

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA

EDUARDA FARIA ABRAHÃO MACHADO

**SUPLEMENTAÇÃO COM CALDO DE CANA DE AÇÚCAR
COMPARADO COM OUTROS CARBOIDRATOS NA REPOSIÇÃO
DO GLICOGÊNIO E CINÉTICA DE BIOMARCADORES PÓS-
EXERCÍCIO AGUDO EM RATOS**

CAMPINAS

2009

EDUARDA FARIA ABRAHÃO MACHADO

**SUPLEMENTAÇÃO COM CALDO DE CANA DE AÇÚCAR
COMPARADO COM OUTROS CARBOIDRATOS NA REPOSIÇÃO
DO GLICOGÊNIO E CINÉTICA DE BIOMARCADORES PÓS-
EXERCÍCIO AGUDO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Educação Física da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Educação
Física.

ORIENTADORA: DENISE VAZ DE MACEDO

CAMPINAS

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA
PELA BIBLIOTECA FEF - UNICAMP

Machado, Eduarda Faria Abrahão.

M18c Suplementação com caldo de cana de açúcar comparado com outros carboidratos na reposição do glicogênio e cinética de biomarcadores pós-exercício agudo em ratos. / Eduarda Faria Abrahão Machado. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Denise Vaz de Macedo.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas.

1. Glicogênio. 2. Cana de açúcar. 3. Caldo de cana. 4. Exercício físico. 5. Maltodextrina. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física. III. Título.

(dilsa/fef)

Título em inglês: Sugarcane juice supplementation compared to others carbohydrates on glycogen stores and recovery kinetics of biomarkers after a bout of acute exercise in rats.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Glycogen; Cane sugar; Sugar cane juice; Exercise; Maltodextrine.

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento.

Titulação: Mestrado em Educação Física.

Banca Examinadora: Denise Vaz de Macedo. Mara Patrícia Traina Chacon-Mikahil. Sergio Eduardo de Andrade Perez.

Data da defesa: 03/07/2009.

EDUARDA FARIA ABRAHÃO MACHADO

**SUPLEMENTAÇÃO COM CALDO DE CANA DE AÇÚCAR
COMPARADO COM OUTROS CARBOIDRATOS NA REPOSIÇÃO DO
GLICOGÊNIO E CINÉTICA DE BIOMARCADORES PÓS-
EXERCÍCIO AGUDO EM RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Eduarda Faria Abrahão Machado e aprovada pela Comissão julgadora em 03/07/2009.



Denise Vaz de Macedo

Orientadora

CAMPINAS

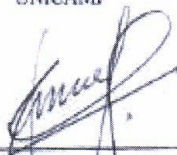
2009

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dra. Denise Vaz de Macedo (Orientadora)

UNICAMP



Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez

UFSCAR



Prof. Dra. Mara Patricia Traina Chacon Mikahil

UNICAMP

“A sabedoria de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência de que não sabe.”

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos verdadeiros atletas, os que buscam os próprios limites dentro de seus esforços diários, sabendo perder e vencer com humildade, e sem a necessidade do uso de substâncias ilegais. Uma pena sermos tão poucos. Mas com certeza somos nós os vitoriosos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sempre agradeço muito!

Agradeço ao cosmos, à natureza, a Deus ou qualquer outro nome que tenha essa forte energia que existe e que nos dá a oportunidade de viver.

Agradeço a Professora Denise, pela oportunidade de realmente aprender os efeitos do exercício físico. Aprender a pesquisar e ensinar. Aprender a ser crítica em minhas leituras. Aprender a querer mais...

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Agradeço ao Prof. Sérgio Perez pela presença em minha banca e pelas críticas construtivas. E aos professores Armindo e Barreto por também terem aceitado meu convite.

Agradeço à Profa. Mara Patrícia não só pela presença em minha banca, mas também por ter me dado oportunidades de ministrar algumas aulas em suas disciplinas, que com certeza me ajudaram muito!!!

Agradeço à Ana Carolina (não fique brava!). Carol, você sabe que esse trabalho é NOSSO! Obrigada pelas conversas e paciência em me aturar todos os dias no Labex, somos uma dupla de sucesso, rs!!!

Agradeço à Ana pela ajuda na obtenção de todos os materiais para a execução desse trabalho. Às secretárias da pós-graduação que sempre me atenderam muito bem, em especial à Maria que me ajudou bastante nesses últimos meses.

Agradeço ao Lázaro, ótimo exemplo de mineiro, nossa terra é muito bem representada por você em Campinas! Obrigada pela ajuda nas análises e discussão dos resultados.

Agradeço aos amigos e colegas do Labex, todos, sem exceção, são muitíssimos especiais em minha vida!

Agradeço à oportunidade que meus pais sempre me deram de trilhar meu próprio caminho, estando sempre presentes. Agradeço você, MÃE, por sempre acreditar em mim e me mostrar como ser forte em todos os momentos da vida. Tenho muito orgulho de ser sua filha. E a você, PAI, pelo jeito divertido que me ensinou a viver.

Agradeço aos meus irmãos, Lucas e Elaine, pela amizade e companheirismo que sempre tive e continuarei tendo durante todo nosso caminho, eternos amigos.

Agradeço às minhas madrinhas, Bé e tia Norma, primos e primas, tios e tias, à vó Helena pelo grande amor e carinho que sempre representou, à vó Nefa, vó Ique e vó Arthur eternos em meu coração. À tia Tina que sempre será meu melhor exemplo de amar o ensino e seus alunos.

Agradeço aos amigos de todas as horas e momentos, galerinha de Pouso Alegre e Campinas.

Agradeço a minha mente e coração, rs! Por me possibilitarem a capacidade de recomeçar, de sonhar, minha vontade de querer entender a vida e as pessoas, pela minha força ao sofrer e entendimento da felicidade. Pela minha forma de pensar e agir, e nunca deixar de ser eu mesma pela crítica de outros. Tento ser, cada vez mais, melhor...de acordo com meus próprios princípios. Com o objetivo final: sempre fazer o bem!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
CAPITULO 1.....	13
CAPITULO 2.....	33
ATIVIDADES COMPLEMENTARES DURANTE O MESTRADO.....	60

MACHADO, E.F.A. Suplementação com caldo de cana de açúcar comparado com outros carboidratos na reposição do glicogênio e cinética de biomarcadores pós-exercício agudo em ratos. 2009. 65f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

RESUMO

O exercício físico pode induzir traumas na musculatura, sinalizando uma resposta inflamatória. O reparo e regeneração das estruturas danificadas dependem do período adequado de descanso para recuperação. Esse período regenerativo é necessário após uma única sessão ou diversas sessões de exercícios. A restauração do glicogênio muscular pós-treino tem sido proposto como um dos fatores mais importantes para a recuperação pós-esforço. Normalmente, no esporte, são utilizados monossacarídeos ou amidos em diluições apropriadas para repor o glicogênio pós-treino. O caldo-de-cana é uma bebida comum no Brasil. Possui 65%-75% de água em sua composição média e alta concentração de sacarose, correspondente a 70%-91% de seus sólidos solúveis, além de antioxidantes, vitaminas, minerais e aminoácidos. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito do caldo-de-cana comparado a soluções carboidratadas ministradas imediatamente após um protocolo de exercício exaustivo na reposição de glicogênio; e na cinética de biomarcadores. No entanto, durante a revisão literária encontramos a utilização de diversos tipos anestésicos como principal variação metodológica nos estudos que quantificavam a concentração de glicogênio em animais. Foi necessário, portanto, definir qual anestésico utilizar permitindo interpretação de dados teciduais com análises concomitantes em sangue. Os agentes anestésicos podem afetar estrutura, função de órgãos e sistemas biológicos diferentemente, importando saber se o anestésico a ser utilizado poderia causar hemólise e/ou glicogenólise tecidual, interferentes na interpretação dos resultados. O capítulo 1 apresenta dados da comparação de 3 anestésicos injetáveis em relação ao grau de hemólise e concentrações de glicogênio. Os animais foram divididos em 3 grupos cada qual com um anestésico: Hidrato de Cloral (CH), Ketamina + Xilazina (KX), Zoletil 50[®] (zolazepam e tiletamina) + Xilazina (ZTX). Os grupos CH e KX exibiram hemólise em graus variados. Já o soro do grupo ZTX não apresentou hemólise. Não houve diferenças significativas nas concentrações de glicogênio entre os grupos CH e ZTX. Já o KX apresentou glicogenólise acentuada em todos tecidos. Os dados apresentados no capítulo 1 mostraram que o anestésico ZTX era o mais apropriado. O Capítulo 2 apresenta dados do efeito do caldo-de-cana comparativamente a soluções carboidratadas ministradas pós-exercício exaustivo, na reposição de glicogênio muscular e hepático, e na cinética de marcadores de proteólise, lesão muscular e inflamação durante 48h de recuperação. Esse estudo foi dividido em 2 experimentos. Os resultados do experimento 1 mostraram que a suplementação com caldo de cana foi tão eficiente quanto à maltodextrina para restaurar o glicogênio muscular. Nenhum dos suplementos foi capaz de repor significativamente o glicogênio hepático. Nos parâmetros bioquímicos e contagem do número de leucócitos totais, analisados no experimento 2, os dados mostraram instalação de quadro inflamatório e dano muscular pós-exercício perdurando pelas 48h de descanso. As amostras dos grupos suplementados com caldo-de-cana e maltodextrina não alteraram o padrão de resposta nas 48h pós-exaustão. Uma provável explicação seria a suplementação aguda, e após uma sessão de exercício, não ter sido suficiente para desencadear alterações nas análises. As potencialidades dos constituintes do caldo-de-cana e a escassez de estudos científicos com objetivo de utilizá-lo como recurso ergogênico no esporte reforçam a continuidade dessas investigações.

Palavras-chave: Glicogênio; Cana de açúcar; Caldo de Cana; Exercício Físico; Maltodextrina.

MACHADO, E.F.A. Sugarcane juice supplementation compared to others carbohydrates on glycogen stores and recovery kinetics of biomarkers after a bout of acute exercise in rats. 2009. 65p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ABSTRACT

Physical exercise induces traumas to biological structures which signal inflammatory process activation. The repair and regeneration of the damaged structures depend on an appropriate rest period for the recovery. This regenerative period is necessary after a single session or after several sessions of exercises. The muscle glycogen repletion after physical exercise seems to influence the recovery time. Usually in practices the carbohydrate rich compounds like maltodextrine, fructose or dextrin are normally used to maximize the rate of glycogen storage in the early hour's post-exercise. Sugar cane juice is an appreciate product and easily to find in Brazil. It possesses 65%-75% of water and a high sucrose concentration that corresponds 70%-91% of their soluble solids, phenolics compounds, vitamins, minerals and amino acids. The goal of this master's degree dissertation was to analyze the effect of sugar cane juice comparatively to other carbohydrates solutions supplied immediately after a bout of exhausting exercise in rats in the replacement of the glycogen stores; and in the kinetics of some biomarkers in 48h post-effort. However, the literature revision found the use of several anesthetics as the main methodological variation in the studies that quantified glycogen concentration in animals. It was necessary, therefore, initially to define the anesthetic that could allow the association of the data obtained in tissues with concomitant analyses in blood. It was important to know if the anesthetic used for samples collection could cause haemolysis and/or glycogenolysis in the animals. The studies accomplished during the master's degree are contained in two chapters. In chapter 1 we presented the comparison data of three injectable anesthetics used in experiments with animals, concerning the degree of haemolysis and glycogenolysis after anesthesia. The animals were divided into three groups: Cloral Hydrate (CH), Ketamine + Xylazine (KX), Zoletil 50® (zolazepam and tiletamine) + Xylazine (ZTX). The CH and KX presented serum haemolysis. Only ZTX presents no detectable values. The average value of the hepatic and muscular glycogen concentrations exhibited no significant difference between CH and ZTX. However, the KX presented accentuated glycogenolysis in all tissues. Our data suggest that the anesthetic ZTX seems to be the most appropriate for studies that need simultaneously to quantify the concentration of glycogen and blood markers without interferences. Chapter 2 presented the data of the effect of sugar cane juice comparatively to other carbohydrates solutions supplied after the exhaustion in rats, in the replacement of muscular and hepatic glycogen stores, and in the kinetics of some markers of proteolyses, muscular lesion and inflammation in 48hs of recovery. For that, we divided this study in two experiments. The results presented in the experiment 1 showed that the supplementation with sugar cane was as efficient as maltodextrine to restore the gastrocnemium red and white portions glycogen after 1 h of the exhaustion. The fructose exhibited less pronounced effect. None of the supplements were able to restore the hepatic glycogen significantly. The biochemical parameters and WBC number data analyzed in experiment 2 showed an persistent inflammatory picture associated to muscular damage even after 48h of rest. The supplemented groups with sugar cane and maltodextrine didn't alter the 48h post-exercise response pattern. Their representatives' potentialities reinforce the continuity of the investigations.

Keywords: Glycogen; Cane sugar; Sugar cane juice; Exercise; Maltodextrine.

