teve concentrações de lactato maiores que os outros dois grupos. Para os ratos treinados, a concentração de lactato foi semelhante entre os grupos.

Tabela 4- Determinações plasmáticas dos grupos CC, SA e SC na condição sedentária.

Condição dos Grupos	Glicemia (mg/100ml)	A.G.L. (mEq/l)	Lactato (mmol/l)
Controle	134,70 $\pm$ 17,80	0,158 $\pm$ 0,05	3,2 $\pm$ 0,79
Suplementado Agudo	132,70 $\pm$ 15,16	0,076 $\pm$ 0,01*	2,7 $\pm$ 2,21*
Suplementado Crônico	120,10 $\pm$ 7,80*#	0,315 $\pm$ 0,14*#	4,4 $\pm$ 1,37*

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média de 12 ratos. As diferenças significativas estão indicadas pelos símbolos: (*) $p < 0,05$ para comparação entre SA e SC contra CC; (#) $p < 0,05$ para a comparação de SC contra SA.

Tabela 5- Determinações plasmáticas dos grupos CC, SA e SC na condição treinada.

Condição dos Grupos	Glicemia (mg/100ml)	A.G.L. (mEq/l)	Lactato (nmol/l)
Controle			
Repouso	132,70 $\pm$ 18,74	0,113 $\pm$ 0,050	4,90 $\pm$ 0,85
Exaustão	29,70 $\pm$ 10,85 ⁺	0,601 $\pm$ 0,219 ⁺	9,44 $\pm$ 2,16 ⁺
Ingestão Aguda			
Repouso	133,20 $\pm$ 13,73	0,078 $\pm$ 0,020	5,15 $\pm$ 2,75
Exaustão	30,12 $\pm$ 13,76 ⁺	0,550 $\pm$ 0,189 ⁺	10,30 $\pm$ 2,80 ⁺
Ingestão Crônica			
Repouso	121,61 $\pm$ 19,28	0,096 $\pm$ 0,068 ^o	5,06 $\pm$ 0,78
Exaustão	32,60 $\pm$ 14,87 ⁺	0,507 $\pm$ 0,217 ⁺	10,60 $\pm$ 2,90 ⁺

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média com as devidas significâncias: (+) $p < 0,05$ como efeito da exaustão ao exercício físico, comparado ao repouso, em cada grupo; (o) $p < 0,05$ para a comparação entre o treinado eo sedentário (Tabela 4), em repouso, nos grupos CC, SA e SC.

4.2.2 Glicogênio

4.2.2.1. Muscular Esquelético

Não houve diferença significativa nas concentrações de glicogênio nos músculos sóleo e gastrocnêmio, entre os grupos treinados suplementados (agudo e crônico) e controle. No grupo de ratos sedentários, os animais SC apresentaram concentrações trinta vezes maiores de glicogênio, quando comparados aos controles. Também para os suplementados agudamente, as concentrações de glicogênio do músculo sóleo foram maiores em comparação ao grupo controle (16 vezes) e 76% inferiores às do grupo suplementado cronicamente.

As concentrações de glicogênio no músculo gastrocnêmio foram semelhantes entre os animais treinados em todas as condições, e mesmo quando submetidos à exaustão. No entanto, os ratos sedentários SA apresentaram maior conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio (29%), que os suplementados cronicamente. Por sua vez, o grupo SC, em comparação ao CC, apresentou concentrações de glicogênio do músculo gastrocnêmio mais elevadas, na ordem de 22%.

Tabela 6- Conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio nos grupos CC, SA e SC na condição sedentária.

Grupos	Sóleo	Gastrocnêmio
Controle	$0,53 \pm 0,11^*$	$0,45 \pm 0,11^*$
Suplementado Agudo	$0,81 \pm 0,26^*$	$0,71 \pm 0,11^*$
Suplementado Crônico	$1,43 \pm 0,30^*$	$0,55 \pm 0,08^*$

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média, com as devidas significâncias: (*) $p < 0,05$ para a comparação entre SA e SC contra CC.

Tabela 7- Conteúdo de glicogênio nos músculos sóleo e gastrocnêmio dos grupos CC, SA e SC na condição treinada.

Grupos	Sóleo	Gastrocnêmio
<i>Repouso</i>		
Controle	$0,86 \pm 0,14$	$0,39 \pm 0,14$
Ingestão Aguda	$0,89 \pm 0,22$	$0,48 \pm 0,17$
Ingestão Crônica	$0,61 \pm 0,33^*$	$0,31 \pm 0,09$
<i>Exaustão</i>		
Controle	$0,38 \pm 0,25^\#$	$0,13 \pm 0,04^\bullet$
Ingestão Aguda	$0,42 \pm 0,21$	$0,12 \pm 0,04^\bullet$
Ingestão Crônica	$0,59 \pm 0,33$	$0,12 \pm 0,05^\bullet$

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão, com as devidas significâncias: (*) $p < 0,05$ para a comparação de SC contra CC e SA; (#) $p < 0,05$ para a comparação de SC contra SA; (●) $p < 0,05$ para a comparação de repouso contra exaustão.

4.2.2.2. Cardíaco e Hepático

O conteúdo de glicogênio hepático foi semelhante em todas as condições estudadas (sedentários e treinados, suplementados - agudo e crônico e controle). Entretanto, o estabelecimento do quadro de exaustão ocorreu com diminuição acentuada do glicogênio hepático.

No coração, os valores de glicogênio não apresentaram diferenças significativas entre os grupos CC, SA e SC dos animais treinados. Apenas na condição sedentária, o grupo suplementado agudo apresentou maior conteúdo de glicogênio cardíaco (em torno de 30%) em relação ao CC e SC. O treinamento ao esforço físico não modificou a concentração desse metabólito no repouso (Tabelas 8 e 9), o mesmo ocorrendo em consequência da exaustão.

Tabela 8- Conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco nos grupos CC, SA e SC na condição sedentária.

Grupos	Fígado	Coração
Controle	3,62 ± 1,88	0,30 ± 0,08
Suplementado Agudo	2,86 ± 1,13	0,44 ± 0,06*
Suplementado Crônico	3,62 ± 1,88	0,30 ± 0,08#

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média, com as devidas significâncias: (*) p<0,05 para a comparação entre SA e SC contra controle; (#) p<0,05 para a comparação entre SC e SA.

Tabela 9- Conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco nos grupos CC, SA e SC na condição treinada.

Grupos	Fígado	Coração
<i>Repouso</i>		
Controle	3.24 ± 1.03	0.37 ± 0.15
Ingestão Aguda	2.83 ± 0.90	0.38 ± 0.10
Ingestão Crônica	3.34 ± 1.77	0.26 ± 0.11
<i>Exaustão</i>		
Controle	0.18 ± 0.13*	0.31 ± 0.22
Ingestão Aguda	0,17 ± 0,13*	0,28 ± 0,15
Ingestão Crônica	0,18 ± 0,15*	0.22 ± 0.15

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média, com as devidas significâncias: (*) p<0.05 para a comparação entre exaustão contra repouso.

4.2.3 Conteúdo Lipídico Relativo

A suplementação crônica de aspartato, asparagina e carnitina elevou significativamente o peso relativo do tecido adiposo epididimal (17% em relação ao CC). O mesmo ocorreu quando os animais foram treinados ao exercício físico por 5 semanas (Tabela 11); redução de 10% no SC contra o CC.

