

EFEITO DO MODELO “VIVER ALTO E TREINAR BAIXO” SOBRE OS ESTOQUES DE GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J

Palavras-Chave: HIPÓXIA, TREINAMENTO, GLICOGÊNIO

Autores(as):

MATHEUS RODRIGUES DOS SANTOS, FCA – UNICAMP

JUAN BORDON ORSI, FCA – UNICAMP

Prof. Dr. MARCELO PAPOTI - EEFERP - USP

Profa. Dra. FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO, FCA – UNICAMP

Prof. Dr. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO (orientador), FCA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

A aplicação de modelos de treinamento associados a exposição à hipóxia estão se tornando cada vez mais comuns na periodização de atletas de alto rendimento. Tais modelos tornam-se interessantes, pois podem gerar adaptações fisiológicas positivas perante as sessões de treinamento, como a melhora de transporte de oxigênio, aumento do volume de hemácias e da potência aeróbia ($VO_{2máx}$) (SINEX & CHAPMAN, 2015). Dentre as diferentes metodologias de treinamento, LEVINE e STRAY-GUNDERSEN (1997) propuseram o modelo “Viver alto – Treinar baixo” (VA-TB), modelo no qual os atletas vivem em ambiente hipóxico (altitude) e treinam em ambiente normóxico. Esses autores, ao analisarem quarenta e um corredores de longa distância de equipes universitárias de atletismo e cross-country, mostraram que apenas 4 semanas de exposição à hipóxia (~2.500m de altitude) foram suficientes para estimular a maior produção de eritropoietina e aumentar o volume da massa de glóbulos vermelhos em até 9%. O modelo VA-TB busca principalmente a melhora da aptidão aeróbia, mas estímulos anaeróbios combinados com períodos de recuperação, como o High Intensity Interval Training (HIIT), também geram adaptações tanto da potência quanto da capacidade aeróbia (BUCHHEIT & LAURSEN, 2013; LAURSEN, 2010; SEILER & TØNNESSEN, 2009), tornando instigante a investigação de aspectos do metabolismo energético anaeróbio frente à adaptações advindas do modelo VA-TB. Já é conhecido pela literatura que o aumento da intensidade do treinamento resulta em uma maior dependência da glicose plasmática e do glicogênio muscular (SOO; RAMAN; LAWLER; GOODS *et al.*, 2023; VØLLESTAD & BLOM, 1985). Além disso, a hipóxia exerce forte influência no metabolismo do glicogênio, uma vez que induz a Glicogênio Sintase (GYS-1) por meio do Fator Induzível por Hipóxia 1-alfa (HIF-1alpha), aumentando os estoques de glicogênio muscular (PESCADOR; VILLAR; CIFUENTES; GARCIA-ROCHA *et al.*, 2010). Partindo desse princípio, é notória a importância da investigação dos aspectos do metabolismo energético frente às adaptações geradas pelo modelo VA-TB. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi observar se 7 semanas de exposição ao ambiente hipóxico associado ao treinamento aeróbio de corrida afeta os estoques de glicogênio hepático e muscular de camundongos C57BL/6J.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e local

Foram utilizados 40 camundongos isogênicos C57BL/6J, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O experimento foi conduzido no Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP), Campus de Limeira - SP. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab®, CR1, Nuvital) e receberam água *ad libitum*. O experimento foi realizado de acordo com a legislação Brasileira corrente e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal foram rigorosamente seguidas. A realização da pesquisa se iniciou somente após a aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA - UNICAMP). Os camundongos foram mantidos em gaiolas convencionais de polietileno e dez animais de cada grupo foram confinados em uma única gaiola. Nossa escolha para preservar a habitação social, em vez de fornecer uma gaiola para cada animal foi baseada no fato de que o isolamento social pode ser maléfico para camundongos