CAPÍTULO 1

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES ANESTÉSICOS NO GRAU DE HEMÓLISE E NO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO DE RATOS

E. F. A. Machado¹, A.C.R. Normand¹, L. A. S. Nunes¹, R. Brenzikofer², D.V. Macedo¹.

1. Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brasil.
2. Laboratório de Instrumentação em Biomecânica (LIB), Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brasil.

Suporte Financeiro: Capes, CNPq, BIO-100.

Resumo

Muitos estudos que utilizam animais quantificam a concentração do glicogênio hepático e muscular após intervenções variadas. Muitos desses estudos associam dados obtidos em tecidos com análises concomitantes em sangue, porém, utilizam variados tipos anestésicos. Como os agentes anestésicos podem afetar a estrutura e função de órgãos e sistemas biológicos diferentemente, esses efeitos precisam ser mais bem estudados e conhecidos. Nesse contexto, muitos estudos analisam a concentração de glicogênio e outros parâmetros bioquímicos utilizando anestésicos que podem causar hemólise e/ou glicogenólise nos animais, interferindo na interpretação dos resultados. O objetivo do presente estudo foi comparar três anestésicos injetáveis comumente utilizados em experimentos com animais em relação ao grau de hemólise e concentrações musculares e hepáticas de glicogênio em ratos Wistar. Nosso objetivo foi determinar qual desses anestésicos seria o mais adequado para ser utilizado em estudos que necessitem quantificar sem interferências a concentração de glicogênio tecidual e marcadores bioquímicos sanguíneos simultaneamente. Para isso foram utilizados 20 ratos Wistar machos. Esses animais foram divididos em 3 grupos. Em cada grupo utilizou-se um anestésico diferente. Os anestésicos utilizados foram Hidrato de Cloral (CH), Ketamina + Xilazina (KX), Zoletil 50[®] (zolazepam e tiletamina) + Xilazina (ZTX). Após a anestesia profunda do animal retirou-se o sangue para obtenção do soro, o tecido hepático e os músculos gastrocnêmio branco e vermelho. Quantificou-se o grau de hemólise no soro pela concentração de hemoglobina sérica (g/dL) e a concentração de glicogênio hepático e muscular (mmol/kg tec úmido), ambos por métodos espectrofotométricos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os 3 grupos na concentração de hemoglobina sérica. Os grupos dos anestésicos CH e KX exibiram amostras com hemólise. Já o grupo ZTX não apresentou hemólise. Não houve diferença significativa entre os grupos CH e ZTX em relação as concentrações de glicogênio em todos os tecidos, já o grupo KX apresentou glicogenólise acentuada quando comparado aos outros grupos. Os dados apresentados nesse estudo indicaram o anestésico ZTX como o mais apropriado para estudos que utilizem diferentes amostras simultaneamente. Além de não causar glicogenólise e nem hemólise possui custo acessível, foi facilmente encontrado no mercado veterinário, é de fácil aplicação, induz anestesia profunda rapidamente e apresentou baixo índice de mortalidade.

Palavras-chaves: Anestésicos, Ratos, Glicogênio, Hemólise, Zoletil, Ketamina.

Introdução

Muitos estudos na literatura que utilizam animais quantificam a concentração do glicogênio hepático e muscular após intervenções variadas tais como diferentes dietas, exercícios físicos, eletroestimulação, administração de medicamentos, suplementos nutricionais, etc (NAKATANI, 1997; FRANCH, 1999; RAJA, 2003; DURIGAN, 2006; GUELF, 2006). Muitos desses estudos associam dados obtidos em tecidos com análises concomitantes em sangue.

Um dado que chama atenção nos diferentes estudos com animais é que os mesmos utilizam variados tipos de anestésicos, desde inalatórios até injetáveis pelas vias intraperitoneal, intramuscular ou intravenosa para a coleta das diferentes amostras. Como os agentes anestésicos podem afetar a estrutura e função de órgãos e sistemas biológicos diferentemente, esses efeitos precisam ser mais bem estudados e conhecidos.

Dentre os vários interferentes pré-analíticos que afetam a qualidade das amostras de sangue, a hemólise merece destaque. A hemólise é definida como a liberação de constituintes celulares no plasma ou soro. Ela é reconhecida pela aparência avermelhada nessas amostras após a centrifugação, causada pela liberação de hemoglobina (Hb) dos eritrócitos no plasma, podendo ocorrer *in vitro* ou *in vivo* (GUDER, 2003). Concentrações acima de valores limite de Hb no soro podem causar interferências na leitura de diferentes análises bioquímicas. Para o soro humano, esses valores já são conhecidos (SOONTAG, 1986).

Embora as mortes por decapitação e deslocamento cervical sejam mais rápidas e, portanto, menos estressante para os animais, esses protocolos não são recomendados para estudos que

quantificam o glicogênio, devido à ocorrência de uma rápida depleção do glicogênio muscular *post-mortem* (BENDALL, 1973; CALDER, 1990).

O barbitúrico pentobarbital é um dos anestésicos mais utilizados nos estudos sobre o metabolismo do glicogênio. Sua principal vantagem é o baixo custo. No entanto, apresenta depressão respiratória e baixo efeito analgésico (FIELD, 1993). Além disso, freqüentemente ocorre parada respiratória no animal antes mesmo do início da cirurgia (BAUM, 1985; ROLLIN, 1990). O efeito nos parâmetros bioquímicos logo após a administração dos barbitúricos tiopental e pentobarbital também não está totalmente esclarecido (GONZALEZ GIL, 2005). Há ainda estudos mostrando que esses anestésicos interferem no metabolismo do glicogênio logo após sua administração (BRUNNER, 1965; NYFELER, 1985; LANG, 1987; PENICAUD, 1987). Outro anestésico injetável muito utilizado nos estudos com animais é o hidrato de cloral, mas também exhibe efeitos como depressão cardiovascular e respiratória além de causar acidose sanguínea (FIELD, 1993).

Dois anestésicos dissociativos injetáveis muito utilizados são a ketamina e a tiletamina. A ketamina é um anestésico com propriedades analgésicas, mas que parece afetar o sistema cardiovascular (HEAVNER, 1997). A tiletamina é um anestésico mais potente do que a ketamina e é utilizado em associação com o zolazepam, que é um tranquilizante similar ao diazepam (THURMON, 1988; LIN, 1993). Esses dois anestésicos dissociativos são geralmente utilizados em conjunto com a xilazina. A xilazina tem efeito analgésico, sedativo e relaxante muscular (POPILSKIS, 1991; LIN, 1993).

O éter, o halotano e o isoflurano são os anestésicos inalatórios mais utilizados em experimentos com animais que quantificam a concentração de glicogênio. No entanto, a concentração inalada de éter

não é mensurada nos estudos (MURAKAMI, 1997; FLUCKIGER-ISLER, 1994). Esse composto, além de ser extremamente perigoso por ser inflamável e explosivo induz várias respostas inflamatórias (ROLLIN, 1990). O isoflurano e o halotano são anestésicos líquidos, voláteis, que parecem não interferir no metabolismo do glicogênio *in vivo* (MUSCH, 1989; FERREIRA, 1998). Porém, para uma inalação correta é necessário um aparelho vaporizador específico, com calibrador de gás, que possui um alto custo no mercado (WAYNFORTH, 1994).

O objetivo do presente estudo foi comparar três anestésicos injetáveis comumente utilizados em experimentos com animais em relação ao grau de hemólise e concentrações musculares e hepáticas de glicogênio em ratos Wistar. Nosso objetivo foi determinar qual desses anestésicos seria o mais adequado para ser utilizado em estudos que necessitem quantificar sem interferências a concentração de glicogênio tecidual e marcadores bioquímicos sanguíneos simultaneamente.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar, machos, com peso entre 330-440 g. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas e acomodados em biotério climatizado a 25° C (± 1), com controle de ciclo de luz claro:escuro de 12 horas invertido, com dieta padrão (ração Nuvital - Nuvilab CR-1 Autoclavável) e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IB - Universidade Estadual de Campinas – (Protocolo 1565-1).

As concentrações anestésicas utilizadas foram testadas em experimento piloto, para que o tempo de indução à anestesia profunda não ultrapassasse 15 minutos. Os animais foram divididos

aleatoriamente, no dia do experimento, em 3 grupos submetidos a diferentes anestésias: Hidrato de cloral, 600 mg/kg peso, via IP, n=6 (CH); Cloridrato de ketamina, 100 mg/kg peso + Cloridrato de Xilazina, 11 mg/kg peso, via IP, n=6 (KX); Zoletil 50[®], 50mg/kg peso + Cloridrato de Xilazina, 11 mg/kg peso, via IM, n=8 (ZTX). O anestésico Zoletil 50[®] (Virbac do Brazil, Jurubatuba, São Paulo) utilizado é composto por 1:1 (125 mg: 125 mg) de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam. Os ratos foram pesados antes da anestesia para o cálculo do volume do anestésico a ser injetado.

Todos os animais foram sacrificados no mesmo período do dia, entre 9:00 - 11:00 h para evitar erros devido a possíveis interferências hormonais no metabolismo de glicogênio (CONLEE, 1976; SAUBERT, 1983).

Coleta e análise de sangue e tecidos

Após serem pesados os animais dos três grupos foram anestesiados com seus respectivos anestésicos e permaneceram em gaiolas individuais até a anestesia profunda. As diferentes soluções foram injetadas pelas vias intraperitoneal ou intramuscular (quadríceps). Os reflexos monitorados foram o corneal, auricular, pinçamento abdominal, caudal e pedal. Mensurou-se o tempo necessário para a completa anestesia e então se iniciou a cirurgia com a abertura da caixa torácica do animal. O sangue total foi coletado por punção cardíaca no ventrículo esquerdo, sendo armazenado em tubos Vacuette (Greiner Bio-One) com gel separador e imediatamente centrifugados a 1800 g, 4° C, 10 minutos para a obtenção do soro. Imediatamente após a retirada do sangue iniciou-se a retirada dos tecidos. Foram coletados 35-50 mg de amostras do fígado e das diferentes porções do músculo gastrocnêmio, branco e vermelho. Os tecidos foram colocados em microtubos, pesados e

imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos em biofreezer a -80°C até a quantificação do glicogênio.

O grau de hemólise do soro foi determinado pela concentração de hemoglobina (g/dL), pelo método espectrofotométrico de cianeto de hemoglobina, que utiliza o reagente de Drabkin (MORRIS, 1999). A quantificação da concentração de glicogênio hepático e muscular foi feita também por espectrofotometria, pelo método fenol-sulfúrico proposto por Lo e colaboradores (1970).

Análise estatística

Os valores obtidos estão expressos como médias $\pm$ desvio padrão. Para a análise estatística dos dados foi aplicado ANOVA (análise de variância) one-way e como pós-teste Tukey post hoc, pelo programa estatístico Graphpad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Para todas as análises comparativas foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

A Tabela 1 apresenta o grau de hemólise analisado através da dosagem da concentração de hemoglobina no soro de cada grupo anestesiado.

Tabela 1. Concentração de hemoglobina no soro dos grupos hidrato de cloral (CH), ketamina e xilazina (KX), zoletil e xilazina (ZTX)

	CH	KX	ZTX
Hemoglobina (g/dL)	$0,49 \pm 0,06^a$	$0,19 \pm 0,06^b$	Sem valores ^c

Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,01$)

Os anestésicos CH e KX induziram hemólise sérica, sendo que o CH foi o mais hemolítico. Já o soro do grupo ZTX não apresentou hemólise.

A Figura 1 apresenta a comparação dos valores da concentração de glicogênio hepático nos diferentes grupos de animais anestesiados.