O treinamento físico claramente reduziu o peso relativo do tecido adiposo epididimal no controle, suplementado agudo e suplementado crônico (9%, 44% e 47%, respectivamente), conforme comparação dos dados da Tabela 11 contra Tabela 10.

Tabela 10- Peso relativo do tecido adiposo epididimal nos grupos CC, SA e SC na condição sedentária.

Grupos	% do Peso
Controle	1,283 $\pm$ 0,234
Suplementado Agudo	1,404 $\pm$ 0,324
Suplementado Crônico	1,548 $\pm$ 0,217*

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) $p < 0,05$ para a comparação de SA e SC contra CC.

Tabela 11- Peso relativo do tecido adiposo epididimal dos grupos CC, SA e SC na condição treinada.

Grupos	% do Peso
Controle	1,169 $\pm$ 0,156#
Ingestão Aguda	0,974 $\pm$ 0,232*#
Ingestão Crônica	1,500 $\pm$ 0,130*#

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) $p < 0,05$ para a comparação de SA e SC contra CC; (#) $p < 0,05$ para a comparação de treinados contra sedentários (Tabela 10) do mesmo grupo.

4.2.4 Tempo de Exaustão

O tempo de exaustão não se alterou significativamente entre os grupos. Os valores (em minutos) obtidos e expressos como média $\pm$ desvio padrão da média de 12 ratos foram: 200 $\pm$ 78; 210 $\pm$ 82 e 223 $\pm$ 81 para CC, SA e SC, respectivamente. Vale apenas salientar que nesse caso os animais foram treinados a um exercício moderado de 20 minutos diários. Na

dissertação de mestrado, em que os ratos foram treinados por 1 hora diariamente, houve elevação em torno de 40% no período para exaustão no grupo SC contra o CC nessas mesmas condições.

4.3. Estudo 3- Incubação de Fatias de Músculo

4.3.1 Animais Sedentários

O conteúdo de glicogênio nos animais sedentários SA, foi superior ao grupo controle (97%) e ao SC (228%). Entre os animais SC e CC, a maior concentração foi observada no grupo controle (66%).

A taxa de síntese de glicogênio a partir da [U- 14 C] glicose foi maior no grupo suplementado crônico (em torno de 22%) comparado ao CC e SA. Entre os grupos controle e o SA, não houve diferença significativa desse parâmetro (tabela 13).

O lactato total produzido a partir da glicose foi menor no grupo SA (66%) em relação ao controle. Já a diferença entre o controle e SC ficou em torno de 13%, superior no primeiro. Entre os animais suplementados, a maior taxa de conversão de glicose em lactato ocorreu no grupo crônico (48%) em relação ao suplementado agudo (tabela 14).

A taxa de conversão de [U- 14 C] glicose em lactato foi superior no grupo suplementado crônico (57%) comparada ao controle e suplementado agudo. Entre os grupos SA e controle, não houve diferença significativa desse parâmetro (tabela 15).

TABELA 12- Conteúdo de glicogênio dos músculos sóleos incubados por uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5mM/5μCi.ml⁻¹). Os animais sedentários foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Conteúdo de Glicogênio (mg/g)
Controle	7.90 ± 2.59
Suplementados Agudo	15.57 ± 2.96*
Suplementados Crônico	4.74 ± 0.82*#

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0.05 para a comparação de SA e SC contra CC.(#) p<0.05 para a comparação de SA contra SC.

TABELA 13- Síntese de glicogênio dos músculos incubados durante uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5mM/5μCi.ml⁻¹). Os animais sedentários foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Taxa de Síntese de Glicogênio (μmol/h/g)
Controle	0.226 ± 0.031
Suplementação Aguda	0.218 ± 0.084
Suplementação Crônica	0.271 ± 0.044**

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0.05 para a comparação entre SC contra SA e CC.

TABELA 14- Lactato produzido pelos músculos incubados durante uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5mM/5μCi.ml⁻¹). Os animais sedentários foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Produção Total de Lactato (mmol/h/g)
Controle	24.99 ± 4.09
Suplementação Aguda	14.89 ± 5.68*
Suplementação Crônica	22.09 ± 3.13*#

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0,05 para a comparação de SA e SC contra CC; (#) p<0.05 para a comparação entre SA e SC.

TABELA 15- Lactato radioativo produzido pelos músculos sóleos incubados durante uma hora em meio contendo [U- ^{14}C]-glicose (5mM/5 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$). Os animais sedentários foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Taxa de Síntese de Lactato Radioativo ($\mu\text{mol/h/g}$)
Controle	14,62 $\pm$ 3,95
Suplementados Agudo	15,21 $\pm$ 2,89
Suplementados Crônico	23,38 $\pm$ 3,22**

Os valores estão apresentados como media $\pm$ desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) $p < 0,05$ para a comparação contra o grupo CC; (#) $p < 0,05$ para comparação entre SA e SC.

4.4.2 Animais Treinados

O conteúdo de glicogênio das fatias de músculo sóleo após incubação apresentou-se elevado nos grupos SA e SC quando comparados ao controle (188% e 40%, respectivamente), sendo superiores para os animais suplementados agudamente (105%) em relação aos SC (tabela 16).

A síntese de glicogênio a partir da glicose [U- ^{14}C] glicose foi superior (19%) nos animais controle quando comparada aos animais suplementados nas duas formas, sendo que entre estes não houve diferença significativa (tabela 17).

O lactato total do meio produzido a partir da glicose foi mais elevado em ambos os grupos suplementados comparados ao controle (55%). Entre os grupos suplementados (agudo e crônico) não ocorreu variação na produção de lactato (tabela 18).

A taxa de formação de lactato radioativo a partir de [U- ^{14}C] glicose foi superior nos animais suplementados (SA e SC) quando comparados ao controle (23%). Entre os animais suplementados (agudo e crônico) não houve diferença (tabela 19).

Como consequência do treinamento imposto (5 semanas, 5 dias por semana, uma hora por dia) houve elevação do conteúdo de glicogênio no músculo sóleo, após 1 hora de incubação, em todos os grupos estudados: 33% CC, 94% SA e 210% SC (conforme comparação entre as tabelas 12 e 16). O mesmo ocorreu com a síntese de glicogênio a partir da [U-¹⁴C] glicose: 80% CC, 57% SA e 28% SC. A quantidade total de lactato foi nitidamente menor nos músculos dos ratos treinados dos 3 grupos: 189% CC, 10% SA e 64% SC. Por sua vez, a taxa de síntese de lactato a partir da [U-¹⁴C] glicose elevou-se nos músculos obtidos dos animais exercitados (36% CC, 54% SA e 7% SC).

TABELA 16- Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo incubado por uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5 mM/5 μ Ci.ml⁻¹). Os animais treinados foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Conteúdo de Glicogênio (mg/g)
Controle	10.51 $\pm$ 1.40
Suplementados Agudo	30.32 $\pm$ 5.16*
Suplementado Crônico	14.73 $\pm$ 1.87*#

Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0.05 para a comparação de SA e SC contra CC; (#) p<0.05 para a comparação entre SA e SC.

