

TREINAMENTO AERÓBIO DE NATAÇÃO AUMENTA A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E O CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO MUSCULOESQUELÉTICO DE RATOS



AEROBIC SWIMMING TRAINING INCREASES THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND THE GLYCOGEN CONTENT IN THE SKELETAL MUSCLE OF RATS

Roberto Carlos Vieira Junior¹
Carolina Mendes Santos Silva¹
Michel Barbosa de Araújo⁵
Alesandro Garcia¹
Vanessa Azevedo Voltarelli²
Adilson Domingos dos Reis Filho⁴
Fabrício Azevedo Voltarelli^{1,3}

1. Programa de Pós-Graduação em Biociências/Nutrição, UFMT – Cuiabá, MT, Brasil.
2. Escola de Educação Física e Esporte, USP – São Paulo, SP, Brasil.
3. Programa de Pós-Graduação em Educação Física, UFMT – Cuiabá, MT, Brasil.
4. UNIVAG – Centro Universitário – Várzea Grande, MT, Brasil.
5. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

Correspondência:

Fabrício Azevedo Voltarelli
Universidade Federal de Mato Grosso –
Faculdade de Educação Física.
Av. Fernando Correa da Costa, s/n
Cidade Universitária, Boa Esperança
78060-900 – Cuiabá, MT, Brasil
E-mail: favoltarelli@ufmt.br

RESUMO

Introdução: São escassos os estudos os quais verificaram os efeitos do exercício físico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e sua relação com o glicogênio muscular. **Objetivo:** O presente estudo verificou o efeito do treinamento aeróbio de natação (TAN) sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, conteúdo de glicogênio e crescimento celular no músculo esquelético de ratos. **Métodos:** Dezoito ratos Wistar macho (60 dias) foram divididos em dois grupos: Grupo Sedentário (SG; n = 10): ratos sedentários; e Grupo Treinado (TG; n = 8): ratos submetidos ao TAN (5,0 % do peso corporal), 1h/dia, 5X/semana, durante oito semanas. A atividade das enzimas antioxidantes (AEA) superóxido dismutase (SOD; U/ml), catalase (CAT; $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ mg}$) e glutatona peroxidase (GPx; $\text{nmol}/\text{min}/100\text{ mg}$), bem como a concentração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs; $\text{nmolMDA}/\text{mg}$ proteína) foram determinadas no músculo gastrocnêmio direito. Os conteúdos de glicogênio ($\text{mg}/100\text{ mg}$), proteína ($\text{g}/100\text{ g}$) e DNA ($\text{g}/100\text{ g}$) foram mensurados no músculo gastrocnêmio esquerdo. **Resultados:** A AEA foi maior no TG (CAT: $0,87 \pm 0,04$; SOD: $6,49 \pm 0,045$; GPX: $6,49 \pm 0,52$) quando comparados com SG (CAT: $0,52 \pm 0,03$; SOD: $4,1 \pm 0,37$; GPX: $2,94 \pm 0,56$). Os níveis de TBARs foram menores em TG (TG: $2,35 \pm 0,41$; SG: $8,90 \pm 0,47$). O conteúdo de glicogênio muscular (SG: $0,108 \pm 0,013$; TG: $0,320 \pm 0,012$) e a razão proteína/DNA (SG: $24,94 \pm 3,25$; TG: $41,68 \pm 4,02$) foram maiores no TG. **Conclusão:** Em conjunto, estes dados confirmam que o TAN melhorou a defesa antioxidante, a qual pode estar associada ao aumento do conteúdo de glicogênio no músculo esquelético dos animais.

Palavras-chave: estresse oxidativo, glicogênio, proliferação celular.