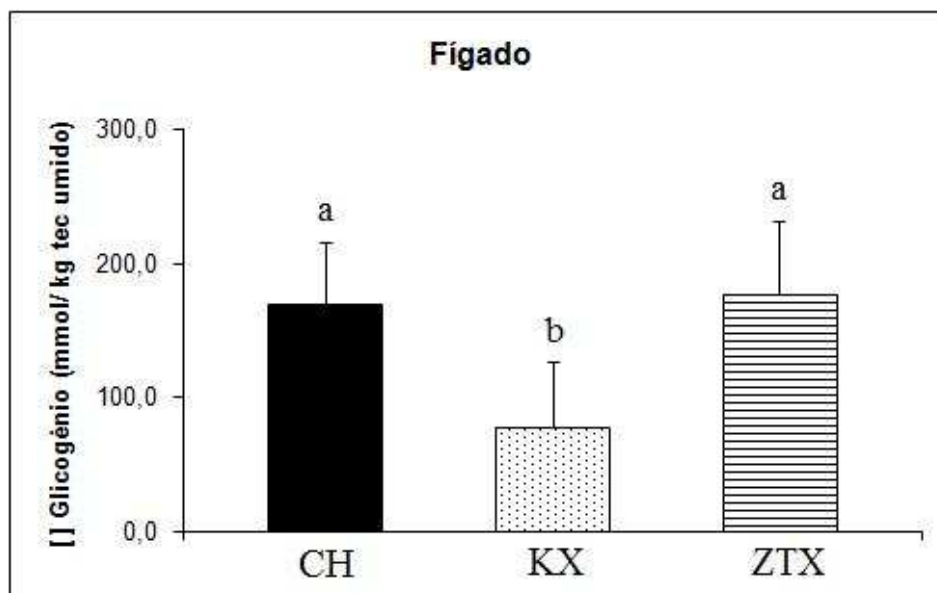
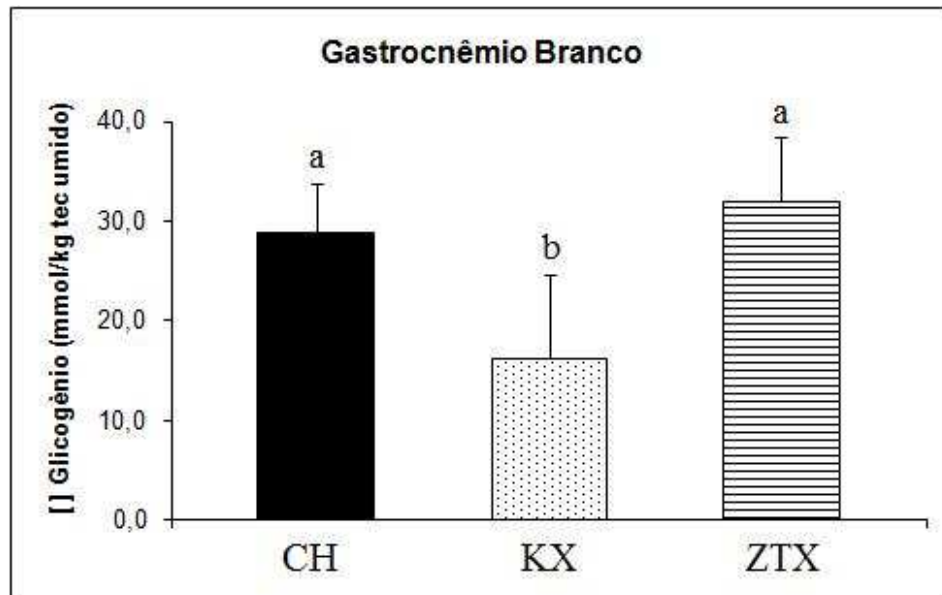


Figura 1. Comparação da concentração de glicogênio hepático (mmol/ kg tecido úmido) entre os diferentes grupos. Animais anestesiados com hidrato de cloral (CH), ketamina e xilazina (KX), zoletil e xilazina (ZTX). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

O valor médio para as concentrações de glicogênio hepático do grupo CH foi de $167,9 \pm 47,8$, do grupo KX de $76,8 \pm 48,9$ e do grupo ZTX de $176,7 \pm 54,4$. Não houve diferença significativa entre os grupos CH e ZTX. Esses grupos apresentaram valores próximos a valores de grupos controle encontrados na literatura (RYAN, 1993; FLÜCKIGER-ISLER, 1994). Comparativamente aos outros dois anestésicos a KX induziu acentuada glicogenólise hepática ($p < 0,05$).

A Figura 2 apresenta a comparação dos valores obtidos da concentração do glicogênio muscular porção branca (A) e porção vermelha (B) nos diferentes grupos estudados.

A



B

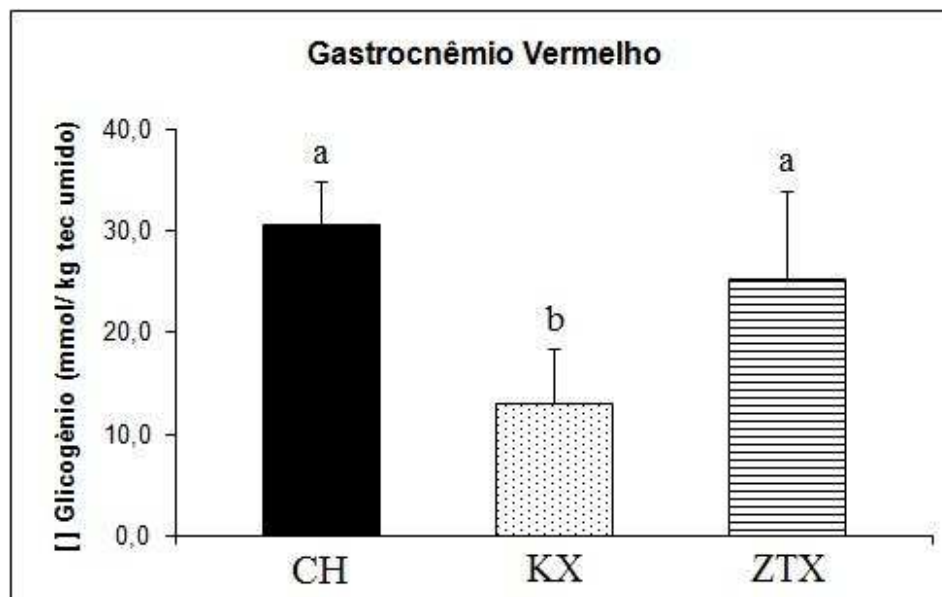


Figura 2. Comparação da concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio branco (mmol/ kg tecido úmido) entre os diferentes grupos (A) e do músculo gastrocnêmio vermelho (B). Animais anestesiados com hidrato de cloral (CH), ketamina e xilazina (KX), zoletil e xilazina (ZTX). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

Novamente se observou o mesmo padrão de efeito dos anestésicos nas concentrações de glicogênio nos dois músculos. Somente o grupo anestesiado com KX apresentou valores significativamente mais baixos de glicogênio nesses músculos ($p < 0,05$).

No músculo gastrocnêmio branco (2A) o valor médio encontrado para o grupo CH foi $28,9 \pm 5,0$, grupo KX $16,3 \pm 8,4$ e ZTX $32,0 \pm 6,5$. Para o músculo gastrocnêmio vermelho (2B) o valor médio encontrado para o grupo CH foi $30,5 \pm 4,3$, KX $12,9 \pm 5,3$ e ZTX $25,2 \pm 8,5$.

Discussão

Os resultados apresentados nesse estudo mostraram a comparação de diferentes anestésicos em ratos Wistar em relação ao grau de hemólise e concentrações de glicogênio muscular e hepático após anestesia profunda. Embora a anestesia possa modificar respostas bioquímicas, metabólicas e hormonais (BUSH, 1991; GONZÁLEZ GIL, 2005), poucos estudos têm investigado o efeito de diferentes anestésicos sobre esses parâmetros simultaneamente em animais (COLLADO, 1987; GONZÁLEZ GIL, 2005).

Existem vários estudos na literatura comparando os efeitos cardiovasculares de diferentes anestésicos (SAHA, 2007). Porém, poucos analisam os efeitos em parâmetros bioquímicos de animais. Nosso estudo não quantificou nenhum parâmetro bioquímico e, portanto, não podemos discutir sobre a interferência dos anestésicos na obtenção de determinados parâmetros. Mesmo assim, nossos dados possibilitam a escolha de anestésicos não hemolíticos como o ZTX em estudos que objetivam a análise de parâmetros bioquímicos, uma vez que muitas dessas análises podem sofrer interferências de leitura (SOONTAG, 1986; GRAFMEYER, 1995).

O anestésico CH não apresentou efeito glicogenolítico, corroborando com o estudo de Field e colaboradores (1993). No entanto, apresentou efeito altamente hemolítico nos animais. A concentração média de hemoglobina encontrada nas amostras dos grupos CH foi visível a olho nu e superior ao valor limite de interferência apresentado na literatura para algumas análises bioquímicas em sangue humano (SOONTAG, 1986; GRAFMEYER, 1995).

Sabe-se que o CH é rapidamente metabolizado em tricloroetanol e ácido tricloroacético no sangue e fígado. Esses metabólitos são altamente tóxicos para as células (LIPSCOMB, 1996). O ácido tricloroacético é um ácido forte, precipitante de proteínas e causa peroxidação lipídica das membranas celulares (CELIK, 2008). Essa peroxidação lipídica parece ser a explicação da hemólise tão acentuada encontrada nos eritrócitos dos animais anestesiados com CH em nosso estudo.

O anestésico KX produziu um grau de hemólise menos acentuado quando comparado ao CH, mas em contrapartida apresentou um potente efeito glicogenolítico hepático e muscular. A ketamina parece perturbar a integridade da membrana dos eritrócitos por interagir diretamente com a proteína transportadora de glicose (GLUT-1) do eritrócito, inibindo a entrada de glicose para dentro da célula, podendo torná-la hipotônica, o que explicaria a hemólise (STEPHENSON, 2000). Já o efeito glicogenolítico pode estar relacionado ao aumento da liberação de catecolaminas pela ativação do sistema nervoso simpático que parece ocorrer logo após a administração dessa droga, ou por ação direta do anestésico em alguma enzima do metabolismo do glicogênio (IVANKOVICH, 1974). A xilazina, agonista alfa-2 adrenérgico, pode causar hiperglicemia em alguns animais, podendo contribuir com a ação glicogenolítica da ketamina quando associadas.

Rodrigues e colaboradores (2006) encontraram valores de glicose sanguínea bem mais elevados em ratos anestesiados com KX quando comparados com ratos anestesiados com CH, sugerindo glicogenólise. Ao contrário do encontrado em nosso estudo, Musch e colaboradores (1989) não verificaram alterações nas concentrações de glicogênio após administração com KX, porém o método de indução à anestesia profunda consistiu em uma menor concentração de anestésico (ketamina: 50mg/kg peso e xilazina: 3mg/kg peso) aliado a uma manutenção por vaporização de gases (70% óxido nítrico e 30% oxigênio). Talvez essa menor concentração ou tal metodologia tenha promovido uma menor ativação do sistema nervoso simpático ou promovido respostas menos acentuadas.

A combinação tiletamina-zolazepam-xilazina do anestésico ZTX mostrou-se a mais adequada entre os anestésicos testados. Apesar da tiletamina sozinha apresentar ativação do sistema nervoso simpático e tendência à atividade convulsiva (KOHN, 1997), e a xilazina ser um agonista alfa-2 adrenérgico, essas drogas associadas ao zolazepam, que possui propriedades anticonvulsivas, ansiolítica, sedativa-hipnótica e de relaxante muscular (LIN, 1993; KOHN, 1997) foram muito eficientes. Não induziram nem hemólise nem glicogenólise imediatamente após a anestesia profunda. A combinação tiletamina-zolazepam tem sido utilizada e estudada como tranqüilizante para imobilizar animais silvestres (SWEITZER, 1997). Há tempos estudos têm mostrado sua efetividade na anestesia de ratos e outros animais (SILVERMAN, 1983; FORSYTHE, 1992; LIN, 1993).

Em um estudo comparativo entre os anestésicos ketamina-xilazina, pentobarbital e tiletamina-zolazepam esse último apresentou efeitos cardiovasculares mínimos em ratos quando comparados aos outros (SAHA, 2007). Em outro estudo foi mostrado que o anestésico ketamina-xilazina apresentou taxas respiratórias e de pressão parcial arterial de O₂ maiores do que a tiletamina-zolazepam-xilazina (POPILSKIS, 1991).

Nesse estudo utilizamos o anestésico comercial Zoletil 50[®], que é formado pela combinação dessas duas drogas e acrescentamos a xilazina, já que estudos mostraram que as respostas com essa administração conjunta causavam uma anestesia profunda, analgesia, sedação e relaxamento muscular eficientes para uma ação cirúrgica (FORSYTHE, 1992; LIN, 1993; KO, 1995; SWEITZER, 1997). Além de melhorar as respostas à anestesia e não apresentar glicogenólise acentuada nessa associação, a xilazina contribuiu também na diminuição do custo final, pois diminuiu a concentração utilizada de Zoletil 50[®] por animal.

Os dados apresentados no presente estudo mostraram que o anestésico ZTX parece ser o mais apropriado para laboratórios de pesquisa com animais que não possuem vaporizador específico para anestesia via inalatória. Além de não causar glicogenólise e nem hemólise possui custo acessível, é facilmente encontrado no mercado veterinário, é de fácil aplicação, induz anestesia profunda rapidamente e apresentou baixo índice de mortalidade.

Referências Bibliográficas

1. Baum, D., Halter, J.B., Traborsky, G. J., Porte D., Jr. Pentobarbital effects on plasma catecholamines: temperature, heart rate, and blood pressure. *Am. J. Physiol.* 248 (Endocrinol. Metab. 11): 95-100, 1985.
2. Bendall, J.R. *Post mortem changes in muscle*. In: *The Structure and Function of Muscle* (2nd ed.), edited by G. H. Bourne. New York: Academic Press. 2, 243–309, 1973.
3. Brunner, E.A., Haugaard, N. The effect of thiopental on hepatic glycogen phosphorylase. *J Pharmacol Exp Ther.* 150(1):99-104, 1965.