TABELA 17- Síntese de glicogênio dos músculos incubados por uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5 mM/5μCi.ml⁻¹). Os animais treinados foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Taxa de Síntese de Glicogênio (μmol/h/g)
Controle	0.409 ± 0.079
Suplementação Aguda	0.343 ± 0.080*
Suplementação Crônica	0.348 ± 0.071*

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0,05 para a comparação entre SA e SC contra CC.

TABELA 18- Lactato total produzido pelos músculos sóleos incubados durante uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5 mM/5μCi.ml⁻¹). Os animais treinados foram divididos nos CC, SA e SC.

Grupos	Produção total de Lactato (mmol/h/g)
Controle	8.62 ± 2.10
Suplementados Agudo	13.44 ± 3.49*
Suplementados Crônico	13.42 ± 3.96*

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0,05 para a comparação entre os grupos SA e SC contra CC.

TABELA 19- Lactato radioativo produzido pelos músculos sóleos ncubadosdurante uma hora em meio contendo [U-¹⁴C]-glicose (5 mM/5μCi.ml⁻¹). Os animais treinados foram divididos nos grupos CC, SA e SC.

Grupos	Taxa de Síntese de Lactato Radioativo (μmol/h/g)
Controle	20.01 ± 4.29
Suplementados Agudo	23.51 ± 4.80*
Suplementados Crônico	25.19 ± 4.72*

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão da média com as devidas significâncias: (*) p<0,05 para a comparação entre SA e SC contra CC.

4.3.3 Aminograma

A análise do aminograma demonstrou que a suplementação de aminoácidos (aspartato e asparagina) nos animais treinados (5 semanas, 5 vezes por semana uma hora por dia) promove elevação nas concentrações plasmáticas desses aminoácidos (acréscimo de 46% no grupo treinado SA) em relação ao controle, não suplementado. Já o treinado suplementado crônico teve elevação da ordem de 12 % em relação ao controle.

Nos animais sedentários, as suplementações aguda e crônica elevaram as concentrações plasmáticas de aspartato (24% e 32% respectivamente), sugerindo que os aminoácidos ingeridos são absorvidos pelo trato digestivo e atingem a corrente sanguínea. Além disso, no entanto, observa-se incremento de taurina, alanina (possivelmente gerada no músculo esquelético), dos aminoácidos ramificados (valina, isoleucina e leucina), metionina, tirosina e ornitina e o aparecimento de glutamina e prolina. Quando o treinamento físico foi associado à suplementação, verifica-se que os valores obtidos para o SA, em comparação ao CC, foram moderadamente diferentes: queda da taurina, alanina, valina, isoleucina, leucina e arginina e elevação da histidina. Entretanto, no plasma dos animais treinados SC, não foram detectados: serina, prolina, valina e triptofano, havendo incremento marcante de cistina e redução de arginina (Tabela 4).

Tabela 20- Concentrações de aminoácidos e amônia no plasma de animais dos grupos CC, SA e SC sedentários e treinados (exercício diário de 1 hora). Os valores foram obtidos a partir do "pool" de soro de 6 ratos (μM de aminoácido).

Aminoácido	Sedentários			Treinados		
	CC	SA	SC	CC	SA	SC
Taurina	186,53	210,83	279,08	236,23	182,75	234,04
Aspartato	45,25	56,26	59,93	37,86	54,94	42,50
Serina	ND	ND	ND	574,75	513,79	ND
Glutamina	ND	62,31	96,96	64,18	91,83	63,58
Prolina	ND	229,77	165,42	266,25	245,48	ND
Glicina	295,78	290,89	308,25	247,59	289,77	245,30
Alanina	364,80	495,02	435,80	427,58	357,40	423,63
Cistina	ND	1,80	1,23	2,02	2,02	91,86
Valina	188,52	285,01	259,05	261,52	184,69	ND
Metionina	50,18	64,46	60,96	58,19	49,16	57,65
Isoleucina	80,36	124,01	121,38	111,26	78,73	110,23
Leucina	141,06	211,10	194,41	194,49	138,20	192,69
Norleucina	125	125,00	125,00	126,16	122,46	125,00
Tirosina	53,19	78,61	83,13	70,29	52,11	69,64
Fenilalanina	81,89	88,55	100,06	86,63	80,23	85,83
Histidina	152,25	99,85	174,43	111,04	149,16	110,01
Lisina	88,94	61,70	93,32	52,45	87,13	51,96
Ornitina	296,00	359,79	394,66	294,78	290,00	292,05
Triptofano	ND	ND	ND	113,06	116,72	ND
Arginina	72,30	58,15	66,32	223,87	147,11	152,43
Amonia	119,14	88,61	158,80	153,85	70,83	112,01

Abreviação: ND = não detectado.

4.4. Estudo 4- Verificação Morfológica

A análise ultraestrutural do músculo sóleo no grupo sedentário controle apresentou características típicas do músculo vermelho, com predominância de fibras do tipo I (Figura 1). Nessas fibras, o número de mitocôndrias na região subsarcolemal mostrou-se elevado, principalmente nas regiões perinucleares. Com frequência, foram observadas mitocôndrias filamentosas ao longo das miofibrilas, ocupando o comprimento de todo o sarcômero. Todas apresentaram-se intactas, com grande número de cristas e intensa eletrondensidade de matriz, indicando elevada atividade funcional. Aparentemente, o treinamento físico provocou um ligeiro aumento no número e tamanho das mitocôndrias, como esperado pelos resultados da citrato sintetase (Figura 2). O programa de treinamento imposto não provocou alterações na estrutura destas organelas.

A suplementação aguda nos animais sedentários provocou aumento do número e tamanho das mitocôndrias, da mesma forma que a atividade motora. No entanto, foram observadas, na região central de algumas fibras, alterações mitocondriais caracterizadas por aumento de volume ("swelling"), diminuição da eletrondensidade da matriz e maior espaçamento entre as cristas (Figura 3). Nessas organelas alteradas, com frequência, verificou-se rompimento das membranas externa e interna e ausência de depósitos lipídicos ou cristalinos no interior. Também na região central dessas fibras, próximo das organelas alteradas, foram observadas cisternas dilatadas do retículo sarcoplasmático.

As fibras do sóleo de animais treinados do grupo SA apresentaram, da mesma forma, aumento do número e tamanho das mitocôndrias nos dois compartimentos: intermiofibrilar e subsarcolemal. No entanto, ao contrário do observado nos animais sedentários, não houve

degeneração mitocondrial. Aparentemente, houve hipertrofia das fibras musculares, evidenciada por aumento do número de núcleos e migração destes para o centro da fibra.. Foram também observadas regiões de degeneração de miofibrilas, mais extensas na periferia da célula, principalmente na proximidade dos capilares (Figura 4).

A suplementação crônica de aminoácidos aos animais sedentários promoveu, no sóleo, o aparecimento de extensas áreas de degeneração de miofibrilas, no centro e periferia das células (Figura 5), assim como constrição das linhas Z de algumas miofibrilas (talvez o sítio inicial da degeneração). Além dessas alterações, foram verificados evidente aumento no compartimento mitocondrial e degeneração de algumas mitocôndrias.

Nos animais treinados do grupo SC, as mesmas alterações foram observadas, embora em menor extensão. As áreas de degeneração de miofibrilas ocupavam apenas 2-3 sarcômeros e ocorreram principalmente na região central da fibra (Figura 6). As mitocôndrias também apresentaram aspectos degenerativos com certa frequência, assim como depósitos lipídicos no interior.