ABSTRACT

Introduction: Studies which verified the effects of physical exercise on oxidative stress biomarkers and its relation to muscle glycogen are lack. **Objective:** The present study verified the effects of aerobic swimming training (AST) on biomarkers of oxidative stress, glycogen content and cell growth in the skeletal muscle of rats. **Methods:** Eighteen male Wistar rats (60 days) were divided into two groups: Sedentary Group (SG; n = 10): sedentary rats; and Trained Group (TG; n = 8): rats subjected to AST (5.0% of body weight), 1h/day, 5x/week, during 8 weeks. The activity of antioxidant enzymes (AOE) superoxide dismutase (SOD; U/ml), catalase (CAT; $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{mg}$), glutathione peroxidase (GPx; $\text{nmol}/\text{min}/100\text{mg}$), and substances that react with thiobarbituric acid levels (TBARs; $\text{nmolMDA}/\text{mg}$ protein) were determined in the right gastrocnemius muscle. Glycogen ($\text{mg}/100\text{mg}$), protein ($\text{g}/100\text{g}$), and DNA ($\text{g}/100\text{g}$) contents were evaluated in the left gastrocnemius muscle. Data were analyzed by Student t-test ($p < 0.05$). **Results:** AOE activity was higher in the TG group (CAT: 0.87 ± 0.04 ; SOD: 6.49 ± 0.45 ; GPX: 6.49 ± 0.52) when compared to SG group (CAT: 0.52 ± 0.03 ; SOD: 4.10 ± 0.37 ; GPX: 2.87 ± 0.35). TBARs levels was lower in TG (TG: 2.35 ± 0.45 ; SG: 8.90 ± 0.47). Gastrocnemius glycogen content (SG: 0.108 ± 0.013 ; TG: 0.320 ± 0.012) and protein/DNA ratio (SG: 24.94 ± 3.25 ; TG: 41.68 ± 4.02) were higher in TG group. **Conclusion:** Altogether, these data provide evidence that AST improved antioxidant defense, which may be associated to higher glycogen content of skeletal muscle of the animals.

Keywords: oxidative stress, glycogen, cell proliferation.

INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não enzimáticos continuamente, e causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares^{1,2}. Estudos denotam que entre 2 e 5% do oxigênio que inalamos transforma-se em algum tipo de EROs^{2,3}.

A condição na qual a produção de EROs supera a capacidade antioxidante intracelular de eliminá-las é conhecida como estresse oxidativo³. O estresse oxidativo é um assunto amplamente difundido na atualidade, uma vez que está intimamente ligado à ocorrência de várias

patologias, tais como câncer, aterosclerose e também ao processo de envelhecimento².

O desequilíbrio oxidante/antioxidante pode levar os ácidos graxos insaturados dos fosfolípidios das membranas celulares a sofrerem peroxidação (peroxidação lipídica), resultando em perda significativa da integridade da membrana¹. Tal ocorrência consiste em um dos principais efeitos dos danos oxidativos, levando à geração de aldeídos e consequências potencialmente nocivas^{4,5}, podendo a célula sofrer morte celular programada (apoptose)⁶. O principal sistema de defesa contra o estresse oxidativo é constituído por enzimas antioxidantes,

como a superóxido dismutase (SOD) (CuZn-SOD Citosólica e extracelular e Mn-SOD-mitocondrial), a catalase (CAT) (CAT-heme-enzima) e a glutathione peroxidase (GPx; dependente ou não de selênio), as quais decompõem o ânion radical superóxido, peróxido e hidróxidos e parecem responder de maneira adaptativa ao exercício, elevando suas atividades em diversos tecidos⁷⁻⁹. Contudo, existem controvérsias em relação a essa afirmação¹⁰.

Durante o exercício físico, várias reações químicas e enzimáticas implicam em aumento fisiológico na formação de EROs e de óxido nítrico¹¹, existindo relatos de que este aumento estimula o transporte de glicose no músculo esquelético por mecanismos insulino-independentes¹², o que poderia aumentar o conteúdo de glicogênio muscular e hepático^{13,14}. Por outro lado, isto não é uma regra, pois se sabe que uma produção desproporcional (não fisiológica) de EROs pode levar o organismo ao estresse oxidativo e, dessa forma, dificultaria a captação de glicose pelo músculo, resultaria na geração de citocinas inflamatórias e causaria uma diminuição do acúmulo de glicogênio nesse tecido em repouso¹⁵.

De acordo com Winick *et al.*¹⁶, o número total de células do tecido muscular pode ser estimado, com objetivo prático, pela determinação do conteúdo total de DNA (hiperplasia), enquanto que o tamanho da fibra (hipertrofia) pode ser estimado pelo cálculo da razão proteína/DNA. Estes parâmetros são considerados marcadores de desempenho e podem ser melhorados pelo treinamento. Inexistem na literatura estudos os quais abordaram a questão do crescimento do músculo esquelético associado ao estresse oxidativo e ao conteúdo de glicogênio muscular.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do treinamento aeróbio de natação sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e sua influência sobre o conteúdo de glicogênio e crescimento do músculo esquelético em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com 60 dias de idade no início do experimento, obtidos por meio da facilidade do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso e que tiveram livre acesso à água e ao alimento (ração comercial para roedores – NUVLAB®). Os animais foram alocados em gaiolas coletivas (quatro a cinco animais por gaiola) de polietileno (37,0 x 31,0 x 16,0 cm) e foram mantidos em sala com temperatura (25 ± 1°C) e umidade (45% a 55%) controladas com ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os procedimentos adotados seguiram as Resoluções Brasileiras específicas em relação à bioética em experimento com animais (Lei no. 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto no. 26.645 de 10 de julho de 1934). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil (Protocolo nº 23108.020868/09-4).

Os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo Sedentário, n = 10 (SG): mantidos sedentários durante todo o período experimental.
- Grupo Treinado, n = 8 (TG): submetidos ao treinamento físico de natação.

O peso dos animais foi mensurado uma vez por semana (Sartorius®, precisão de 10 g).

Adaptação ao meio líquido

A adaptação consistiu em manter os animais em contato com água rasa à temperatura (termômetro marca Initial®) de 31 ± 1°C¹⁷, durante uma semana, cinco dias por semana, durante 30 minutos¹⁸. Na segunda

semana, os ratos foram submetidos ao mesmo protocolo, porém, em águas profundas, a fim de estabelecer a mecânica correta para o padrão de nado de cada animal. O propósito da adaptação foi o de reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água.

Treinamento físico

Na terceira e quarta semanas, os animais foram submetidos ao treinamento com sobrecargas de chumbo (pequenas sacolas de tecido [algodão] com elástico e Velcro®) atadas ao tórax, já com 5% do peso corporal, seguindo o seguinte cronograma (tabela 1):

Tabela 1. Cronograma de treinamento físico a que os animais foram submetidos.

Dia	Tempo de treino (min)
1	10
2	15
3	20
4	25
5	30
6	35
7	40
8	45
9	50
10	55

O protocolo de treinamento físico utilizado, previamente estabelecido na literatura^{18,19}, caracterizou-se por ser de intensidade moderada.

Após o período de adaptação, os animais do TG foram submetidos, por oito semanas, a exercício de natação em tanques coletivos (100 cm x 80 cm x 80 cm) contendo água a 31 ± 1°C, cinco dias por semana, uma hora por dia, suportando sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal^{18,19}. Os animais eram pesados a cada início de semana para a adequação das sobrecargas de treinamento.

Os ratos realizaram o treinamento físico em canos cilíndricos de polietileno (PVC) para que não tivessem contato entre si, facilitando, dessa forma, a mecânica correta da natação.

Eutanásia

Os animais pertencentes a ambos os grupos experimentais foram eutanasiados (inalação de CO₂) e submetidos ao deslocamento cervical 48 horas após a última sessão de exercício. Feito isso, alíquotas do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo (~250mg) foram coletados para análises posteriores.

Biomarcadores de estresse oxidativo

A fim de verificar o *status* antioxidante, as atividades enzimáticas de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e de glutathione peroxidase (GPx) foram determinadas no músculo gastrocnêmio direito dos animais. Como um indicador da peroxidação lipídica (danos à membrana do músculo), avaliou-se a concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no mesmo tecido. Os métodos para a determinação destas variáveis estão descritos a seguir:

CATALASE (CAT)

Para a determinação da atividade de CAT, as amostras de tecido muscular foram colocadas em tubos Eppendorf® gelados contendo 1 ml de tampão fosfato 0,05 N (composição, em g/L: KH₂PO₄, 1,34 e NaHPO₄ 2H₂O, 7,1), sonicadas e centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para posterior análise por meio de *kits* comerciais (Cayman Chemical®, Michigan, EUA).

Superóxido dismutase (SOD) e glutiona peroxidase (GPx)

Para a determinação da atividade de SOD e CAT, as amostras de tecido muscular foram imediatamente lavadas com PBS (pH 7,4) contendo heparina (0,16 mg/ml), a fim de remover as células sanguíneas. Imediatamente após, as amostras foram homogêneas (em gelo), em 1 ml de tampão HEPES (20 mM, pH 7,2) contendo (em mM): 1 EGTA, Manitol 210 e sacarose 70, bem como centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm (4°C). O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análise posterior de SOD total (citoplasmática e mitocondrial) e GPx por meio de kits comerciais (Cayman Chemical®, Michigan, EUA).

Biomarcadores de peroxidação de lipídios: concentração TBARs

Para a determinação das concentrações de TBARs, as amostras de tecido muscular foram colocadas em Eppendorf® gelados contendo 1,5 ml de tampão fosfato 0,05 N (composição, em g/L: KH_2PO_4 , 1,34 e $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,1), homogêneas em Polytron® e centrifugadas durante cinco minutos a 10.000 rpm. Feito isso, o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C para análise posterior por meio de kits comerciais (Cayman Chemical®, Michigan, EUA).

Glicogênio muscular

A concentração de glicogênio muscular foi determinada pelo método colorimétrico com fenol e ácido sulfúrico no músculo gastrocnêmio esquerdo dos animais²⁰.

Crescimento celular do musculoesquelético

Visando inferir quanto ao crescimento do músculo esquelético, foram determinados os teores de DNA, como índice do número de células e a razão proteína/DNA, como índice de crescimento celular, no músculo gastrocnêmio esquerdo dos animais¹⁶. Os teores de proteína foram determinados pelo método folin-fenol²¹, enquanto que as taxas de DNA no músculo foram avaliadas pelo método da difenilamina²².

Procedimento estatístico

Os dados foram analisados mediante o pacote estatístico BioEstat® 5.0 (Brasil) e expressos em média \pm desvio padrão. Para verificar a normalidade, foi utilizado o teste kolmogorov-Smirnov. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a diferença entre as médias e posteriormente calculou-se, também, o *Effect Size* (ES) por meio do software GPower® 3²³. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

RESULTADOS

O valor médio da atividade de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína) mostrou-se menor ($p < 0,0004$; ES: 11,3) no SG ($0,52 \pm 0,03$) se comparado ao TG ($0,87 \pm 0,04$) (figura 1). Tais resultados demonstram um aumento de 69% na atividade dessa enzima no TG em relação ao SG.

A concentração média da atividade de SOD (U/ml) apresentou-se menor ($p < 0,0004$; ES: 3,8) no SG ($4,10 \pm 0,37$) quando comparado ao TG ($6,49 \pm 0,45$) (figura 2). Observou-se, dessa forma, aumento de 58% na atividade dessa enzima no TG em relação ao SG.

Em relação à atividade da GPx ($\text{nmol}/\text{min}/100 \text{ mg}$), foi possível notar que o SG apresentou concentração média ($2,87 \pm 0,35$) inferior ($p < 0,0004$; ES: 8,7) ao TG ($6,49 \pm 0,52$) (figura 3), denotando um aumento de 126% no TG em relação ao SG.

As concentrações de TBARs encontram-se na figura 4. O valor médio de TBARs ($\text{nmolMDA}/\text{mg}$ proteína) encontrado no TG ($2,35 \pm 0,45$) foi menor ($p < 0,0004$; ES: 14,6) em relação ao SG ($8,90 \pm 0,47$); tais valores correspondem a valores 74% menores para os animais que realizaram exercício. Os ratos pertencentes ao grupo TG apresentaram maior peso corporal ao final do experimento (tabela 2). Foi observado, ainda, um

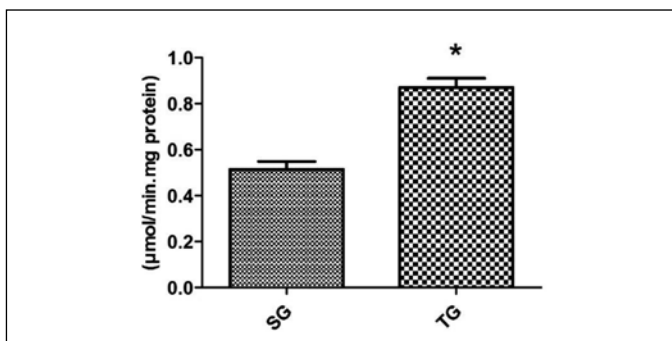


Figura 1. Atividade da enzima catalase (CAT) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Treinados (TG; n = 8) > Sedentários (SG; n = 10).

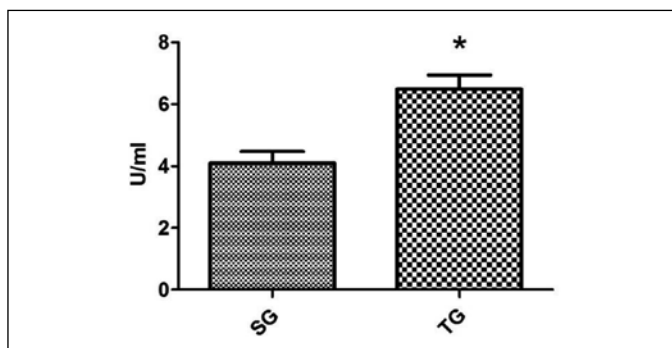


Figura 2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Treinados (TG; n = 8) > Sedentários (SG; n = 10).

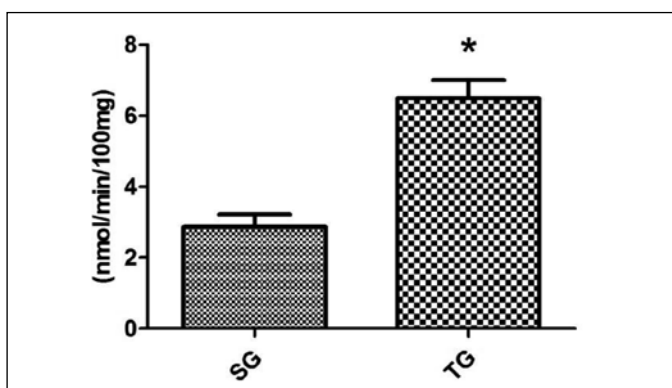


Figura 3. Atividade da enzima glutiona peroxidase (GPx) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Treinados (TG; n = 8) > Sedentários (SG; n = 10).

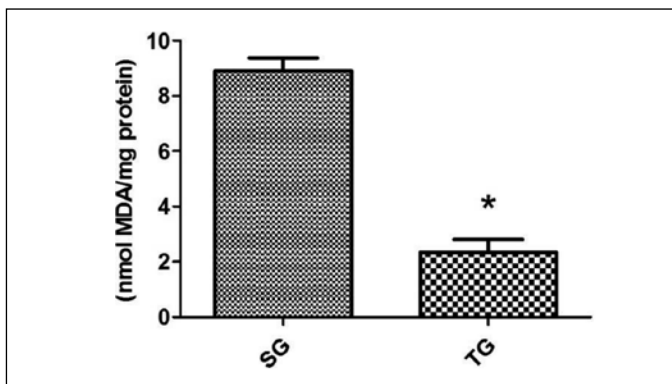


Figura 4. Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no músculo gastrocnêmio dos animais ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Treinados (TG; n = 8) < Sedentários (SG; n = 10).

aumento no conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio dos animais treinados. A razão proteína/DNA também aumentou em TG (maior crescimento celular), confirmando a eficácia do treinamento físico. Não foi observada diferença nos valores de DNA muscular (número de células) (tabela 2).

Tabela 2. Ganho de peso corporal e glicogênio, proteína, DNA e razão proteína/DNA no músculo gastrocnêmio dos animais.

Variáveis	Grupo Sedentário	Grupo Exercitado	p-valor	Tamanho do Efeito
Ganho de peso (g)	70,6 ± 13,5	85,4 ± 25,0	0,04	5,3
Glicogênio muscular (mg/100mg)	0,108 ± 0,013	0,320 ± 0,012	0,0004	21,0
Proteína muscular (g/100g)	2,09 ± 0,20	3,52 ± 0,36	0,0004	4,4
DNA muscular (g/100g)	0,084 ± 0,006	0,085 ± 0,002	0,63	0,0
Razão proteína DNA	24,94 ± 3,24	41,67 ± 4,02	0,0004	4,6

DISCUSSÃO

Com o intuito de combater o estresse oxidativo, nosso organismo conta com mecanismos químicos e enzimáticos altamente regulados². No presente trabalho, foi verificado o efeito do treinamento físico de natação sobre as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e um biomarcador de peroxidação lipídica (TBARs); além disso, verificamos as concentrações musculares de glicogênio, proteína e DNA.

Apesar de o exercício ser um conhecido gerador de EROs³, o estímulo causado parece ter sido compensatório. No presente estudo, o treinamento foi eficaz no sentido de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, bem como reduzir a magnitude do processo de peroxidação lipídica, um biomarcador de estresse oxidativo. Esses resultados mostram a importância do exercício físico na promoção de adaptações fisiológicas positivas em relação aos mecanismos de defesa antioxidante.

A enzima CAT, encontrada nos peroxissomas, tem papel específico de metabolizar o peróxido de hidrogênio, substância altamente tóxica para a célula². No presente estudo, foi observado aumento significativo da atividade dessa enzima. Por outro lado, em estudo realizado por Schneider *et al.*²⁴, com seres humanos, não foi encontrada diferença na atividade da catalase, independente da intensidade do treinamento ou do grupo avaliado. Araújo *et al.*²⁵, em estudo realizado com ratos exercitados em esteira rolante e suplementados com creatina, verificaram uma redução na atividade da catalase no fígado de animais que realizaram o exercício físico. A justificativa para essa discordância de resultados parece estar associada, pelo menos em parte, ao organismo estudado, ao protocolo de exercício aplicado e à utilização de ergogênico.

A enzima SOD possui três isoformas presentes no organismo humano: a SOD1 encontra-se no citoplasma, SOD2 nas mitocôndrias e SOD3 no líquido extracelular. Essa enzima catalisa a dismutação (reação *redox* de oxidação e redução) do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio^{2,8,9}. No presente estudo, foram encontrados valores de atividade dessa enzima (nós analisamos SOD total) significativamente diferentes entre os dois grupos avaliados, onde o grupo treinado apresentou valores médios superiores ao grupo mantido sedentário durante o experimento. Os relatos de Schneider *et al.*²⁴ não mostraram diferenças significativas de SOD antes e após a aplicação do protocolo

de exercício no grupo treinado. O trabalho de Araújo *et al.*⁴, o qual verificou a atividade dessa enzima no tecido hepático, também não encontrou diferença significativa entre os grupos de seu experimento, os quais eram treinados no limiar anaeróbio ou 25% acima do mesmo.

A enzima GPx, localizada na mitocôndria, possui o papel de reduzir hidroperóxidos a álcoois e peróxido de hidrogênio a água. Em nosso estudo, encontramos diferenças significativas da atividade dessa enzima entre os dois grupos avaliados, sendo os valores médios maiores no grupo treinado em relação ao grupo sedentário. Em outro trabalho²⁴, os autores somente identificaram diferença significativa de atividade da glutathione peroxidase em determinadas intensidades de treinamento, evidenciando, novamente, que a questão protocolo-dependência pode ser a explicação para a discordância entre os resultados obtidos por nós em comparação a outros estudos.

Como limitação do estudo, não efetuamos a determinação bioquímica direta de EROs, porém, um importante e fidedigno marcador de estresse oxidativo foi mensurado: TBARs. As concentrações de TBARs foram significativamente diferentes quando comparados os dois grupos estudados. O grupo sedentário apresentou concentrações médias de TBARs superiores em relação ao grupo treinado, o que indica redução da peroxidação lipídica (biomarcador de estresse oxidativo, lesão e/ou ruptura da membrana da fibra muscular) no músculo dos animais treinados. Corroborando com nossos achados, Araújo *et al.*²⁵ verificaram maiores concentrações de TBARs no tecido hepático de ratos não exercitados quando comparados com o grupo treinado. Contrariando estes achados, Koçtürk *et al.*²⁶ verificaram aumento nas concentrações de TBARs em seu estudo, o qual foi desenvolvido com ratos e utilizou um protocolo de exercício agudo em esteira rolante até a exaustão dos animais. O aumento nas concentrações de TBARs foi verificado até seis horas após o final do exercício. Neste último caso, a diferença de protocolo experimental exerceu, possivelmente, importante influência na obtenção dos resultados, principalmente no que se refere às variáveis analisadas e ao tipo de exercício aplicado.

Há evidências de que o aumento fisiológico na produção de espécies radiculares possa favorecer o transporte de glicose para o interior da fibra muscular por uma via mediada pela contração do músculo esquelético, podendo causar aumento nas concentrações de glicogênio nesse tecido^{13,14}. Em nosso estudo, as concentrações de glicogênio muscular foram aumentadas no grupo exercitado. Tal fato pode estar associado ao aumento da glicogênese, ao maior transporte de glicose por mecanismo insulino-independente²⁷ e, ainda, ao aumento da atividade dos transportadores de glicose do tipo GLUT-4²⁸. Para confirmar essa hipótese, seria necessária a determinação de GLUT-4, o que não efetuamos no presente estudo.

Dessa forma, os achados do presente estudo relacionados aos biomarcadores de estresse oxidativo (aumento da atividade das enzimas antioxidantes e diminuição da peroxidação lipídica), associados ao aumento no conteúdo de glicogênio muscular dos animais pertencentes ao grupo treinado, sugerem que o treinamento físico aplicado foi capaz, possivelmente, de regular positivamente a maquinaria antioxidante em prol do acúmulo desse importante substrato energético. Nesse sentido, pode ter ocorrido aumento fisiológico na produção de EROs associada à concomitante elevação dos conteúdos de glicogênio nos tecidos desses animais, corroborando, dessa forma, com os estudos de Higaki *et al.*¹³ e Roberts *et al.*¹⁴.

Por outro lado, os animais mantidos sedentários apresentaram, além de altas concentrações de TBARs, menores concentrações de glicogênio muscular; tal fato indica, pelo menos em parte, que a condição sedentária promove a produção supra-fisiológica de EROs e prejudica o acúmulo de glicogênio no tecido citado. Para a confirmação dessa

hipótese, seria necessária a mensuração direta de EROs ou mesmo da expressão e/ou atividade da enzima glicogênio sintase; no presente estudo, não determinamos tais variáveis.

Blair *et al.*²⁹ investigaram os mecanismos moleculares envolvidos na redução da sensibilidade à insulina em resposta ao estresse oxidativo. Esses autores²⁹ verificaram que o aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio no músculo esquelético causa inibição de vias insulínicas de transporte de glicose que, por sua vez, pode provocar diminuição da síntese de glicogênio muscular. Estes achados reforçam a hipótese de que os animais pertencentes ao grupo sedentário do nosso estudo podem ter sido acometidos, devido à condição de sedentarismo, ao aumento supra-fisiológico de EROs, o qual hipoteticamente prejudicou o transporte de glicose para o interior das fibras musculares, acarretando, assim, em menores concentrações de glicogênio muscular quando comparados aos animais pertencentes ao grupo treinado.

Ainda, em nosso estudo, verificamos que os ratos submetidos ao exercício físico aeróbio apresentaram maior valor médio de razão proteína/DNA no músculo analisado (gastrocnêmio), denotando que ocorreu crescimento celular nesse tecido, o que pode ter colaborado tanto para o controle no que se refere à produção de EROs como para o aumento no conteúdo de glicogênio muscular dos ratos treinados. Em relação à quantidade total de DNA muscular, não houve diferença significativa entre os grupos.

Estudos futuros são necessários para melhor esclarecer os efeitos do treinamento físico sobre o mecanismo de estresse oxidativo e sua influência sobre o conteúdo de glicogênio e crescimento do músculo esquelético de ratos.

CONCLUSÃO

O sistema de defesa antioxidante foi melhorado no músculo gastrocnêmio dos animais submetidos ao treinamento físico aeróbio quando comparados aos ratos sedentários. Estes resultados indicam que o exercício físico regular é uma estratégia importante para combater a produção supra-fisiológica de EROs, uma vez que aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e reduziu a peroxidação lipídica no músculo esquelético. Tais ocorrências podem ter influenciado, pelo menos em parte, o aumento do conteúdo de glicogênio bem como o crescimento do músculo esquelético dos animais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo apoio financeiro concedido (Processo número 450794/2009).

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002;30:280-5.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.
3. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006;36:327-58.
4. Araújo MB, Voltarelli FA, Contartez RVL, Machado-Gobatto FB, Mello MAR. Oxidative stress in rats exercised at different intensities. *J Chin Clin Med* 2009;4:11-8.
5. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell. *Comp Ted Proc* 1997;32:1870-4.
6. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2008;12:13-9.
7. Avula RCP, Fernandes G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging* 1999;11:246-52.
8. Jenkins RR. Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sports Med* 1987;5:156-70.
9. Pereira B, Costa Rosa LFPB, Bechara EJH, Curí R, Safi DA. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise – trained rats. *Physiol Behav* 1994;56:1095-9.
10. Prada FJA, Voltarelli FA, Macedo DV, Mello MAR. Indicadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento em natação. *Rev Port Cien Desporto* 2004;4:237-74.
11. Reid MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:371-6.
12. Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology* 2005;20:260-70.
13. Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes* 2011;50:241-7.
14. Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1997;273:E220-5.
15. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944-8.
16. Winick M, Basel JA, Rosso P. A Nutrition and cell growth. In: Winick M, editor. *Nutrition and development*. New York: John Wiley & Sons, 1972;49-97.
17. Harri M, Kuusela P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiol Scand* 1986;126:189-97.
18. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1389-94.
19. Voltarelli FA, Mello MAR, Gobatto CA. Limiar Anaeróbio determinado pelo Teste do Lactato Mínimo em Ratos: Efeito dos Estoques de Glicogênio Muscular e do Treinamento Físico. *Rev Port Cien Desporto* 2004;4:16-25.
20. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970;28:234-6.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
22. Giles KW, Meyers, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965;93.
23. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner, A. GPower 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-91.
24. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Bellóklein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Can J Appl Physiol* 2005;30:723-34.
25. Araújo MB, Moura LP, Ribeiro C, Dalia RA, Voltarelli FA, Mello MAR. Oxidative Stress in the Liver of Exercised Rats Supplemented with Creatine. *Int J Nutr Metabolism* 2011;3:58-64.
26. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıköz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol* 2008;102:515-24.
27. Henriksen EJ, Stump CS, Trinh TH, Beaty SD. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996;80:1540-6.
28. Dela F, Mikines KJ, Sonne B, Galbo H. Effect of training on interaction between insulin and exercise in human muscle. *J Appl Physiol* 1994;76:2386-93.
29. Blair AS, Hajdich E, Gary J, Litherland GJ, Hundal HS. Regulation of Glucose Transport and Glycogen Synthesis in L6 Muscle Cells during Oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and sapk2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways *J Biol Chem* 1999;274:36293-9.