4. Bush, B.M. *Interpretation of laboratory results for small animal clinicians*. Blackwell Science Ltd., Oxford. 1991.
5. Calder, P.C., Geddes, R. Postmortem glycogenolysis is a combination of phosphorolysis and hydrolysis. *Int. J. Biochem.* 22: 847–856, 1990.
6. Celik, I., Isik, I. Determination of chemopreventive role of *Foeniculum vulgare* and *Salvia officinalis* infusion on trichloroacetic acid-induced increased serum marker enzymes lipid peroxidation and antioxidative defense systems in rats. *Nat Prod Res.* 22(1): 66-75, 2008.
7. Collado, P.S., Pozo-Andrada, M.J., Gonzalez, J., Jiménez, R., Esteller, A. Effect of pentobarbital or urethane on bile secretion and chemical composition of blood in the rabbit. *Lab. Anim.* 21: 11-17, 1987.
8. Conlee, R.K., Rennie, R.K., Rennie, R.M., Winder, W.W. Skeletal muscle glycogen content: diurnal variation and effects of fasting. *Am. J. Physiol.* 231: 614-618, 1976.
9. Durigan, J.Q., Cancelliero, K.M., Dias, C.K.N., SILVA, C.A., Guirro, R.R.J., Polacow, M.L.O. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. *Rev. Bras. Fisioter.* 10(3): 297-302, 2006.
10. Ferreira, L.D.M.C.B., Palmer, T.N., Fournier, P.A. Prolonged exposure to halothane and associated changes in carbohydrate metabolism in rat muscles in vivo. *J. Appl. Physiol.* 84, 1470-1474, 1998.
11. Field, K.J., White, W.J., Lang, M.C. Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Lab. Ani.* 27, 258-269, 1993.

12. Fluckiger-Isler, R., Mörikofer-Zwez, S., Kahn, J.M. Walter, P. Dietary components of malt extract such as maltodextrins, proteins and inorganic salts have distinct effects on glucose uptake and glycogen concentrations in rats. *J Nutrition*. 124(9):1647-1653, 1994.
13. Forsythe, D.B., Payton, A.J., Dixon, D., Myers, P.H., Clark, J.A., Snipe, J.R. Evaluation of Telazol-xylazine as an anesthetic combination for use in Syrian hamsters. *Lab. Anim. Sci.* 42(5):497-502, 1992.
14. Franch, J., Aslesen, R., Jensen, J. Regulation of glycogen synthesis in rats skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Biochem. J.* 344:231-235, 1999.
15. Gonzalez Gil, A., Silvan, G., Illera, J.C. Effects of barbiturate administration on hepatic and renal biochemical parameters in New Zealand white rabbits. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 44 (6): 43-45, 2005.
16. Grafmeyer, D., Bondon, M., Manchon, M., Levillain, P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. Results of an interlaboratory study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 33(1):31-52, 1995.
17. Guder, W.G., Narayanan, S., Wisser H., Zawta, B. *Samples: From de Patient do the Laboratory*. Wiley-VCH. 3ed. Darmstadt. 2003.
18. Guelfi, K.J., Casey, T.M., Giles, J.J., Fournier, P.A., Arthur, P.G. A proteomic analysis of the acute effects high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clin, Exp. Pharm. Physiol.* 33, 952–957, 2006.

19. Heavner, J. E. *Pharmacology of analgesics*, p.8, 10. In Kohn, D.F., Wixson, S.K., White, W.J., Benson, G.J. (ed.). *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. New York: Academic Press, 1997.
20. Ivankovich, A.D., Miletich, D.J., Reimann, C., Albrecht, R.F., Zahed, B. Cardiovascular effects of centrally administered ketamine in goats. *Anesth Analg*. 53 (6), 924–933, 1974.
21. Ko, J.C., Williams, B.L., Rogers, E.R., Pablo, L.S., McCaine, W.C., McGrath, C.J. Increasing xylazine dose-enhanced anesthetic properties of telazol-xylazine combination in swine. *Lab. Anim. Sci*. 45(3):290-294, 1995.
22. Kohn, D.F., Wixson, S.K., White, W.J., Benson, G.J. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. New York: Academy Press, 1997.
23. Lang, C.H., Bagby, G.J., Hargrove, D.M., Hyde, P.M., Spitzer, J.J. Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. *Am. J. Physiol*. 253 (Endocrinol. Metab. 16):657–663, 1987.
24. Lin HC, Thurmon JC, Benson, GJ, Tranquilli, WJ. Telazol- a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Therap*. 16: 383-418, 1993.
25. Lipscomb, J.C., Mahle, D.A., Brashear, W.T., Garrett, C.M. A species comparison of chloral hydrate metabolism in blood and liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 227 (2): 340-350, 1996.
26. Lo, S., Russel, J.C., Taylor, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol*. 28(2): 234-236, 1970.
27. Morris, M. W., Davey, F. R. *Exame básico de sangue*. In Henry, J.B. *Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais* (19^a ed). São Paulo: Manole, 1999.

28. Murakami, T., Shimomura, Y., Fujitsuka, N., Sokabe, M., Okamura, K., Sakamoto, S. Enlargement of glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 82(3): 772-775, 1997.
29. Musch, T.I., Warfel, B.S., Moore, R.L., Larach, D.R. Anesthetic effects on liver and muscle glycogen concentrations: rest and post exercise. *J. Appl. Physiol.* 66: 2895-2900, 1989.
30. Nakatani, A., Han, D.H., Hansen, P.A., Nolte, L.A., Host, H.H., Hickner, R.C., Holloszy, J.O. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J. Appl. Physiol.* 82: 711-715, 1997.
31. Nyfeler, F., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, S.J. Effect of pentobarbital on fructosa 2,6 bisphosphate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 249 (Endocrinol. Metab. 12): 525-533, 1985.
32. Penicaud, L., Ferre, P., Kande, J., Leturque, A., Issad, T., Girard, J. Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. *Am. J. Physiol.* 252 (Endocrinol. Metab. 3): 365-369, 1987.
33. Popilskis, S.J., OZ, M.C., Gorman, P., Florestal, A., Kohn, D.F. Comparison of xylazine with tiletamina-zolazepam (Telazol) and xylazine-ketamine anesthesia in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 41(1): 51-53, 1991.
34. Raja, G., Brau, L., Palmer, T.N., Fournier, P.A. Repeated bouts of high-intensity exercise and muscle glycogen sparing in the rat. *J. Exp. Biol.* 206, 2159-2166, 2003.
35. Rodrigues, S.F., de Oliveira, M.A., Martins, J.O., Sannomiya, P., Tostes, R.C., Nigro, D., Carvalho, M.H., Fortes, Z.B. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci.* 20, 79(17):1630-1637, 2006.

36. Rollin, B.E., Kesel, M.L. *The experimental animal in biomedical research*. 1: A survey of scientific and ethical issues for investigators. Florida: Crc Press, 1990.
37. Ryan, C., Ferguson, K., Radziuk, J. Glucose dynamics and gluconeogenesis during and after prolonged swimming in rats. *J Appl Physiol*. 74(5):2404-11, 1993.
38. Saha, D.C., Saha, A.C., Malik, G., Astiz, M.E., Rackow, E.C. Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, penthobarbital, and ketamine-xylazine in male rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 46(2):74-80, 2007.
39. Saubert, C.W, Armstrong, R.B. Hormonal influence on diurnal glycogen rhythms in rats skeletal muscles. *J. Exp. Biol*. 102: 285-293, 1993.
40. Silverman, J., Huhndorf, M., Balk, M., Slater, G. Evaluation of a combination of tiletamine and zolazepam as an anesthetic for laboratory rodents. *Lab Anim Sci*. 33(5):457-460, 1983.
41. Sonntag, O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem*. 24(2):127-39, 1986.
42. Stephenson, K.N., Croxen, R.L., El-Barbary, A., Fenstermacher, J.D., Haspel, H.C. Inhibition of glucose transport and direct interactions with type 1 facilitative glucose transporter (GLUT-1) by etomidate, ketamine, and propofol. A comparison with barbiturates. *Biochem Pharmacol*. 60(5): 651-659, 2000.
43. Sweitzer, R.A., Ghneim, G.S., Gardner, I.A., Van Vuren, D., Gonzales, B.J., Boyce, W.M. Immobilization and physiological parameters associated with chemical restraint of wild pigs with Telazol and xylazine hydrochloride. *J Wildl Dis*. 33(2):198-205, 1997.

44. Thurmon, J.C., Benson, J.G., Tranquilli, W.J., Olson, W. A. The anesthetic and analgesic effects of Telazol and xylazine in pigs: Evaluating clinical trials. *Vet Med.* 83:841-845, 1988.
45. Waynforth, H.B., Flecknell, P.A. *Experimental and Surgical Technique in the rat.* v. 2, London: Academic Press, 1994.

CAPÍTULO 2

SUPLEMENTAÇÃO COM CALDO DE CANA DE AÇÚCAR COMPARADO A OUTROS CARBOIDRATOS NA REPOSIÇÃO DO GLICOGÊNIO E CINÉTICA DE MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR E INFLAMAÇÃO PÓS-EXERCÍCIO AGUDO EM RATOS.

Machado, EFA; Normand, ACR; Nunes, LAS; Macedo, DV.

Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brasil.

Suporte Financeiro: CNPq, BIO 100

RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos do caldo de cana comparativamente a outras soluções de carboidratos ministradas imediatamente após um protocolo de exercício exaustivo em ratos na repleção dos estoques de glicogênio, e na cinética de alguns marcadores de proteólise, lesão muscular e inflamação nas primeiras 48h de recuperação. O estudo foi dividido em 2 experimentos, que utilizaram ratos submetidos ao mesmo protocolo de exercício, sempre precedido por 24h de jejum. No primeiro experimento foi analisada a capacidade de reposição do glicogênio hepático e muscular após 1h do exercício exaustivo e gavagem com as diferentes soluções de carboidratos ou água. Os animais foram divididos em 7 grupos: Controle sem jejum e sem exercício (CO); Jejum 24h + exercício (JEX) e grupos JEX com gavagem de água (AG); frutose (F); maltodextrina (M) e caldo de cana em duas diferentes concentrações (CC1 e CC2). Os animais foram sacrificados após 1h de descanso, sendo quantificadas as concentrações de glicogênio hepático e do músculo gastrocnêmio, porções vermelha e branca. Os resultados mostraram que a suplementação com caldo de cana foi tão eficiente quanto à maltodextrina para restaurar significativamente os estoques de glicogênio muscular 1h após a exaustão. Já a frutose praticamente não alterou as concentrações de glicogênio muscular pós-exercício. Nenhum suplemento foi capaz de repor, significativamente, o glicogênio hepático ($p>0,05$). No experimento 2 foi analisada a cinética de alguns parâmetros bioquímicos (uréia, CK, albumina e urato) e a contagem do número de leucócitos totais (WBC) nas primeiras 48h de recuperação pós-exercício na ausência ou presença de suplementações. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: CO, JEJUM, ÁGUA, MALTO e CALDO. Os grupos exercitados suplementados foram analisados nos momentos 3h, 6h, 24h e 48h pós-exercício. Os dados apresentados indicaram que o exercício agudo induziu dano muscular acompanhado de resposta inflamatória, sem um estado catabólico mais acentuado. Houve também um nível maior de estresse oxidativo pós-exercício. Nossos dados mostraram que nenhuma das suplementações foi capaz de alterar a resposta nas primeiras 48h pós-exercício. Os grupos suplementados com carboidratos apresentaram valores ligeiramente inferiores nos primeiros momentos (3h) na análise de CK e uréia em relação ao grupo água, porém sem diferenças significativas, sugerindo um possível efeito protetor pelos carboidratos. As potencialidades dos constituintes do caldo de cana e a escassez de estudos científicos com o objetivo de utilizá-lo como recurso ergogênico no esporte reforçam a continuidade dessas investigações.

Palavras-chaves: Glicogênio, caldo-de-cana de açúcar, exercício físico, maltodextrina, CK, WBC

INTRODUÇÃO

O exercício físico é capaz de induzir microtraumas na musculatura e estruturas envolvidas com a mecânica do movimento (CHEVION, 2003; FLUCK, 2006). Nesse caso, para o reparo e regeneração das estruturas danificadas, há a necessidade de um período adequado de descanso, durante o qual ocorre um conjunto de respostas agudas. Essas incluem aumentos nos níveis de marcadores de estresse oxidativo e resposta inflamatória, em conjunto com a ação de hormônios e outras moléculas sinalizadoras (BASSEL-DUBY, 2006). Essas respostas têm como objetivo a manutenção homeostática do organismo estimulado após uma única sessão ou após diversas sessões de esforços físicos.