A análise ultraestrutural do músculo gastrocnêmio no grupo sedentário controle mostrou o padrão esperado para as fibras do tipo IIB, em sua maior parte (Figura 7). Foram selecionadas para análise apenas as fibras cujas miofibrilas apresentavam linha Z estreita, característica das fibras brancas. As mitocôndrias mostraram-se pequenas e pouco numerosas, localizadas principalmente ao redor das bandas I de cada miofibrila. Na região subsarcolemal, a quantidade de mitocôndrias observadas foi também reduzida, quando comparada às fibras do músculo sóleo. O conteúdo de glicogênio mostrou-se elevado e foram observados depósitos lipídicos esparsos. O treinamento aparentemente não alterou a estrutura do músculo

gastrocnêmio, ao contrário do ocorrido com o sóleo. No entanto, o conteúdo de glicogênio apresentou-se aumentado.

Os animais sedentários do grupo SA apresentaram diferenças estruturais nas fibras do gastrocnêmio, caracterizadas pelo aparecimento de mitocôndrias intermiofibrilares alongadas ou aumentadas em diâmetro (Figura 8). Poucas das mitocôndrias observadas apresentaram lesões, sempre coincidentes com as alterações estruturais acima mencionadas. Depósitos lipídicos foram observados com frequência. A suplementação aguda associada ao exercício físico foi eficiente no sentido de evitar degenerações (Figura 9). Embora o compartimento mitocondrial estivesse aumentado, nenhuma outra alteração estrutural foi verificada.

No músculo gastrocnêmio de animais sedentários suplementados cronicamente foram observadas as mesmas alterações já descritas para o grupo sedentário suplementado agudamente, mas em menor escala (Figura 10). Provavelmente, este fato deve-se a uma efetiva regeneração das fibras. O grupo treinado suplementado cronicamente apresentou, além do aumento do compartimento mitocondrial, dilatação de cisternas do retículo sarcoplasmático em algumas regiões das fibras (Figura 11). Essas dilatações *a priori* não significam degeneração ou lesão, e podem ser consideradas como reflexo de alterações funcionais do retículo. Nenhum foco degenerativo de miofibrilas foi observado nas fibras do gastrocnêmio em todos os grupos analisados.

Figura 1. Sóleo sedentário CC: a) compartimentos subsarcolemais de duas fibras adjacentes; observar elevado número de mitocôndrias (aumento 10.000 X); b) compartimento intermiofibrilar (aumento 14.000 X).

Figura 2. Sóleo treinado CC (aumento de 14.000 X).

Figura 3 Sóleo sedentário SA: detalhe das alterações mitocondriais (aumento de 40.000 X).

Figura 4 Sóléo treinado SA: degeneração de miofibrilas na periferia da fibra (aumento de 10.000 X).

Figura 5 Sóleo sedentário SC: degeneração de miofibrilas; notar mitocôndrias intactas nesta região (aumento de 6.700 X).

Figura 6 Sóleo treinado SC: pequeno foco de degeneração de miofibrilas; podem ser observadas múltiplas alterações mitocondriais (aumento de 6.700 X).

Figura 7 Gastrocnêmio sedentário CC (aumento de 14.000X).

Figura 8 Gastrocnêmio sedentário SA: observam-se mitocôndrias alongadas entre as miofibrilas ocupando aproximadamente um sarcômero (aumento de 20.000 X)

Figura 9 Gastrocnêmio treinado SA: detalhe da região intermiofibrilar com mitocôndrias aumentadas (aumento de 14.000 X).

Figura 10 Gastrocnêmio sedentário SC (aumento de 10.000 X)

Figura 11 Gastrocnêmio treinado SC: detalhe da dilatação de cisternas do retículo sarcoplasmático (aumento de 40.000 X)

5. DISCUSSÃO

A resistência ao esforço envolve um conjunto de aspectos bastante complexos e inúmeras variáveis (Edwards, 1983). Para exemplificar isso, basta citar que o aumento do conteúdo de glicogênio muscular é considerado um fator determinante para a resistência ao esforço moderado e prolongado (Bergstrom et al 1967). De fato, nessa condição, os ácidos graxos livres representam a principal fonte energética (Galbo et al, 1977; Coggan, 1991) e ao glicogênio caberia a função de manter a atividade do ciclo de Krebs na geração de oxaloacetato. Esta proposição foi sustentada pelos resultados da atividade da piruvato carboxilase apresentados na Tabela 2. Esta enzima deve ser importante para o metabolismo muscular durante o esforço físico, embora seu papel fosse considerado negligenciável por Crabtree et al. (1972), quando avaliaram sua atividade em músculos esqueléticos de ratos na condição de repouso. Nossos resultados demonstram que a atividade dessa enzima eleva-se dramaticamente durante o esforço físico de uma hora (tabela 2). A significância desse resultado está no fato de que a atividade motora prolongada necessitaria de maior geração de oxaloacetato para garantir o funcionamento do ciclo de krebs e a oxidação dos ácidos graxos livres. Na condição de repouso, entretanto, o fornecimento de oxaloacetato ocorre, provavelmente, de forma satisfatória, não havendo necessidade adicional deste intermediário no ciclo de Krebs. Contudo, Rowan et al (1978) demonstraram que a concentração de oxaloacetato em músculos de gafanhoto aumenta em 100% devido à atividade física. Para isso, a piruvato carboxilase deve desempenhar papel relevante.

A elevação da atividade da piruvato carboxilase durante o esforço físico foi verificada tanto nos animais treinados como nos sedentários, porém o maior incremento ocorreu no músculo sóleo (12 vezes)

dos animais não exercitados.

De forma especulativa, podemos entender que a elevação da atividade dessa enzima durante o exercício físico nos músculos dos animais sedentários ocorreu pelo aumento das concentrações de piruvato (Denton & Halestrap, 1979), que pode elevar-se em até 3 vezes pelo esforço físico (1,22 para 3,87 mmol/Kg/ de músculo seco) (Kowslowsky, 1986). Sendo este o substrato para a enzima piruvato carboxilase, ocorreria resposta estimulatória da sua atividade (Denton & Halestrap, 1979).

Com o treinamento, ocorreria aumento no número e tamanho das mitocôndrias (Holloszy, 1975) elevando a atividade do ciclo de Krebs e consequentemente aumentando a produção de citrato. Este, por sua vez, inibiria a atividade da fosfofrutoquinase (Newsholme & Leech, 1988) e, portanto, a via glicolítica, reduzindo a disponibilidade de piruvato e fazendo com que o estímulo gerado para a atividade da enzima fosse menos dependente deste substrato e mais dependente da concentração de acetil CoA (Denton & Halestrap, 1979). Portanto, a elevação da atividade da piruvato carboxilase seria mais pronunciada nos animais sedentários, enquanto que nos treinados ocorreriam mecanismos regulatórios mais precisos, controlando o fluxo pela via glicolítica e garantindo por maior tempo a geração de oxaloacetato para o ciclo de Krebs. Esta hipótese é reforçada pelos dados obtidos por Bergstrom et al (1967) que demonstraram ser o aumento do glicogênio muscular um dos fatores determinantes para a manutenção do esforço prolongado em indivíduos treinados.