(RIITTINEN; LINDROOS; KIMANEN; PIENINKEROINEN *et al.*, 1986; VALZELLI, 1973) . As gaiolas dos animais dos grupos hipóxia (Hx) foram alocadas dentro das tendas normobáricas (Colorado Altitude Training's Controlled Tent Systems™). A hipóxia foi gerada pelo equipamento Hypoxic Everest Summit II Generator®. Os animais dos grupos Hx foram diariamente expostos ao ambiente hipóxico (18h.dia⁻¹) a uma fração inspirada de oxigênio (FIO₂) equivalente a 14,5% (~3000m). Os experimentos foram conduzidos na cidade de Limeira-SP, a qual possui altimetria em torno de 588 metros e FIO₂ aproximadamente de 19,5%. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C), umidade relativa do ar entre 45 e 55%, ruídos não ultrapassando 85 decibéis e ciclo claro/escuro de 12/12horas, sendo a luz acessa às 6:00h e apagada às 18:00h.

Desenho experimental

Aos cinco meses de idade, animais adultos (150 dias) foram aleatoriamente divididos em 2 tipos de alojamento: Normóxia (Nx) e Hipóxia (Hx). Para cada tipo de alojamento, animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos experimentais: Não-treinado (N) e Treinado (T). Dessa forma, os animais foram alojados da seguinte forma: Grupo Normóxia/Não-treinado (Nx/N, n=10), animais que não foram submetidos ao treinamento físico aeróbio e foram continuamente alojados em condições de normóxia. Grupo Normóxia/Treinado (Nx/T, n=10), animais que realizaram treinamento físico aeróbio em condições de normóxia e foram continuamente alojados em condições de normóxia. Grupo Hipóxia/Não-treinado (Hx/N, n=10), animais que não foram submetidos ao treinamento físico aeróbio e foram alojados em ambiente hipóxico. Grupo Hipóxia/Treinado (Hx/T, n=10), animais que foram submetidos ao treinamento físico aeróbio e foram alojados em condições de hipóxia. Os camundongos foram mantidos sob as intervenções experimentais durante 7 semanas com eutanásia 48h após a última sessão de treinamento.

Protocolo de velocidade crítica e treinamento físico aeróbio

Durante o período experimental, os camundongos do grupo treinado (T) foram submetidos a um programa de treinamento aeróbio contínuo que foi executado em esteira rolante em normóxia. Vale salientar que não houve estímulos elétricos em nenhuma hipótese. O protocolo de velocidade crítica (VC) foi útil para prescrever o treinamento físico dos camundongos T previamente ao início do experimento. A avaliação das capacidades aeróbia e anaeróbia foi realizada pelo protocolo de VC (BILLAT; MOUISEL; ROBLOT, MELKI, 2005), a partir da aplicação de 4 esforços aleatórios e individualizados de corrida em esteira rolante (intensidades 18 à 27 m/min) e registro do tempo limite de cada esforço em segundos. As intensidades de exercício foram individualmente selecionadas para que o tempo limite esteja entre 1 a 15 min, de acordo com os pressupostos do protocolo (DE BARROS MANCHADO-GOBATTO; GOBATTO; CONTARTEZE; PAPOTI *et al.*, 2010; ORSI; ARAUJO; SCARIOT; POLISEL *et al.*, 2023). A partir de uma relação linear entre distância vs. tempo limite foi possível determinar o coeficiente angular e o intercepto y, os quais correspondem respectivamente à VC (capacidade aeróbia) e a capacidade de corrida anaeróbia (CCA, capacidade anaeróbia) (BILLAT; MOUISEL; ROBLOT, MELKI, 2005). Vale ressaltar que os animais passaram por um período de 3 dias para adaptação e familiarização com a esteira rolante. As sessões de treinamento tiveram um volume diário de 40 min, e ocorreram em uma frequência de cinco dias por semana, durante sete semanas, sempre em condições de normóxia, independente do grupo estudado. A intensidade de corrida (m/min) foi de 80% da intensidade de VC. Considerando sua proximidade com a intensidade de máxima fase estável de lactato, como já visto em ratos e camundongos (DE BARROS MANCHADO-GOBATTO; GOBATTO; CONTARTEZE; PAPOTI *et al.*, 2010; ORSI; ARAUJO; SCARIOT; POLISEL *et al.*, 2023), a intensidade de treinamento (80% da velocidade crítica) foi escolhida visando adaptações aeróbias. Todos os procedimentos laboratoriais foram conduzidos sempre no mesmo horário do dia. Os animais correram em esteira rolante com baias individualizadas.