O processo adaptativo envolve a ativação de vias de sinalização intracelulares e subsequente ativação gênica que pode resultar em alterações na massa muscular, nas propriedades contráteis e nas respostas metabólicas (TOIGO, 2006). Essa sinalização protéica é dependente das características dos exercícios físicos aplicados. Quando os exercícios são realizados de forma constante e sistematizada induzem aumento no rendimento de capacidades biomotoras diversas (HAWLEY, 2006). Dentre os estímulos ativadores das vias de transdução de sinal encontra-se o próprio estresse mecânico, gerador de uma série de micro-traumas, que sinaliza uma resposta inflamatória local para o reparo; aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , alterações do estado redox celular (aumento na produção de espécies reativas de oxigênio – EROs), alterações hormonais, diminuição da concentração de ATP e substratos energéticos como glicogênio e fosfocreatina (GIBALA, 1995).

O glicogênio muscular é o principal combustível para o trabalho muscular, pois é o único capaz de contribuir para a produção de ATP tanto pela via anaeróbica (3 ATPs) quanto aeróbica (39 ATPs). Estoques maiores de glicogênio muscular antes do exercício parecem estar associados com a melhora do rendimento e capacidade de manter força e potência, um critério normalmente utilizado para definir

fadiga (MACLAREN, 1989). Já a depleção, parcial ou total, de glicogênio pré-exercício parece afetar negativamente o desempenho em exercícios físicos moderados ou intensos (IVY, 1991; BALSOM, 1999). Restaurar os estoques de glicogênio muscular, após uma ou mais sessões de treino, tem sido proposto como um dos fatores mais importantes para a recuperação pós-esforço (JENTJENS, 2003). Porém, a restauração completa depende da extensão da depleção, do fornecimento de carboidratos no tempo correto e do tipo de carboidrato consumido (IVY, 1999).

Um aumento na oferta de glicose na corrente sanguínea sinaliza a liberação de insulina pelo pâncreas, hormônio responsável por estimular a síntese e inibir a degradação do glicogênio, através da ativação da enzima glicogênio sintase e inativação da enzima glicogênio fosforilase. A velocidade de absorção e conseqüente extensão com que os carboidratos ingeridos aumentam a glicemia influenciam a taxa de secreção de insulina. Essa ação levou à classificação funcional dos carboidratos dos alimentos em relação ao seu Índice Glicêmico (IG), glicemia induzida pela ingestão de alimento com 50 g de carboidrato, comparada com a glicemia atingida após ingestão de 50 g de glicose (LUDWIG, 2000). De acordo com a resposta da glicemia, os carboidratos da dieta vêm sendo classificados como de alto, moderado ou baixo IG (LAZARIM, 2009).

A captação da glicose plasmática e seu armazenamento como glicogênio pelas células hepáticas não são diretamente dependentes da ação da insulina. Já a captação de glicose pelas fibras musculares depende de insulina. Isso porque os transportadores de glicose nos músculos (GLUT-4) ficam armazenados em vesículas no interior do citosol. Para migrarem para o sarcolema dependem da interação insulina-receptor e respectiva sinalização intracelular. Uma vez no sarcolema os GLUT-4 permitem a entrada de glicose e seu posterior armazenamento como glicogênio na musculatura. No entanto, estudos mostram que a própria atividade contrátil e a depleção dos estoques de glicogênio

sinalizam uma fase rápida e transiente de captação de glicose por também estimularem a migração dos GLUT-4 para o sarcolema (GOODYEAR, 1998). Essa fase começa imediatamente após o término do exercício, dura aproximadamente de 30 a 60 minutos e pode ser otimizada com a ingestão de carboidratos imediatamente após o esforço físico, sendo conhecida como fase rápida de captação de glicose (MAEHLUM, 1977; PRICE, 1994). O glicogênio sintetizado nessa fase é de pequena densidade e chamado de proglícogênio (ADAMO, 1998). Seguindo essa fase rápida, a síntese de glicogênio acontece numa velocidade muito mais lenta, necessitando da presença de carboidratos e altos níveis de insulina (IVY, 1991).

A fase lenta é caracterizada por um aumento marcado na sensibilidade à insulina tanto dos GLUT-4 como da enzima glicogênio sintase (CARTEE, 1990). Dependendo da quantidade consumida de carboidratos e da magnitude da concentração de glicogênio a sensibilidade à insulina no músculo pode ficar aumentada por um longo período de tempo ($> 48h$) (CARTEE, 1990). O glicogênio formado nessa fase possui grande densidade e por isso é chamado de macroglícogênio (ADAMO, 1998).

Está bem documentado na literatura que a ingestão de carboidratos de moderado a alto IG (na concentração de $0,7 - 1,5$ g/kg de peso corporal) em intervalos freqüentes (15 a 60 minutos) durante um período de recuperação de 3 a 4 h permite uma maior reposição de glicogênio (JENTJENS, 2003). Normalmente, na prática desportiva, são utilizados monossacarídeos (frutose) ou amidos (glicose) em diluições apropriadas para a reposição do glicogênio pós-treino ou pós-competição. Os açúcares utilizados para esse fim são facilmente encontrados no mercado de suplementos nutricionais, dentre eles os mais conhecidos são a frutose e a maltodextrina.

O caldo de cana é um tipo de bebida muito comum no Brasil. Possui 65% a 75% de água em sua composição média e uma alta concentração de sacarose, que corresponde entre 70% a 91% de seus sólidos solúveis. A cana também contém glicose (2% a 4%), frutose (2% a 4%), sais minerais (K^+ , P, Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+}) (3% a 5%), proteínas (0,5% a 0,6%), amido (0,001% a 0,05%), ceras e lipídios (0,05% a 0,15%), compostos polifenólicos (3% a 5%), vitaminas do complexo B e ascorbato (PATON, 1992; FRANCO, 2001). Embora seja um produto de baixo custo e de boa aceitação pela população, não há estudos na literatura em relação ao seu uso como um recurso ergogênico para a reposição de glicogênio muscular pós-exercício.

O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos do caldo de cana comparativamente a soluções de maltodextrina e frutose, ministrados em uma única dose imediatamente após uma sessão de exercício exaustivo agudo, na reposição dos estoques de glicogênio muscular e hepático, e na cinética de alguns biomarcadores nas primeiras 48h de recuperação pós-esforço.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi dividido em 2 experimentos, que utilizaram ratos submetidos ao mesmo protocolo de exercício, sempre precedidos de jejum de 24h.

Animais

Foram utilizados 78 ratos Wistar machos para o 1º experimento e 92 ratos Wistar machos para o 2º experimento, com peso entre 300 - 440 g. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp, e acomodados em biotério climatizado a 25° C (± 1), com controle de ciclo de luz claro:escuro de 12 horas invertido, com dieta padrão (ração Nuvital - Nuvilab CR-1 Autoclavável) e

água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo 1565-1).

Protocolo de exercício exaustivo e gavagem das diferentes suplementações

Utilizamos o protocolo proposto por Nikolovski e colaboradores (1996) com algumas modificações. Os animais permaneceram por 24 horas em jejum prévio ao exercício, a fim de facilitar a depleção do glicogênio hepático e diminuir o tempo de exaustão dos animais (RAJA, 2004; GUELFI, 2006), sendo pesados imediatamente antes do exercício. Com o peso calculou-se o volume de anestesia, das soluções de gavagem e peso do chumbo correspondente a uma sobrecarga de 10% da massa corporal. O chumbo foi então colocado em uma mochila, fixando-a no tórax dos animais, que nadaram por cerca de 3 minutos até a exaustão, em tanques individuais em uma piscina de vidro com 55cm de largura, 83cm de comprimento e 60cm de profundidade. A temperatura da água foi mantida a 34°C (± 2). A exaustão foi definida no momento em que os animais permaneciam submersos por 10 segundos (McARDLE, 1966).

Imediatamente após a exaustão os animais dos diferentes grupos exercitados receberam as seguintes soluções por gavagem estomacal. Experimento 1: Solução água, 1 ml, (AG); Solução 10% frutose (0,7g CHO/kg peso corporal - F); Solução 10% maltodextrina, (0,7g CHO/ kg peso corporal - M); Solução caldo de cana 1 (0,7 CHO/kg peso corporal - CC1); Solução caldo de cana 2 (1,4 CHO/kg peso corporal - CC2). Experimento 2: Solução água, 1 ml, (água), Solução 10% maltodextrina, (0,7g CHO/ kg peso corporal - malto); Solução caldo de cana 1 (0,7 CHO/kg peso corporal - caldo). Os volumes adicionados por gavagem variaram entre 1–3 ml, dependendo da solução de CHO utilizada e da massa corporal do animal.

Anestesia

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina e Zoletil 50[®] (Virbac do Brazil, Jurubatuba, São Paulo). A concentração utilizada foi 50mg/kg peso + Cloridrato de Xilazina, 11 mg/kg peso, pela via intramuscular. Todos os animais foram sacrificados no mesmo período do dia, entre 9:00 - 11:00 h para evitar erros devido a possíveis interferências hormonais no metabolismo de glicogênio (CONLEE, 1976; SAUBERT, 1983).

Análises estatísticas

Os valores do primeiro experimento foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e os valores do segundo experimento em média $\pm$ desvio padrão da média, para uma melhor análise visual dos gráficos. Para a análise estatística dos dados foi aplicado ANOVA one-way (análise de variância) e Tukey post hoc. Utilizamos o programa estatístico Graphpad Instat 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Para todas as análises comparativas foi adotado, como nível de referência de significância, $p < 0,05$.

Grupos Experimentais: 1º Experimento

Os animais foram divididos aleatoriamente no dia do experimento em 7 grupos, suplementados com diferentes soluções imediatamente pós-exercício: Controle sem jejum e sem exercício, n=13 (CO); Jejum 24h + exercício (JE), n=12; JE + água (AG), n=11; JE + frutose (F), n=10; JE + maltodextrina (M), n=10; JE + caldo de cana 0,7 (CC1), n=12; JE + caldo de cana 1,4 (CC2), n=10. Os animais se recuperaram nas gaiolas sem ter acesso à comida por 60 minutos até serem anestesiados e posteriormente sacrificados.

Coleta e análise de tecidos

Após a anestesia profunda iniciou-se a retirada dos tecidos. Foram coletados 35-50mg de amostra do fígado e do músculo gastrocnêmio branco e vermelho. Os tecidos foram colocados em microtubos, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo mantidos em biofreezer a -80°C. A quantificação da concentração de glicogênio hepático e muscular foi feita por espectrofotometria, pelo método fenol-sulfúrico proposto por Lo e colaboradores (1970).

Grupos Experimentais: 2º Experimento

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: controle, sem jejum e sem exercício (CO n=10); grupo jejum 24h, sem exercício (JEJUM n=10); e mais 12 grupos de animais exercitados com jejum prévio (n=6 em cada grupo): controle com água (ÁGUA) e suplementados com maltodextrina (MALTO) e caldo de cana (CALDO), sacrificados após 3h, 6h, 24h e 48h de recuperação do esforço, período onde receberam água e ração *ad libitum*.

Coleta de sangue e dosagens bioquímicas e hematológicas

O sangue total foi coletado por punção cardíaca do ventrículo esquerdo, sendo 2 ml armazenados em tubos contendo EDTAK₃ marca Vacuette® (Greiner Bio-One) para a contagem do número de leucócitos. O restante do sangue foi armazenado em tubos Vacuette (Greiner Bio-One) com gel separador, sendo imediatamente centrifugados a 1800 g, 4° C, 15 minutos para a obtenção do soro.

Para contagem do número de leucócitos totais (WBC) utilizou-se o aparelho KX-21N Sysmex®. As análises bioquímicas foram realizadas no aparelho automatizado Autolab 18 Boehringer Mannheim com a utilização de kits específicos (Wiener lab, Rosário, Argentina). Os parâmetros

bioquímicos analisados no soro foram: concentração de uréia, atividade da enzima creatina quinase (CK), concentração de albumina e concentração de urato.

RESULTADOS

1º Experimento

A Figura 1 apresenta a concentração do glicogênio hepático mensurada nos animais dos diferentes grupos experimentais.

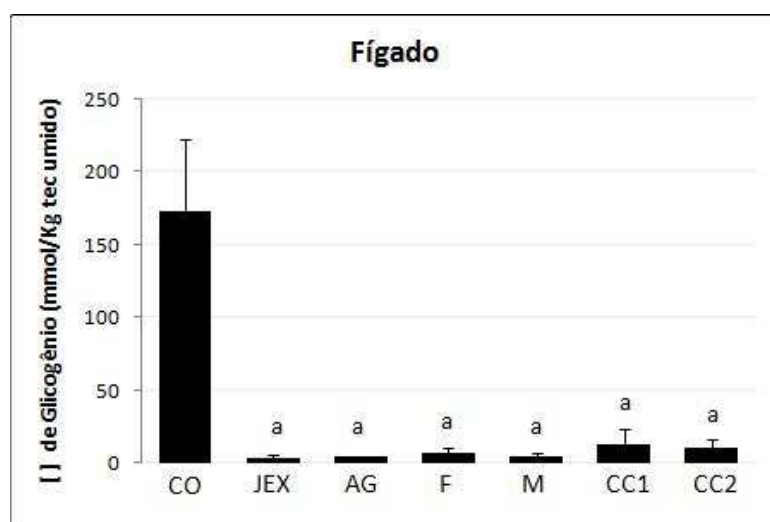


Figura 1. Comparação da concentração de glicogênio hepático (mmol/ kg tecido úmido) entre os diferentes grupos. Controle sem jejum e sem exercício (CO); Jejum 24h + exercício (JEX); Jejum 24h + exercício + água (AG); Jejum 24h + exercício + frutose (F); Jejum 24h + exercício + maltodextrina (M); Jejum 24h + exercício + caldo de cana 0,7 (CC1); Jejum 24h + exercício + caldo de cana 1,4 (CC2). **a** - representa diferença significativa em relação ao grupo CO ($p < 0,05$);

Os valores médios e desvio padrão das concentrações de glicogênio hepático dos grupos estudados foram: 172,9±49,9 (CO); 3,7±1,5 (JE); 4,1±0,6 (AG); 6,6±4,0 (F), 4,6±1,8 (M); 12,9±10,1 (CC1) e 10,2±5,5 (CC2). Os grupos suplementados com diferentes concentrações de caldo de cana apresentaram valores superiores aos demais grupos, embora não significativos ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo CO ($p < 0,05$).