Os fenômenos descritos acima ocorrem preferencialmente no músculo esquelético vermelho, que apresenta maior capacidade oxidativa. O sóleo possui maior número de fibras do tipo I. Desta forma, para a manutenção da atividade motora prolongada, o fornecimento de oxaloacetato

pelos carboidratos passaria a constituir-se em um fator limitante, por isso a maior concentração de glicogênio poderia determinar maior resistência ao esforço.

Poderíamos ter nesta situação a ativação de isoenzimas, pois foi observado aumento marcante da atividade da piruvato carboxilase, o que poderia representar a resposta de uma isoenzima específica ao esforço físico imposto. Porém, os dados referentes ao K_m da piruvato carboxilase obtidos por Crabtree et al (1972) e aqueles observados na tabela 3, demonstram que, nos músculos estriados (sóleo e gastrocnêmio) e coração, a atividade da piruvato carboxilase que se eleva durante o exercício refere-se exclusivamente à mesma enzima. Assim, a não estimulação de isoenzimas pelo exercício físico e também as diferenças na atividade da piruvato carboxilase entre os tecidos não se devem a proteínas diferentes.

Em vista do possível papel da piruvato carboxilase (exposto acima) para determinar a resistência ao esforço, a suplementação de aminoácidos, precursores de oxaloacetato, poderia garantir maior consumo de ácidos graxos livres e consequentemente economia do glicogênio muscular. Os aminoácidos aspartato e asparagina, suplementados na dieta dos animais, desempenham esta função (Lancha Jr., 1991). Conforme mostra a tabela 4, a suplementação apresentou-se eficiente em elevar a concentração desses aminoácidos no plasma dos animais. A disponibilidade desses aminoácidos na circulação sanguínea favoreceria o metabolismo do tecido muscular, que passaria a consumi-los, podendo gerar oxaloacetato, através da enzima aspartato aminotransferase. Além disso, no entanto, haveria a formação de outros aminoácidos, como pode ser observado na mesma tabela

Os estudos realizados por Lancha Jr. (1991) mostraram que

ratos suplementados cronicamente (5 semanas) e treinados em natação (sobrecarga de 5% do peso corporal, 5 dias por semana, durante cinco semanas, 1 hora por dia) apresentam elevação de 40% no tempo de exaustão.

O oxaloacetato gerado, sob ação da piruvato carboxilase seria condensado com o acetil CoA à citrato no ciclo de Krebs. Este fato favoreceria o consumo de acetil CoA e garantiria a atividade do ciclo de Krebs (Newsholme & Leech, 1998).

A metabolização do aspartato no músculo pode também gerar adenilsuccinato pela atividade da enzima adenilsuccinato sintetase (Arch & Newsholme, 1978). Este metabólito pode produzir adenosina, que constitui precursor para a síntese de adenosina monofosfato (AMP) e posteriormente (ATP) (Simpson & Phillis, 1993).

A condição sedentária poderia deslocar o aspartato e asparagina para a síntese de oxaloacetato nos animais (SA), reduzindo sua função geradora de adenosina. Assim, o oxaloacetato geraria citrato (ciclo de Krebs) e, na presença de ATP, inibiria a glicólise (enzima fosfofrutoquinase), favorecendo o consumo de A.G.L. e diminuindo a produção de lactato. Desta forma, teríamos elevação do glicogênio muscular (estriado e cardíaco), redução dos A.G.L. e do lactato plasmático, como observado na tabela 4. Com o fornecimento adicional de precursores de oxaloacetato ocorreria elevação das concentrações plasmáticas dos aminoácidos consumidos pelo ciclo (isoleucina, leucina e valina), bem como daqueles gerados a partir de precursores do ciclo como a glutamina, fato este verificado na tabela 12.

As alterações do conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco e fígado dos animais sedentários restringiram-se ao grupo suplementado agudo, com elevação dos valores no coração, em comparação ao CC e SC. A disponibilidade dos aminoácidos para a síntese de oxaloacetato deve ter

aumentado a resposta oxidativa e preservado o glicogênio cardíaco.

Os animais treinados (20 minutos) não apresentaram diferenças no conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco entre os três grupos. Este fato ocorreu provavelmente pela menor demanda energética necessária para a manutenção da atividade nessa intensidade.

A possibilidade de geração de oxaloacetato pela suplementação de aspartato e asparagina favorecer a síntese de lipídeos na condição sedentária foi investigada pela avaliação do peso relativo do tecido adiposo epididimal. O oxaloacetato pode ser condensado com o acetil CoA gerando citrato. Este, por sua vez, pela ação da enzima ATP citrato liase, gera acetil CoA no citoplasma (Newsholme & Leech, 1988). O acetil CoA gerado poderia ser utilizado para a síntese *de novo* de ácido graxo e este seria posteriormente incorporado aos triglicerídeos (Newsholme & Leech 1988). Este fato foi confirmado pela elevação no peso relativo do tecido adiposo epididimal nos animais sedentários com suplementação crônica, quando comparados aos controle e suplementados agudamente (tabela 11). Os animais suplementados de forma aguda apresentaram tendência de aumento do peso relativo do tecido adiposo epididimal, porém a diferença não se apresentou significativa. Podemos, assim, assumir que os efeitos da suplementação sobre a síntese de triglicerídeos dependem do período de tempo em que o mesmo ocorre. A escolha da avaliação dos efeitos causados pela suplementação durante uma e cinco semanas demonstram nitidamente isto.

Os animais treinados do grupo SC, de forma diferente dos sedentários, apresentaram menor peso relativo do tecido adiposo epididimal em comparação ao controle. Nesta situação, a maior funcionalidade do ciclo de Krebs consumiria mais intensamente os ácidos graxos livres. A redução da

glicemia estimularia a liberação dos hormônios lipolíticos (tais como adrenalina e hormônio do crescimento), favorecendo a mobilização dos ácidos graxos livres pela lipólise. Porém, faz-se necessário salientar que apenas a redução dos valores glicêmicos não garante o consumo aumentado dos ácidos graxos livres pelo tecido muscular. Para que os ácidos graxos sejam oxidados intensamente, a funcionalidade do ciclo de Krebs associada à maior demanda energética são fundamentais.

Os animais suplementados de forma aguda apresentaram tendência de redução do peso relativo do tecido adiposo epididimal, provavelmente não sendo significativa pelo mesmo motivo observado em relação aos animais sedentários, ou seja, curto espaço de tempo com a suplementação de aminoácidos.

A atividade motora de curta duração (20 minutos diários), provavelmente não necessita das vias alternativas de produção de intermediários do ciclo de Krebs. Em vista disso, a suplementação de precursores de oxaloacetato não foi efetiva em aumentar o tempo de exaustão nessas condições. A atividade em questão agiria, portanto, modulando o efeito dos aminoácidos. Este fato explica a elevação no tempo de exaustão observada por Lancha Jr. (1991) quando a mesma suplementação foi efetuada na atividade motora moderada e prolongada (60 minutos diários). Os mecanismos envolvidos nessa resposta serão discutidos abaixo.

O aumento da resistência ao esforço provocado pela suplementação crônica, encontrada por Lancha Jr. (1991), levou-nos a investigar de modo mais detalhado as alterações metabólicas promovidas no músculo. Assim, foi feita incubação do músculo sóleo (como descrito no estudo 3) obtido de animais sedentários e treinados (60 minutos diários) e

suplementados agudamente (cinco dias) e cronicamente (cinco semanas). Os dados obtidos sugerem que a suplementação promove elevação nas concentrações de glicogênio, como verificado anteriormente (Lancha Jr., 1991). Porém, este aumento foi mais acentuado nos animais que fizeram a ingestão aguda de aminoácidos. Os aminoácidos contidos na suplementação parecem inibir a degradação do glicogênio muscular, provavelmente pela geração de oxaloacetato adicional, ocorrendo maior formação de citrato que, na presença de ATP, inibiria a fosfofrutoquinase (enzima regulatória da via glicolítica), resultando em diminuição da glicólise (Newsholme & Leech, 1988). Assim, ocorreria "economia" de glicogênio, resultando em elevação das concentrações deste no músculo. Com a suplementação crônica haveria maior necessidade da geração de acetil CoA para ser complexado ao oxaloacetato. O músculo teria então duas estratégias: degradar o glicogênio ou os ácidos graxos para este fim. Esta segunda possibilidade resultaria em maior fornecimento de energia e maior capacidade de resistência ao esforço. A primeira ocorreria preferencialmente quando da não disponibilidade de ácidos graxos livres, fato este ocorrente na incubação de músculo. Isto sugere que a suplementação com aminoácidos por tempo prolongado deve promover mudanças morfológicas como elevação do número e do tamanho de mitocôndrias, semelhantes ao efeito do treinamento de baixa intensidade e longa duração como relatado por Holloszy & Coyle (1984).

O aumento no conteúdo de glicogênio determina diminuição de sua síntese (Newsholme & Leech, 1988). Com isto, os animais suplementados, que apresentaram maior conteúdo de glicogênio muscular, passaram a ter a síntese reduzida de glicogênio em comparação ao controle, que teve a síntese estimulada. Este fato determina a regulação do glicogênio tecidual em termos de síntese e degradação. Assim, os tecidos musculares

que apresentaram concentração elevada de glicogênio ao final de uma hora de incubação tiveram maior atividade glicolítica e menor taxa de síntese de glicogênio. Esta hipótese foi confirmada pelos dados de lactato total e radioativo elevados nos animais treinados, suplementados tanto aguda como cronicamente, quando comparados ao controle e também nos valores da síntese de glicogênio a partir de [U- ^{14}C] glicose.

Na condição sedentária, os resultados apontam para aumento nas concentrações de glicogênio nos animais suplementados agudamente quando comparados com os outros dois (controle e suplementado crônico) e redução para os suplementados cronicamente quando comparados ao controle. Estes dados reforçam a hipótese levantada anteriormente quanto aos resultados dos animais treinados. Os animais sedentários não possuem estímulo efetivo para a degradação dos triglicerídeos (lipólise) do tecido adiposo, como ocorre nos treinados. Nesses, a suplementação de aminoácidos geradores de oxaloacetato pode potencializar o consumo de acetil CoA. Entretanto, com o aumento da disponibilidade de AGL devido ao esforço físico, apenas o aporte dos aminoácidos não atenderia à necessidade de oxaloacetato nessas condições. Assim, cronicamente, algumas adaptações metabólicas imporiam mudanças morfológicas, para garantir resposta oxidativa efetiva, como o aumento no número e tamanho das mitocôndrias. Isto faria com que o músculo apresentasse capacidade geradora de oxaloacetato elevada, resultando em redução do conteúdo de glicogênio no músculo sóleo dos animais SC em comparação com o controle e SA. Com esta redução do conteúdo de glicogênio, teríamos elevação da atividade da glicogênio sintetase, fato este confirmado pela maior taxa de síntese de glicogênio observado nos animais SC comparados aos grupos controle e SA.

Os valores de lactato total do meio demonstram redução da

glicólise e glicogenólise nos animais suplementados (crônico e agudo) quando comparados ao controle. Os animais suplementados cronicamente apresentaram valores superiores ao SA, porém, inferiores ao controle. Estes resultados reforçam a hipótese levantada sobre a maior necessidade de oxaloacetato gerada pela suplementação de aminoácidos por um período de tempo prolongado. As concentrações reduzidas de glicogênio nos animais SC promoveriam, teoricamente, redução na produção de lactato radioativo nos animais suplementados cronicamente. Entretanto, este fato não ocorreu. Possivelmente, a diminuição no conteúdo de glicogênio incapacita o tecido em produzir o oxaloacetato. Este fato faria com que o músculo dos animais suplementados cronicamente utilizasse maior fração de glicose do meio para a produção de piruvato e oxaloacetato, resultando como consequência maior geração de lactato.

Esses fatos levantam questões que precisam ser discutidas, por exemplo: o fornecimento de oxaloacetato por vias alternativas parece exigir da célula adaptações funcionais, que podem estar acompanhadas de mudanças estruturais. O treinamento por si só determina aumento no número e tamanho das mitocôndrias (Holloszy, 1975; Holloszy & Both, 1976; Holloszy & Coyle, 1984). A suplementação crônica, de forma semelhante, impôs à célula muscular as mesmas alterações. Este fato implica em elevação da capacidade oxidativa celular. A maior atividade da piruvato carboxilase observada no grupo SC quando comparado ao CC nos animais treinados reforça as condições acima, pois ocorreu em condições semelhantes de treinamento. A possibilidade desta elevação ter ocorrido devido ao aumento da disponibilidade de AGL pelo fornecimento adicional de carnitina não parece provável. Recentemente, Decombaz et al (1993) demonstraram que a suplementação adicional de carnitina, em indivíduos com glicogênio muscular

depletado, não aumenta a oxidação dos ácidos graxos livres. Assim, as alterações ocorridas com o grupo suplementado seriam consequência de modificações estruturais, especialmente no número e tamanho das mitocôndrias, semelhante ao provocado apenas pelo treinamento físico, pois a piruvato carboxilase é uma enzima mitocondrial (Denton & Halestrap, 1979).

Os aminoácidos contidos na suplementação, em animais sedentários, promoveram alterações morfológicas evidenciadas por degeneração de miofibrilas (sóleo do grupo SC), lesões mitocondriais e dilatação de cisternas do retículo sarcoplasmático. Essas observações, juntamente com o aumento no número e tamanho das mitocôndrias, podem ser decorrentes da elevação na capacidade oxidativa. Diversas possibilidades devem ser consideradas para explicar essas alterações: 1) a elevação na atividade oxidativa, desencadeada pelo aumento do número e tamanho de mitocôndrias, resulta em estímulo para a produção de radicais livres (Pereira et al, 1992; Jenkins & Goldfarb, 1993); além disso, o aspartato participa da via das xantinas, que produz radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) (Simpson & Phillis, 1993) que, por sua vez, atuam sobre as estruturas proteínicas promovendo lesões estruturais; 2) os aminoácidos da suplementação, principalmente o aspartato, estão relacionados com o ciclo das purinas (Newsholme & Leech, 1988; Mommsen & Hochachka, 1988), estimulando a síntese de ATP, RNA e como consequência a síntese proteínica; assim, as alterações observadas seriam resultantes de aumento do "turnover" proteínico celular (Rennie et al, 1981), já que lesões similares foram observadas por Fridén & Lieber (1992) e Byrd (1992), em indivíduos exercitados intensamente e 3) os aminoácidos suplementados, elevando o número e o tamanho das mitocôndrias, poderiam elevar o fluxo de Ca^{++} mitocondrial, o que estimularia as proteases cálcio

dependentes, resultando em lesões estruturais (Suzuki & Ohno, 1990; Fridén & Lieber, 1992).

A geração de oxaloacetato no músculo esquelético durante a atividade física moderada apresenta-se como fator determinante para a resistência ao esforço. Assim, para a suplementação de aminoácidos precursores deste (como o aspartato e asparagina) podem ser efetivos em aumentar a performance, desde que esta ocorra por tempo prolongado (5 semanas) em atividade física de resistência (1 hora). Entretanto, a suplementação de aspartato e asparagina resulta em alterações metabólicas e ultraestruturais evidentes, não sendo, portanto, totalmente inócua ao organismo.

Os resultados obtidos e as hipóteses levantadas abrem novas perspectivas na investigação dos efeitos da suplementação nutricional de aminoácidos na atividade motora.

6. CONCLUSÕES

- A atividade motora eleva de modo acentuado a atividade da piruvato carboxilase nos músculos esqueléticos e cardíaco de ratos sedentários e treinados.

- A suplementação crônica e aguda de aspartato, asparagina e carnitina em animais treinados por vinte minutos não altera o tempo de resistência ao esforço.

- A suplementação crônica de aspartato, asparagina e carnitina em animais treinados por uma hora diária eleva o tempo de resistência ao esforço. Os mecanismos são provavelmente: elevação da síntese de bases nitrogenadas (como adenosina) e conseqüentemente síntese de proteínas, além da geração suplementar de oxaloacetato e aumento no número e tamanho de mitocôndrias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 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**: 1080-1090, 1974.
- ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* **154**: 689-700, 1976.
- ARCH, J.R.S. and NEWSHOLME, E.A. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem.* **14**: 82--123, 1978.
- BAGBY, G.J.; GREEN, H.J.; KATSUTA, S. and GOLLNICK, P.D. Glycogen depletion in exercising rats infused with glucose, lactate or pyruvate. *J. Appl. Physiol.* **45**: 425-429, 1978.
- BALDWIN, K.M.; WINDER, W.W. and TERJUNG, R.L. Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle in adaptation to exercise. *Am. J. Physiol.* **225**: 962-926, 1973.
- BALLARD, F.J.; HANSON, R.W.; RESHEF, L. Immunochemical studies with soluble and mitochondrial pyruvate carboxilase activities from rat tissues. *Biochem. J.* **119**: 735-42, 1970.
- BERGMAYER, H.U. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, New York, ed. Bergmeyer, H.U., Academic Press, 1974, p.1205-1212.
- BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E. and SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol. Scand* **71**: 140-150, 1967.
- BIEBER, L.L. Carnitine. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 261-283, 1987.
- BUXTON, D.B.; FISHER, R.A.; ROBERTSON, S.M.; OLSEN, M.S. Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver. *Biochem. J.* **248**: 35-41, 1987.
- BYRD, S.K. Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**: 531-536, 1991.
- CHANG, T.W. & GOLDBERG, A.L. The origin of alanine produced in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **253**: 3677-84, 1978.

* 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. Philadelphia Biosis, 1989.

- COOGAN, A.R. Plasma glucose metabolism during exercise in humans. *Sports Med.* **11**: 102-124, 1991.
- COSTILL, D.L. & HARGREAVES, M. Carbohydrate nutrition and fatigue. *Sports Med.* **13**(2): 86-92, 1992.
- CRABTREE, B. and NEWSHOLME, E.A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* **126**: 49-58, 1972.
- CRABTREE, B.; HIGGINS, S.J.; NEWSHOLME, E.A. The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* **130**: 391-396, 1972.
- CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Com.*, **138**:318-22, 1986.
- CURI, R. Does PEPCK play a role in amino acid oxidation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **21**: 27-30, 1988.
- DECOMBAZ, J.; DERIAZ, O.; ACHESON, K.; GMUENDER, B. and JEQUIER, E. Effect of L-carnitine on submaximal exercise metabolism after depletion of muscle glycogen. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**(6): 733-740, 1993.
- DENTON, R.M. & HALESTRAP, A.P. Regulation of pyruvate metabolism in mammalian tissues. *Essays Biochem.* **15**: 37-77, 1979.
- DUNAWAY, G.A. & WEBER, G. Rat liver phosphofructokinase isoenzymes. *Arch.Biochem.Biophys.*, **162**:620-35, 1974.
- EDWARDS, R.H.T. Biochemical bases of fatigue in exercise performance: Catastrophe theory of muscular fatigue. In: *Biochemistry of Exercise*. Ed.J.Poortmans, G. Niset. Baltimore Univ. Park Press, 1983 p:3-28.
- ENGLE, P.C. and JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay for L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Anal. Biochem.*, **88**: 475-484, 1978.
- FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta* **46**: 105-111, 1973.
- FELIG, P. and WAHREN, J. Fuel homeostasis in exercise. *N. Engl. J. Med.* **293**: 1078-1084, 1975.
- FELIG, P. and WAHREN, J. Amino acid metabolism in exercising man. *J. Clin. Invest.* **50**: 2703-12, 1971.

- FRIDEN, J. & LIEBER, R.L. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**: 521-530, 1992.
- GALBO, H.; RICHTER, E.A.; HILSTED, J.; HOLST, J.J.; CHRISTENSEN, N.J.; HENRIKSSON, J. Hormonal regulation during prolonged exercise. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **301**:73-80,1977
- GREEP, R.O.& WEISS, L. Cell and Tissue Biology, ed. Weiss, L., Urban & Schwarzenberg, New York. McGraw-Hill, 6 ed., 1990, p. 255-276.
- HAGERMAN, F.C. Energy metabolism and fuel utilization. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**(9 Supplement): S309-S314, 1992.
- 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. and ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polyssacarides. *Methods Enzymol.* **3**:34-50, 1957.
- HELLSTEN-WESTING, Y.; NORMAN, B.; BALSOM, P.D. and SJODIN, B. Decreased resting levels of adenine nucleotides in human skeletal muscle after high-intensity training. *J Appl. Physiol.* **74**(5): 2523-2528, 1993.
- HERMANSEN, L.; HULTMAN, E. and SALTIN, B. Muscle glycogen during prolonged sever exercise. *Acta Physiol. Scand.* **71**: 129-139, 1967.
- HOLLOSZY, J.O. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise. *Med. Sci. Sports* **7**: 155-164, 1975
- HOLLOSZY, J.O.; DALSKY, G.P.; NEMETH, P.M.; HURLEY, B.F.; MARTIN, W.H.; HAGBERG, J.M. Utilization of fat as substrate during exercise: effect of training. In: *Biochemistry of Exercise*, International Series on Sports Sciences, Saltin, ed. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, 1986; p. 183-190.
- HOLLOSZY, J.O. & COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* **56**: 831-838, 1984.
- HOLLOSZY, J.O.and BOOTH, F.W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **38**: 273-291, 1976.
- HOOD, D.A. and TERJUNG, R.L. Amino acid metabolism during exercise and following endurance training. *Sports Med*, **9**(1): 23-35, 1990.
- 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.

- JENKINS, R.R. & GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**:210-212, 1993.
- JOHNSON, R.N. & HANSFORD, R.G. The control of tricarboxylate-cycle oxidations in blowfly flight muscle *Biochem.J.*, **146**:527-35, 1975.
- KEUL, J.; DOLL, E.; KEPPLER, D. Energy metabolism of human muscle. In: *Medicine and Sport*, ed. Jokl, E. & Lexington, K., New York, S. Karger, 1972
- KOWSLOWSKY, S. Body temperature as a factor modifying exercise metabolism. In: *Biochemistry of Exercise*, International Series on Sports Sciences, Saltin, ed. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, 1986; p. 183-190.
- KREBS, H. & JOHNSON, W.A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymol.* **48**: 148-156, 1937.
- LANCHA JR., A.H. Resistência ao esforço físico: efeito da suplementação nutricional de carnitina, aspartato e asparagina. São Paulo, 1991, 76 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- LAW, W.R.; RAYMOND, R.M. Adenosine potentiates insulin-stimulated myocardial glucose uptake in vitro. *Am. J. Physiol.* **254**: H970-H975, 1988.
- LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier, 1988.
- LEIGHTON, B. & COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin skeletal muscle in vitro. *Nature* **335**:632-635, 1988
- LI, J.; STILLMAN, J.S.; CLORE, J.N.; BLACKARD, W.G. Skeletal muscle lipids and glycogen mask substrate competition (Randle cycle) *Metabolism* **42**:451-456, 1993.
- 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.
- NEWSHOLME, E.A.; SUGDEN, P.H.; WILLIAMS, T. Effect of citrate on the activities of 6-phosphofructokinase from different animals and its relationship to the regulation of glycolysis. *Biochem.J.* **166**:123-34, 1977.
- NEWSHOLME, E.A. & START, C. Regulation in metabolism. New York. John Wiley. 1976.

- NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. The role of the Krebs cycle in cells of immune system and its importance in sepsis, trauma and burns. *Biochem.Soc.Symp.* **54**:145-161, 1987.
- NEWSHOLME, E.A. & LEECH, A.R. *Biochemistry for the medical Sciences*. New York, John Wiley 1988.
- PEREIRA, B.; CURI, R.; BECHARA, E. Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercised-trained rats. *J. Appl. Physiol.* **72**: 226-230, 1992.
- 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.
- 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.; 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. *Clin. Sci.*, **61**:627-39, 1981.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. *J.Biol.Chem.*, **239**:375-80, 1964.
- 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.
- ROWAN, A.N.; NEWSHOLME, E.A. Partial purification and some properties of pyruvate carboxylase from the flight muscle of the locust (*Schistocerca Gregaria*). *Biochem. Biophys. Acta* **552**: 270-275, 1978.
- RYAN, C.; FERGUSON, K. and RADZIUK, J. Glucose dynamics and gluconeogenesis during and after prolonged swimming in rats. *J. Appl. Physiol.* **74**(5): 2404-2411, 1993.
- SAHLIN, K. Muscle fatigue and lactic acid accumulation. *Acta.Physiol.Scand.* **128**:82-91, 1986.
- SALTIN, B.; HENRIKSSON, J. and NYGAARD, E. Fibre types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **301**: 3-29, 1977.

- SIMPSON, R.E.; PHILLIS, J.W. Adenosine and adaptation to exercise. *Sports Med* **15**: 219-224, 1993.
- SOAR, K.; DAVIES, M.; FENTEM, H.; NEWSHOLME, E.A. The effect of endurance training on the maximum activities of hexokinase, 6-phosphofructokinase, citrate synthase, and oxoglutarate dehydrogenase in red and white muscles of the rat. *Biosci. Rep.*, **3**:831-35, 1983.
- STRYER, L. Biochemistry. New York. W. H. Freeman, 1988.
- SUZUKI, K. & OHNO, S. Calcium activated neutral protease - structure-function relationship and functional implications. *Cell Struct Function* **15**: 1-6, 1990.
- TORNHEIM, K.; LOWENSTEIN, J.M. Control of phosphofructokinase 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 phosphofructokinase from rat liver and their relation to the control of glycolysis and gluconeogenesis. *Biochem.J.* **95**:868-81, 1965.
- UYEDA, K. Phosphofructokinase. *Adv.Enzimol.*, **48**:193-224, 1979.
- VIEIRA, R.; VECCHIA, M.G.; HOMEM-DE-BITTENCOURT JR., P.I.; ALMEIDA, A.F.; FERNANDES, L.C.; CURI, R. Desenvolvimento de homogeneizador de alta velocidade para tecidos. *Arq. Biol. Tecnol.* **32**: 495-505, 1989.
- VIEIRA, R.; HAEBISCH, H.; KOKUBUN, E.; HELL, N.S.; CURI, R. Swimming system for physical exercise of rats. *Arq. Biol. Tecnol.* **31**: 387-394, 1988.
- VIEIRA, R.; DUARTE, A.M.; CURI, R.; VILLELA, F.G.; MACHADO, U.F.; CARPINELLI, A.R. A rotating wheel cage for rats allowing free movement, feeding and drinking. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **20**: 825-828, 1987.
- VIRU, A. Mobilisation of structural proteins during exercise. *Sports Med* **4**: 95-128, 1987.
- WASSERMAN, K.; BEAVER, W.L.; WHIPP, B.J. Mechanisms and patterns of blood lactate increase during exercise in man. *Med.Sci. Sports Exerc.* **18**:344-52, 1986.

RESUMO

A importância na geração de oxaloacetato foi investigada através da determinação da atividade da piruvato carboxilase nos músculos estriados e da suplementação de seus precursores (aspartato e asparagina) na dieta de ratos. A atividade da piruvato carboxilase eleva-se durante o exercício físico e, portanto, deve fornecer mais oxaloacetato para a etapa inicial do ciclo de Krebs. A suplementação crônica (5 semanas) de aspartato e asparagina promove aumento da resistência ao esforço em ratos treinados em natação durante 1 hora diária por 5 semanas. Este efeito foi acompanhado de elevação no número e tamanho das mitocôndrias e alteração no metabolismo de glicose dos músculos esqueléticos (elevação do conteúdo de glicogênio e de sua síntese e diminuição da glicólise). Esses resultados sugerem que a geração de oxaloacetato desempenha papel fundamental na manutenção do esforço prolongado. A suplementação de aspartato e asparagina na dieta melhora a performance nessas condições, porém causa lesões na ultraestrutura muscular (mitocôndrias, linha "Z" e miofibrilas).

ABSTRACT

The importance of oxaloacetate formation was investigated by measuring pyruvate carboxylase activity in muscles and by given its precursors (aspartate, asparagine) in the diet of rats. The activity of pyruvate carboxylase markedly raised during physical effort and so might provide oxaloacetate for Krebs cycle functioning. The supplementation of aspartate and aspagine for a prolonged period of time (5 weeks) promotes increment in the resistance to exercise in rats trained to swimming during 1 hour daily for 5 weeks. This effect is accompanied by an increase in the size and number of mitochondria and also changes in glucose metabolism; elevation in glycogen synthesis and content and reduction in the rate of glycolysis. These results suggest that the production of oxaloacetate plays a role to maintain the moderate exercise during a prolonged period of time. Nevertheless, the aspartate and asparagine supplemented in the diet, despite improving the performance to moderate and prolonged exercise, provokes muscle ultrastructure lesions of mitochondria, "Z" line and miofibrils.