Obtenção do material biológico

Com o intuito de eliminar qualquer efeito de fármacos sobre respostas neuroendócrinas, o deslocamento cervical foi o método utilizado para eutanásia. Após esse procedimento, amostras do músculo esquelético (tríceps braquial, sóleo e gastrocnêmio) e fígado foram coletadas cirurgicamente, pesadas e rapidamente depositadas em nitrogênio líquido para evitar a degradação tecidual, sendo posteriormente armazenadas a uma temperatura de -80°C graus.

Método de determinação do glicogênio

A fim de determinar os estoques de glicogênio muscular e hepático, foram seguidos protocolos propostos por SJÖRGREEN et al. (1938) e DUBOIS; GILLES; HAMILTON; REBERS *et al.* (1956). Para cada amostra foram pesados 250mg (músculo) e 500mg (fígado) de tecido, sendo colocados em tubos de ensaio de vidro contendo solução de KOH 30%. Os tubos foram colocados em banho-maria (80°C) fervente para digestão. Independente do tecido estudado, foi adicionado Na₂SO₄ saturado antes de retirar os tubos do banho-maria. Após agitação intensa, foi adicionado álcool bidestilado 70% e novamente agitados. Em sequência, os tubos foram levados em banho-maria fervente até a ebulição do álcool. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 3600rpm por 5 minutos e logo em seguida desprezou-se o sobrenadante por inversão. O corpo de fundo foi diluído com água quente e agitado fortemente. Novamente foi adicionado álcool bidestilado seguido de agitação. As amostras foram levadas para o banho-maria até ebulição do álcool e centrifugadas novamente a 2000rpm. O sobrenadante foi desprezado por inversão e os tubos foram deixados de cabeça para baixo sobre o papel higiênico apoiados numa estante. Por fim, o precipitado foi diluído com água destilada quente e os tubos foram levados para o vórtex a fim de homogeneizar a solução.

Para colorimetria, foi utilizado o método fenol sulfúrico. Para isso preparou-se uma solução de fenol e água deionizada. Foram enumerados outros tubos de ensaio e adicionado a solução em todos os tubos. Após isso, foi adicionada amostra e água deionizada. Preparou-se a “Solução padrão principal” (SPP), contendo D-Glicose e água deionizada. A partir desta solução foram preparados os tubos de reação contendo os padrões de diferentes concentrações. Foi dispensado água deionizada para fazer o Branco e 1mL dos padrões. Foi adicionado Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) concentrado em todos os tubos sendo que as estantes mergulhadas em banho de água fria para evitar aumento abrupto da temperatura. As amostras foram agitadas vigorosamente e colocadas em banho maria durante 15 minutos. Com isso, foi pipetado as amostras em cada poço da microplaca, cuja leitura foi realizada na frequência de 490nm no leitor de microplaca (EPOC-Biotech).

Tratamento estatístico

Todos os dados estão apresentados em média e erro padrão da média ($\pm EP$). A normalidade dos parâmetros mensurados foi verificada pelo teste de Shapiro- Wilk e homogeneidade por teste de Levene. A análise paramétrica de variância (ANOVA-fatorial) foi efetuada para analisar o efeito do treinamento físico aeróbio e exposição à hipóxia, bem como suas interações sobre todas as variáveis previstas. Foi utilizado Post Hoc de Fisher LSD. Em todos os casos o nível de significância foi fixado em 5% ($P < 0.05$).

RESULTADOS

A figura 1 apresenta as comparações de estoques de glicogênio das musculaturas esqueléticas e fígado ($\mu\text{g}/100\text{mg}$ de tecido) dos camundongos C57BL/6J dos quatro grupos experimentais. No painel A, é possível observar que os animais Hx-T ($78,18 \pm 6,1$) apresentaram valores significativamente menores dos estoques de glicogênio hepático quando comparados aos animais Nx-N ($96,63 \pm 4,5$) e Hx-N ($103,10 \pm 5,6$), bem como o grupo Hx-N apresentou valores maiores que o grupo Nx-T ($80,85 \pm 5,1$), sendo observado um efeito significativo do treinamento. Para o tríceps braquial (Painel B), o grupo Hx-T ($158,07 \pm 14,1$) exibiu maior conteúdo de glicogênio em comparação aos grupos Nx-N ($30,10 \pm 0,8$), Nx-T ($75,47 \pm 11,1$) e Hx-N ($61,26 \pm 10,0$), além do grupo Nx-T mostrou maiores valores em relação ao grupo Nx-N. Também foi observado um efeito significativo do ambiente, treinamento e interação. No painel C, os animais Hx-T ($45,94 \pm 4,6$) apresentaram maiores valores de glicogênio no sóleo que os animais dos grupos Nx-N ($29,27 \pm 1,1$) e Nx-T ($30,10 \pm 1,6$), apresentando efeito significativo do ambiente. O grupo Hx-N ($38,62 \pm 6,1$) não apresentou diferenças significativas com outros grupos. Para o gastrocnêmio (painel D), o grupo Hx-T ($113,59 \pm 11,8$) apresentou maiores teores de glicogênio que os grupos Nx-N ($47,29 \pm 13,4$), Nx-T ($49,49 \pm 6,5$) e Hx-N ($60,95 \pm 5,1$), exibindo efeitos significativos do ambiente, treinamento e interação.

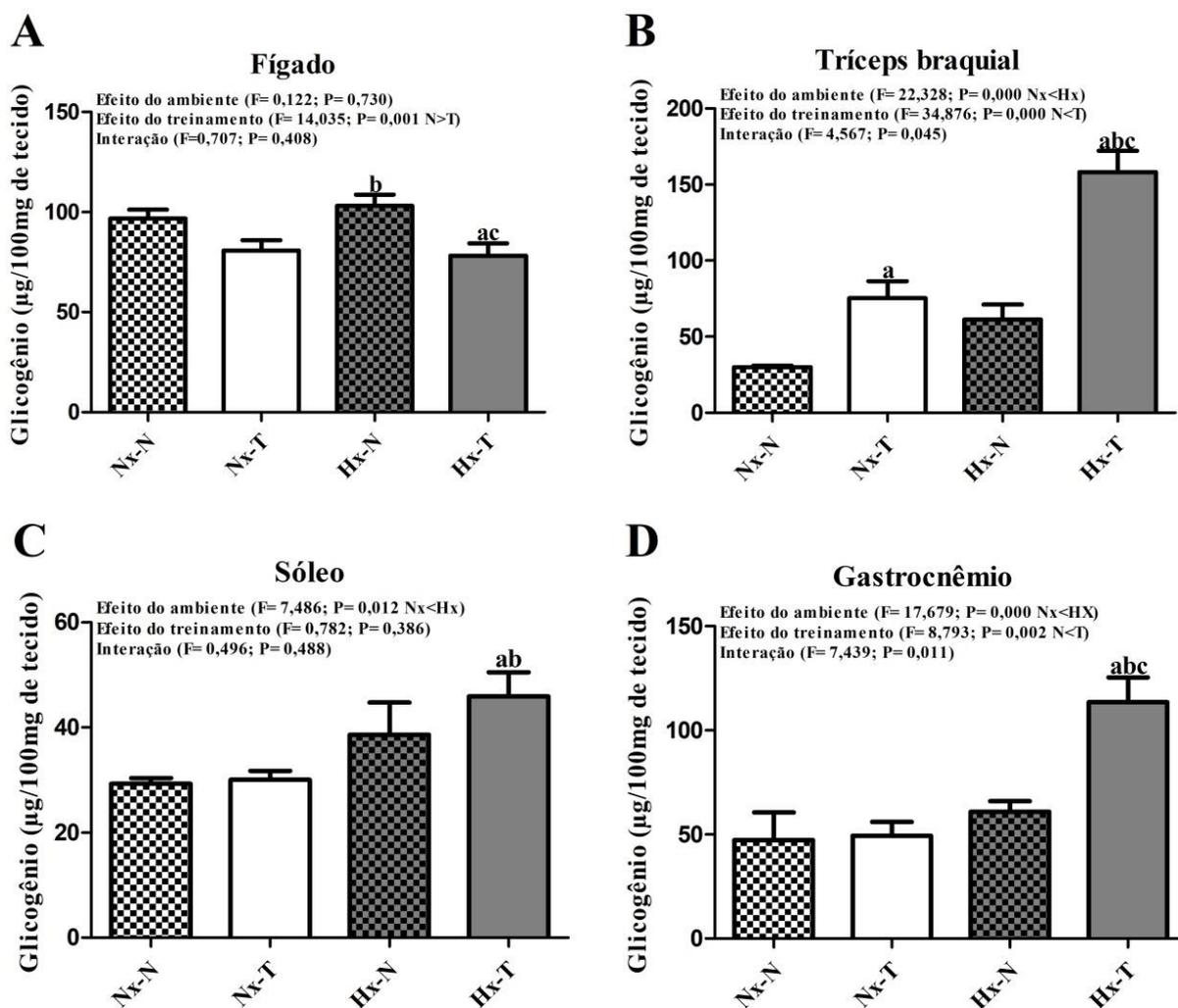


Figura 1. Comparação entre os estoques de glicogênio dos tecidos fígado (A), tríceps braquial (B), sóleo (C) e gastrocnêmio (D). Análise estatística: a, b, c representam as diferenças significativas (P<0,05) em relação à Nx-N, Nx-T e Hx-N, respectivamente.

DISCUSSÃO

O presente estudo buscou investigar os efeitos do modelo de treinamento VA-TB sobre os estoques de glicogênio hepático e muscular, a fim de auxiliar na compreensão do metabolismo energético e ampliar o conhecimento sobre tal intervenção. Os resultados do presente trabalho reafirmam que a hipóxia é uma estratégia interessante para o aumento do glicogênio muscular, uma vez que investigações anteriores sugeriram que a hipóxia afeta o metabolismo do glicogênio em vários níveis, tendo suas vias desencadeadas pela falta de oxigênio, ativando a proteína GYS-1, que desempenha um papel fundamental no acúmulo de glicogênio mediado por HIF-1 α (PESCADOR; VILLAR; CIFUENTES; GARCIA-ROCHA *et al.*, 2010). Além disso, o fato de o grupo Hx-T ter apresentado maior teor de glicogênio que todos os outros grupos Nx, nas musculaturas tríceps braquial, sóleo e gastrocnêmio, enfatiza a notoriedade do modelo de treinamento VA-TB, uma vez que a exposição ao ambiente hipóxico associada ao treinamento mostrou-se eficaz para o aumento dos estoques de glicogênio muscular. Esses achados se tornam interessantes, uma vez que o aumento dos estoques de glicogênio muscular, está diretamente ligado com a manutenção e aumento da intensidade do esforço, especialmente em provas de endurance (AHLBORG; BERGSTRÖM; EKELUND, HULTMAN, 1967; HEARRIS; HAMMOND; FELL, MORTON, 2018). O baixo teor dos estoques de glicogênio hepático encontrado em animais T pode ser explicado pelas adaptações geradas pelo treino, como a melhora da sinalização do glucagon e consequente otimização da utilização de ácido graxo livre (AGL) e outros metabólitos para produção de energia por parte do fígado (TREFTS, E.; WILLIAMS, A. S. & WASSERMAN, D. H., 2015). A intensidade utilizada nas sessões de treinamento (80% da Vcrit) pode ter contribuído para a otimização da oxidação de gordura, aumentando a

capacidade do organismo em transportar e metabolizar AGL, além de elevar o número de mitocôndrias nas células hepáticas (TREFTS, E.; WILLIAMS, A. & WASSERMAN, D., 2015).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados do presente estudo, a hipóxia mostrou-se eficiente no que se refere ao aumento dos estoques de glicogênio das musculaturas tríceps braquial, gastrocnêmio e sóleo, tendo esse efeito potencializado pelo treinamento, o que demonstra a eficiência do modelo de treinamento VA-TB e contribui para um melhor entendimento do metabolismo dos carboidratos. Tais respostas não se manifestaram no fígado, evidenciando a tecido dependência nas adaptações ligadas ao metabolismo de carboidratos quando da associação do treinamento físico aeróbio e o modelo de hipóxia VA-TB.

BIBLIOGRAFIA

- AHLBORG, B.; BERGSTRÖM, J.; EKELUND, L. G.; HULTMAN, E. Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, 70, n. 2, p. 129-142, 1967.
- BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLLOT, N.; MELKI, J. Inter-and intrastrain variation in mouse critical running speed. *Journal of applied physiology*, 98, n. 4, p. 1258-1263, 2005.
- BUCHHEIT, M.; LAURSEN, P. B. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. *Sports medicine*, 43, n. 5, p. 313-338, 2013.
- DE BARROS MANCHADO-GOBATTO, F.; GOBATTO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M. *et al.* Determination of Critical Velocity and Anaerobic Capacity of Running Rats. *Journal of Exercise Physiology Online*, 13, n. 4, 2010.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. t. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- HEARRIS, M. A.; HAMMOND, K. M.; FELL, J. M.; MORTON, J. P. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. *Nutrients*, 10, n. 3, p. 298, 2018.
- LAURSEN, P. B. Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training? *Scandinavian journal of medicine science in sports*, 20, p. 1-10, 2010.
- LEVINE, B. D.; STRAY-GUNDERSEN, J. "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *Journal of applied physiology*, 83, n. 1, p. 102-112, 1997.
- ORSI, J. B.; ARAUJO, L. S.; SCARIOT, P. P.; POLISEL, E. E. *et al.* Critical Velocity, Maximal Lactate Steady State, and Muscle MCT1 and MCT4 after Exhaustive Running in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, n. 21, p. 15753, 2023.
- PESCADOR, N.; VILLAR, D.; CIFUENTES, D.; GARCIA-ROCHA, M. *et al.* Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PloS one*, 5, n. 3, p. e9644, 2010.
- RIITTINEN, M. L.; LINDROOS, F.; KIMANEN, A.; PIENINKEROINEN, E. *et al.* Impoverished rearing conditions increase stress-induced irritability in mice. *Dev Psychobiol*, 19, n. 2, p. 105-111, Mar 1986.
- SEILER, S.; TØNNESSEN, E. Intervals, thresholds, and long slow distance: the role of intensity and duration in endurance training. *Sportscience*, 13, 2009.
- SINEX, J. A.; CHAPMAN, R. F. Hypoxic training methods for improving endurance exercise performance. *Journal of Sport Health Science*, 4, n. 4, p. 325-332, 2015.
- SJÖRGREEN, B., NORDENSKJOLD, T., HOLMGREN, H., WOLLERSTROM, J., Bertrag zur kenntnis des le berrhythmik. *Pflugers Arch. Gesante Physiol. Menschen Tiere*, 240: 247, 1938.
- SOO, J.; RAMAN, A.; LAWLER, N.; GOODS, P. *et al.* The role of exercise and hypoxia on glucose transport and regulation. *European journal of applied physiology*, 123, n. 6, p. 1147-1165, 2023.
- TREFTS, E.; WILLIAMS, A. S.; WASSERMAN, D. H. Exercise and the regulation of hepatic metabolism. *Progress in molecular biology translational science*, 135, p. 203-225, 2015.
- VALZELLI, L. The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia*, 31, n. 4, p. 305-320, Aug 3 1973. Review.
- VØLLESTAD, N. K.; BLOM, P. C. S. Effect of varying exercise intensity on glycogen depletion in human muscle fibres. *Acta Physiologica Scandinavica*, 125, n. 3, p. 395-405, 1985.