A Figura 2 apresenta a concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção branca (A) e vermelha (B) dos diferentes grupos de animais.

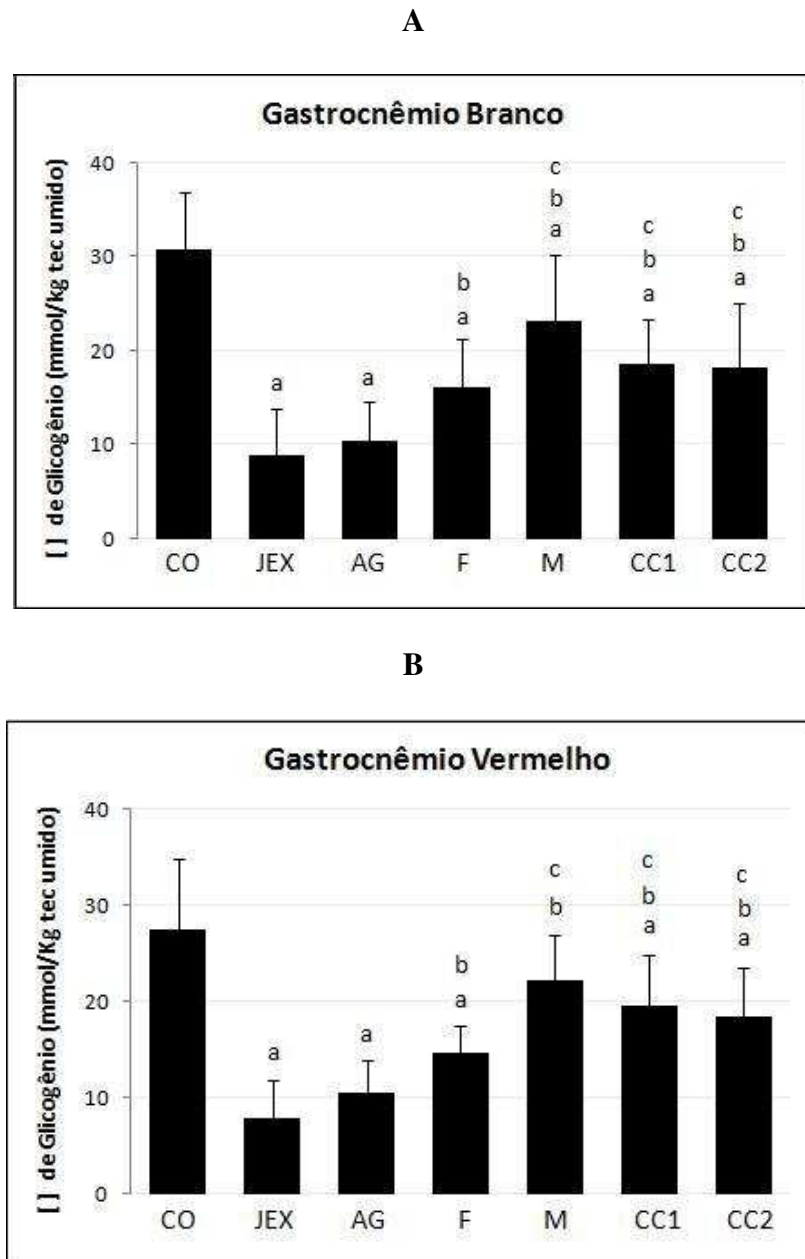


Figura 2. Concentrações de glicogênio do músculo gastrocnêmio branco (A) e vermelho (B) entre os diferentes grupos suplementados (mmol/ kg tecido úmido). Controle sem jejum e sem exercício (CO); Jejum 24h + exercício (JEX); Jejum 24h + exercício + água (AG); Jejum 24h + exercício + frutose (F); Jejum 24h + exercício + maltodextrina (M); Jejum 24h + exercício + caldo de cana 0,7 (CC1); Jejum 24h + exercício + caldo de cana 1,4 (CC2).

a- representa diferença significativa do grupo CO ($p < 0,05$);

b- representa diferença significativa do grupo JEX ($p<0,05$);

c- representa diferença significativa do grupo AG ($p<0,05$).

Observamos uma depleção significativa do glicogênio no grupo JEX em ambos os músculos analisados. O grupo AG não apresentou diferença significativa do grupo JEX comprovando que não houve eficiência na repleção do glicogênio muscular desses grupos. Os grupos M, CC1 e CC2 exibiram concentrações de glicogênio superiores às do grupo JEX e AG ($p<0,05$), embora significativamente menores que as do grupo CO ($p<0,05$). Somente o grupo M apresentou valores próximos aos do grupo controle no músculo gastrocnêmio vermelho. O grupo F exibiu valores de glicogênio superiores ao grupo JEX, mas próximos aos do grupo AG. O grupo AG exibiu somente uma tendência de aumento em relação ao grupo JEX.

2º Experimento

Efeitos do exercício e suplementações no estado catabólico

A Figura 3 apresenta a média e o desvio padrão da média da concentração sérica de uréia nos diferentes grupos.

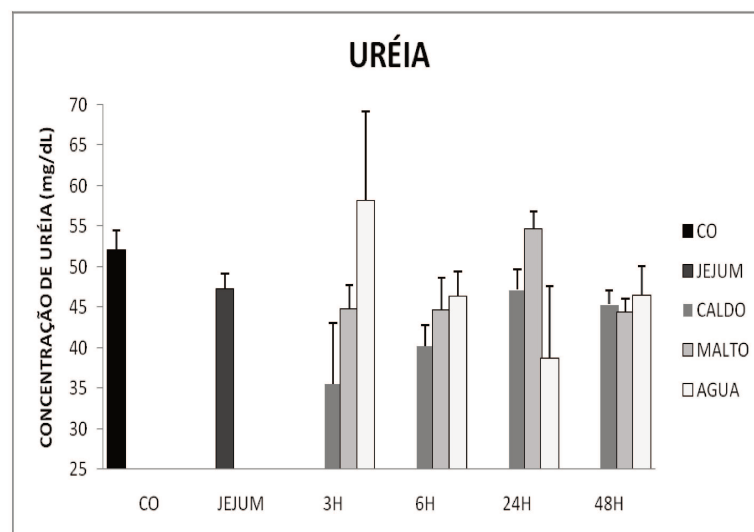


Figura 3. Concentração de uréia no soro (g/dL) dos diferentes grupos analisados e nos diferentes momentos pós-exercício: 3 horas (3H); 6 horas (6H), 24 horas (24H) e 48horas (48H).

Os dados mostraram que o grupo exercitado suplementado com água (ÁGUA) exibiu uma tendência de aumento nas concentrações médias de uréia no momento 3h e volta para valores próximos aos dos grupos CO e JEJUM nos demais momentos (6h, 24h e 48h) pós-recuperação. Esses dados sugerem um estado catabólico ligeiramente superior nos animais exercitados sem suplementação principalmente nos momentos iniciais da recuperação. Os grupos suplementados com MALTO e CALDO exibiram tendência de concentrações médias de uréia sérica menores no momento 3h. Os valores médios do grupo suplementado com caldo foram ligeiramente inferiores a todos os outros grupos nos momentos 3h e 6h. No entanto, é importante ressaltar que não houve diferenças significativas intergrupos nas concentrações séricas de uréia em nenhum dos momentos analisados ($p>0,05$).

Efeitos do exercício e das suplementações nos níveis de lesão muscular e resposta inflamatória

A Figura 4 mostra a atividade da enzima creatina quinase (CK) no soro dos animais dos grupos CO e JEJUM e dos grupos exercitados suplementados com AGUA, MALTO e CALDO nos diferentes tempos de recuperação (3h, 6h, 24h e 48h) pós-exercício.

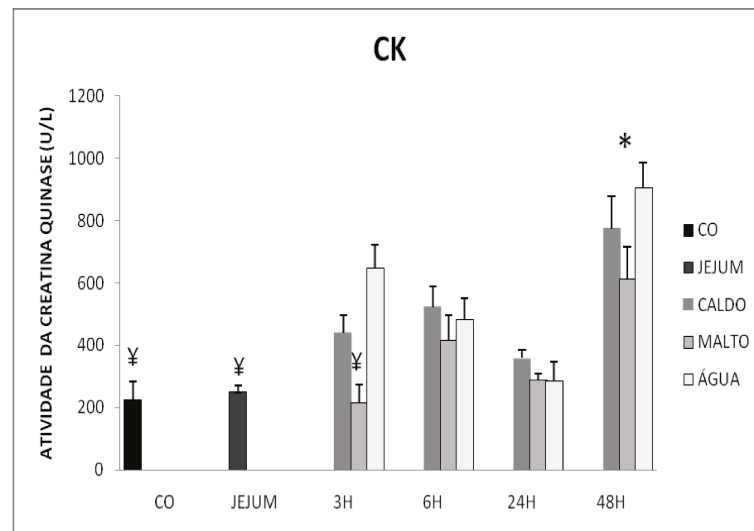


Figura 4. Atividade da CK no soro (U/L) dos diferentes grupos analisados e nos diferentes momentos pós-exercício + gavagem com água, milho ou caldo de cana imediatamente após o exercício, 3 horas (3H), 6 horas (6H), 24 horas (24H) e 48 horas (48H) pós-exaustão.

* Diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos exercitados, no momento 48h, em relação aos grupos controle e jejum.

¥ Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo água momento 3H.

A CK sérica do grupo exercitado controle (ÁGUA) aumentou significativamente em relação aos grupos CO e JEJUM no momento 3h, diminuiu nos tempos 6 h e 24h, voltando a aumentar significativamente no momento 48h pós-exercício. Esses dados sugerem que o dano muscular induzido pelo exercício persistiu mesmo após 48h de descanso. Já os grupos suplementados com MALTO e CALDO exibiram valores menos acentuados de CK no soro nos momentos 3h e 48h que o grupo ÁGUA, especialmente o grupo suplementado com MALTO ($p < 0,05$ para o grupo MALTO 3h). No entanto, as diferenças na média entre os grupos suplementados nos outros momentos não foram significativas. Os grupos exercitados exibiram valores significativamente maiores no momento 48h em relação aos grupos CO e JEJUM ($p < 0,05$).

A Figura 5 apresenta a média e o desvio padrão da média do número de leucócitos totais nos diferentes grupos (A) e das concentrações de albumina sérica (B), uma proteína de fase aguda negativa.

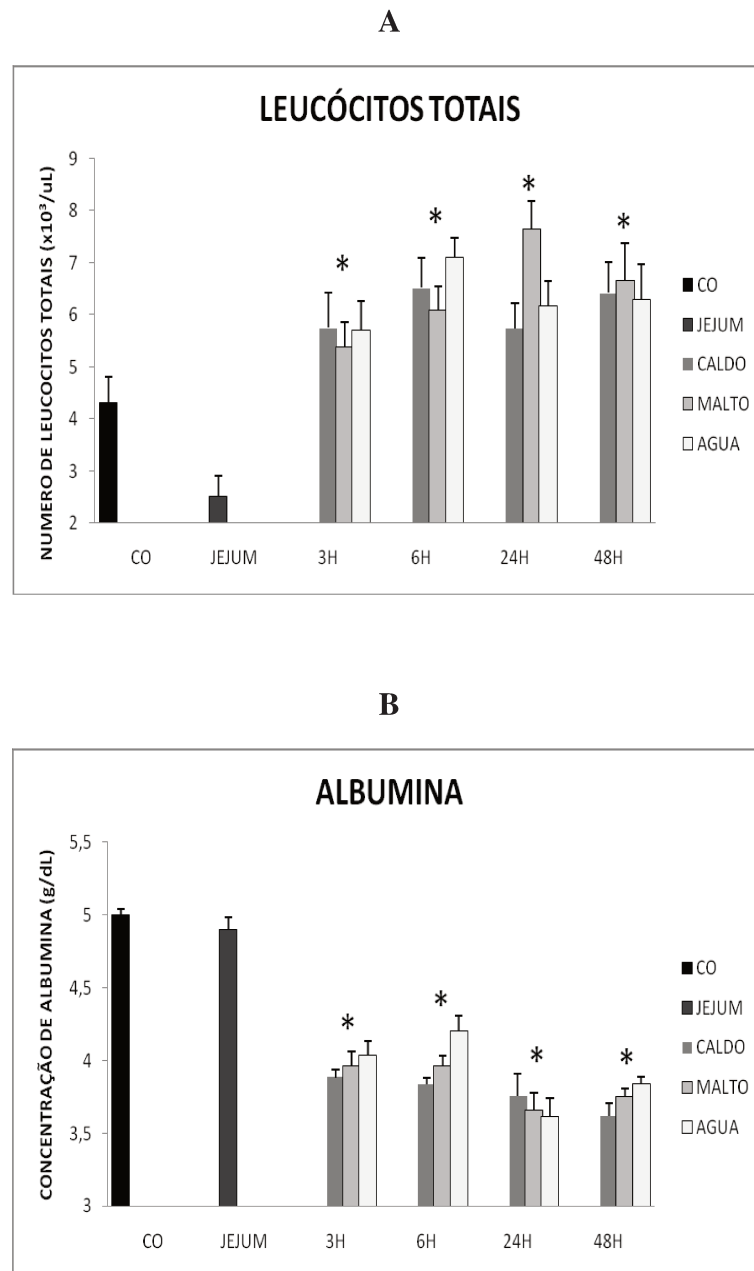


Figura 5. Concentração de glóbulos brancos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) (A) e de albumina sérica (g/dL) (B) dos diferentes grupos analisados e nos diferentes momentos pós-exercício + gavagem: 3 horas (3H); 6 horas (6H), 24 horas (24H) e 48 horas (48H).

* Diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos exercitados, analisados nos determinados momentos, comparativamente aos grupos controle e jejum.

Os grupos CO e JEJUM não exibiram diferenças significativas entre si em nenhum dos parâmetros analisados ($p>0,05$). Porém, houve uma tendência de diminuição no número médio de leucócitos totais no grupo JEJUM quando comparado ao CO. Os grupos exercitados exibiram aumento no número de leucócitos e diminuições nas concentrações de albumina em relação ao CO e JEJUM em todos os momentos analisados ($p<0,05$). Os grupos suplementados com MALTO ou CALDO não foram diferentes do grupo apenas exercitado (ÁGUA) para nenhum desses parâmetros. Esses dados sugerem que a suplementação aguda não alterou o padrão da resposta inflamatória nas 48h subsequentes ao exercício.

Efeitos do exercício e das suplementações na capacidade antioxidante sérica

A Figura 6 apresenta a média e o desvio padrão da média da concentração sérica de urato (mg/dL) como representante da capacidade antioxidante sérica nos diferentes grupos.

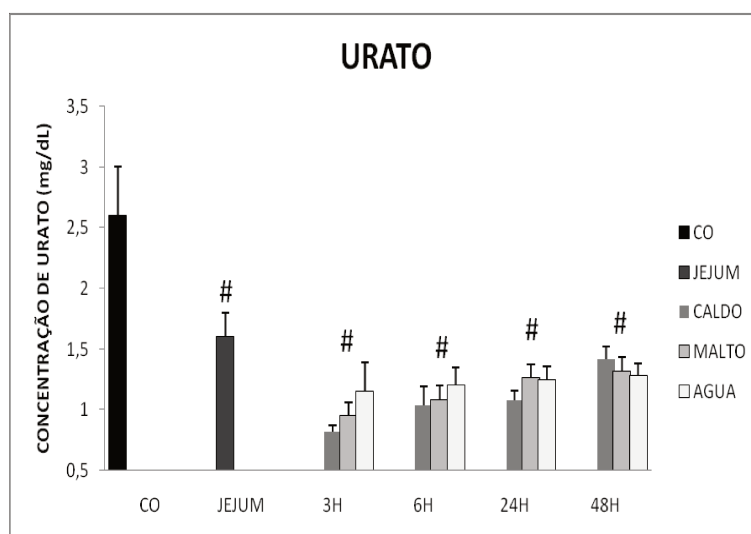


Figura 6. Concentração de urato no soro (g/dL) dos diferentes grupos analisados e nos diferentes momentos pós-exercício + gavagem: 3 horas (3H); 6 horas (6H), 24 horas (24H) e 48horas (48H).

Diferença significativa ($p<0,05$) do grupo jejum e dos grupos exercitados, analisados nos determinados momentos, comparativamente ao grupo controle.

Podemos observar que o jejum de 24h foi capaz de diminuir significativamente a concentração de urato no soro, enquanto o exercício físico contribuiu para uma diminuição ainda maior. O grupo CO apresentou diferença significativa do grupo JEJUM e também dos grupos exercitados suplementados em todos os momentos ($p < 0,05$). Esses dados sugerem um aumento nos níveis de estresse oxidativo durante as 48h de descanso pós-exaustão. Os grupos suplementados com MALTO ou CALDO não apresentaram valores diferentes do grupo AGUA para esse parâmetro. As concentrações séricas de urato se mantiveram baixas mesmo após 48h de descanso.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo mostraram que a suplementação com caldo de cana foi tão eficiente quanto a maltodextrina para restaurar os estoques de glicogênio muscular após 1 h de recuperação de um exercício exaustivo. Esses dados reforçam que a restauração do glicogênio muscular é prioritária após um exercício físico que resulte em uma depleção significativa das reservas intramusculares (KIMBER, 2003), uma vez que os estoques no fígado se mantiveram muito baixos após 1 h de recuperação, independente da solução de carboidrato utilizada.

Os carboidratos contidos no caldo de cana (sacarose) e na maltodextrina (amido, glicose) induziram percentuais de aumento similares nas concentrações de glicogênio muscular. Outros estudos mostraram velocidade similar de síntese de glicogênio com a ingestão de sacarose (IG moderado) ou glicose (IG alto) pós-exercício (BLOM, 1987; CASEY, 2000). A sacarose contém quantidades equimolares de glicose e frutose e, portanto, somente metade da quantidade de glicose disponível para a síntese de glicogênio muscular. Foi sugerido que como o metabolismo da frutose ocorre predominantemente no fígado, o mesmo inibiria a captação hepática de glicose pós-exercício, captando

apenas frutose, e com isso mais glicose estaria disponível para ser utilizada pelos músculos (BLOM, 1987).

A frutose (IG baixo) induziu um efeito menos acentuado nas concentrações de glicogênio muscular pós-exercício. O aumento foi ligeiramente superior ao observado para o grupo água, que somente descansou por uma hora. A reposição de glicogênio muscular mesmo na ausência de carboidratos já foi reportada em músculos de humanos, peixes, répteis e anfíbios, embora a extensão da reposição pareça diferir entre as espécies (FOURNIER, 2002). A gliconeogênese muscular a partir do lactato parece ser a principal fonte de carbonos para a reposição de glicogênio muscular após exercícios intensos na ausência de alimentação (DONOVAN, 2000; FOURNIER, 2002). Demonstrou-se que a atividade gliconeogênica é quantitativamente similar nas fibras tipo IIa e IIb, e negligível nas fibras tipo I (DONOVAN, 2000).

Nossos dados mostraram que o protocolo de exercício utilizado induziu depleção de glicogênio nos músculos com predominância de fibras do tipo II. As fibras tipo IIb são recrutadas somente em exercícios intensos. Esse fato, e o aumento na atividade plasmática da CK e WBC concomitante a diminuição nas concentrações de albumina, uma proteína de fase aguda negativa, (Figuras 4 e 5) sugerem que o protocolo de exercício utilizado nesse estudo, embora extremamente curto (cerca de 3 min) induziu dano muscular e resposta inflamatória persistente mesmo após 48h de descanso.

Apesar dos valores séricos da CK terem sido, na média, ligeiramente inferiores nos grupos suplementados com MALTO e CALDO quando comparados ao grupo ÁGUA, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (com exceção do grupo MALTO 3h). Esses dados sugerem que a suplementação aguda com esses carboidratos, embora seja eficiente para repor rapidamente os estoques de glicogênio muscular, não foi suficiente para reduzir a severidade e duração

do dano muscular induzido pelo exercício durante as primeiras 48h de recuperação (MILES, 2006; 2007).

Já os valores séricos de uréia não se alteraram significativamente em resposta ao exercício. Houve uma variabilidade maior na resposta do momento 3h no grupo exercitado (ÁGUA), com tendência de aumento nos valores médios. O cortisol liberado em condição de estresse sinaliza proteólise (SIMMONS, 1984; BRILLON, 1995). As concentrações médias séricas de uréia aumentadas principalmente no momento 3h nos animais do grupo exercitado reforçam essa condição, já que a uréia é um catabólito proveniente da proteólise muscular. No entanto, esse efeito não foi duradouro e já no momento 6h a uréia sérica apresentava valores próximos aos do grupo CO. Mesmo com os estoques de glicogênio muscular parcialmente repletos após 1h da exaustão não houve diferenças intergrupos para esse parâmetro, somente uma tendência de diminuição no grupo CALDO 3h. A insulinemia oriunda da oferta de glicose como contribuinte para uma diminuição na ação proteolítica do cortisol e sinalização de síntese protéica e reparo muscular não surtiu efeito adicional provavelmente porque a proteólise induzida pós-exercício foi insignificante.

CONCLUSÃO

A idéia de utilizar o caldo de cana de açúcar como recurso ergogênico deveu-se ao fato da abundância de plantações de cana de açúcar no País em função do seu potencial energético como biocombustível, sendo um subproduto extremamente barato. Sua composição média apresenta uma alta concentração de sacarose, correspondente a 70% a 91% de seus sólidos solúveis além de outros elementos (FRANCO, 2001). Contêm antioxidantes como os ácidos fenólicos (cafêico, sináptico e isômeros do ácido clorogênico), flavonóides (apigenina, luteolina e derivados de tricina) e outros

compostos fenólicos (PATON, 1992; McGHIE, 1993). Existem estudos mostrando a atividade antioxidante dos compostos fenólicos do caldo de cana (DUARTE-ALMEIDA, 2006), de flavonóides (VILA, 2006), da ação antiinflamatória das misturas de seus ácidos graxos (NOA, 2002; MOLINA 2005), de efeitos imuno-estimulatórios e promotores de crescimento (EL-ABASY, 2002, YAMAUCHI, 2006). No entanto, os estudos sobre as propriedades dos constituintes do caldo de cana sobre marcadores de sobrecarga e exercício físico são ainda escassos, mas com um campo enorme de aplicação, inclusive com diversas possibilidades de combinação com outras substâncias como as proteínas.

Os dados apresentados nesse estudo mostraram que nenhuma das suplementações foi capaz de restabelecer os valores séricos de urato, que já estavam diminuídos pelo jejum de 24h e diminuíram ainda mais com o exercício exaustivo. Provavelmente a resposta inflamatória instalada contribuiu para um nível maior de estresse oxidativo pós-exercício. Porém o grupo CALDO não apresentou valores superiores aos outros grupos exercitados, mesmo contendo antioxidantes naturais. Os dados apresentados no presente estudo sugerem que o ligeiro efeito protetor observado, principalmente no momento 3h pós-esforço, ocorreu principalmente pela oferta de carboidratos, independente do tipo, já que o grupo MALTO foi o único que apresentou valores séricos de CK inferiores ao grupo ÁGUA no momento 3h.

Mais estudos comparando essas suplementações, utilizando outros protocolos de exercício e suplementações crônicas estão sendo desenvolvidos no nosso laboratório e poderão apresentar resultados diferentes desses. A síntese rápida de glicogênio pós-esforço parece ser mais importante entre sessões de treino realizadas no mesmo dia ou em modalidades que exijam o melhor rendimento do atleta em vários momentos do mesmo dia (NELSON, 2001; BARNETT, 2006). As potencialidades

dos constituintes do caldo de cana e a escassez de estudos científicos com o objetivo de utilizá-lo como recurso ergogênico no esporte reforçam a continuidade dessas investigações. É um produto facilmente obtido em nosso país e de baixo custo, ideal para as condições sócio-econômicas da maioria dos atletas nacionais. É eficiente para repor glicogênio muscular assim como a maltodextrina, podendo ser uma alternativa às soluções de carboidratos utilizadas nos esportes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chevion, S, Moran DS, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *PNAS* 2003; 100(9):5119—23.
2. Flück, M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol.* 2006; 209: 2239-2248.
3. Bassel-Duby, R, Olson, EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75:19-37.
4. Toigo, M, Boutellier, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol.* 2006; 97:643-663.
5. Hawley, JA, Hargreaves, M, Zierath, JR. Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and adaptation. *Essays Biochem.* 2006; 42: 1-12.
6. Gibala, MJ, MacDougall, JD, Tarnopolsky, MA, Stauber, WT, Elorriaga, A. Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *J Apply Physiol.* 1995; 78(2): 702-708
7. Maclaren, DP, Gibson, H, Parry-Billings, M, Edwards, RH. A review of metabolic and physiological factors in fatigue. *Exerc Sport Sci Rev.* 1989; 89 (17): 29-66.

8. Ivy, JL. Muscle glycogen synthesis before and after exercise. *Sports Med.* 1991; 6 (84).
9. Balsom, PD, Gaitanos, GC, Soderlund, K, Ekblom, B. High-intensity exercise and muscle glycogen availability in humans. *Acta Physiologica.* 1999; 165 (4), 337-34.
10. Jentjens, R, Jeukendrup, AE. Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. *Sports Med.* 2003; 117:144.
11. Ivy, JL. Role of carbohydrate in physical activity. *Clin Sports Med.* 1999; 496 (84).
12. Ludwig, DS. Dietary glycemic index and obesity. *J Nutr.* 2000; 280S:283S.
13. Lazarim, FL, Stancanelli, M, Brenzikofer, R, Macedo, DV. Understanding of the glycemic index and glycemic load and their practical applications. *Biochem. Mol Biol Education* (aceito para publicação).
14. Goodyear, LJ, Kahn, BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med.* 1998; 49, 235-261.
15. Maehlum S, Hostmark AT, Hermansen L. Synthesis of muscle glycogen during recovery after prolonged severe exercise in diabetic and non-diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977; 309 (16).
16. Price, TB, Rothman, DL, Taylor, R, et al. Human muscle glycogen resynthesis after exercise: insulin-dependent and -independent phases. *J Appl Physiol.* 1994; 104(11).
17. Adamo, KB, Tarnopolsky, MA, Graham, TE. Dietary carbohydrate and postexercise synthesis of proglycogen and macroglycogen in human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1998; 275 (Endocrinol. Metab. 38): E229–E234.
18. Cartee, GD, Young DA, Slepper MD, et al. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am J Physiol.* 1990; 494(9).

19. Paton, NH, Duong, M. Sugar-cane phenolics and 1st expressed juice color. 3. role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymatic browning of cane juice. *Inter Sugar J.* 1992; 94(1124); 170-176.
20. Franco, G. *Tabela de Composição Química dos Alimentos*. Atheneu: São Paulo. 9 ed, 2001; p.117.
21. Nikolovski S, Faulkner DL, Palmer TN, Fournier PA. Muscle glycogen repletion from endogenous carbon sources during recovery from high intensity exercise in the fasted rat. *Acta Physiol Scand.* 1996; 427:434.
22. Raja, G, Brau, L, Palmer, TN, Fournier, PA. Repeated bouts of high-intensity exercise and muscle glycogen sparing in the rat. *J Exp Biol.* 2003; 206, 2159-2166.
23. Guelfi, KJ, Casey, TM, Giles, JJ, Fournier, PA, Arthur, PG. A proteomic analysis of the acute effects high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clin Exp Pharm Physiol.* 2006; 33: 952–957.
24. Mcardle, WD, Montoy, HJ. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol.* 1966; 1431:1434.
25. Conlee, R.K., Rennie, R.K., Rennie, R.M., Winder, W.W. Skeletal muscle glycogen content: diurnal variation and effects of fasting. *Am J Physiol.* 1976; 231: 614-618.
26. Saubert, CW, Armstrong, RB. Hormonal influence on diurnal glycogen rhythms in rats skeletal muscles. *J Exp Biol* 1993; 102: 285-293.
27. Lo, S, Russell, JC, Taylor, AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970; 234:236.
28. Benzie, IFF, Strain, JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239:70-76.

29. Kimber, NE, Heogenhauser, GJF, Spriet, LL, Dyck, DJ. Skeletal muscle fat and carbohydrate metabolism during recovery from glycogen-depleting exercise in humans. *J Physiol.* 2003; 919:927.
30. Blom, PCS, Hostmark, AT, Vaage, O, et al. Effect of different post-exercise sugar diets on the rate of glycogen synthesis. *Med Sci Sports Exerc.* 1987; 491(6).
31. Casey A, Mann R, Banister K, et al. Effect of carbohydrate ingestion on glycogen resynthesis in human liver and skeletal muscle, measured by ¹³C MRS. *Am J Physiol.* 2000; 65:75.
32. Fournier, PA, Bräu, L, Ferreira, B, Fairchild, T, Raja, G, James, A, Palmer, TN. Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002;755:63.
33. Donovan, CM, Pagliassotti, MJ. Quantitative assessment of pathways for lactate disposal in skeletal muscle fiber types. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 772:777.
34. Simons, SS Jr, Miller PA. Comparison of DNA binding properties of activated, covalent and noncovalent glucocorticoid receptor-steroid complexes from HTC cells. *Biochem.* 1984, 18; 23(26):6876-6882.
35. Brillon, JD, Zheng, B, Campbell, RG, Matthews, DE. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995; 268: E501-E513.
36. Duarte-Almeida, MJ, Novoa, AV, Linares, AF, Lajolo, FM, Genovese, I M. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Foods Hum Nutr.* 2006; 61(4):187-92.

37. Miles, MP, Walker, EE, Conant, SB, Hogan, SP, Kid, JR. Carbohydrate influences plasma interleukin-6 but not C-reactive protein or creatine kinase following a 32-km mountain trail race. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2006; 16(1):36-46.
38. Miles MP, Pearson SD, Andring JM, Kidd JR, Volpe SL. Effect of carbohydrate intake during recovery from eccentric exercise on interleukin-6 and muscle-damage markers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2007; 17(6):507-20.
39. McGhie TK. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr.* 1993; 634: 107-112.
40. Vila, FC. Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana de açúcar. Dissertação de Mestrado. USP, São Carlos, 2006.
41. Noa, M, Mendoza, S, Mas, R, Mendoza, N. Effect of D-003, a mixture of high molecular weight primary acids from sugar cane wax, on CL4C-induced liver acute injury in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2002; 28(5): 177–183.
42. Molina, V, Noa, M, Arruzazabala, L, Carbajal, D, Mas, R. Effect of D-003, a mixture of very-long-chain aliphatic acids purified from sugarcane wax, on cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *J Med Food.* 2005; 8(4): 482–487.
43. El-Abasy, M, Motobu, M, Shimura, K, Na, KJ, Kang, CB, Koge, K, Onodera, T, Hirota, Y. Immunostimulating and growth-promoting effects of sugar cane extract (SCE) in chickens. *J Vet Med Sci.* 2002; 64(11):1061-3
44. Yamauchi, K, Buwjoom, T, Koge, K, Ebashi, T. Histological alterations of the intestinal villi and epithelial cells in chickens fed dietary sugar cane extract. *Br Poult Sci.* 2006; 47 (5): 544-553.

45. Nelson, AG, Kokkonen, J, Eldredge, C. Chronic stretching and running economy. *Scan J Med Sci Sports*. 11: 260-265, 2001.
46. Barnett, A. Using recovery modalities between training sessions in elite athletes. Does it help? *Sports Med*. 36(9); 781-796, 2006.

ATIVIDADES COMPLEMENTARES DURANTE O MESTRADO

Curso de Especialização

Bioquímica, Fisiologia, Treinamento e Nutrição desportiva. (360horas). IB-Unicamp. 2006-2007.

Participação em Congressos/Palestras:

- 1- 7º Slaca - Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, SBCTA. Campinas-SP. 2007.
- 2- 9º Congresso da SBAN - Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. São Paulo. 2007.
- 3- Palestra ministrada pelo prof. Dr. Marcos Garcia Neira – USP. O olhar multicultural da Educação Física: pesquisa sobre a prática pedagógica. Promovida pelo grupo PAIDEIA, EPISTEDUC e CBCE. Campinas-SP. 2007.
- 4- III Simpósio sobre Ácidos Graxos e Saúde. Unicsul, São Paulo-SP. 2007.
- 5- Colorímetro: o que é e para que serve? Ciclo de Palestras de Ciência e Tecnologia do Instituto de Biologia. Unicamp, Campinas-SP. 2007.
- 6- XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Águas de Lindóia-SP. 2008.
- 7- 1º Workshop do Programa de Estágio Docente - Ética na Universidade. Unicamp, Campinas-SP. 2008.
- 8- XXIII Reunião Anual da FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia-SP. 2008.

Monitoria de Disciplinas:

- 1- Professora- Monitora da disciplina BB110- Bioquímica. 2007, 60hs.
- 2- Professora-Monitora da disciplina EF944- Bioquímica do Treinamento de Força. 2007, 30hs.
- 3- Professora- Monitora PED bolsista da disciplina BB110- Bioquímica. 2008, 60hs.
- 4- Professora- Monitora PED C bolsista da disciplina EF922- Fisiologia do Esforço. 2008, 30hs.

Palestras Ministradas/ Apresentação oral de trabalhos:

- 1- Glicogênio muscular, entendendo essa importante reserva energética. Palestra ministrada à graduação do curso de Educação Física da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC. Itajubá-MG. 2008.
- 2- Estudo comparativo dos efeitos do treinamento físico periodizado na performance de duas equipes de handebol feminino categoria sub-21. VI Encontro Nacional para Professores de Handebol das Instituições de Ensino Superior. Florianópolis-SC. 2007.
- 3- Avaliação de uma periodização de preparação física sobre a *performance* de uma equipe de handebol feminino sub-21 (2ª autora). VII Encontro Nacional para Professores de Handebol das Instituições de Ensino Superior. Bonito-MS. 2008.
- 4- Metabolismo energético frente a diferentes tipos de exercício físico: ajustes e adaptações fisiológicas. Palestra ministrada à graduação do curso de Educação Física da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas-SP. 2008.
- 5- Metabolismo Aeróbio e Anaeróbio. Palestra ministrada à graduação do curso de Educação Física da Universidade do Vale do Sapucaí – UNIVÁS. Pouso Alegre-MG. 2009.

Apresentação de Pôster em Congressos:

- 1- NORMAND, A.C.R.; **MACHADO, E. F. A.**; STANCANELLI, M.; MACEDO, D.V. Comparação do Caldo de Cana com Diferentes Soluções de Carboidratos na Reposição das Reservas de Glicogênio Muscular e Hepático Pós-exercício Exhaustivo em Ratos. In: 9º Congresso da SBAN- Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2007, São Paulo. Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição, 2007.
- 2- **MACHADO, E. F. A.**; NORMAND, A.C.R.; STANCANELLI, M. ; NETTO, F ; MACEDO, D.V. Caldo de Cana de Açúcar Desidratado para Utilização como Suplemento Esportivo. In: 7º Slaca - Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, SBCTA. Campinas. 2007.
- 3- **MACHADO, E. F. A.**; NORMAND, A.C.R.; STANCANELLI, M.; MACEDO, D.V. Sugar cane juice dehydrate compared with different carbohydrate solutions in muscle glycogen repletion after exhaustive exercise. In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia. XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008.
- 4- NORMAND, A. C. R., **MACHADO, E. F. A.**, STANCANELLI, M., PASSOS, M., NETTO, F. M., MACEDO, D. V. Repleção do glicogênio muscular e hepático pós-exercício exaustivo seguido de suplementações com carboidratos. XXIII Reunião Anual da FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia-SP. 2008.

- 5- **MACHADO, E. F. A.**, NORMAND, A. C. R., NUNES, L. A., MACEDO, D.V. Efeito hemolítico e glicogenolítico de diferentes anestésicos em ratos. XXIII Reunião Anual da FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia-SP. 2008.
- 6- **MACHADO, E. F. A.** ; NORMAND, ACR ; NUNES, L. A. S. ; MACEDO, D. V. . Comparison of the effects of different anesthetics on serum haemolysis and glycogenolysis in rats. In: I International Meeting in Exercise Physiology. São Carlos-SP. 2008.
- 7- TESSUTTI, L. ; **MACHADO, E. F. A.** ; FERRUCCI, D. L. ; LOURENCO, T. F. ; LOPES, C. R. ; MURAMATSU, L ; BRENIKOFE, R . Effects of a training season of master runners on maximal and sub-maximal prescription parameters. In: I International Meeting in Exercise Physiology. São Carlos-SP. 2008.

Prêmio Honra ao Mérito Fesbe:

Normand, A. C. R., **Machado, E. F. A.**, Stancanelli, M., Passos, M., Netto, F. M., Macedo, D. V. Repleção do glicogênio muscular e hepático pós-exercício exaustivo seguido de suplementações com carboidratos. XXIII Reunião Anual da FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Águas de Lindóia-SP. 2008.



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1565-1, sobre "Desenvolvimento de um protocolo de exercício físico agudo para ratos capaz de depletar o glicogênio muscular e hepático sem a interferência do jejum 24h", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo / Eduarda Faria Abrahão Machado, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 30 de junho de 2008.

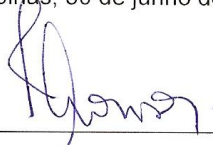
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1565-1, entitled "Acute physical exercise protocol development to deplete muscle and liver glycogen without 24 hours fasting", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 30, 2008.

Campinas, 30 de junho de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria Geraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva