



CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO *✗*

METABOLISMO GLICÍDICO EM MÚSCULO SÓLEO ISOLADO DE RATOS DESNUTRIDOS E RECUPERADOS

EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E DO TREINAMENTO FÍSICO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Cláudio Alexandre
Gobatto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

25/06/97 man

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, área de Fisiologia e
Biofísica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Alice Rostom de Mello *✗*

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Kokubun

CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO

**METABOLISMO GLICÍDICO EM MÚSCULO SÓLEO
ISOLADO DE RATOS DESNUTRIDOS
E RECUPERADOS**

EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E DO TREINAMENTO FÍSICO

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, área de Fisiologia e
Biofísica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Alice Rostom de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Kokubun

**Campinas - SP
1997**

9760746

G 535m	
V.	Ex.
TUMBO BC/ 31610	
PROC. 281/97	
C	☐
D	☒
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 16/09/97	
Nº CPU	

CM-00100434-2

Ficha Catalográfica

G0535m Gobatto, Claudio Alexandre
Metabolismo glicídico em músculo sóleo isolado de ratos. Efeitos do oleato sobre a desnutrição protéica e do treinamento físico na recuperação nutricional/ Claudio Alexandre Gobatto. -- Campinas, SP [s.n.], 1997.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Alice Rostom de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Kokubun

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Desnutrição Protéica. 2. Recuperação Nutricional. 3. Captação de Glicose. 4. Síntese de Glicogênio. 5. Produção de Lactato. 6. Incubação. 7. Sóleo. 8. Ratos. I. Mello, Maria Alice Rostom de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III Título.

Campinas, 27 de junho de 1997

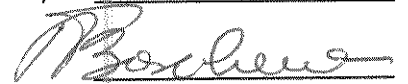
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

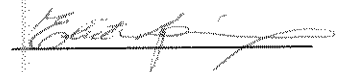
Prof^a Dr^a MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO (Orientadora)



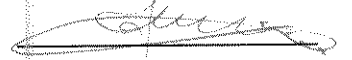
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO



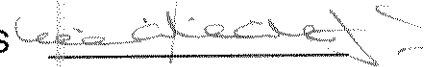
Prof^a Dr^a ELIETE LUCIANO



Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO MOREIRA DE AZEVEDO



Prof^a Dr^a MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES



SUPLENTE:

Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO

Prof. Dr. MIGUEL ARCANJO AREAS

Dedico este trabalho a DEUS e aos meus pais, Sérgio Gobatto e Conceição Monteiro Perdigão Gobatto, que com desprendimento, dedicaram suas vidas por mim.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a Dr^a Maria Alice Rostom de Mello, pela confiança depositada, pelo interesse, dedicação e competente orientação. Pela sincera amizade demonstrada desde minha iniciação científica;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Kokubun, que mais uma vez me proporcionou indispensável orientação, especialmente no desenvolvimento experimental do trabalho. Agradeço pelo incentivo, amizade e exemplo profissional,
- À Bioquímica Clarice Yoshiko Sibuya, pelo desprendimento com que me auxiliou em todas as fases do experimento. Sem sua competência e dedicação, a realização desse trabalho seria impossibilitada;
- Aos professores Dr^a Eliete Luciano, Dr. José Roberto Moreira de Azevedo e Dr. Everardo Magalhães Carneiro, pelo constante incentivo e auxílio na discussão dos nossos resultados;
- Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela motivação transmitida e concessão de uso de equipamentos;
- Aos Docentes do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pela amizade e conhecimentos ensinados nas aulas, os quais procurarei transmitir fielmente;
- Ao Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP - Câmpus de Rio Claro, onde foram desenvolvidos os experimentos;
- Ao Prof. Dr. Luis Claudio Fernandes pelo auxílio na padronização experimental;
- Ao Departamento de Educação Física da UNESP - Bauru, pela concessão de afastamento parcial;
- À Luciana M. Motta, Eliane Stevanato, José Roberto R. da Silva e Eduardo Custódio, pelo auxílio técnico;
- À CAPES e FUNDUNESP, pelo auxílio financeiro;
- À Karin Ayumi Matsushigue, pelo companheirismo e afeto;
- À Alexandra Ap. Gobatto Rodrigues, Arnaldo Rodrigues, Maria Carolina G. Rodrigues e aos sinceros amigos, que estiveram sempre ao meu lado.

Obrigado !

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
<u>3.1. Alterações morfo-funcionais causadas pela desnutrição....</u>	5
<u>3.2. Aspectos metabólicos da desnutrição e da recuperação</u> <u>nutricional.....</u>	6
<u>3.3. Interações entre exercício físico, desnutrição e</u> <u>recuperação nutricional.....</u>	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
<u>4.1. Animais.....</u>	20
<u>4.2. Dietas.....</u>	20
<u>4.3. Delineamento e grupos experimentais.....</u>	21
<u>4. 4. Protocolo de exercício físico.....</u>	22
<u>4.5. Determinações Gerais efetuadas:</u>	22
4.5.1. Ganho de Peso Corporal:	22
4.5.2. Ingestão Alimentar Absoluta:	22
<u>4.6. Obtenção das amostras sanguíneas e teciduais:.....</u>	22
4.6.1. Sangue :	22
4.6.2. Tecidos :	22
<u>4.7. Procedimentos de incubação do músculo sóleo:.....</u>	23
4.7.1. Preparação dos músculos:.....	23
4.7.2. Incubação das fatias de músculo:.....	23
4.7.3. Meios de pré-incubação e incubação:.....	24
4.7.4. Preparação da Albumina:	25
<u>4.8. Determinações bioquímicas efetuadas:</u>	25
4.8.1. Captação de glicose e síntese de glicogênio:	25

4.8.2. Glicose sérica:	26
4.8.3. Proteínas Totais séricas:	26
4.8.4. Albumina sérica:	26
4.8.5. Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) séricos:	27
4.8.6. Glicogênio Tecidual :	27
4.8.6.1 Glicogênio Muscular:	27
4.8.6.2. Glicogênio do músculo submetido à incubação..	27
4.8.6.3. Glicogênio Hepático:	28
4.8.7. Lactato do meio de incubação:	28
<u>4.9. Estimativa da glicólise nos músculos incubados:</u>	28
<u>4.10. Procedimento Estatístico</u>	28
5. RESULTADOS	30
<u>5.1. Primeira Fase: DESNUTRIÇÃO</u>	30
5.1.1. Ganho de Peso Corporal durante a fase de desnutrição:	30
5.1.2. Ingestão alimentar absoluta durante a fase de desnutrição:	31
5.1.3. Parâmetros séricos e teciduais de repouso, ao final da fase de desnutrição.	33
5.1.4. Incubação do músculo sóleo isolado ao final da fase de desnutrição.	38
<u>5.2. Segunda Fase: RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL E TREINAMENTO FÍSICO</u>	44
5.2.1. Ganho de Peso Corporal durante a fase de recuperação nutricional e treinamento:	44
5.2.2. Ingestão Alimentar Absoluta durante a fase de recuperação nutricional e treinamento físico:	46
5.2.3. Parâmetros séricos e teciduais de repouso ao final da fase de recuperação nutricional e treinamento físico.....	48
5.2.4. Incubação do músculo sóleo isolado ao final da fase de recuperação nutricional e treinamento físico.....	57
6. DISCUSSÃO	64
<u>6.1. Primeira Fase: DESNUTRIÇÃO</u>	64
<u>6.2. Segunda Fase: RECUPERAÇÃO E TREINAMENTO FÍSICO</u> ..	73
7. CONCLUSÕES	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Evolução do Ganho de Peso Corporal (g) de ratos controles e desnutridos ao longo das cinco primeiras semanas de experimento. (fase de desnutrição).....	30
Tabela 2. Ingestão alimentar de ratos controles e desnutridos ao longo das cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).....	32
Tabela 3. Concentrações circulantes de Glicose e Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).....	33
Tabela 4. Concentrações circulantes de Proteínas Totais e Albumina de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).....	35
Tabela 5. Concentrações teciduais de Glicogênio do fígado e do músculo sóleo de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).....	37
Tabela 6. Captação de glicose (^3H - 2DG) e incorporação de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose pelo músculo sóleo de ratos controles (C) e desnutridos (D), na primeira fase do experimento, após 60 minutos de incubação em meio ausente (N) e com (P) AGL (oleato - 0.8 mM).....	40
Tabela 7. Produção de Lactato pelo músculo sóleo de ratos controles (C) e desnutridos (D), na primeira fase do experimento, após 60 minutos de incubação em meio ausente (N) e com (P) AGL (oleato-0.8mM).....	40
Tabela 8. Evolução do Ganho de Peso Corporal (g) de ratos controles sedentários, controles treinados, recuperados sedentários e recuperados treinados nas seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	45
Tabela 9. Ingestão Alimentar (g) de ratos controles sedentários, controles treinados, recuperados sedentários e recuperados treinados nas seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	47
Tabela 10. Concentrações circulantes de Glicose e Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) de ratos controles (C) e recuperados (R), sedentários (S) e treinados (T), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	49

Tabela 11. Concentrações circulantes de Proteínas Totais e Albumina de ratos controles (C) e recuperados (R), sedentários (S) e treinados (T), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	52
Tabela 12. Concentrações teciduais glicogênio hepáticos e muscular (sóleo) de ratos controles (C) e recuperados (R), sedentários (S) e treinados (T), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	55
Tabela 13. Captação de glicose (³ H- 2DG) e incorporação de [U- ¹⁴ C] glicose pelo músculo sóleo de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (DS e DT) após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação.....	59
Tabela 14. Produção de Lactato pelo músculo sóleo de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (DS e DT) após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação.....	62

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Evolução do Ganho de peso corporal (g) de ratos controles (quadrados fechados) e desnutridos (círculos fechados) nas primeiras cinco semanas de experimento (Fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle	31
Figura 2. Ingestão Alimentar Absoluta de ratos controles (quadrados fechados) e desnutridos (círculos fechados) nas primeiras cinco semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.....	32
Figura 3. Concentrações circulantes de Glicose de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.....	34
Figura 4. Concentrações circulantes de Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). *dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle	34
Figura 5. Concentrações circulantes de Proteínas Totais de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.....	35
Figura 6. Concentrações circulantes de Albumina de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.....	36
Figura 7. Concentrações teciduais de Glicogênio do fígado de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.....	37
Figura 8. Concentrações teciduais de Glicogênio do músculo sóleo de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.....	38
Figura 9. Captação de glicose pelo músculo sóleo isolado de ratos controles (C) e desnutridos (D) na primeira fase do experimento, incubados por 60 minutos em meio de incubação sem (N) ou com (P) a presença de AGL (oleato - 0.8 mM).....	41

Figura 10. Síntese de glicogênio pelo músculo sóleo isolado de ratos controles (C) e desnutridos (D) na primeira fase do experimento, incubados por 60 minutos em meio de incubação sem (N) ou com (P) a presença de AGL (oleato - 0.8 mM). ¥Dif. Significativa ($p<0.05$) em relação aos controles, na presença ou ausência de oleato no meio de incubação. * dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: a) CN; b) CP.....	42
Figura 11. Produção de Lactato pelo músculo sóleo isolado de ratos controles (C) e desnutridos (D) na primeira fase do experimento, incubados por 60 minutos em meio de incubação sem (N) ou com (P) a presença de AGL (oleato - 0.8 mM). ¥Dif. Significativa ($p<0.05$) em relação aos controles, na presença ou ausência de oleato no meio de incubação. £Dif. Significativa ($p<0.05$) em relação aos meio sem oleato, independente do estado nutricional dos animais * dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: a) CN; c) DN.....	43
Figura 12. Evolução do Ganho de peso corporal de ratos Controles Sedentários (CS), Controles Treinados (CT), Recuperados Sedentários (RS) e Recuperados Treinados (RT) nas seis semanas da segunda fase do experimento (recuperação nutricional e treinamento físico). *Diferença significativa ($p<0.05$) em relação a: a) CS, b)CT, c)RS.....	46
Figura 13. Ingestão Alimentar de peso corporal de ratos Controles Sedentários (CS), Controles Treinados (CT), Recuperados Sedentários (RS) e Recuperados Treinados (RT) nas seis semanas da segunda fase do experimento (recuperação nutricional e treinamento físico). * Diferença significativa ($p<0.05$) em relação a: a) CS, b)CT.....	48
Figura 14. Concentrações circulantes de Glicose de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	50
Figura 15. Concentrações circulantes de Ácidos Graxos Livres de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	51
Figura 16. Concentrações circulantes de Proteínas Totais de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico). # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários,	

independente do tratamento alimentar.....	53
Figura 17. Concentrações circulantes de Albumina de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (Rs), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	54
Figura 18. Concentrações teciduais Glicogênio hepático de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (Rs), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico). # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre controles e recuperados, independente do estado de treinamento. * Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: e) CT.....	56
Figura 19. Concentrações teciduais de Glicogênio do músculo sóleo de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (Rs), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).....	57
Figura 20. Captação de glicose em sóleo isolado de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (RS e RT), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação. # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre controles e recuperados, independente do estado de treinamento.* Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: d) CS; e) CT.e f) RS.....	60
Figura 21. Síntese de glicogênio em sóleo isolado de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (RS e RT), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação. # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar.....	61
Figura 22. Produção de lactato em sóleo isolado de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (RS e RT), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre controles e recuperados, independente do estado de treinamento.* Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: d) CS.....	63

Figura. 23. Fluxo glicolítico proposto para o sóleo de ratos controles e desnutridos incubados sem (CN, DN) e com (CP, DP) ácidos graxos livres no meio de incubação durante 60 minutos. Os valores são expressos em $\mu\text{mol/g.h}$ e em porcentagem em relação à glicose captada..... 72

Figura. 24. Fluxo glicolítico proposto para o sóleo de ratos controles e recuperados, submetidos (T) ou não (S) ao treinamento físico, após incubação de 60 minutos. Os valores são expressos em $\mu\text{mol/g.h}$ e em porcentagem em relação à glicose captada..... 86

RESUMO

Metabolismo glicídico em músculo sóleo isolado de ratos. Efeitos do oleato sobre a desnutrição e o treinamento físico na recuperação nutricional.

Mais do que a simples reposição dos estoques energéticos, a recuperação nutricional deve restaurar a funcionalidade orgânica, com a mobilização normal dos substratos energéticos. O principal objetivo desse estudo foi verificar o efeito dos ácidos graxos livres na desnutrição e do treinamento físico na recuperação nutricional no que se refere ao fluxo glicolítico de ratos. O experimento foi realizado em duas partes: na primeira, os animais foram separados em dois grupos: D, alimentados com uma dieta contendo baixo teor protéico (6%) do desmame aos 60 dias de idade e C, animais alimentados com dieta normoprotéica (17%) no mesmo período. Do 61º ao 100º dia de idade, os ratos foram novamente separados em dois grupos: C - ratos que foram sempre alimentados com a dieta normoprotéica e R - animais alimentados com a dieta hipoprotéica do desmame aos 60 dias, passando então a receber a dieta a 17% de proteína. C e R foram ainda subdivididos em sedentários (S) e treinados (T - natação 1h/dia, 5 dias/semana, com carga equivalente a 5% do peso corporal). Ao final de cada uma das etapas, fatias de músculos sóleos (25-35 mg) foram incubadas em frascos contendo Krebs-Ringer bicarbonato com [³H]-2-deoxyglucose (0.5 µCi/ml), [U-¹⁴C]glucose (25 µCi/ml) e insulina para a determinação da captação de glicose e síntese de glicogênio. Na primeira fase, as fatias dos sóleos de ratos C e D foram ainda incubadas em meio com (P) e sem (N) oleato (0.8 mM), formando quatro grupos: CN, CP, DN e DP. Após 60 minutos de incubação, a concentração de lactato foi determinada no meio. Todos os resultados foram expressos em µmol.g⁻¹.h⁻¹. Na primeira fase, não foram observadas alterações na captação de glicose entre os grupos (CN=19.60 ± 1.34; CP=21.19 ± 1.15; DN=19.13 ± 1.09; DP=18.45 ± 1.03). Os animais desnutridos apresentaram menor síntese de glicogênio muscular,

independente da presença ou não de AGL (CN= 3.12 ± 0.18 ; CP= 3.42 ± 0.22 ; DN= 2.29 ± 0.22 ; DP= 2.04 ± 0.24). No meio N, a produção de lactato foi maior nos animais D do que nos C. Entretanto, ambos os grupos apresentaram menores concentrações no meio com AGL que os respectivos resultados das fatias musculares no meio N (CN= 37.10 ± 1.85 ; CP= 19.36 ± 1.91 ; DN= 61.03 ± 6.00 ; DP= 25.32 ± 2.24). Na segunda fase, os ratos I captaram mais glicose que os animais sedentários, com valores inferiores nos ratos R em relação aos C. (CS= 29.91 ± 1.10 , CT= 34.14 ± 1.52 , RS= 25.88 ± 1.28 , RT= 29.53 ± 1.00). A síntese de glicogênio na incubação foi similar nos quatro grupos (CS= 2.71 ± 0.26 , TC= 3.10 ± 0.18 , RS= 2.42 ± 0.14 , RT= 3.07 ± 0.26), mas os ratos CT apresentaram maior produção de lactato (15.22 ± 0.66) em relação aos ratos CS (12.29 ± 0.67). Não houveram diferenças entre a produção de lactato entre os grupos RS (16.78 ± 1.04) e RT (15.95 ± 0.75), mas a concentração de lactato foi maior nos RS do que nos CS. Nossos resultados sugerem que a desnutrição leva a alterações no fluxo glicolítico, o qual não é totalmente restabelecido com a recuperação nutricional utilizada em nosso modelo. O treinamento físico parece melhorar a recuperação nutricional.

ABSTRACT

Carbohydrate metabolism in the rats isolated soleus muscle. Effects of the oleate on malnourished and the physical training on the nutritional recovery.

The nutritional recovery must provide, beyond the simple reposition of the energetic fuels, also the restauration of the normal mobilization these substrates. This study was designed to verify the effects of free fatty acids on malnutrition and the physical training on the nutritional recovery in rats soleus glycolitic flux. The experiment was developed in two parts: First, the animals were separated into 2 groups: M, fed a low protein (6%) diet from weaning to 60 days of age and C, fed a normal protein (17%) diet on some period. From 61th to 100th days of age, the rats were separated into 2 groups: C: rats allways fed the normal protein diet and R: rats fed the low protein diet from weaning to the 60th days of age and the normal diet from this day on. C and R animals were divided into 2 sub-groups: S (sedentary) and I (swimming 1h/day, 5d/week supporting a load equivalent to 5% of body weight). At the end of each part, soleus muscles were isolated for incubation procedures. Muscle strips (25-35 mg) were transferred to separate flasks countaining Krebs-Ringer bicarbonate solution with [³H]-2-deoxyglucose (0.5 µCi/ml), [U-¹⁴C]glucose (25 µCi/ml) and insulin for determination of glucose uptake and glycogen synthesis. Muscle slices from C and M animals (first period) were incubated in the presence (P) or absence (N) of FFA (0.8 mM), forming four groups: CN, CP, MN and MP. After 60 minutes of incubation, the concentration of lactate in the medium was measured. All results were expressed as µmol.g⁻¹.h⁻¹. In the first part, no alterations in glucose uptake were observed among groups (CN=19.60 ± 1.34; CP=21.19 ± 1.15; MN=19.13 ± 1.09; MP=18.45 ± 1.03), although the malnourished animals presented lower glycogen synthesis than the control rats in medium with or without FFA (CN=3.12 ± 0.18; CP=3.42 ± 0.22; MN=2.29 ± 0.22; MP=2.04 ± 0.24). In medium N, lactate production was higher in M rats than C rats. However, both nutritional treatments showed

lower lactate production in medium P than in medium N (CN= 37.10 ± 1.85 ; CP= 19.36 ± 1.91 ; MN= 61.03 ± 6.00 ; MP= 25.32 ± 2.24). In the second period, the I rats showed higher glucose uptake than S animals (SC= 29.91 ± 1.10 , TC= 34.14 ± 1.52 , SR= 25.88 ± 1.28 , TR= 29.53 ± 1.00), with lower values for R rats than C rats. The glycogen synthesis was similar for the four groups (SC= 2.71 ± 0.26 , TC= 3.10 ± 0.18 , SR= 2.42 ± 0.14 , TR= 3.07 ± 0.26), but the TC rats showed greater lactate production (15.22 ± 0.66) than SC rats (12.29 ± 0.67). There was no difference in the lactate production between SR (16.78 ± 1.04) and TR (15.95 ± 0.75) rats, but the lactate production was higher for SR than for SC rats. Our results suggest that malnutrition leads to alterations on glycolytic flux, which do not totally disappear with the nutritional recovery, although physical training appears to improve the nutritional recovery.

1. INTRODUÇÃO

A revista "Veja", edição nº 1468, publicada no dia 30 de outubro de 1996, relatou que a queda da mortalidade infantil refletiu na sobrevivência de 20.000 crianças no Nordeste brasileiro, de 1994 até aquela data. Na redação de Silvana dal Bosco, autora da reportagem, algumas informações foram desanimadoras. Uma delas está relacionada à cidade de Jurema, com 12.000 habitantes, no agreste de Pernambuco, onde até 1994 a cada 1000 bebês nascidos vivos, 263 morriam antes mesmo de completarem um ano de vida. A solução para esse triste quadro: alimento.

A reportagem relata também que, segundo o Ministério da Saúde, no período de um ano (de 1994 a 1995), a mortalidade média caiu de 10% para 6% em 582 municípios nordestinos. Em 1994, o Brasil, em sua totalidade, apresentava cerca de 45 óbitos para cada 1000 crianças nascidas vivas (4.5%) com estimativa de 4.3% em 1996. Apesar desses valores já serem por si mesmos desoladores, eles não são confiáveis considerando que o registro de óbitos, em alguns municípios, chega a custar R\$ 40,00 (US\$ 42.80), quando por lei deveriam ser cobrados no valor de R\$ 1,79 (US\$ 1.92), o que impossibilita a muitas famílias pobres o registro dos óbitos de suas crianças.

Embora a discussão dos índices de desnutrição no país, não seja o tema central do presente trabalho, o que mais chama a atenção naquela reportagem é o destaque para o "milagre" da recuperação nutricional estampado na capa e no interior da revista.

A recuperação nutricional foi novamente tema de reportagem de Mário Cezar Carvalho, intitulada "Subnutrido é recuperável, diz pesquisa", publicada na "Folha de São Paulo" no dia 15 de dezembro de 1996. Trata-se de um trabalho conduzido por Maria de Fátima Alves Viera sob a orientação da Dra. Ana Lydia Sawaia, da Universidade Federal de São Paulo. Os resultados mostraram que através do acompanhamento nutricional de três refeições

diárias, ocorreu aumento na estatura de crianças desnutridas, com idade entre 8 meses e 5 anos. As autoras, no entanto, não conseguiram explicar as causas da recuperação da estatura, cuja velocidade foi maior do que o ganho de peso corporal. De acordo com as mesmas, é provável que o aporte protéico oferecido às crianças (duas vezes superior ao que prescreve a Organização Mundial da Saúde - OMS) tenha sido o responsável por esse crescimento.

É interessante analisar como as pesquisadoras conduziram esse trabalho. Elas selecionaram crianças de favelas de São Paulo, nas quais a Universidade Federal de São Paulo atua. As crianças passaram a receber três refeições diárias na escola, voltando para casa no final da tarde. Esse detalhe - aparentemente despercebido - provavelmente permitiu que as crianças mantivessem sua atividade física diária normal - com jogos e brincadeiras, contrariamente ao observado nas internações, comuns em hospitais de desnutridos, onde os meninos e meninas são mantidos em seus leitos, sob recuperação alimentar. Esse aspecto parece ser fundamental na recuperação do crescimento linear após desnutrição.

TORUN & VITERI (1994) relatam, em estudos envolvendo animais de laboratório e crianças, que o crescimento linear na recuperação alimentar foi maior nos ratos e crianças que realizaram atividade física regular durante este período. Portanto, o exercício físico pareceu desempenhar um papel importante na recuperação nutricional.

Em nossa dissertação de mestrado (GOBATTO, 1993), estudamos os aspectos metabólicos de ratos em três etapas:

- desnutrição protéica, do desmame aos 60 dias de idade,
- posterior recuperação nutricional de seis semanas, e, subseqüentemente,
- treinamento físico, que consistiu de natação de uma hora por dia, cinco dias por semana, durante sete semanas.

Assim, a preocupação central da recuperação nutricional esteve voltada aos aspectos metabólicos, que foram analisados no estado de repouso em todas as etapas do experimento. Nesse trabalho, foram também analisadas na última fase, respostas dos animais ao exercício agudo, através de testes

com cargas progressivas, visando determinar a qualidade funcional da recuperação nos animais.

Os resultados obtidos revelaram que, deixados de lado os aspectos biométricos dos animais, as respostas foram semelhantes entre os animais anteriormente desnutridos e recuperados e treinados, e os controles.

Um dos aspectos que motivou nossa investigação foi o freqüente relato de atletas, de diferentes modalidades e muitas vezes provenientes de famílias com baixo poder aquisitivo, terem sofrido desnutrição na infância, que desapareceu quando passaram a morar nos clubes e receberem melhor alimentação e cuidados. Isso os afastou da carência alimentar e, aparentemente, os recuperou. Entretanto, ficou a questão se esses indivíduos responderiam aos treinamentos e teriam rendimentos atléticos semelhantes aos dos indivíduos que foram sempre bem nutridos.

Os resultados obtidos em nossa dissertação elucidaram essa questão, mostrando que os animais anteriormente tratados com dieta hipoprotéica apresentam desempenho semelhante ao dos que nunca sofreram de desnutrição. Os estoques teciduais de glicogênio, as concentrações séricas de substratos e a resposta sanguínea de lactato ao exercício agudo apresentaram valores semelhantes entre os treinados, independentemente do estado nutricional anterior.

Apesar disso, sentimos a necessidade da utilização de procedimentos mais sensíveis para a determinação de possíveis alterações decorrentes da desnutrição, com posterior recuperação nutricional e treinamento físico. Assim sendo, ainda voltados para a temática iniciada no mestrado procuramos, no presente estudo, simular melhor em modelo experimental utilizando ratos o que ocorre com os indivíduos que sofrem de desnutrição na infância e se mostram, apesar disso, com um grande potencial esportivo. Utilizamos duas fases em nosso protocolo experimental, uma de desnutrição e outra de recuperação associada ao treinamento físico, já que os atletas iniciam seus treinamentos imediatamente após serem integrados aos clubes, pelos quais estes indivíduos estarão competindo.

2. OBJETIVOS

De acordo com o exposto anteriormente, o presente trabalho teve por objetivos:

- Caracterizar o estado nutricional de ratos submetidos a desnutrição protéica do desmame aos 60 dias de idade, com posterior recuperação nutricional associada ao treinamento físico, por meio da avaliação de parâmetros clássicos como peso corporal e ingestão alimentar; glicose, ácidos graxos livres, proteínas totais e albumina séricos; e glicogênio hepático e muscular,
- Determinar, em músculo sóleo isolado de ratos desnutridos incubado em presença de insulina, o efeito de ácidos graxos livres (oleato), na captação de glicose, utilizando como marcador [^3H] 2-deoxiglucose; na síntese de glicogênio, avaliando a incorporação de [$\text{U-}^{14}\text{C}$] glicose ao glicogênio, e na produção de lactato no meio após 60 minutos de incubação.
- Determinar, em músculo sóleo isolado de ratos recuperados nutricionalmente incubado em presença de insulina, o efeito do treinamento físico dos animais, na captação de glicose, na síntese de glicogênio e na produção de lactato no meio, após 60 minutos de incubação, através dos mesmos parâmetros citados acima.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Alterações morfo-funcionais causadas pela desnutrição.

A desnutrição protéica causa alterações funcionais nos processos de digestão e absorção, provocando redução na concentração de enzimas digestivas, especialmente do pâncreas exócrino e do epitélio entérico, e menor síntese de sais biliares. No aspecto estrutural, a desnutrição promove alterações morfológicas dos tecidos em geral e do aparelho digestivo especialmente, além do crescimento exagerado da população microbiana (MARCONDES, 1976).

Dessa forma, a absorção de proteínas, gorduras e carboidratos é prejudicada na desnutrição, especialmente a de glicose, quando esse nutriente é o principal conteúdo da dieta (MARCONDES, 1976). A estrutura da mucosa intestinal apresenta várias alterações morfológicas, com diminuição de vilosidades, achatamento e dismorfia; redução da altura do enterócito; desorganização das microvilosidades; distorção das membranas intracitoplasmáticas e alterações das mitocôndrias (MARCONDES, 1976).

O peso corporal de animais desnutridos é invariavelmente menor que o observado em animais alimentados com dieta de boa qualidade e em quantidade adequada. Assim, qualquer que seja a alteração nutricional, protéica, calórica ou a associação entre essas resultará em redução do peso (CRACE et al., 1989; GOBATTO, 1993; RAO, 1995). A recuperação nutricional aumenta a velocidade do ganho de peso do animal anteriormente desnutrido, a qual passa a ser maior que a normal. Todavia, o restabelecimento do peso corporal poderá ser ou não total, dependendo principalmente do tempo de duração e do período desenvolvimental em que se iniciou a desnutrição. Quanto mais precoce for iniciada, mais prejudicada será a recuperação do peso (GOBATTO, 1993). Obviamente, o tamanho das células, medidas através

da razão proteína tecidual/DNA, é menor nos animais desnutridos, como observado por CRACE et al. (1989).

3.2. Aspectos metabólicos da desnutrição e da recuperação nutricional.

Estudos clássicos envolvendo a desnutrição protéico calórica apontam valores normais ou reduzidos de glicose circulante em crianças com marasmo ou kwashiorkor (WHITEHEAD & HARLAND, 1966; WATERLOW & ALLEYNE, 1974). JAMES & COORE (1970) encontraram glicemia média entre 55 e 70 mg/100ml em crianças anteriormente malnutridas após três meses de recuperação. Os autores verificaram que, apesar do restabelecimento clínico, tais crianças ainda demonstravam baixa tolerância à glicose. Esses resultados foram semelhantes aos relatados anteriormente por ALLEYNE & SCULLARD (1969). Estudos mais recentes envolvendo desnutrição clínica e experimental indicam a ocorrência de hipoglicemia de jejum, intolerância à glicose e menor secreção de insulina em resposta à glicose (CLAEYSSSENS et al. 1990, MELLO, 1994), embora haja controvérsias entre autores e modelos de desnutrição. Na recuperação nutricional de crianças, a tolerância à glicose parece voltar ao normal mesmo antes da restauração do processo secretor de insulina (CRACE et al., 1990).

Em ratos adultos e jovens submetidos à desnutrição protéico-calórica, os valores glicêmicos também apresentaram-se normais ou reduzidos em grande número de estudos (ANTHONY & FALONA, 1974; KABADI et al. , 1976; WEINKOVE et al. , 1976; HEARD et al. , 1977; CARPINELLI, 1978; GOBATTO, 1993). Foi relatado que a desnutrição protéico-calórica afeta vários aspectos da homeostase glicêmica no rato. A principal causa é uma severa diminuição na liberação da insulina, a qual pode ou não levar a deterioração progressiva da tolerância à glicose dos tecidos periféricos altamente sensíveis ao hormônio. Na recuperação nutricional de ratos anteriormente tratados com dieta hipoprotéica, SWENNE et al., (1987, 1988) verificaram restauração da tolerância à glicose, embora a secreção de insulina *in vivo* ainda estivesse reduzida. OKITOLONDA et al. (1987) encontraram

redução na concentração de insulina e na razão insulina/glicose em ratos tratados com 5% de proteína na dieta em relação aos alimentados com 15%. Esses autores relataram pequena reversibilidade desse quadro na recuperação nutricional. Foi também sugerido que quanto mais duradoura a desnutrição, maior a vulnerabilidade das células beta, o que facilita o desenvolvimento do diabetes.

ESCRIVA et al. (1991) observaram baixas concentrações de insulina de repouso, mas secreção normal (*in vivo*) de insulina em ratos tratados cronicamente com dieta hipoprotéica, quando foram submetidos a sobrecarga de glicose. Recentemente, entretanto, CARNEIRO et al. (1995) constataram *in vitro*, menor secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de animais submetidos a desnutrição protéica estimuladas com glicose. ESCRIVA et al. (1991) relataram também que a intolerância à glicose foi menos severa em ratos submetidos à desnutrição protéica em relação aos alimentados com dietas hipocalóricas, indicando maior sensibilidade à insulina nos animais alimentados com dieta hipoprotéica. A concentração de receptores de insulina em células de ratos desnutridos parece estar diminuída, assim como sua afinidade pelo hormônio hipoglicemiante (PAYNE-ROBINSON & BROWN, 1992). ESCRIVA et al. (1991) sugerem que a baixa responsividade das células beta pancreáticas à glicose verificada em ratos durante a desnutrição protéico-calórica deve estar, também, mais relacionada à deficiência calórica.

Preocupados com a influência dos tipos de desnutrição na gênese do diabetes, verificado principalmente na fase de recuperação nutricional, quando a secreção de insulina muitas vezes permanece alterada, a despeito do crescimento corporal e da tolerância à glicose estarem normalizados, CRACE et al. (1991) procuraram identificar se as perturbações metabólicas e hormonais observadas em ratos alimentados com dietas contendo baixos teores protéicos são decorrentes da deficiência protéica ou energética. CRACE et al. (1990), assim como OKITOLONDA et al. (1987), concluíram que a secreção de insulina está mais afetada pela desnutrição protéica que

energética, contrariamente aos achados de ESCRIVA et al. (1991), relatados anteriormente.

CRACE et al. (1990) verificaram hipersensibilidade à insulina em estudos realizados *in vivo* em ratos recém desmamados desnutridos (5% de proteína) por três semanas. Esse efeito continuou por mais 21 dias, mesmo com os animais sendo recuperados com dieta normoprotéica. Os autores investigaram também a sensibilidade da insulina no músculo sóleo incubado, constatando maiores resultados de efluxo de [^{14}C - metil] glicose nos animais desnutridos, portanto, maior sensibilidade nesses ratos.

O metabolismo total de glicose de ratos desnutridos (baixa proteína) foi significativamente maior que nos ratos controles em concentrações submáximas de insulina, indicando que o metabolismo corporal total é mais sensível à insulina em desnutridos que nos controles (CRACE et al., 1990). A utilização basal de glicose foi significativamente maior nos desnutridos. Durante os estudos de clampeamento da glicose, a utilização do carboidrato induzida pela insulina submáxima (relacionada à massa corporal) foi significativamente maior nos desnutridos que nos controles. Tem sido relatado também que a insulina exógena causa hipoglicemia mais acentuada em animais desnutridos (OKITOLONDA et al, 1987) e que preparações do músculo sóleo desses animais são mais sensíveis *in vitro* à insulina (CRACE et al., 1990). REIS et al. (1997) descreveram que elementos envolvidos nas etapas iniciais da sinalização insulínica em músculo gastrocnêmio isolado de ratos mantidos com dieta contendo 6% de proteína respondem com fosforilação aumentada após tratamento com insulina "in vivo". Em conjunto, esses dados sugerem que a captação de glicose mediada pela insulina está aumentada em animais desnutridos.

A captação periférica de glicose na desnutrição parece estar também relacionada a outros fatores, tais como a menor atividade enzimática, especialmente da hexoquinase, verificada em fibras brancas e mistas; ao aumento plasmático de AGL, muito relatado na desnutrição; ou ainda, ao aumento da quebra de glicogênio muscular, após supercompensação do

substrato (MELLO, 1994). CRACE et al. (1990) observaram maior incorporação de ^{14}C -glicose no glicogênio hepático de animais desnutridos em meio de incubação não contendo insulina. Com a presença do hormônio, não houveram diferenças significativas com os animais alimentados com a dietas normoprotéica. Após 6 e 18 semanas de recuperação nutricional, esses autores não registraram diferenças na incorporação de ^{14}C -glicose no glicogênio hepático de ratos anteriormente desnutridos ou não.

Após um longo período de desnutrição calórica em ratos, RAO (1995) verificou hipoglicemia de repouso, redução da secreção de insulina e glucagon. Estudando a insulinopenia portal, esse autor verificou que na desnutrição crônica, os baixos níveis periféricos de insulina não podem ser atribuídos ao aumento hepático da extração de insulina, como havia sido proposto anteriormente. Concluiu, também, que as concentrações plasmáticas reduzidas de glicose não podem ser consequência de menor produção hepática de glicose causadas por defeito enzimático, como postulado por OKITOLONDA et al. (1987). RAO (1995) sugere que a concentração de receptores de insulina em células de animais submetidos à desnutrição calórica está diminuída, assim como também está reduzida a afinidade pela insulina. Essa é uma diferença entre os modelos de desnutrição, pois na desnutrição protéica, a sensibilidade à insulina parece estar aumentada (CRACE et al. 1990 ; OKITOLONDA et al. 1987, REIS et al., 1997), como já descrito acima.

RAO (1995) verificou que a hipoglicemia de jejum na desnutrição calórica parece estar associada à hipoglucagonemia. Observou também resistência ao glucagon nos animais desnutridos, a despeito da insulinopenia e resistência à insulina na desnutrição calórica. A baixa glicemia associada a menor concentração de insulina na desnutrição verificada em seres humanos e animais de laboratório é um paradoxo metabólico bastante relatado na literatura. Os achados de RAO (1995) apontando as reduzidas concentrações de glucagon, parecem elucidar esse aspecto no metabolismo de carboidratos na desnutrição. Entretanto, ao contrário da desnutrição calórica, animais

submetidos à desnutrição protéica apresentam concentração normal de glucagon no jejum (DOLLET, 1985), o que dificulta o entendimento da homeostase da glicose no tecido desses animais, uma vez que os mesmos apresentam quadro hipoglicêmico e hipoinsulinêmico.

Em crianças portadoras de kwashiorkor (desnutrição protéica), é bastante relatada a elevação das concentrações de AGL com rápido retorno aos teores normais na recuperação. No marasmo (desnutrição calórica) os achados se confrontam, havendo relatos tanto de concentrações normais de ácidos graxos livres, quanto de valores elevados. Em macacos, foram verificados teores elevados de ácidos graxos livres quando submetidos à dieta hipoprotéica (WATERLOW & ALLEYNE, 1974). Estudos com ratos desnutridos em várias fases do desenvolvimento mostram valores também elevados de AGL (MELLO, 1994). CLAEYSSSENS et al. (1990) não verificaram aumento da concentração plasmática de AGL, mas verificaram aumento da atividade da enzima ácido graxo sintetase no fígado de animais recém desmamados, tratados com dieta contendo 6% de proteína, no sétimo dia do experimento.

Ratos geneticamente obesos (*fa/fa*), assim como ratos velhos apresentam aumento circulante de ácidos graxos livres. Animais *fa/fa*, exceto os jovens, reduzem o metabolismo intramuscular de carboidratos sem alterar o efeito da insulina na captação de glicose (CRETAZ et al, 1980). Esse comportamento metabólico é também verificado no envelhecimento, quando os animais aumentam a massa de gordura, o que leva ao aparecimento de resistência à insulina em decorrência do aumento plasmático de AGL (BARZILAI & ROSSETTI, 1995). O aumento da oxidação dos AGL, que eleva a presença citossólica de citrato, inibindo a glicólise e reduz o metabolismo de carboidratos, como foi postulado na década de 60 (RANDLE et al., 1963). Isso parece explicar a resistência à insulina verificada em condições de aumento dos AGL circulantes.

Apesar da semelhança quanto a presença elevada de AGL entre animais submetidos à desnutrição protéica e obesos, os primeiros, ao menos em nosso modelo de desnutrição, apresentam secreção reduzida de insulina

em resposta à glicose (CARNEIRO et al., 1995). Na obesidade, ao contrário, pode ser verificada hiperinsulinemia em humanos e animais, provavelmente pela extração hepática de insulina diminuída (LE MARCHAND-BRUSTEL et al., 1978) embora isso seja contestado por RAO (1995), como já mencionado.

A diferença na sensibilidade à insulina entre músculos e tecido adiposo pode ter importância fisiológica no entendimento do controle da concentração de glicose sanguínea, uma vez que, sendo o tecido adiposo mais sensível à insulina que o músculo (K_m de 10 $\mu\text{UI/ml}$ vs 150-400 $\mu\text{UI/ml}$), baixas concentrações do hormônio resultam em influência sobre o metabolismo de glicose no músculo, aumentando a disponibilidade circulante de ácidos graxos livres (AGL) decorrente da lipólise (ESPINAL et al., 1983a).

Porém, após esses achados terem sido publicados, outros pesquisadores mostraram dúvidas quanto ao nível de desorganização celular capaz de apresentar essa intolerância à insulina. Para eles, a mesma não pode ser atribuída somente à ligação insulina-receptor. Em animais obesos, por exemplo, foi também constatada no tecido adiposo a diminuição da síntese de ácidos graxos e a redução da atividade do desvio pentose-fosfato, ou seja, alterações intracelulares.

CRETIAZ et al. (1980), investigando a resposta à insulina em músculo sóleo isolado, verificou a existência de receptores de insulina de reserva, representando 20 a 30% do total de sítios específicos de ligação da insulina, o que, segundo eles, parecem ser suficientes para promover a estimulação máxima do metabolismo de glicose. Em ratos geneticamente obesos, esses autores observaram redução de 25 a 35% da ligação de diferentes concentrações de insulina no sóleo incubado. Essa pequena diminuição é incompatível à menor captação de glicose observada nesses animais. Dessa forma, parece que a ligação hormônio-receptor não deva ser a única determinante da resistência do músculo de ratos obesos à insulina. Provavelmente, esse defeito ocorre após essa interação nos tecidos musculares dos animais obesos. O reduzido efeito da insulina na captação

periférica de glicose nesses animais pode explicar a observada redução do metabolismo da glicose no músculo.

CRETIAZ et al. (1980), trabalhando com ratos obesos de 10-11 semanas, verificaram que o metabolismo de glicose no interior da fibra muscular desses ratos foi menos sensível e menos responsivo para a captação de 2-deoxiglicose (2-DG). Particularmente, em meio de incubação contendo 100 μ UI/ml de insulina, a captação de 2-DG foi semelhante entre os ratos obesos e controles, mas houve deficiência na incorporação da glicose à glicogênio nos primeiros. Estas observações sugerem a existência de defeitos adicionais não diretamente ligados ao transporte de glicose e/ou à fosforilação. A menor síntese de glicogênio é uma característica também relatada em animais desnutridos. Não se sabe, entretanto, se os mecanismos de inibição apresentam diferenças entre os dois estados.

As informações referentes aos teores de glicogênio hepático na desnutrição são conflitantes. ALLEYNE & SCULLARD (1969) constataram que a quantidade de glicogênio hepático foi significativamente reduzida em crianças apresentando desnutrição aguda. Ao contrário, foi verificado aumento dos valores teciduais de glicogênio no fígado de ratos tratados com dietas hipoprotéicas (MELLO, 1985). FLETCHER (1966) havia observado resultados semelhantes em crianças malnutridas e sugeriu que a elevação do glicogênio no fígado poderia ser explicada pela baixa capacidade hepática de liberação da glicose para o sangue, pois foram verificadas concentrações subnormais da enzima glicose-6-fosfatase no fígado durante a desnutrição. WATERLOW & ALLEYNE (1974) não encontraram tal efeito, observando, inclusive, aumento da atividade dessa enzima no fígado de crianças desnutridas. ALLEYNE & SCULLARD (1969) relataram que o glicogênio muscular se apresenta reduzido em indivíduos malnutridos. Porém, na fase de recuperação, esse glicogênio mostra-se em quantidades acima das normais, retornando aos teores basais em crianças totalmente restabelecidas.

WHITEHEAD & HARLAND (1966) observaram concentrações sanguíneas elevadas de lactato e piruvato em pacientes com kwashiorkor,

causadas possivelmente, por disfunção na entrada do piruvato no ciclo de Krebs. Recentemente foi verificado *in vivo* valores circulantes superiores de lactato em animais tratados com dieta a 6% de proteína submetidos ao exercício agudo, em relação a animais controles (GOBATTO et al., 1991), sugerindo não haver bloqueio da glicólise nesse modelo de desnutrição. Outros autores encontraram valores sanguíneos elevados de piruvato após injeção de glicose em crianças com marasmo, o que desaparece após a recuperação (WINICK, 1972). Estudando crianças desnutridas, ALLEYNE & SCULLARD (1969) observaram concentrações circulantes de lactato e piruvato consideradas normais após o jejum.

Alguns pesquisadores observaram valores diminuídos de fosfoenolpiruvato e oxalacetato em amostras de músculos de crianças desnutridas, embora esse tecido tenha apresentado concentrações normais de piruvato (WINICK, 1972). A atividade da piruvato quinase esteve reduzida, com alterações nas propriedades cinéticas dessa enzima quando estudada *in vitro* com substratos e cofatores em concentrações similares às aquelas encontradas em músculos de crianças desnutridas. É difícil explicar como na desnutrição os teores de fosfoenolpiruvato estão baixos e os de piruvato inalterados, se, *in vivo*, foi observado um bloqueio na etapa da piruvato quinase. Ao contrário, se concentrações de intermediários metabólicos refletem a situação *in vivo*, mudanças opostas deveriam ser esperadas. Nesse sentido, foi observada diminuição na atividade da piruvato quinase, concomitante a reduções no ATP, e nas concentrações de piruvato e oxalacetato em leucócitos de crianças severamente desnutridas (WINICK, 1972).

A disfunção da glicólise observada na desnutrição, seria uma possível explicação para a relatada intolerância à glicose. Para testar essa hipótese, amostras de músculo obtidas de biópsia em crianças desnutridas foram estudadas *in vitro*. Os pesquisadores analisaram a produção de lactato em músculos de crianças desnutridas antes e após a recuperação, após a administração de vários substratos como glicose, glicose-6-fosfato, frutose-1,6-

difosfato e fosfoenolpiruvato. A produção do lactato foi essencialmente a mesma em crianças desnutridas e recuperadas, mas os valores para ambos os grupos estiveram menores do que os das crianças normais para dois substratos, a glicose-6-fosfato e frutose-1,6-difosfato. Estes achados sugerem haver um bloqueio na glicólise nestas reações e parece persistir mesmo após a recuperação clínica, embora os autores indiquem a necessidade de mais investigações a esse respeito (WINICK, 1972).

Através desses trabalhos não foi possível identificar precisamente quais as enzimas responsáveis pelo bloqueio da glicólise e em quais condições isso pode ocorrer durante a desnutrição e recuperação. Nos modelos de desnutrição em que foram constatados tais bloqueios, parece mais provável tratar-se de múltiplas alterações enzimáticas (MELLO, 1985).

Com relação às concentrações de proteínas totais e albumina, alguns pesquisadores observaram teores reduzidos no plasma de ratos jovens desnutridos (ANTHONY & EDOZIEN, 1975; HEARD et al. , 1977; LUNN & AUSTIN, 1983; GOBATTO, 1993). Estes resultados não estão de acordo com os relatados por SLOBODIANIK et al. (1977) e MELLO (1985), que verificaram concentrações semelhantes nos grupos experimentais e controle. As controvérsias dessas observações decorrem, talvez, em função das diferenças dos protocolos experimentais, do tempo de duração da desnutrição e da idade dos animais.

Em estudo envolvendo a recuperação de seis semanas da glicemia, AGL, proteínas totais e albumina séricos e teores hepáticos e musculares de glicogênio após um período de desnutrição de 5 semanas, GOBATTO (1993) observou total restauração das concentrações desses parâmetros em ratos que iniciaram o tratamento hipoprotéico a partir do desmame.

3.3. Interações entre exercício físico, desnutrição e recuperação nutricional.

BELDA & ZUCAS (1983) submeteram ratos recém-desmamados à desnutrição protéica, reduzindo a quantidade de caseína na dieta ou tratando os animais com proteína de baixo valor biológico (proteína da soja), e calórica, reduzindo a quantidade de alimento ofertado. Após a maturação sexual, os animais foram treinados (roda de atividade), sendo que parte do grupo desnutrido também foi submetido à recuperação nutricional. Nessa investigação, foram determinados alguns efeitos da qualidade e quantidade da dieta protéica associada ao exercício físico no desenvolvimento do fígado de ratos machos. Os parâmetros analisados foram o peso do órgão e lípidos totais hepáticos. Os autores relataram que em ambos os tipos de desnutrição a que foram submetidos os animais houve aumento na quantidade de lípidos totais (mg/g) no primeiro período experimental, bem como na recuperação alimentar. Porém, o treinamento físico, provocou reversão desse quadro.

CURI et al. (1990a,b) alimentaram ratos machos durante apenas duas horas por dia (Grupo MF) e os submeteram ao treinamento físico (Grupo EMF), consistindo de natação diária. Os autores verificaram em quatro semanas que, no repouso, a concentração plasmática de ácidos graxos livres esteve menor nos animais exercitados tratados com restrição alimentar. No exercício agudo, os animais EMF apresentaram mesma resposta de elevação das concentrações circulantes que os controles, porém com maior amplitude. Com relação aos conteúdos de glicogênio hepático, os animais MF apresentaram aumento dos teores de repouso a partir da segunda semana do experimento. Porém, os ratos deste grupo que realizaram treinamento físico tiveram um aumento já na primeira semana do experimento. No exercício agudo, os animais controle apresentaram redução de 31% dos estoques hepáticos de glicogênio contra 20% dos animais treinados tratados com restrição. Dessa forma os conteúdos de glicogênio hepático nos animais EMF se mantiveram significativamente maiores, mesmo ao final do exercício. CURI et al. (1990b) observaram que no músculo sóleo os teores de glicogênio estiveram maiores

nos animais que sofreram restrição alimentar. Os outros músculos estudados (gastrocnêmio e cardíaco) apresentaram apenas tendência ao aumento nos grupos MF e EMF. Durante o exercício agudo, verificaram que a magnitude da depleção dos estoques musculares de glicogênio foi maior nos animais tratados com restrição, exceto no músculo gastrocnêmio, quando foi verificada depleção igual a dos animais controles. Esta semelhança, porém, foi observada apenas até o trigésimo minuto de esforço, sendo que ao final de 60 minutos os animais tratados com restrição alimentar depletaram significativamente mais glicogênio que os controles.

Estudando os efeitos da desnutrição protéica e do treinamento físico sobre a produção de ácido láctico em ratos machos adultos, GOBATTO et al. (1991) verificaram que animais treinados com natação diária e tratados com dietas a 6% de proteína apresentaram aumento da produção de ácido láctico em relação aos animais controle treinados tratados com 25% de proteína. Este aumento foi observado após exercício com cargas progressivas, consistindo de natação com sobrecarga de 0, 5, 8 e 12% do peso corporal a cada 3 minutos. Os autores observaram, também, que os animais desnutridos treinados apresentaram menor glicemia e maior glicogênio muscular de repouso. Os teores de glicogênio hepático estiveram menores nos animais desnutridos treinados em relação aos desnutridos sedentários, embora ambos os grupos tenham apresentado maiores valores em relação ao grupo controle não treinado.

Em nossa tese de mestrado (GOBATTO, 1993), submetemos ratos recém desmamados à desnutrição protéica durante cinco semanas. Após essa fase, recuperamos os animais com dieta normoprotéica durante seis semanas e após esse período treinamos os animais por mais sete semanas, mantendo a dieta normoprotéica. Na primeira fase, os animais desnutridos apresentaram redução do peso corporal, da glicemia, albuminemia e do glicogênio muscular, enquanto que aumentaram a ingestão alimentar relativa, os estoques hepáticos de glicogênio e as concentrações séricas de ácidos graxos livres. Na fase de recuperação nutricional, todas essas alterações foram

normalizadas, exceto o peso corporal dos animais, que se manteve inferior ao dos animais controles. Após a última etapa do experimento (treinamento físico), todos os parâmetros analisados apresentaram valores semelhantes entre os animais recuperados e controles, independente do estado de treinamento físico. Durante o exercício agudo com cargas progressivas, as concentrações sanguíneas de lactato foram iguais entre os grupos treinados controles e recuperados.

É comum considerar um organismo totalmente restabelecido após a desnutrição, quando substratos energéticos sanguíneos e teciduais estão semelhantes aos de indivíduos bem nutridos. Entretanto, mais importante que isso é verificar a funcionalidade desse organismo, quando submetido a estímulos que exijam adaptações energéticas, como por exemplo no jejum prolongado ou no exercício físico (GOBATTO, 1993). Isso pode ser verificado no exemplo anterior, onde foi mostrado que não somente os valores de repouso se mostraram restabelecidos após o treinamento físico como também estiveram recuperadas as respostas energéticas frente a um estímulo, no caso, exercício físico.

O efeito do exercício físico na desnutrição calórica foi investigado, sendo que os autores observaram crescimento linear superior dos ratos treinados tratados com dietas hipocalóricas em relação ao dos animais sedentários alimentados com dietas *ad libitum*. Apesar disso, o crescimento dos desnutridos exercitados foi inferior ao dos treinados bem alimentados (TORUM & VITERI, 1994), mostrando que o exercício, por si, estimula o crescimento linear. Com crianças foi verificado também que, durante a recuperação nutricional, aquelas que foram mantidas com atividade física diária apresentaram crescimento corporal superior ao das crianças mantidas em repouso em seus quartos nos hospitais destinados à recuperação nutricional (TORUM & VITERI, 1994). Os mecanismos fisiológicos que exercem tal efeito ainda necessitam maior esclarecimento, mas devem estar relacionados a fatores endócrinos, que promovem o crescimento dos ossos

longos, como por exemplo o hormônio do crescimento e fatores de crescimento (insulin-like growth factors).

Como vimos na seção 3.2., tolerância à glicose reduzida, menor secreção de insulina e menor sensibilidade a esse hormônio são características em alguns tipos de desnutrição. O treinamento físico em ratos e humanos tem sido indicado como fator de melhora da tolerância à glicose e de redução na concentração de insulina em resposta à uma mesma carga oral ou intravenosa de glicose. Isso indica que a sensibilidade à insulina está aumentada em animais intactos, mas não está bem estabelecido quais são os tecidos mais afetados pelo treinamento.

ESPINAL et al. (1983a) verificaram aumento da atividade da hexoquinase no músculo quadríceps oxidativo de ratos submetidos ao treinamento físico em esteira rolante durante quatro semanas (6 dias/semana, 1 hora por dia). Em músculo sóleo incubado de ratos, a glicólise aumentou aproximadamente em 50% nos animais treinados, indicando aumento no número de carreadores de glicose na membrana celular. O Km da concentração de insulina diminuiu nos animais treinados, sendo de 10 μ UI/ml para treinados, contra 100 μ UI/ml para animais sedentários. Apesar disso, não foi verificado aumento na síntese de glicogênio entre os grupos de animais. Como mostrado anteriormente, o treinamento físico não afeta a sensibilidade à insulina no tecido adiposo, o que sugere que em animais treinados pequenas concentrações de insulina são suficientes para estimular a utilização de glicose no músculo e tecido adiposo.

Foi observado que a adenosina aumenta a sensibilidade à insulina no tecido adiposo. Dessa forma, ESPINAL et al. (1983b) investigaram o efeito desse ribonucleosídeo no músculo. O problema metodológico para esse estudo é que a produção endógena de adenosina no interior das fatias do músculo sóleo incubado poderia mascarar o efeito da adenosina exógena no meio. Surgiu então a idéia de incubar o músculo com adenosina deaminase, para converter a adenosina produzida pelo músculo em inosina, que é um metabólito inativo, junto a um análogo da adenosina, que não é inativado pela

deaminase, a N⁶-fenilisopropiladenosina. Dessa maneira, os autores puderam investigar os efeitos da insulina na taxa de glicólise e síntese de glicogênio em incubação de fatias de sóleo (25-35 mg) contendo ou não adenosina deaminase, com e sem N⁶-fenilisopropiladenosina. Os autores verificaram que para a síntese de glicogênio, não houve nenhuma diferença entre as preparações, indicando não haver interação entre adenosina e o complexo enzimático sintetase-fosforilase. Por outro lado, a adição de adenosina-deaminase aumentou a sensibilidade da glicólise à insulina, que, nesse caso, apresentou um Km de 10 μ UI/ml, contra 100 μ UI/ml nas demais preparações. Assim, esses achados sugerem que a adenosina no músculo diminui a sensibilidade à glicólise muscular em resposta à insulina e que seus efeitos sobre a síntese de glicogênio ocorrem via mecanismo pós-receptor. Os efeitos dessa deaminase na sensibilidade à insulina em músculos são idênticos ao efeito do treinamento em ratos. Isso sugere que os efeitos do treinamento físico na sensibilidade à insulina são decorrentes de mudanças locais na concentração de adenosina, ou seja, na diminuição de sua formação, no aumento da taxa de sua utilização ou ainda, mudanças no número e/ou sensibilidade de receptores de adenosina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, desmamados aos 21 dias, provenientes do Biotério Central de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais permaneceram por uma semana no biotério do laboratório de Biodinâmica da UNESP - Câmpus de Rio Claro, para adaptação, antes do início do tratamento experimental. Durante todo o trabalho, os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas, não excedendo a quatro animais por gaiola, em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas. Todos os ratos receberam alimento e água "ad libitum".

4.2. Dietas

Durante o experimento foram empregadas dietas semipurificadas normo (17%) e hipo (6%) protéicas, isocalóricas, cujas composições encontram-se descritas no quadro 1.

Quadro 1. Composição das Dietas (g/Kg)

Componentes	Concentração (g/Kg seco)	
	Normoprotéica ^º (17% de proteína)	Hipoprotéica [†] (6% de proteína)
Caseína *	202.0	71.5
Amido	397.0	480.0
Dextrina	130.5	159.0
Sacarose	100.0	121.0
L-Cistina	3.0	1.0
Mistura de Sais (AIN-93G)	35.0	35.0
Mistura de Vitaminas (AIN-93G)	10.0	10.0
Colina Cloridrato	2.5	2.5
Óleo de Soja	70.0	70.0
Fibra (microcelulose)	50.0	50.0

* Valores corrigidos para o teor de proteína contida na caseína (84% de proteína)

^º Reeves et al. (1993)

[†] Padronizada em nosso laboratório

4.3. Delineamento e grupos experimentais

Este estudo foi delineado em duas fases:

Na primeira fase (fase de desnutrição) do estudo, os ratos foram separados em dois grupos experimentais, de acordo com a dieta recebida:

I. Controles (C): ratos alimentados com a dieta normoprotéica.

II. Desnutridos (D): ratos alimentados com a dieta hipoprotéica.

Decorridas 5 semanas, 10 animais de cada grupo foram sacrificados para a avaliação do estado nutricional (através das análises bioquímicas) e para os procedimentos de incubação do músculo sóleo. A seguir, todos os animais restantes passaram a receber a dieta normoprotéica por período de 5 semanas (2ª Fase, Recuperação e Treinamento Físico), compondo, então, quatro novos grupos:

I. Controles Sedentários (CS): ratos alimentados por 10 semanas com a dieta normoprotéica.

II. Controles Treinados (CT): ratos alimentados por 10 semanas com a dieta normoprotéica, os quais realizaram atividade de natação durante as cinco últimas semanas.

III. Recuperados Sedentários (RS): ratos alimentados por 5 semanas com a dieta hipoprotéica e por 5 semanas com a dieta normoprotéica.

IV. Recuperados Treinados (RT): ratos alimentados por 5 semanas com a dieta hipoprotéica e por 5 semanas com a dieta normoprotéica, os quais realizaram atividade de natação durante as cinco últimas semanas.

Ao final do período de treinamento (2ª fase do experimento), os animais de todos os grupos foram sacrificados em repouso, para avaliação das respostas ao treinamento físico, assim como para os procedimentos de incubação do músculo sóleo e análise do lactato produzido.

4.4. Protocolo de exercício físico

O treinamento a que foram submetidos os animais consistiu de natação de 40 minutos com sobrecarga de 5% do peso corporal do animal, seguido de 30 minutos de natação sem sobrecarga, cinco dias por semana, durante sete semanas consecutivas, em tanque de 100 x 70 x 60 cm, contendo água mantida a $32 \pm 1^\circ \text{C}$.

4.5. Determinações gerais efetuadas:

4.5.1. Ganho de peso corporal:

Para a determinação do ganho de peso corporal em cada uma das fases do experimento, os animais foram pesados três vezes por semana..

4.5.2. Ingestão alimentar absoluta:

A ingestão alimentar dos animais foi obtida pesando-se diariamente o alimento contido nos comedouros. Por subtração da quantidade de alimento colocada no dia anterior, obteve-se a quantidade de alimento ingerido pelos animais de cada gaiola. A estimativa de ingestão alimentar por rato foi conseguida através da divisão do consumo total da gaiola pelo número de animais.

4.6. Obtenção das amostras sanguíneas e teciduais:

4.6.1. Sangue :

Os animais foram sacrificados por decapitação, sendo coletado o sangue em tubos de vidro sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e separado o soro para determinações de Glicose, Ácidos Graxos Livres, Albumina e Proteínas Totais.

4.6.2. Tecidos :

Imediatamente após o sacrifício, através de laparotomia mediana, foi retirada uma porção do fígado. Foi também extraída uma porção do músculo gastrocnêmio da pata posterior. Ambas as amostras dos tecidos foram imediatamente digeridas em solução de KOH a 30% e à quente, para

determinação do glicogênio. Foram ainda retiradas fatias do músculo sóleo de ambas as patas para os procedimentos de incubação.

4.7. Procedimentos de incubação do músculo sóleo:

4.7.1. Preparação dos músculos:

A preparação dos músculos, assim como a pré-incubação e incubação foram realizadas segundo procedimento básico descrito por KOKUBUN (1990).

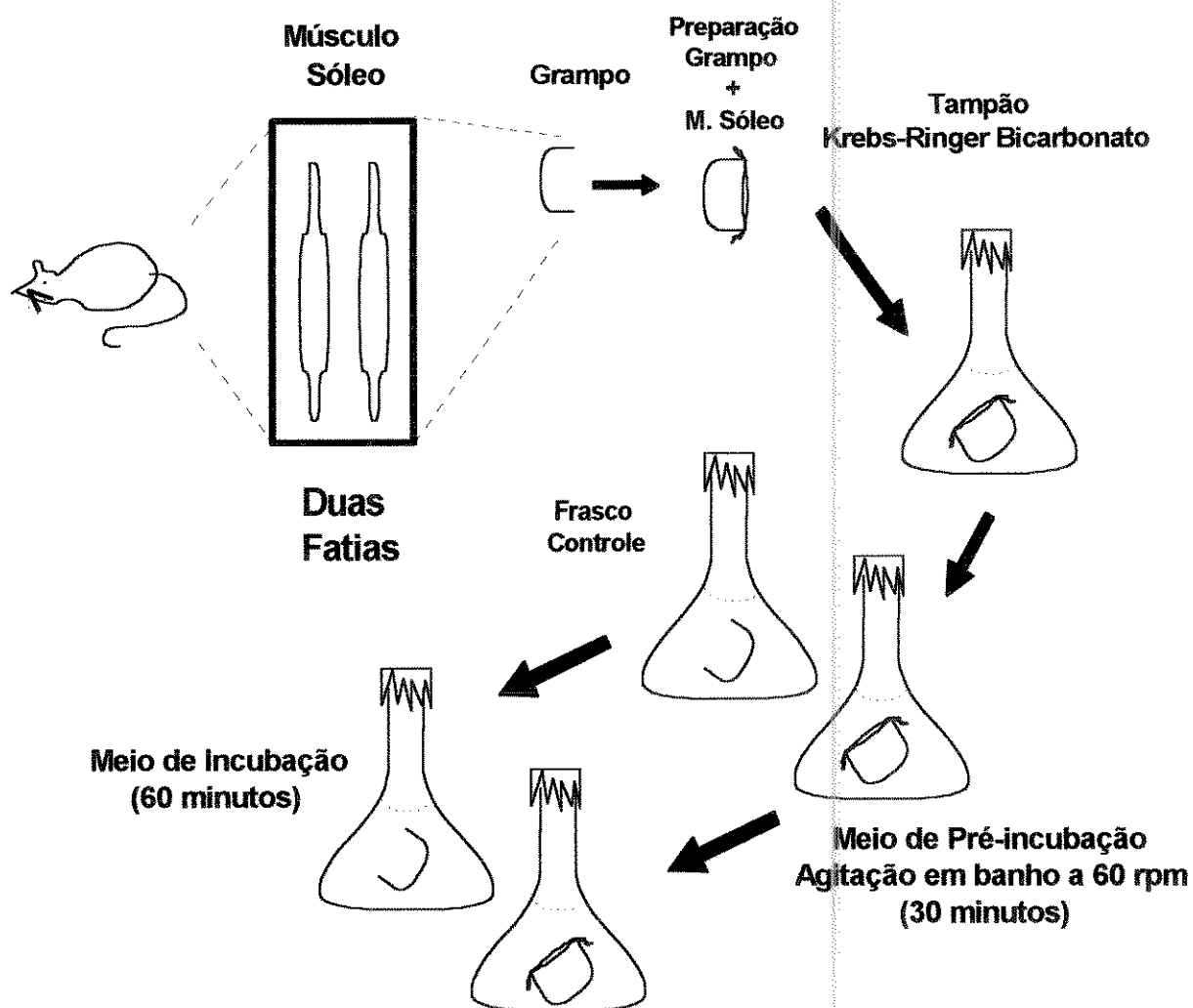
Após sacrifício, as patas traseiras dos ratos foram removidas, sendo então retirados em mesa cirúrgica a pele e o músculo gastrocnêmio, com exposição do músculo sóleo. Os tendões distal e proximal do músculo sóleo foram liberados e com um bisturi foi efetuado um corte longitudinal na linha mediana do músculo. Os tendões de cada fatia de músculo foram ligados *in situ* com uma linha de algodão, a grampos em "U" recobertos por cânulas de polipropileno, respeitando-se o comprimento de repouso do músculo. A seguir, essa preparação foi pesada e as fatias com peso entre 25 e 35 mg foram submetidas ao procedimento de incubação. O período de tempo entre o sacrifício do animal e o início da incubação foi de, no máximo, 5 minutos.

4.7.2. Incubação das fatias de músculo:

As fatias de músculos presas aos grampos foram colocadas em Erlenmeyers de 25 ml siliconizados, contendo 3.5 ml de tampão Krebs-Ringer bicarbonato. Os frascos foram selados com tampas de borracha e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubinoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂ /CO₂ (95%/5%). Após esse período de pré-incubação, os músculos foram transferidos a outro frasco contendo 3.5 ml de meio de incubação, durante 60 minutos, com gaseamento durante os primeiros 15 minutos. Frascos controle contendo meio de incubação e grampo sem músculo foram incubados em cada experimento. Após o período de incubação, 1 ml de amostra do meio foi desproteïnizada em 1 ml de solução de HClO₄ 0.6N e a fatia de músculo imediatamente digerida em 0.5 ml de KOH para dosagem do glicogênio muscular (ver item 4.8.6.2.). A temperatura na pré-

incubação e incubação foi de 37° C. Os procedimentos de incubação estão resumidos no Esquema 1 abaixo:

Esquema 1: PROCEDIMENTOS DE INCUBAÇÃO



4.7.3. Meios de pré-incubação e incubação:

O tampão Krebs-Ringer foi preparado para concentração final de: NaCl 0.6 %, HEPES 6.64 mM, KCl 0.032 %, CaCl_2 1.14 mM, KH_2PO_4 0.015 %, NaHCO_3 0.19%, Mg.SO_4 0.03%.

A solução assim preparada foi gaseada durante 20 a 30 minutos em O_2/CO_2 (95%/5%) e o pH ajustado a 7.4. À esta solução foram adicionados 20 volumes de albumina sérica bovina livre de gordura para o meio de pré-incubação ou um total de 20 volumes de albumina livre de gordura (1.4%). Ao meio de pré-incubação foi adicionado piruvato de sódio para a concentração de 5 mM. Ao meio de incubação, foram adicionadas glicose (5.5mM) contendo $[U-^{14}C]$ glicose (0.25 $\mu Ci/ml$), $[^3H]$ 2-deoxiglicose (2-DG) (0.5 $\mu Ci/ml$) e insulina (100 $\mu UI/ml$). Feitas as adições, o pH foi ajustado a 7.25 e os meios transferidos para os frascos que foram selados e equilibrados no banho a 37° C sob gaseamento em O_2/CO_2 (95%/5%) durante pelo menos 15 minutos. Na fase de desnutrição, as fatias dos animais C e D foram incubadas em meio contendo (P) ou não (N) oleato (0.8 mM) para a verificação do papel dos ácidos graxos livres no metabolismo muscular dos animais desnutridos, que sabidamente apresentam valores elevados de AGL nesse estado nutricional, como inclusive foi verificado no presente trabalho. Na segunda fase, as fatias do sóleo foram incubadas apenas em meios sem oleato.

4.7.4. Preparação da albumina:

Para retirar toda a gordura presente na albumina, foram dissolvidos por toda noite 32 gramas de albumina em 120 mililitros de água destilada. Foram adicionados 16 gramas de carvão ativado pré-lavado, sendo então ajustado o pH para 3 com HCl (7.5N), agitando por uma hora. Após essa etapa, a solução foi filtrada e centrifugada a 6000 rpm em Ultra centrífuga para separação total do carvão da albumina. A solução foi neutralizada com NaOH (1N) e dializada contra NaCl (0.9%).

4.8. Determinações bioquímicas efetuadas:

4.8.1. Captação de glicose e síntese de glicogênio:

Foram realizadas a determinação da captação da 2-DG e a incorporação do carbono ao glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ^{14}C da glicose e 3H da 2-deoxiglicose contidas, respectivamente, no

precipitado e na fase alcoólica da extração do glicogênio utilizando-se contador de partículas Beta¹. (contador BECKMAN LS6000TA).

4.8.2. Glicose sérica:

O método utilizado para a determinação da glicose sérica foi enzimático (glicose oxidase), no qual marcamos três tubos contendo 2ml de tampão contendo fenol 2.5 mM, 4 (p-benzoquinona monodimino) fenazona 1,14 mM, tampão Tris 0,04 mM, glicose-oxidase 2,7 U/ml e peroxidase 0,33 U/ml. Em um dos tubos foi pipetado 20 µl de padrão glicose (100mg/dl) e em outro 20µl de soro. O ensaio foi incubado por 15 minutos em banho a 37°C. A absorbância das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro² a 505 nm (HENRY, 1974):

4.8.3. Proteínas totais séricas:

A determinação da concentração sérica de Proteínas Totais, foi realizada através do método do reagente de biureto (sulfato de cobre a 10%), que utiliza a presença de íons Cu^{++} em meio alcalino reagindo com as ligações peptídicas das proteínas, dando origem a um complexo de cor violeta, portanto, proporcional ao teor de proteínas. Os valores das amostras foram conseguidos, adicionando a 0.1 ml de soro, 5.0 ml de reagente de biureto. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro² a 545 nm e as concentrações obtidas contra curva de calibração de Proteínas Totais (HENRY, 1974).

4.8.4. Albumina sérica:

A concentração da albumina sérica foi determinada através do método colorimétrico do verde de bromocresol. Foram adicionados a 0,02 ml de soro, 5,0 ml de reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0.60 mM, tampão succinato 0.1 M, surfactante não iônico 30% e pH 4,0. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro² a 630 nm e as concentrações

¹ Contador BECKMAN LS6000TA

² Espectrofotômetro Micronal modelo B382

determinadas contra curva de calibração de albumina, linear até concentrações de 6 g/l (DOUMAS et al., 1971).

4.8.5. Ácidos Graxos Livres (AGL) séricos:

Para determinação deste substrato, foram adicionados em 0,3 ml de soro, 7 ml da mistura solvente clorofórmio, heptano e metanol, na proporção de 28:21:1, seguida de forte agitação e centrifugação a 700 xg por um período de 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e a ele adicionado uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,05 M, trietanolamina 0,10 M, NaOH 0,035 N e NaCl 35% a pH 8,1, seguido de nova agitação e centrifugação. A 3,0 ml de sobrenadante foram adicionados 0,5ml de solução de dietilditiocarbamato de sódio (1mg/ml de butanol secundário). A concentração de AGL foi medida em espectrofotômetro² a 435 nm contra curva de calibração de ácido palmítico (REGOUW et al., 1971).

4.8.6. Glicogênio tecidual :

4.8.6.1 Glicogênio muscular:

Frações entre 25-35 mg do músculo sóleo foram pesadas após sacrifício do animal e imediatamente digeridas em banho a 100°C em 0,5 ml de KOH 1N durante 20 minutos. Foram adicionados 20 µl de solução saturada de Na_2SO_4 e o glicogênio foi precipitado através de duas passagens de 2,5 ml de etanol a quente, seguido de centrifugação, descartando-se o sobrenadante. O glicogênio precipitado foi ressuspenso em 4 ml de água e a determinação colorimétrica realizada em 1 ml de extrato, 20 µl de fenol a 80% e 2,0 ml de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro² a 490 nm. Foram utilizadas soluções de glicose para as curvas de calibração (HASSID & ABRAHAM, 1957).

4.8.6.2. Glicogênio do músculo submetido à incubação

A digestão foi realizada em 0.5 ml de KOH 1 N durante 20 minutos, seguido de adição de 20 µl de solução saturada de Na_2SO_4 e precipitação do glicogênio em 2.5 ml de etanol. O precipitado foi ressuspenso em 4 ml de água e a determinação colorimétrica realizada em 1 ml de extrato, 20 µl de fenol a 80% e 2.0 ml de ácido sulfúrico. A radioatividade do ^{14}C da glicose e ^3H da 2-

deoxiglicose contida, respectivamente no precipitado e sobrenadante, foi medida em contador de partículas Beta¹.

4.8.6.3. Glicogênio hepático:

As diferenças na determinação do glicogênio no tecido hepático, em relação ao tecido muscular, são as seguintes: as frações de tecido hepático retirados após sacrifício pesaram aproximadamente 500 mg, portanto, com necessidade de digestão em 2 ml de solução KOH 30%. A precipitação do glicogênio hepático foi feita em 0,1 ml de Na_2SO_4 e 7 ml de etanol e, após a extração, o precipitado foi suspenso em 25 ml de água deionizada (HASSID & ABRAHAM, 1957).

4.8.7. Lactato do meio de incubação:

O lactato foi determinado por método enzimático no sangue ou no meio de incubação desproteinizados, conforme ENGEL & JONES (1978), modificado para as seguintes concentrações finais no meio de ensaio: glicina 1,4%, EDTA.Na_2 0,42%, hidrato de hidrazina 0,92%, NAD^+ 0,43 mM, LDH 1U/ml a pH 8.85. Após a incubação da amostra a 37° C durante 30 minutos, a concentração de lactato foi medida a 340 nm contra curva de calibração de L-lactato.

4.9. Estimativa da glicólise nos músculos incubados:

Este parâmetro foi determinado por meio da subtração da glicose captada pela síntese de glicogênio. Dessa maneira, a depleção do glicogênio não foi considerada nessa estimativa. Em algumas situações na descrição dos resultados, a síntese de glicogênio, a estimativa da glicólise e a produção do lactato no meio de incubação foram expressos em porcentagem em relação à glicose captada.

4.10. Procedimento estatístico

Foi realizado através de Análise de Variância, sendo testados os efeitos estado nutricional (desnutrido, recuperado), presença de ácidos graxos livres e estado de treinamento. Quando necessário, foi utilizado teste "post hoc" de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos. Em todos os

casos, foi prefixado o nível de significância para $p < 0.05$, tendo sido tomados os cuidados estatísticos necessários, com relação ao tamanho da amostra, segundo COSTA NETO (1977). Os resultados foram expressos em médias $\pm$ erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1. Primeira Fase: DESNUTRIÇÃO

5.1.1. Ganho de Peso Corporal durante a fase de desnutrição:

Ao longo das cinco semanas da primeira fase do trabalho, os animais alimentados com a dieta contendo 6% de proteína apresentaram menor ganho de peso que os animais controles que foram tratados com dieta normoprotéica (tabela 1, figura 1). Observando os resultados referentes ao período todo, os desnutridos tiveram um ganho de peso corporal de apenas 26.9% do verificado nos controles.

Tabela 1. Evolução do Ganho de Peso Corporal (g) de ratos controles e desnutridos ao longo das cinco primeiras semanas de experimento. (fase de desnutrição)

Grupo	Semanas				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Controle (n=8)	21.1 ± 1.94	16.1 ± 1.0	43.3 ± 2.2	43.0 ± 2.5	35.0 ± 1.4
Desnutrido (n=8)	6.7 ± 0.7*	3.0 ± 0.4*	11.9 ± 1.1*	10.5 ± 1.1*	12.8 ± 1.3*

Os resultados são médias ± erro padrão.

*Dif. Significativa (p<0.05) em relação a: grupo controle.

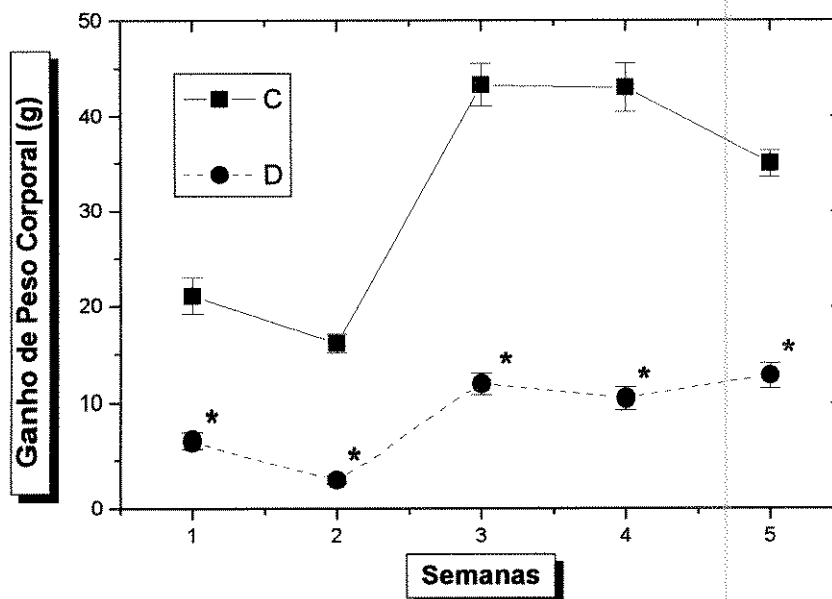


Figura 1. Evolução do Ganho de peso corporal (g) de ratos controles (quadrados fechados) e desnutridos (círculos fechados) nas primeiras cinco semanas de experimento (Fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

5.1.2. Ingestão alimentar absoluta durante a fase de desnutrição:

Os animais desnutridos apresentaram menor ingestão alimentar absoluta em relação aos animais controles nas cinco semanas da fase de desnutrição (tabela 2, figura 2). Foi verificado também, nos controles, rápido aumento da ingestão alimentar na terceira semana, que é coincidente a um aumento, também rápido no ganho de peso corporal (figura 1).

Tabela 2. Ingestão alimentar de ratos controles e desnutridos ao longo das cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição)

Grupo	Semanas				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Controle (n=8)	11.83 ± 0.62	11.57 ± 0.49	17.28 ± 1.15	15.84 ± 0.74	18.26 ± 0.46
Desnutrido (n=8)	8.30 ± 0.16*	9.01 ± 0.58*	8.73 ± 0.67*	9.45 ± 0.60*	11.97 ± 1.00*

Os resultados são médias ± erro padrão.

Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação a: * grupo controle.

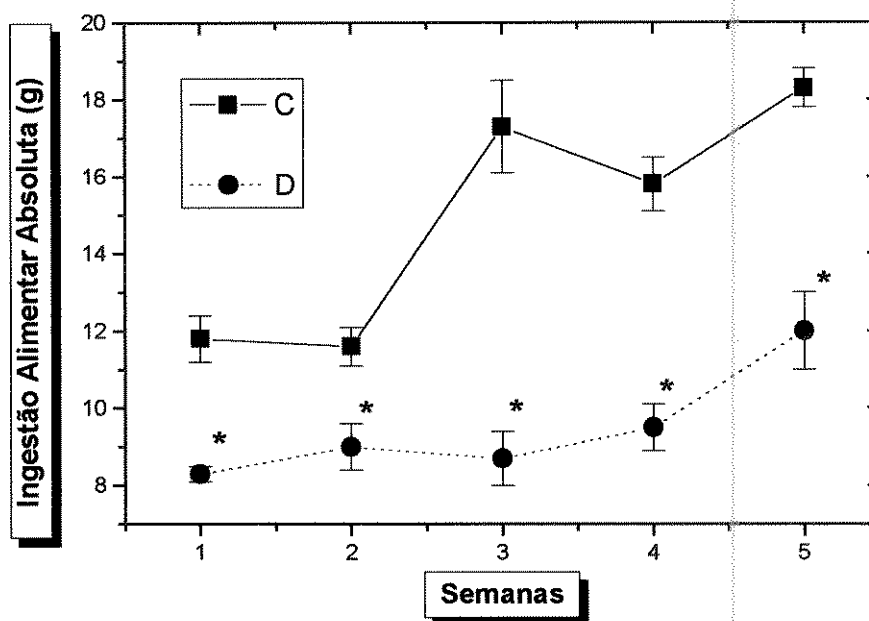


Figura 2. Ingestão Alimentar Absoluta de ratos controles (quadrados fechados) e desnutridos (círculos fechados) nas primeiras cinco semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

5.1.3. Parâmetros séricos e teciduais de repouso, ao final da fase de desnutrição.

Os ratos submetidos à dieta a 6% de proteína apresentaram valores diferentes nas concentrações sanguíneas de glicose e ácidos graxos livres (AGL) em relação aos animais controles. Para o primeiro parâmetro, os desnutridos tiveram concentrações 19.1% inferiores as encontradas nos ratos controles (tabela 3, figura 3). Os valores dos AGL registrados para os animais desnutridos foram 10.3% superiores aos observados nos animais tratados com a dieta normoprotéica (tabela 3, figura 4).

Tabela 3. Concentrações circulantes de Glicose e Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).

	Glicose (mg/dl)	A.G.L. (μ Eq/l)
Controle (n=8)	122.8 $\pm$ 5.2	576.8 $\pm$ 17.2
Desnutrido (n=8)	99.4 $\pm$ 5.2 *	636.4 $\pm$ 16.6 *

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. *Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

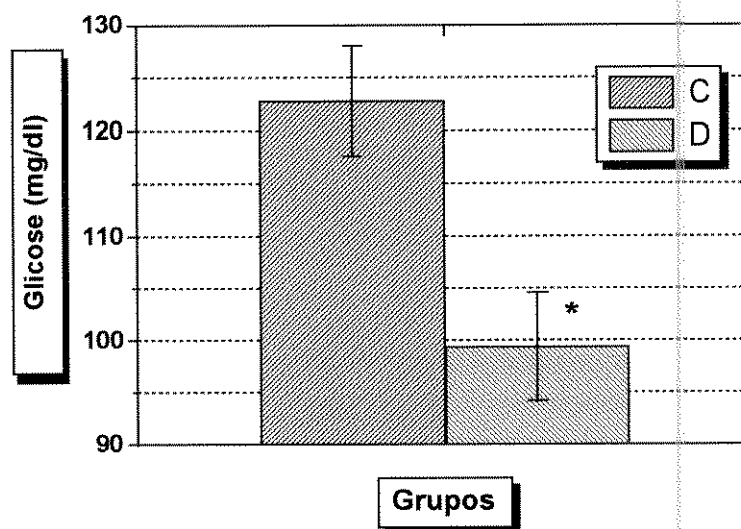


Figura 3. Concentrações circulantes de Glicose de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

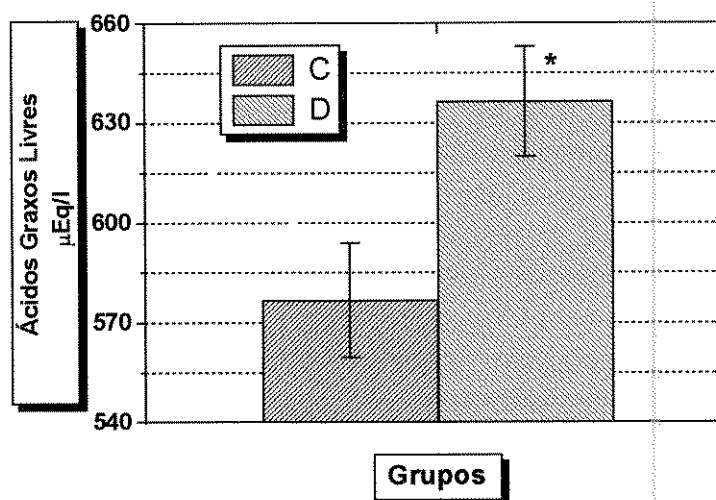


Figura 4. Concentrações circulantes de Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). *dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

Os animais desnutridos apresentaram concentrações sanguíneas de proteínas totais e albumina inferiores 32.0% e 20.5%, respectivamente, em relação as concentrações obtidas no soro dos ratos controles (Tabela 4, figuras 5 e 6).

Tabela 4. Concentrações circulantes de Proteínas Totais e Albumina de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).

	Proteínas Totais (g/dl)	Albumina (g/dl)
Controle (n=6)	6.22 ± 0.20	2.69 ± 0.14
Desnutrido (n=6)	4.23 ± 0.21 *	2.14 ± 0.07 *

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. *Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

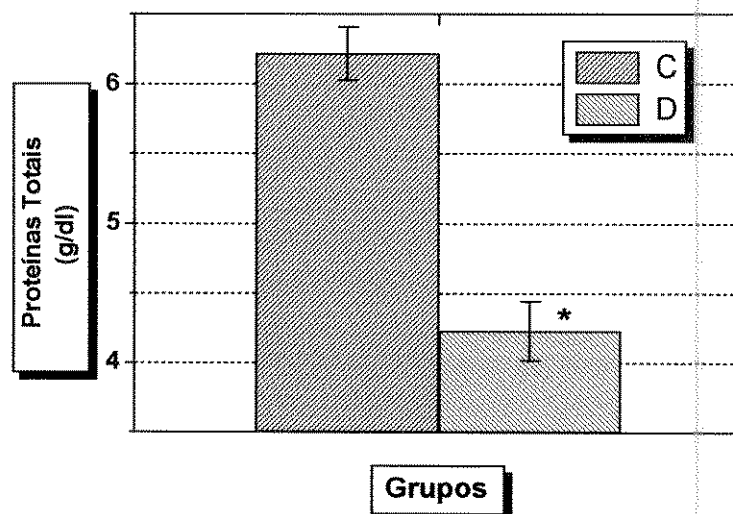


Figura 5. Concentrações circulantes de Proteínas Totais de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

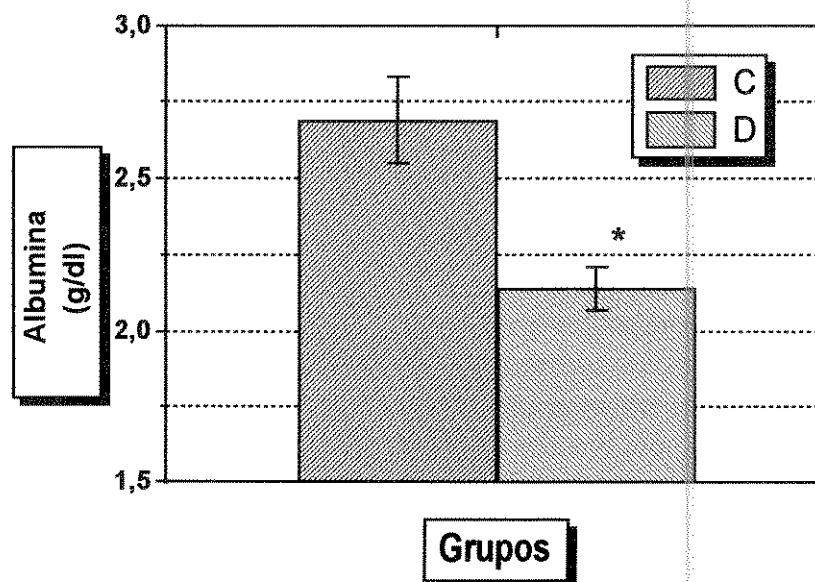


Figura 6. Concentrações circulantes de Albumina de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

Os teores de glicogênio hepático estiveram superiores nos animais desnutridos (28.5%, tabela 5, figura 7), enquanto que para o glicogênio do músculo sóleo, nenhuma diferença foi constatada quando esses ratos foram comparados aos controles (tabela 5, figura 8).

Tabela 5. Concentrações teciduais de Glicogênio do fígado e do músculo sóleo de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição).

	GLICOGÊNIO ($\mu\text{mol/g}$)	
	Fígado	Sóleo
Controle (n=8)	386.9 $\pm$ 45.1	49.2 $\pm$ 4.5
Desnutrido (n=8)	540.7 $\pm$ 58.8*	48.8 $\pm$ 2.0

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. *Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

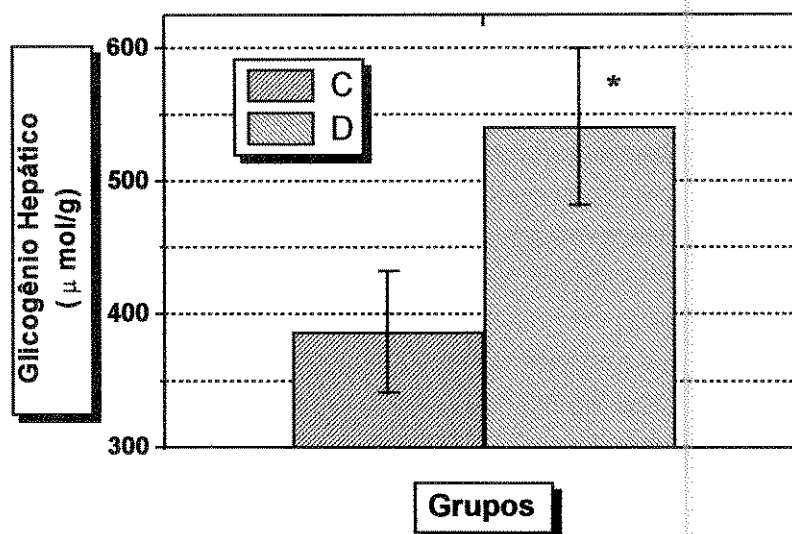


Figura 7. Concentrações teciduais de Glicogênio do fígado de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

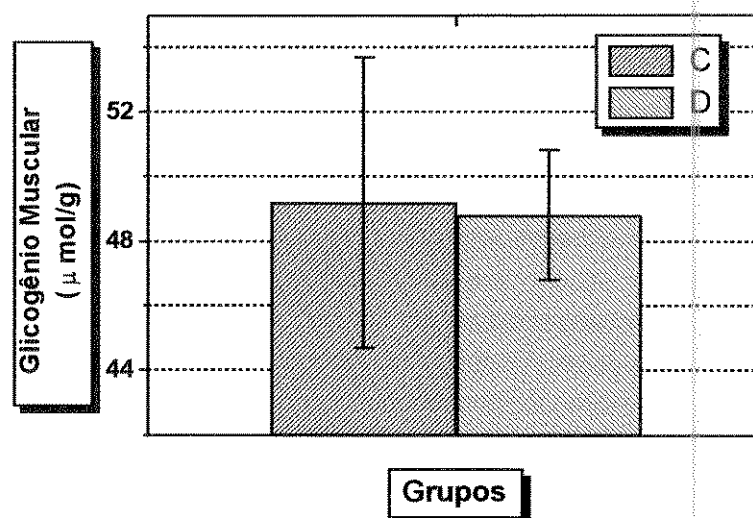


Figura 8. Concentrações teciduais de Glicogênio do músculo sóleo de ratos controles e desnutridos após cinco primeiras semanas de experimento (fase de desnutrição). * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle.

5.1.4. Incubação do músculo sóleo isolado ao final da fase de desnutrição.

Como descrito na metodologia, imediatamente após o sacrifício frações de músculo sóleo foram separadas (25-35 mg) para os procedimentos de incubação. Uma vez que os animais desnutridos apresentaram valores de ácidos graxos livres elevados *in vivo* em relação aos controles (tabela 3, figura 4), realizamos incubações em meio contendo AGL (0.8 mM) para melhor simular as condições *in vivo* dos animais alimentados com dieta hipoprotéica. Ao final de 60 minutos, o músculo incubado foi digerido para determinação da captação de glicose e síntese de glicogênio. Além disso, foram coletadas amostras do meio de incubação para a determinação do lactato produzido. A captação de glicose pelo músculo sóleo não esteve alterada entre animais desnutridos e controles após o período de incubação, independente da presença (P) ou não (N) dos AGL

(tabela 6, figura 9). Por outro lado, a incorporação de ^{14}C à glicogênio (síntese) esteve maior nos animais tratados com dieta normoprotéica, independente do meio apresentar ou não AGL (Tabela 6, figura 10). Os animais DN incorporaram 26.6% menos ^{14}C que os ratos CN, enquanto que para os DP, a síntese de glicogênio foi 40.4% menor que a dos animais do grupo CP.

Assim sendo, os resultados mostraram que os AGL não interferiram sobre a captação de glicose e síntese de glicogênio (Tabela 6, figuras 9 e 10).

A produção de lactato no meio de incubação foi superior nas fatias musculares que não receberam AGL no meio, independente do estado alimentar dos animais. Os animais CN apresentaram produção 47.7% superior a dos controles incubados com AGL (CP). Essa diferença foi ainda maior entre os grupos DN e DP. Os primeiros tiveram produção 58.5% maior que a verificada nas fatias dos desnutridos incubadas com AGL (tabela 7, figura 11). As fatias DN produziram 39.2% mais lactato que as CN, enquanto que nos meios contendo AGL (P), os sóleos dos desnutridos apresentaram produção 23.3% superior a dos CP (tabela 7, figura 11).

Tabela 6. Captação de glicose (^3H - 2DG) e incorporação de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose pelo músculo sóleo de ratos controles (C) e desnutridos (D), na primeira fase do experimento, após 60 minutos de incubação em meio ausente (N) e com (P) AGL (oleato - 0.8 mM).

GRUPOS	Captação de glicose	Síntese de glicogênio
	($\mu\text{mol/g.h}$)	($\mu\text{mol/g.h}$)
CN	19.60 ± 1.34 (12)	3.12 ± 0.18 (7)
CP	21.19 ± 1.15 (7)	3.42 ± 0.22 (8)
DN	19.13 ± 1.09 (13)	2.29 ± 0.22 ¥ *a (7)
DP	18.45 ± 1.03 (8)	2.04 ± 0.24 ¥ *b (8)

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. ¥ Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação aos controles, na presença ou ausência de oleato no meio de incubação. * Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação a: a) CN; b) CP.

Tabela 7. Produção de Lactato pelo músculo sóleo de ratos controles (C) e desnutridos (D), na primeira fase do experimento, após 60 minutos de incubação em meio ausente (N) e com (P) AGL (oleato-0.8mM).

	Produção de Lactato no meio de incubação ($\mu\text{mol/g.h}$)
CN (n=7)	37.10 ± 1.85
CP (n=8)	19.36 ± 1.91 £ *a
DN (n=7)	61.03 ± 6.00 ¥ *a
DP (n=8)	25.32 ± 2.24 ¥ £ *c

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. ¥ Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação aos controles, na presença ou ausência de oleato no meio de incubação. £ Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação aos meio sem oleato, independente do estado nutricional dos animais. * Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação a: a) CN; c) DN.

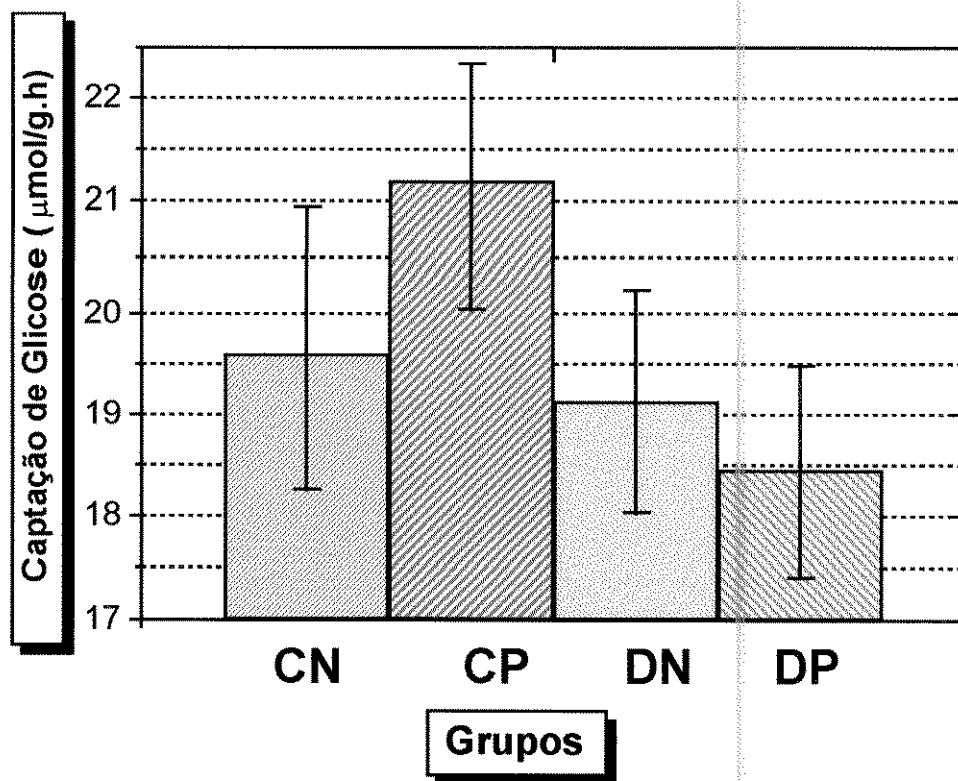


Figura 9. Captação de glicose pelo músculo sóleo isolado de ratos controles (C) e desnutridos (D) na primeira fase do experimento, incubados por 60 minutos em meio de incubação sem (N) ou com (P) a presença de AGL (oleato - 0.8 mM).

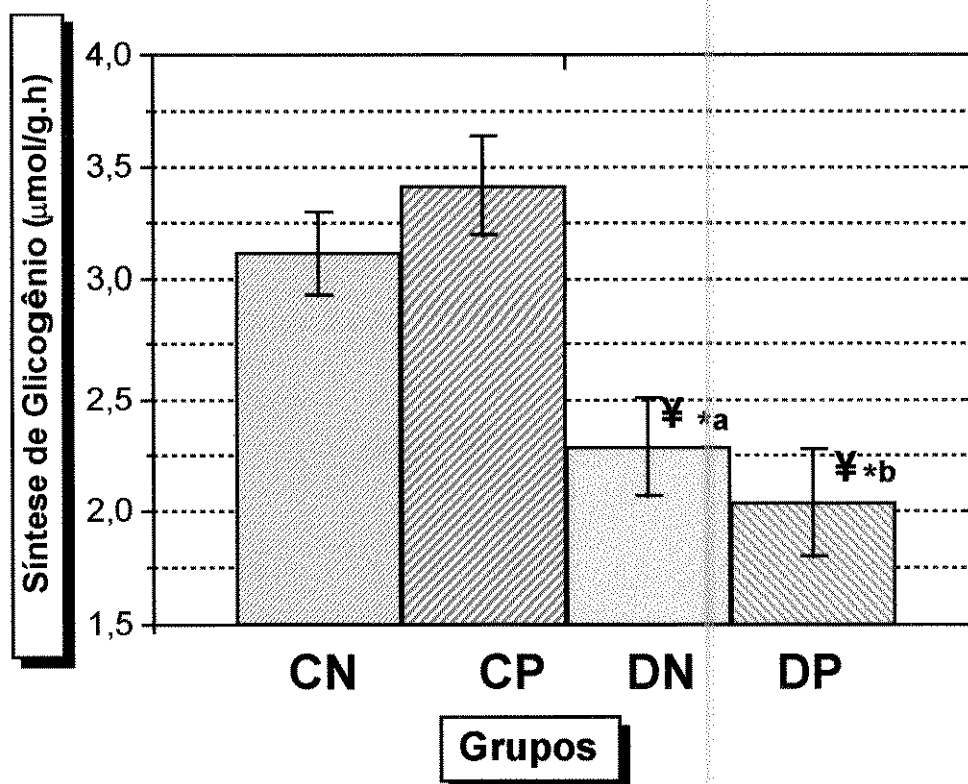


Figura 10. Síntese de glicogênio pelo músculo sóleo isolado de ratos controles (C) e desnutridos (D) na primeira fase do experimento, incubados por 60 minutos em meio de incubação sem (N) ou com (P) a presença de AGL (oleato - 0.8 mM). ¥ Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação aos controles, na presença ou ausência de oleato no meio de incubação. * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação a: a) CN; b) CP.

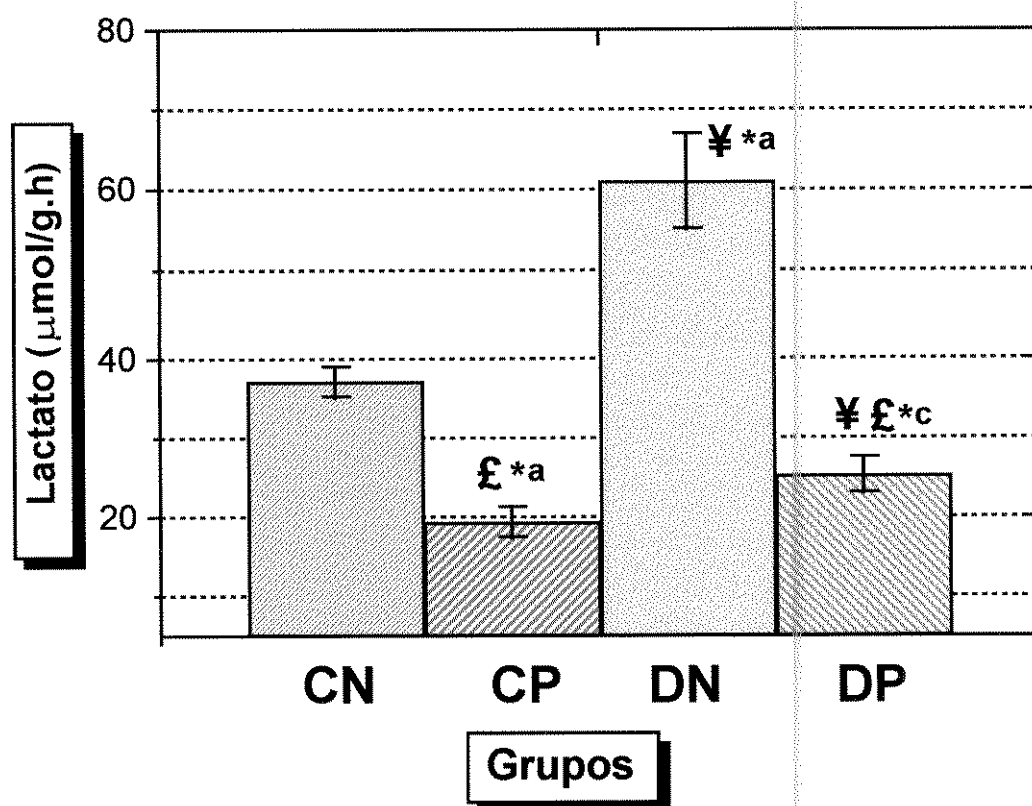


Figura 11. Produção de Lactato pelo músculo sóleo isolado de ratos controles (C) e desnutridos (D) na primeira fase do experimento, incubados por 60 minutos em meio de incubação sem (N) ou com (P) a presença de AGL (oleato - 0.8 mM). ¥Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação aos controles, na presença ou ausência de oleato no meio de incubação. £Dif. Significativa ($p < 0.05$) em relação aos meio sem oleato, independente do estado nutricional dos animais * dif. significativa ($p < 0.05$) em relação a: a) CN; c) DN.

5.2. Segunda Fase: RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL E TREINAMENTO FÍSICO

5.2.1. Ganho de Peso Corporal durante a fase de recuperação nutricional e treinamento:

Os animais desnutridos da fase anterior e recuperados posteriormente, apresentaram maior ganho de peso corporal na sexta, nona e décima semanas do experimento (respectivamente, primeira, quarta e quinta do período), na presença ou ausência do treinamento físico. Nas sétima e oitava semanas, os animais recuperados sedentários e treinados apresentaram ganho de peso semelhante aos respectivos controles. Na décima primeira, apenas os RT tiveram ganho superior aos controles (CT). Com relação ao estado de treinamento físico, os animais CT tiveram menor ganho de peso nas sexta, décima e décima primeira semanas, enquanto que os recuperados treinados tiveram menor crescimento em relação aos RS nas sétima, oitava e décima primeira semanas (tabela 8, figura 12).

Tabela 8. Evolução do Ganho de Peso Corporal (g) de ratos controles sedentários, controles treinados, recuperados sedentários e recuperados treinados nas seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

Grupos	Semanas					
	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a
CS (n=8)	36.8 ± 2.2	30.8 ± 1.6	24.6 ± 1.7	17.6 ± 1.5	16.9 ± 0.7	29.9 ± 2.9
CT (n=10)	16.3 ± 1.4 ^{*a}	32.8 ± 2.1	19.6 ± 2.4	15.1 ± 2.2	8.6 ± 1.6 ^{*a}	18.2 ± 1.5 ^{*a}
RS (n=9)	58.6 ± 3.5 ^{*a}	42.9 ± 2.7	28.7 ± 1.9	27.2 ± 1.6 ^{*a}	20.9 ± 1.1 ^{*a}	31.7 ± 2.0
RT (n=9)	55.2 ± 1.5 ^{*b}	35.3 ± 1.7 ^{*c}	17.8 ± 1.7 ^{*c}	24.8 ± 1.6 ^{*b}	16.7 ± 1.7 ^{*b}	23.8 ± 1.5 ^{*b*c}

Os resultados são médias ± erro padrão. * Dif. Significativa (p<0.05) em relação a: a) grupo CS, b) grupo CT, c) grupo RS.

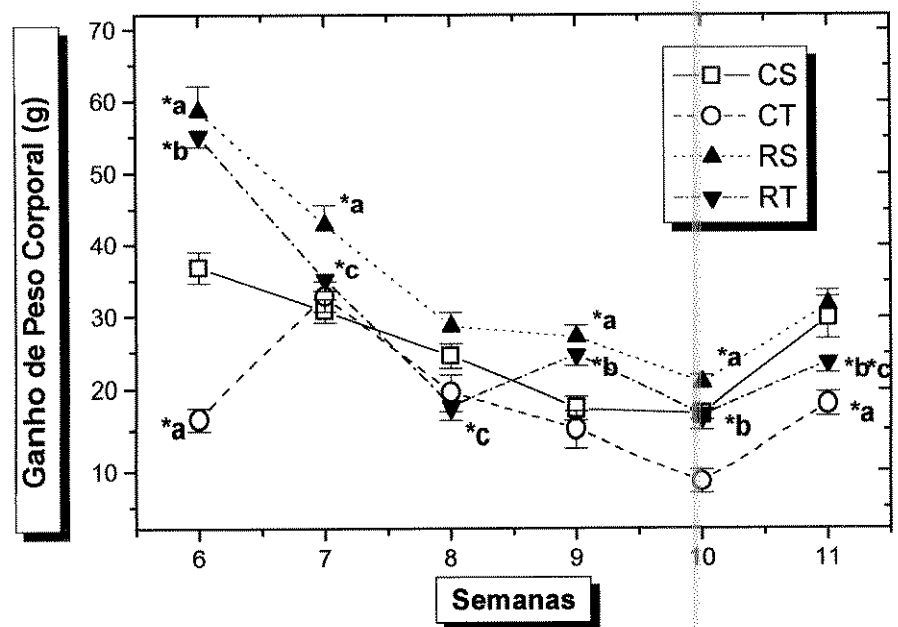


Figura 12. Evolução do Ganho de peso corporal de ratos Controles Sedentários (CS), Controles Treinados (CT), Recuperados Sedentários (RS) e Recuperados Treinados (RT) nas seis semanas da segunda fase do experimento (recuperação nutricional e treinamento físico). *Diferença significativa ($p<0.05$) em relação a: a) CS, b)CT, c)RS.

5.2.2. Ingestão Alimentar Absoluta durante a fase de recuperação nutricional e treinamento físico:

Os animais recuperados sedentários tiveram menor ingestão que os controles sedentários nas oitava e nona semanas do experimento. A ingestão alimentar dos animais recuperados treinados foi menor que a dos controles treinados apenas na sexta semana. Assim, de maneira geral, os aspectos alimentares estiveram bastante semelhantes entre controles e recuperados na segunda fase do trabalho (tabela 9, figura 13). Se observarmos o maior ganho de peso corporal dos recuperados, podemos supor que a eficiência alimentar esteve maior nesses grupos.

Tabela 9. Ingestão Alimentar (g) de ratos controles sedentários, controles treinados, recuperados sedentários e recuperados treinados nas seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

Grupos	Semanas					
	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a
CS (n= 08)	21.3 ± 2.7	23.4 ± 5.7	27.0 ± 1.4	27.4 ± 1.9	27.9 ± 1.5	27.1 ± 3.6
CT (n= 10)	23.9 ± 3.1	25.7 ± 5.2	26.0 ± 3.3	26.0 ± 2.5	27.2 ± 3.3	27.6 ± 1.7
RS (n= 09)	17.8 ± 1.8	22.3 ± 2.0	23.9 ± 0.5 ^{*a}	24.4 ± 1.0 ^{*a}	25.8 ± 1.0	26.2 ± 0.6
RT (n= 09)	18.9 ± 0.8 ^{tb}	21.8 ± 1.4	23.1 ± 0.6	23.6 ± 0.8	25.1 ± 0.7	24.8 ± 1.9

Os resultados são médias ± erro padrão.
* Dif. Significativa (p<0.05) em relação a:a) grupo CS, b) grupo CT.

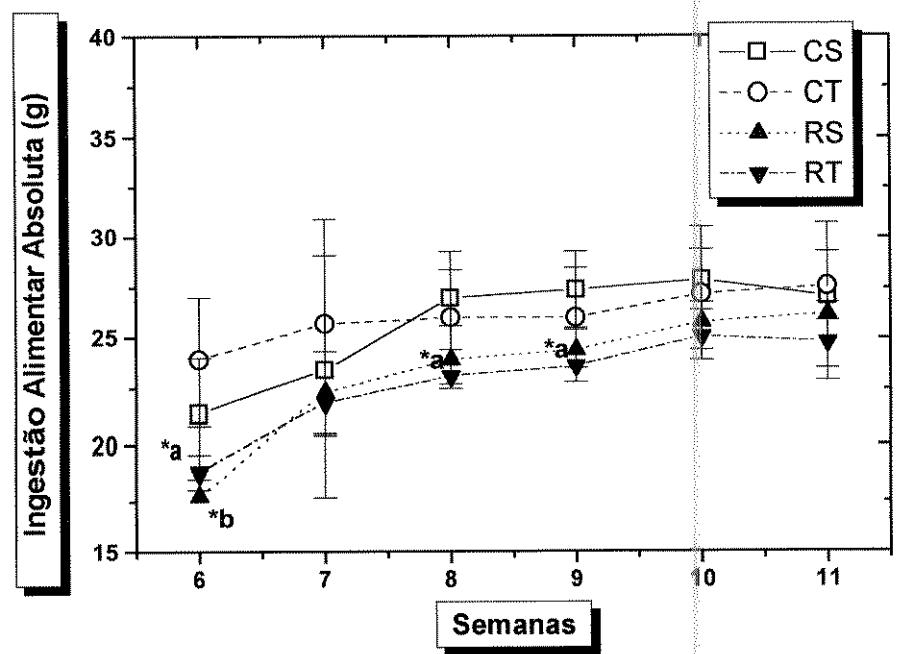


Figura 13. Ingestão Alimentar de peso corporal de ratos Controles Sedentários (CS), Controles Treinados (CT), Recuperados Sedentários (RS) e Recuperados Treinados (RT) nas seis semanas da segunda fase do experimento (recuperação nutricional e treinamento físico). * Diferença significativa ($p<0.05$) em relação a: a) CS, b)CT.

5.2.3. Parâmetros séricos e teciduais de repouso ao final da fase de recuperação nutricional e treinamento físico.

Ao final da fase de recuperação e treinamento físico, as concentrações séricas de glicose e ácidos graxos livres, que estavam alteradas nos animais desnutridos na etapa anterior, passaram a apresentar valores semelhantes nos quatro grupos da presente fase (tabela 10, figuras 14 e 15).

Tabela 10. Concentrações circulantes de Glicose e Ácidos Graxos Livres (A.G.L.) de ratos controles (C) e recuperados (R), sedentários (S) e treinados (T), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

	Glicose (mg/dl)	A.G.L. (μEq/l)
CS	93.9 ± 3.5 (12)	645.8 ± 41.0 (13)
CT	99.2 ± 3.4 (10)	522.1 ± 49.8 (10)
RS	104.0 ± 5.4 (12)	545.0 ± 43.5 (13)
RT	100.6 ± 5.0 (12)	557.6 ± 50.9 (11)

Os resultados são médias ± erro padrão com o número de animais entre parêntesis.

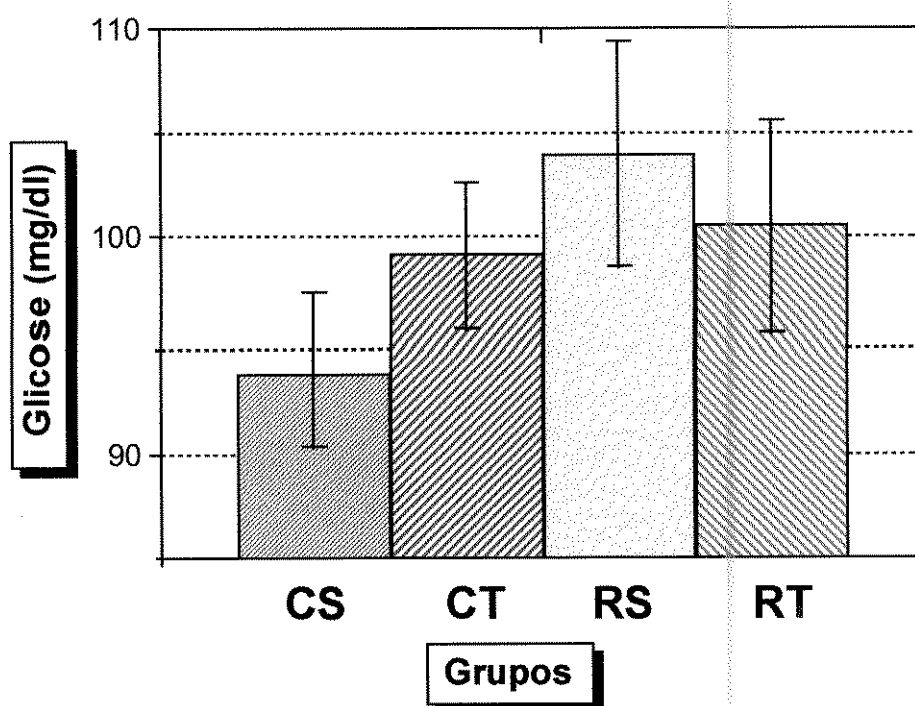


Figura 14. Concentrações circulantes de Glicose de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

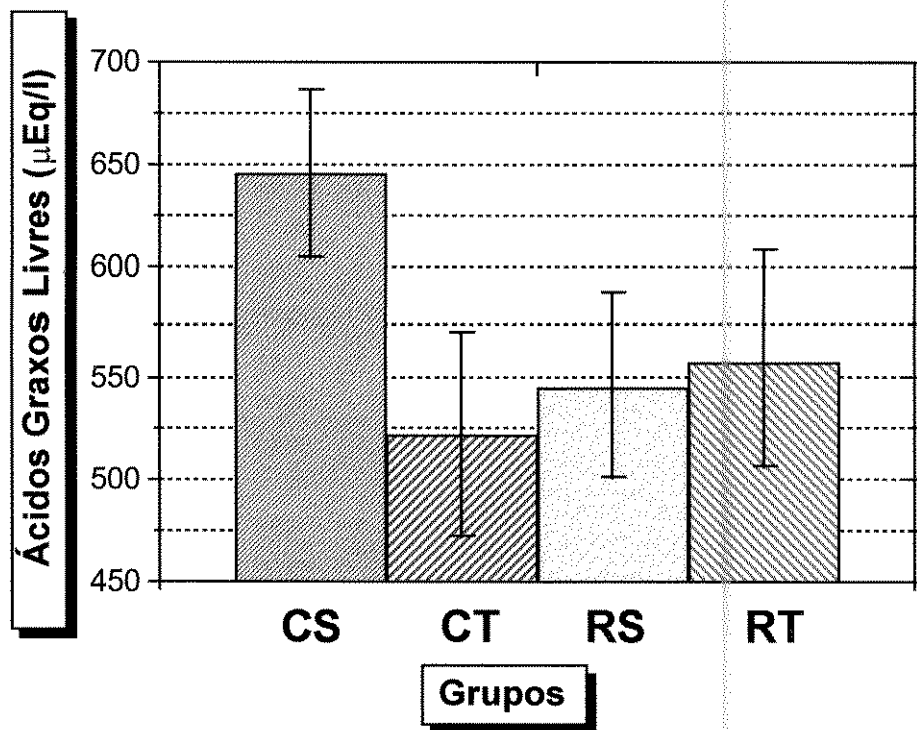


Figura 15. Concentrações circulantes de Ácidos Graxos Livres de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

Com relação às concentrações séricas de proteínas totais e albumina, foi verificado que os animais treinados apresentaram valores 5.9% inferiores de proteínas totais em relação aos animais sedentários, independente da dieta a que foram mantidos na fase anterior (tabela 11, figura 16). A albuminemia esteve semelhante em todos os grupos estudados (tabela 11, figura 17).

Tabela 11. Concentrações circulantes de Proteínas Totais e Albumina de ratos controles (C) e recuperados (R), sedentários (S) e treinados (T), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

	Proteínas Totais (g/dl)	Albumina (g/dl)
CS	7.38 ± 0.25 (15)	3.38 ± 0.17 (13)
CT	6.72 ± 0.17 # (11)	3.32 ± 0.16 (11)
RS	6.98 ± 0.19 (15)	3.37 ± 0.19 (12)
RT	6.79 ± 0.13 # (15)	3.34 ± 0.17 (13)

Os resultados são médias ± erro padrão com o número de animais entre parêntesis. # Dif. significativa (p<0.05) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar.

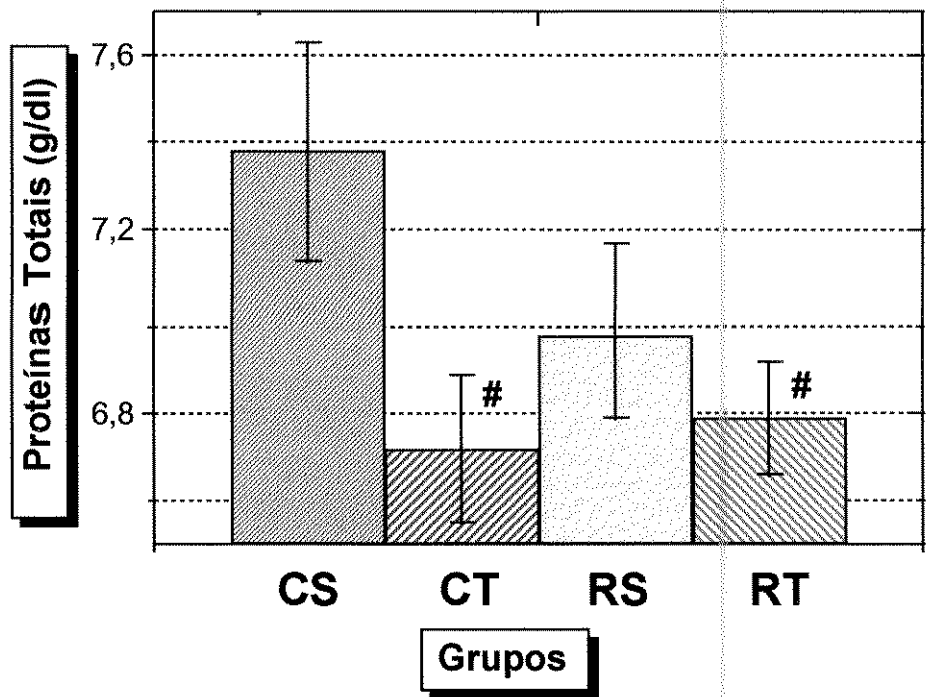


Figura 16. Concentrações circulantes de Proteínas Totais de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico). # Dif. significativa ($p < 0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar.

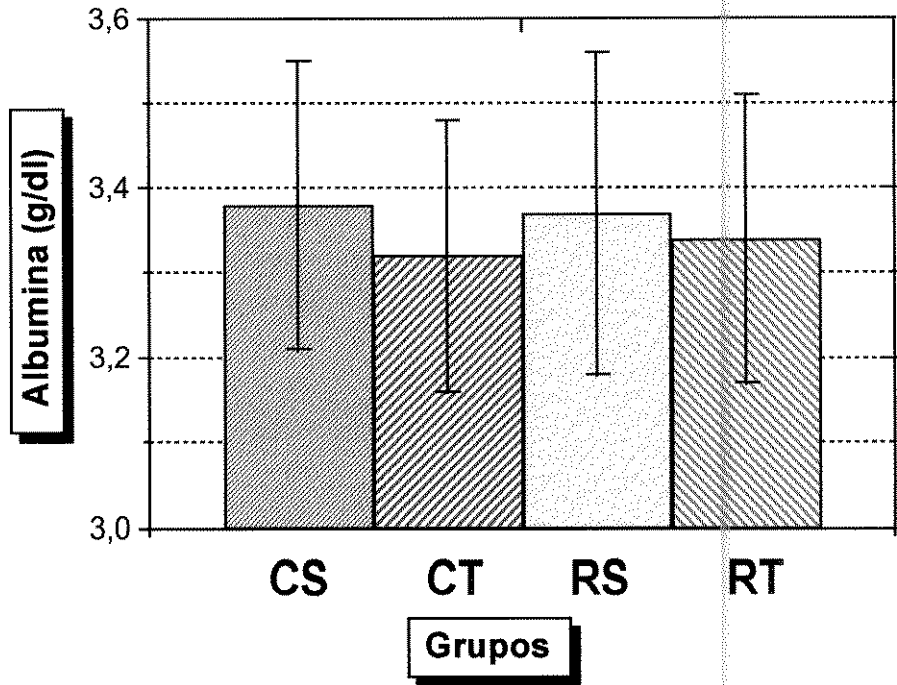


Figura 17. Concentrações circulantes de Albumina de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

Os valores de glicogênio do fígado mostraram-se 11.9 % superiores nos animais controles em relação aos recuperados, independentemente do estado de treinamento físico. Levando em conta o estado de treinamento, verificamos que os ratos exercitados apresentaram, coincidentemente, concentrações 11.9% maiores que os sedentários, independente do estado nutricional. Estas diferenças nos teores de glicogênio hepático foram marcadas pelo “estado nutricional” e “estado de treinamento” isolados, não havendo, entretanto, interações entre esses dois efeitos (tabela 12, figura 18). Os resultados referentes aos valores musculares de glicogênio (sóleo), não revelaram quaisquer diferenças entre os grupos de ratos (tabela 12, figura 19).

Tabela 12. Concentrações teciduais glicogênio hepáticos e muscular (sóleo) de ratos controles (C) e recuperados (R), sedentários (S) e treinados (T), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

GLICOGÊNIO (μmol/g)		
	Fígado	Sóleo
CS	340.6 ± 20.6 (8)	57.2 ± 5.1 (7)
CT	436.1 ± 40.6 # (6)	57.8 ± 6.1 (6)
RS	325.6 ± 13.9@ (8)	63.3 ± 2.9 (8)
RT	341.7 ± 29.4 @# *e (8)	68.9 ± 4.1 (8)

Os resultados são médias ± erro padrão com o número de animais entre parêntesis. # Dif. significativa (p<0.05) entre treinados e sedentários, independente do estado nutricional. @ Dif. significativa (p<0.05) entre recuperados e controles, independente do estado de treinamento. *Dif. significativa (p<0.05) em relação a: e) CT.

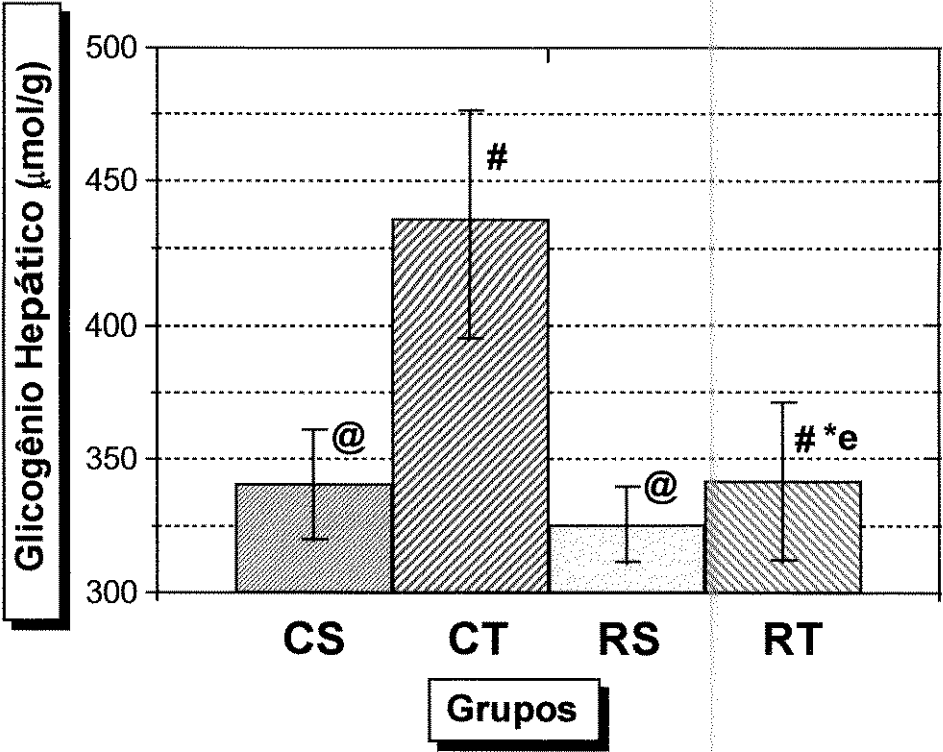


Figura 18. Concentrações teciduais Glicogênio hepático de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico). # Dif. significativa ($p < 0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar. @ Dif. significativa ($p < 0.05$) entre controles e recuperados, independente do estado de treinamento. * Dif. significativa ($p < 0.05$) em relação a: e) CT.

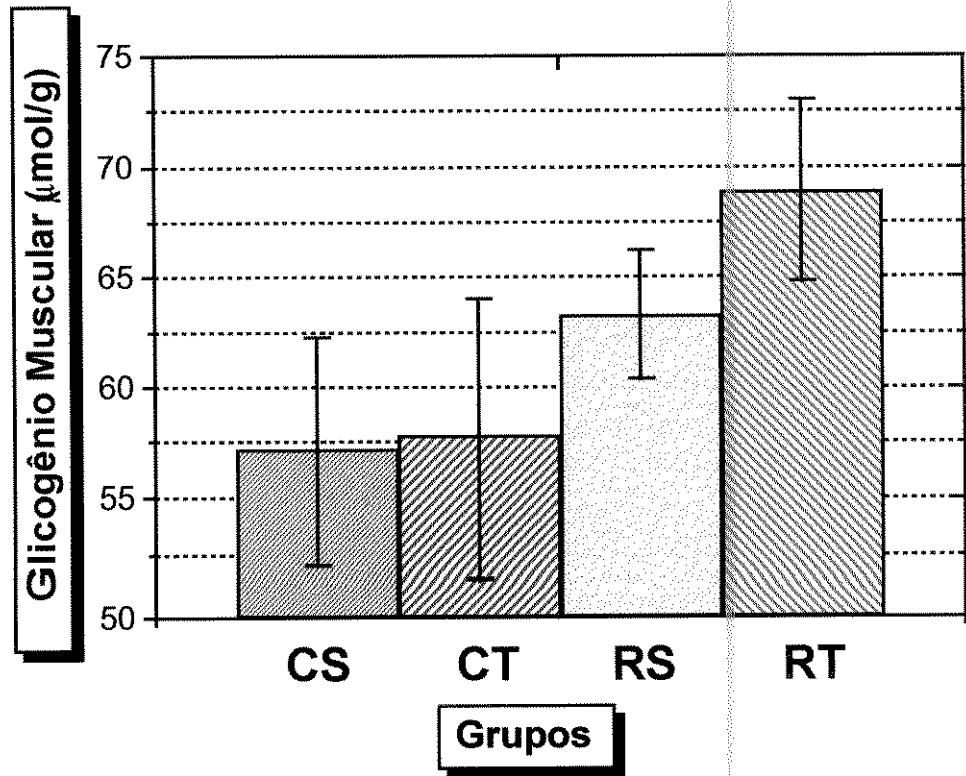


Figura 19. Concentrações teciduais de Glicogênio do músculo sóleo de ratos controles sedentários (CS), controles treinados (CT), recuperados sedentários (RS), recuperados treinados (RT) após as seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico).

5.2.4. Incubação do músculo sóleo isolado ao final da fase de recuperação nutricional e treinamento físico.

As fatias musculares dos ratos dos grupos CT e RT aumentaram a captação de glicose em relação aos seus grupos sedentários em 12.3% e 12.2%, respectivamente. Entre os animais sedentários (CS e RS), os controles apresentaram maior captação de glicose (13.4%) em relação aos ratos anteriormente desnutridos. Esses resultados foram também verificados entre

os treinados, sendo que nos CT, os valores de captação de glicose foram 13.5% superiores aos observados nos RT. Apesar de parecer estranha a comparação, os animais RT não apresentaram diferenças nesse parâmetro em relação aos CS, o que, como vimos, foram diferentes aos RS. Esse resultado será destacado na seção discussão e parece ser um efeito importante do treinamento físico no processo de recuperação nutricional muscular (tabela 13, figura 20).

Na fase anterior (desnutrição), os animais tratados com dieta hipoprotéica apresentaram valores inferiores de síntese de glicogênio. Na fase de recuperação e treinamento físico, a incorporação do ^{14}C ao glicogênio não apresentou diferenças entre os grupos estudados. Entretanto, os ratos treinados apresentaram maior síntese de glicogênio (20.1% superior), independente do estado nutricional da fase anterior (tabela 13, figura 21).

A produção de lactato no meio de incubação foi maior (19.2%) nas fatias de músculo dos ratos CT do que nas dos CS. Entre os animais recuperados, não foram registradas diferenças nas concentrações de lactato nos meios de incubação. Entre os grupos treinados (CT e RT), também não foram verificadas diferenças, mas entre os sedentários, os recuperados (RS) produziram mais lactato (26.8%) que os CS (tabela 14, figura 22).

Tabela 13. Captação de glicose (³H- 2DG) e incorporação de [U-¹⁴C] glicose pelo músculo sóleo de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (DS e DT) após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação.

GRUPOS	Captação de glicose	Síntese de glicogênio
	($\mu\text{mol/g.h}$)	($\mu\text{mol/g.h}$)
CS	29.91 ± 1.10 (13)	2.71 ± 0.26 (10)
CT	$34.14 \pm 1.52 \#^{*d}$ (14)	$3.10 \pm 0.18 \#$ (12)
RS	$25.07 \pm 1.04 @^{*d}$ (13)	2.42 ± 0.14 (9)
RT	$29.53 \pm 1.00 @ \#^{*e, f}$ (13)	$3.07 \pm 0.26 \#$ (10)

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários, independente do estado nutricional. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre recuperados e controles, independente do estado de treinamento. *Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: d) CS; e)CT; f)RS.

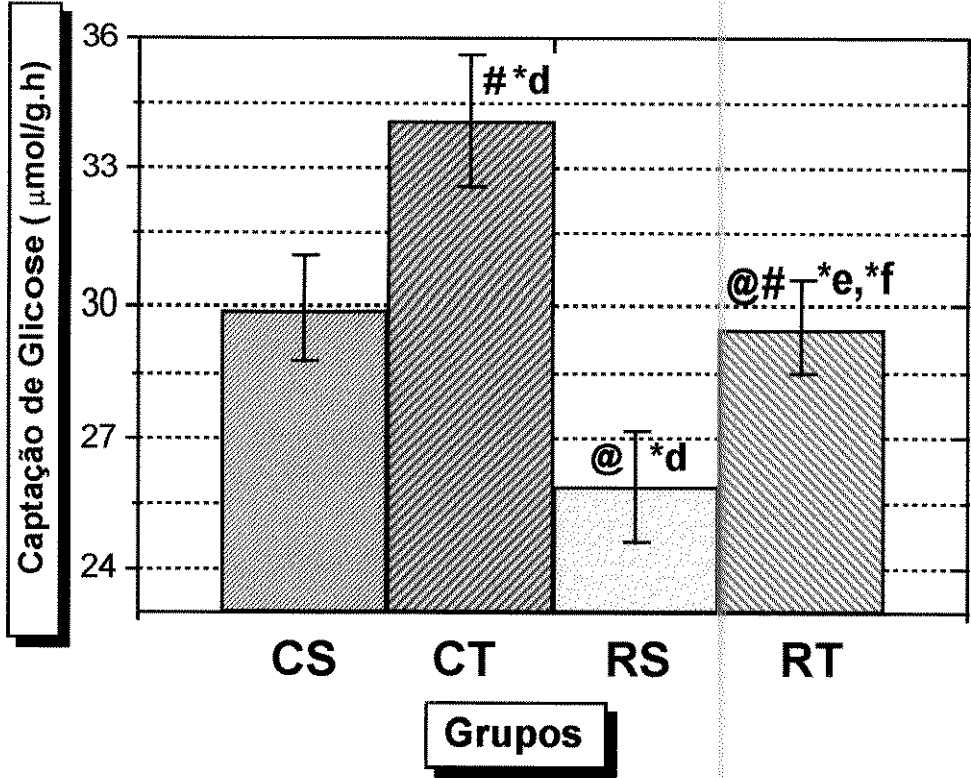


Figura 20. Captação de glicose em sóleo isolado de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (RS e RT), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação. # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre controles e recuperados, independente do estado de treinamento. * Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: d) CS; e) CT.e f) RS.

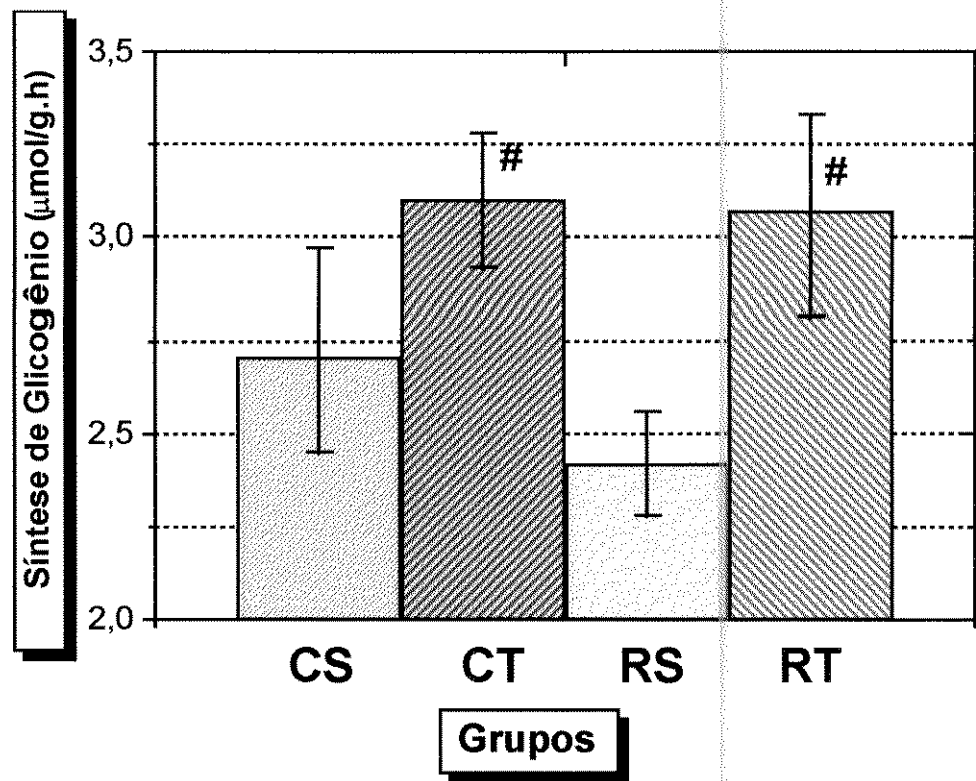


Figura 21. Síntese de glicogênio em sóleo isolado de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (RS e RT), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação. # Dif. significativa ($p<0.05$) entre treinados e sedentários, independente do tratamento alimentar.

Tabela 14. Produção de Lactato pelo músculo sóleo de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (DS e DT) após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação.

	Produção de Lactato no meio de incubação ($\mu\text{mol/g.h}$)
CS	12.29 ± 0.67 (14)
CT	$15.22 \pm 0.66^{*d}$ (15)
RS	$16.78 \pm 1.04^{@*d}$ (10)
RT	$15.95 \pm 0.75^{@}$ (13)

Os resultados são médias $\pm$ erro padrão com o número de animais entre parêntesis. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre controles e recuperados, independente do tratamento de treinamento. *Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: d) CS.

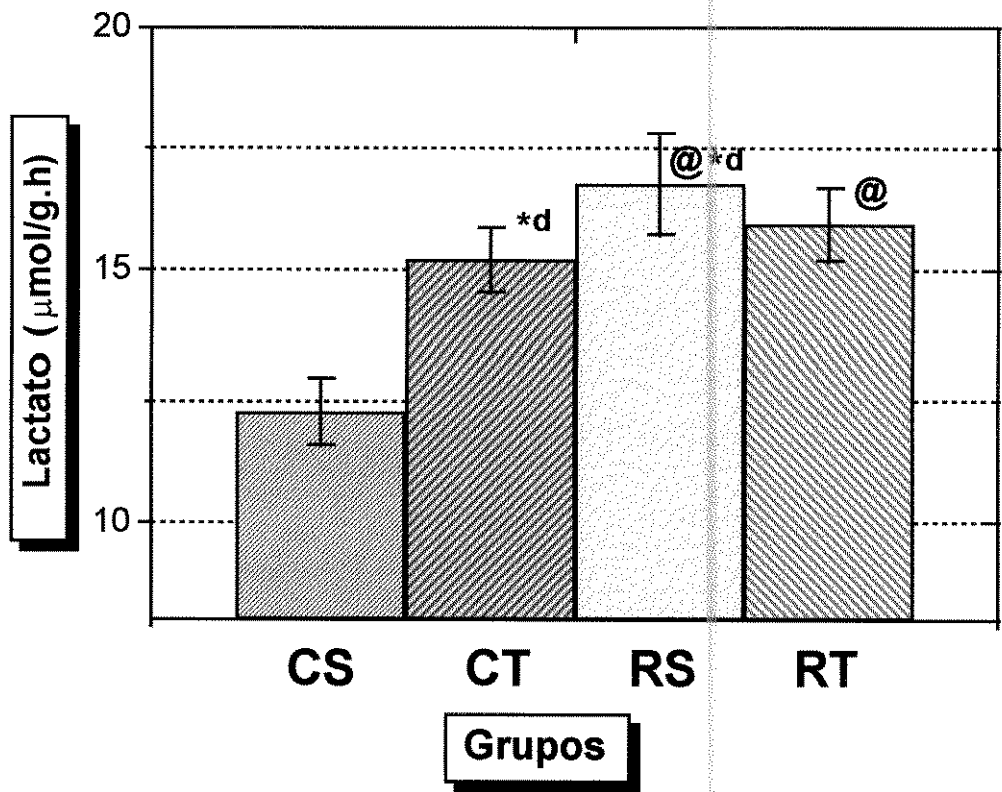


Figura 22. Produção de lactato em sóleo isolado de ratos controles sedentários e treinados (CS e CT) e recuperados sedentários e treinados (RS e RT), após seis semanas da segunda fase do experimento (Recuperação e treinamento físico), após 60 minutos de incubação. @ Dif. significativa ($p<0.05$) entre controles e recuperados, independente do estado de treinamento.* Dif. significativa ($p<0.05$) em relação a: d) CS.

6. DISCUSSÃO

6.1. Primeira Fase: DESNUTRIÇÃO

Os resultados referentes ao ganho de peso corporal, às concentrações sanguíneas de glicose, AGL, proteínas totais e albumina e teores hepáticos de glicogênio, indicam que a alimentação dos ratos com a dieta a 6% de proteína foi eficaz em causar o estado de desnutrição nos animais (WATERLOW & ALLEYNE, 1974; LUNN & AUSTIN, 1983; GOBATTO & MELLO, 1991; MELLO, 1994).

A redução do ganho de peso na desnutrição (tabela 1, figura 1) tem sido relacionada a alterações funcionais e morfológicas, principalmente no pâncreas exócrino e epitélio entérico, que comprometem a digestão e absorção de nutrientes. Dessa forma, a ingestão inadequada de proteínas que, por si, retarda o crescimento, pode levar o organismo à redução do aproveitamento alimentar (MARCONDES, 1976). Com a reduzida eficiência do alimento, o baixo peso corporal em ratos submetidos à desnutrição protéica é fenômeno amplamente relatado na literatura (ESCRIVA et al., 1991).

Os valores superiores de glicogênio hepático observado nos ratos D em relação aos C (tabela 5, figura 7) são observações clássicas na desnutrição protéica. É provável que isso seja causado por deficiência de conteúdo e/ou de atividade da enzima glicose-6-fosfatase, presente no fígado, o que impede a liberação hepática de glicose. Entretanto, no músculo, constata-se ausência da G-6-Pase, o que pode explicar a semelhança entre os conteúdos de glicogênio muscular dos ratos D e C (WATERLOW & ALLEYNE, 1974).

Constatamos baixas concentrações sanguíneas de glicose em um modelo de desnutrição no qual previamente foi detectado reduzida secreção pancreática de insulina (CARNEIRO et al., 1995). Assim, verificamos o paradoxo metabólico relatado anteriormente em modelos de desnutrição, ou seja, baixa glicemia associada a baixa insulinemia (ESCRIVA et al., 1991;

OKITOLONDA et al., 1987; RAO, 1995). Com isso, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar essa inconsistência metabólica. Uma delas é simplesmente a menor absorção intestinal de carboidratos na desnutrição. Outra possibilidade pode estar relacionada à maior captação de glicose pela maior sensibilidade à insulina principalmente no tecido muscular, por ser o mais abundante nesses animais apesar da desnutrição. Finalmente, pode ocorrer aumento da utilização de carboidratos pelo fígado.

A primeira hipótese parece difícil de ser sustentada pois em testes de tolerância à glicose, animais submetidos a desnutrição protéica apresentam valores máximos de glicose simultaneamente ao verificado em ratos controles, sugerindo integridade do processo absorptivo naqueles animais. Apesar disso, observa-se intolerância à glicose nos desnutridos (MELLO & CURY, 1989). Embora essa hipótese seja pouco provável, pelo exposto acima, alguns autores acreditam que a mesma não pode ser totalmente descartada pois em dietas hipoprotéicas, em geral, substitui-se proteínas por carboidratos a fim de torná-las isocalóricas, tornando-as hiperglicídicas. Essa alteração na desnutrição protéica parece causar redução na absorção de carboidratos (MARCONDES, 1976).

Em nosso experimento, a captação de glicose pelo músculo não esteve alterada pela desnutrição, em meio contendo ou não AGL (tabela 6, figura 9). Em incubações com concentração de insulina próxima ao Km para o tecido muscular ($100 \mu\text{U/ml}$), os animais tratados com dieta a 6% de proteína apresentaram sensibilidade à insulina semelhante à dos animais C (tabela 6). Ao contrário, CRACE et al. (1990), CARNEIRO et al. (1995) e REIS et al. (1997), verificaram maior sensibilidade à insulina em animais tratados com dieta deficiente em proteína. CRACE et al. (1990) relataram maior captação de glicose em músculos sóleo desnutridos isolados, em relação aos alimentados com dieta normoprotéica, mesmo na ausência total de insulina.

Com relação à possibilidade de aumento da utilização de carboidratos pelo fígado, o que poderia ser um dos motivos da hipoglicemia na desnutrição, apesar de não termos realizado incubação do tecido hepático, é provável que

tenha ocorrido maior extração hepática de insulina, o que se confirma pelos elevados teores de glicogênio hepático. Entretanto, como os estoques de glicogênio hepático são limitados, parece inadequado atribuir a isso a baixa glicemia verificada nos animais alimentados com a dieta hipoprotéica.

Outra possibilidade é a ocorrência de maior sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos de indivíduos desnutridos, uma vez que recentemente foi relatado que as etapas iniciais da sinalização da insulina encontram-se exacerbadas em músculo e fígado isolados de ratos deficientes em proteína (REIS et al., 1997). Os dados anteriores de OKITOLONDA et al. (1987) suportam tal possibilidade, já que observaram maior efeito da insulina intravenosa em tecidos de ratos alimentados com dieta hipoprotéica.

Por outro lado, RAO (1995) considerou pouco provável a ocorrência de maior sensibilidade à insulina em indivíduos desnutridos, já que os mesmos são resistentes aos efeitos hipoglicêmicos da insulina exógena. Em seus estudos, RAO (1995) não verificou comprometimento na extração hepática de insulina ou na produção de glicose pelo fígado em decorrência da desnutrição calórica. Para o autor, a reduzida concentração sanguínea de glicose na desnutrição parece estar mais relacionada à menor secreção de glucagon durante a desnutrição energética. Entretanto, DOLLET et al. (1985) não verificaram alterações na concentração de glucagon na desnutrição protéica.

Considerando o exposto acima e com vistas aos nossos resultados, parece pouco provável que alterações na captação de glicose pelo músculo possam estar envolvidas na gênese do paradoxo metabólico observado em nosso estudo.

Na tentativa de elucidarmos esses aspectos contraditórios, devemos levar em consideração que o valor do Km da concentração de insulina no tecido muscular é 100 $\mu\text{U/ml}$, ao passo que é extremamente menor no tecido adiposo (10 $\mu\text{U/ml}$). Esse valor para o adipócito refere-se tanto para a captação de glicose como também para a lipólise (GREEN & NEWSHOLME, 1979).

É então possível que, um organismo com menor capacidade de produção de insulina desenvolva adaptações, visando maior síntese hepática e adiposa de ácidos graxos. No aspecto energético, essa adaptação reduz a glicemia, elevando a concentração de AGL, o que é característica da desnutrição e resposta verificada no presente estudo (tabela 3, figura 4). Em contrapartida, sabidamente o aumento plasmático dos AGL causa resistência à insulina (RANDLE et al., 1963) e redução na extração hepática desse hormônio, o que no caso da desnutrição, parece ser interessante ao organismo, que apresenta deficiente síntese de insulina (CARNEIRO et al., 1995).

Quanto ao metabolismo intramuscular, quando os animais foram sacrificados, constatamos *in vivo* elevada concentração sérica de AGL, baixa glicemia, maior concentração de glicogênio do fígado e semelhantes teores de glicogênio muscular nos ratos D em comparação aos C. Além disso, foram estudadas, em uma primeira etapa, fatias do músculo sóleo, incubadas *in vitro* em meio sem oleato (AGL). Os resultados mostraram menor síntese de glicogênio (tabela 6, figura 10) e maior produção de lactato no meio de incubação nos músculos dos ratos D em relação aos ratos controles (tabela 7, figura 11).

Com relação à menor síntese de glicogênio, tem sido relatado que a insulina pode interferir sobre o mRNA para a síntese da hexoquinase (HK) e glicogênio sintetase (GS) em músculos esqueléticos. Em humanos, a constante infusão de insulina aumentou o mRNA para a síntese muscular de HK e a atividade da enzima, mas não interferiu no mRNA, nem na concentração da GS, embora tenha aumentado a atividade dessa enzima (MANDARINO et al., 1995). Isso sugere que a atividade da GS nos músculos dos desnutridos possa estar reduzida em relação aos ratos C, com menor resposta à insulina, mesmo em concentrações semelhantes do hormônio no meio de incubação, o que parece possível uma vez que no estado *in vivo*, a concentração de insulina nos D é menor. É importante frisar que essa hipótese tem que ser analisada com cautela em face aos dados de REIS et al. (1997)

mostrando aumento das etapas iniciais da sinalização da insulina em tecidos provenientes de ratos desnutridos, de forma que futuros trabalhos estão sendo projetados para investigá-la.

A partir dos nossos resultados verificamos, através da elevada concentração de lactato no meio, que o sóleo desnutrido incubado apresentou em ausência de oleato, um estado catabólico glicídico. Isso é conflitante com os dados obtidos em repouso *in vivo*, onde foi observado glicogênio muscular em concentrações semelhantes à dos ratos C (tabela 5, figura 8). Portanto, nossos resultados *in vitro* parecem não refletir o estado *in vivo* dos animais desnutridos quando o AGL não está presente no meio. Isso nos levou a acreditar que o meio de incubação sem AGL não é eficaz em simular as mesmas condições verificadas no organismo desnutrido.

Como os animais desnutridos do presente estudo mostraram teores elevados de ácidos graxos livres circulantes e, sendo as fibras musculares do sóleo predominantemente oxidativas (BONEN et al., 1986), passamos a acreditar que a falta de AGL no meio de incubação estaria relacionada à diferença entre os estados *in vitro* com o organismo vivo.

Para testar essa hipótese, realizamos uma segunda série de incubações com músculos de animais nas mesmas condições nutricionais (C e D) e na presença de AGL no meio (oleato, 0.8 mM). Verificamos que a captação de glicose não foi diferente entre os grupos tratados com dietas a 17 e 6% de proteína em ensaios contendo ou não AGL (tabela 6, figura 9). A presença de ácidos graxos no meio de incubação também não promoveu alterações na síntese de glicogênio nos animais desnutridos (tabela 6), mas reduziu significativamente a produção de lactato pelo sóleo (tabela 7, figura 11), o que nos leva a crer que na presença de AGL, o metabolismo oxidativo foi predominantemente utilizado nos dois grupos.

A utilização de AGL pelo grupo desnutrido encontra-se provavelmente exacerbada *in vivo*, já que na ausência desse substrato *in vitro*, os animais D aumentaram a utilização do metabolismo anaeróbico láctico em relação aos C, o que não ocorreu na presença dos AGL. A figura 23 (apresentada nessa seção)

representa esquematicamente nossa interpretação referente ao fluxo glicolítico verificado no músculo sóleo de animais controles e desnutridos, durante incubação de 60 minutos, sem e com a presença de AGL no meio de incubação. Os percentuais são referentes à utilização da glicose captada, desconsiderando a depleção do glicogênio muscular.

Observando a figura 23, verificamos que a glicólise estimada (glicose captada - glicogênio sintetizado) foi semelhante entre as fatias dos dois grupos em ambas as preparações (com ou sem oleato), contrariando os achados de CRACE et al. (1990) que verificaram aumento do metabolismo intramuscular de glicose em ratos desnutridos. Porém, o lactato produzido pelas fatias musculares de animais desnutridos na preparação sem oleato revelou valores que não poderiam ser conseguidos apenas pela utilização da glicose captada. Dessa forma, o estado catabólico nessa preparação, como já mencionado anteriormente, ficou bastante caracterizado. Portanto, ocorreu depleção do glicogênio muscular das fatias DN, o que em estudos anteriores mostrou ser maior em animais submetidos à desnutrição protéica em incubações realizadas em meio ausente de oleato (GOBATTO et al., 1995). Nesse trabalho, as fatias de sóleo de ratos controles depletaram ($\mu\text{mol/g.h}$) 19.1 ± 2.7 versus 47.2 ± 6.3 das fatias dos ratos desnutridos.

Na preparação onde se verificou maior catabolismo, no caso, nas fatias DN, houve provável redução na oxidação de substratos, o que não ocorreu no meio que continha as fatias DP, pois o lactato produzido reduziu significativamente em relação à preparação DN. Isso sugere que, nas fatias desnutridas incubadas em meio ausente de ácidos graxos livres, haja bloqueio da glicólise aeróbia, provavelmente na etapa mediada pelas enzimas piruvato desidrogenase (PDH) e/ou piruvato carboxilase (PC). A primeira trata-se de um complexo enzimático bastante específico, com uma descarboxilação e redução do NAD a NADH com formação de acetil-CoA. A segunda enzima, em presença de biotina (vitamina do complexo B), ATP e CO_2 (proveniente do bicarbonato), converte o piruvato a oxaloacetato (MURRAY et al., 1990).

Esse bloqueio parece ser liberado na presença do oleato, como já foi destacado. O mecanismo dessa resposta não foi estudado nesse trabalho, mas algumas possibilidades podem ser especuladas. Em condições normais, a PDH converte o piruvato a acetil-CoA, que exerce ativação alostérica sobre a PC, passando a produzir oxaloacetato a partir do piruvato. Do ponto de vista energético, essa integração enzimática é importante para que o ciclo de Krebs seja mantido em atividade. Nesse caso, a produção de oxaloacetato e a condensação com a acetil-CoA formam a etapa geradora de fluxo da primeira parte do ciclo. Os substratos do ciclo necessitam ser originados para que haja produção de ATP. Na desnutrição, portanto, o comprometimento desse complexo enzimático pode impedir a manutenção da glicólise aeróbia.

Com a presença de oleato no meio de incubação e, assumindo que o transporte de AGL para o interior da mitocôndria esteja preservado na desnutrição, como parece, a β -oxidação fornece acetil-CoA que é, como vimos, ativador alostérico da PC. Esse quadro metabólico pode então viabilizar o metabolismo aeróbio nas fatias musculares dos animais desnutridos. Provavelmente, esse mecanismo garante a presença de substratos no ciclo de Krebs e consome AGL.

Parece então, que o "complexo PDH" (assim designado por envolver várias enzimas) está comprometido na desnutrição e deve envolver delicada regulação. É necessária maior investigação nessas etapas oxidativas intramitocondriais em nossas condições experimentais.

A partir dos nossos resultados, podemos sugerir que a via glicolítica não se encontra afetada nas fibras musculares do sóleo de ratos desnutridos, o que indica atividade normal das enzimas envolvidas nessa via e que a oxidação intramuscular parece selecionar substratos durante a desnutrição. A presença de oleato no meio de incubação de fatias de músculos de ratos controles e desnutridos não inibiu a captação de glicose e/ou glicólise em nossas condições experimentais, ou seja, parece não ter ocorrido a inibição via ciclo glicose/AGL proposta por RANDLE et al. (1963). Esses dados não foram verificados por NOLTE et al. (1994) em animais controles em

incubações semelhantes às nossas, com e sem insulina (100 μ U/ml) no meio, mas com duração de 120 minutos e 1.0 ou 2.0 mM de oleato. No meio contendo insulina, esses autores encontraram redução da captação de glicose em ambas as concentrações de oleato. Entretanto, em meio sem insulina, os pesquisadores não verificaram alterações na captação de glicose.

Como em nosso estudo, NOLTE et al. (1994) não relataram alterações na síntese de glicogênio (incorporação de ^{14}C) em presença ou não de oleato, mas verificaram redução na oxidação da glicose das fatias incubadas com insulina durante 120 minutos.

A maior oxidação dos AGL pelo tecido periférico desnutrido deve permitir que tecidos mais nobres, como os do sistema nervoso central, que só utilizam carboidratos como substrato energético, possam ter adequada disponibilidade de glicose.

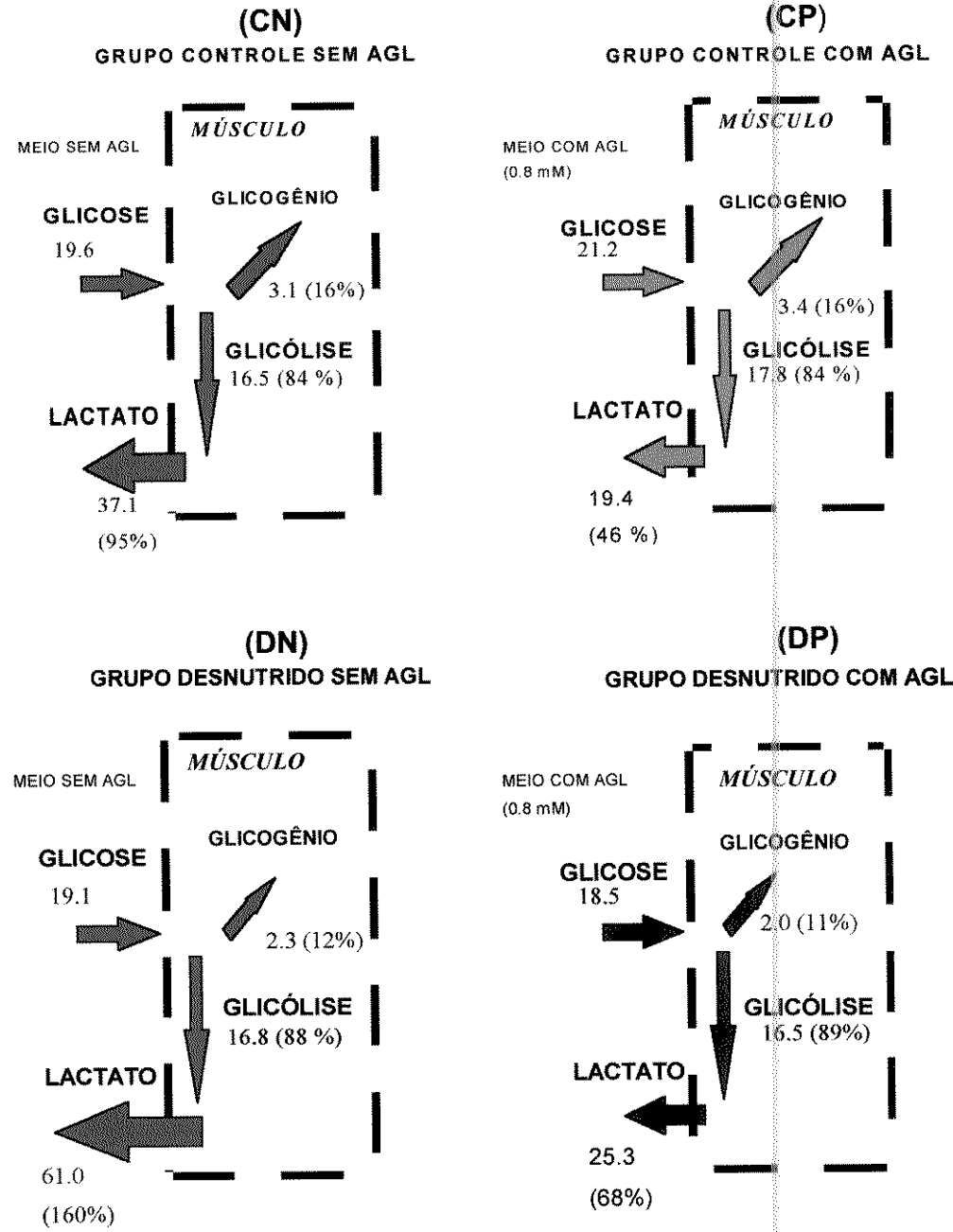


Figura. 23. Fluxo glicolítico proposto para o sóleo de ratos controles e desnutridos incubados sem (CN, DN) e com (CP, DP) ácidos graxos livres no meio de incubação durante 60 minutos. Os valores são expressos em $\mu\text{mol/g.h}$ e em porcentagem em relação à glicose captada.

6.2. Segunda Fase: RECUPERAÇÃO E TREINAMENTO FÍSICO

Após o período de desnutrição, os animais tratados com dieta a 6% de proteína passaram a receber, durante 6 semanas, a dieta a 17% de proteína, tal como os animais controles. Nesse mesmo período, parte dos animais foram também submetidos ao treinamento físico. Ao longo dessa fase, registramos a ingestão alimentar absoluta e, para a avaliação do estado nutricional dos grupos controles e recuperados, registramos o ganho de peso corporal. Ao final, dosamos alguns parâmetros bioquímicos que são comumente utilizados para a caracterização do estado nutricional dos animais, como já descrito nas seções anteriores.

Em seres humanos, após várias semanas de recuperação, as medidas de ganho de peso corporal, circunferências corporais e valores de dobras cutâneas são bons indícios de progresso clínico (McLAREN & MEGUID, 1988). Quanto à eficiência e à velocidade de recuperação nutricional, foi verificado que no homem, assim como no rato, os efeitos tardios da desnutrição são mais graves quanto mais precocemente a mesma se instale (WATERLOW & ALLEYNE, 1974).

Observamos, nessa 2ª fase, maior ganho de peso nos ratos do grupo recuperado (tabela 8, figura 12). Esses resultados provavelmente estão associados a maior eficiência alimentar, como foi verificado em estudo anterior, onde houve aumento da velocidade de ganho de peso por elevação do aproveitamento alimentar no grupo recuperado (GOBATTO, 1993). No presente trabalho, apesar de não termos realizado cálculos precisos de eficiência alimentar, ficou evidente que a mesma foi superior nos animais recuperados. Se observarmos as tabelas 8 e 9, verificamos que a primeira mostra valores maiores de ganho de peso corporal nos animais dos grupos R, principalmente nos animais que não realizaram atividade física regular. Na tabela 9, observamos que, praticamente, a ingestão alimentar absoluta não apresentou diferenças entre os grupos. Assim, se os animais ingeriram a mesma quantidade de alimento e os recuperados ganharam mais peso

corporal do que os alimentados com dieta normoprotéica na fase anterior, fica evidente que o aproveitamento alimentar foi superior nos ratos anteriormente desnutridos.

A maior eficiência alimentar verificada nessa fase, pode estar relacionada a uma série de fatores, morfológicos/ funcionais e metabólicos. Isso envolve, provavelmente, maior absorção dos nutrientes, com redução do catabolismo protéico e possível aumento dos depósitos de gorduras. As eventuais mudanças determinantes do melhor aproveitamento alimentar são difíceis de serem apontadas com base nos dados do presente trabalho, já que não realizamos análises histológicas, hormonais e enzimáticas. No entanto, é provável que no período de recuperação tenha ocorrido a restauração do processo digestivo-absortivo, o que possivelmente garantiu a absorção adequada de proteínas, gorduras e carboidratos, como tem sido observado, após tratamento em animais e seres humanos (MARCONDES, 1976; McLAREN & MEGUID, 1988).

Nossos dados referentes ao ganho de peso corporal dos animais anteriormente desnutridos representam interessante adaptação à nova dieta. Todos os ratos tinham a mesma idade, porém, o ritmo de crescimento dos R, foi extremamente reduzidos na primeira fase. Isso foi revertido pela ingestão da dieta balanceada na segunda fase, passando esses animais a apresentarem maior ganho de peso, evoluindo para os valores de peso corporal normal, observados nos grupos C.

Apesar do ganho de peso se apresentar aumentado nos animais recuperados nessa fase, o treinamento físico parece ter interferido negativamente sobre este parâmetro. Verificamos menor ganho de peso dos RT nas sétima, oitava e décima primeira semanas do período experimental. Esse quadro foi também observado entre os controles, com os CT tendo um menor ganho de peso em relação aos CS nas sexta, décima e décima primeira semanas. Assim, a diferença dos animais treinados (CT e RT) em relação aos animais controles e recuperados sedentários provavelmente tenha ocorrido

em função do maior dispêndio energético dos exercitados, como relatado anteriormente (CURI et al., 1990).

Resultados verificados em modelo de treinamento físico após a recuperação nutricional e não concomitante a ela, revelaram menor ganho de peso nos animais controles treinados em relação aos sedentários (GOBATTO, 1993). Nesse trabalho, os ratos submetidos a desnutrição, recuperação e posterior treinamento físico apresentaram maior ganho de peso corporal do que os ratos controles sedentários e treinados. Dessa maneira, à luz do presente estudo e do trabalho anterior (GOBATTO, 1993), sugerimos que o gasto calórico aumentado nos animais recuperados treinados interferem negativamente após o período de desnutrição, mas positivamente se o organismo anteriormente desnutrido passar por um estágio de recuperação nutricional antes de ser submetido ao treinamento físico.

Os valores de repouso de glicose sanguínea foram semelhantes nos quatro grupos estudados nessa fase (tabela 10, figura 14). Esses dados mostram o restabelecimento das concentrações sanguíneas de glicose nos animais anteriormente desnutridos e também indicam que o treinamento físico não interferiu na glicemia dos ratos. Esses resultados são conflitantes aos nossos achados anteriores utilizando sessões de treinamento semelhantes (GOBATTO, 1993). No trabalho de 1993, determinamos maiores concentrações de glicose circulante em grupos de animais submetidos ao treinamento. Por outro lado, LUCIANO (1991) também não verificou diferenças nas concentrações de glicose sérica entre animais controles sedentários e controles treinados em repouso, após período de treinamento com natação em modelo semelhante ao usado por nós.

CURI et al. (1990) avaliaram a evolução da glicemia durante quatro semanas de treinamento e verificaram alternância de resultados ao longo desse período. Na primeira e última semanas, esses autores observaram menores concentrações de glicose sanguínea nos ratos controles exercitados, em relação aos sedentários; não verificaram alterações na segunda semana, mas encontraram glicemia maior nos animais treinados na terceira semana do

treinamento. Isso sugere que a glicemia seja um parâmetro bastante inconstante durante processo de treinamento.

As concentrações plasmáticas de AGL em repouso também foram semelhantes entre os quatro grupos estudados (tabela 10, figura 15). Assim como para a glicose, os dados do presente trabalho indicam o restabelecimento dos valores de AGL, superiores nos animais desnutridos na fase anterior. Esses resultados são diferentes dos relatados por CURI et al. (1990) e GOBATTO (1993), que encontraram concentrações reduzidas de AGL em animais treinados. Para os autores, o fato pode representar maior oxidação dos AGL como resposta adaptativa ao treinamento físico.

Para determinarmos as concentrações séricas dos AGL, os animais foram sacrificados no estado alimentado, diferente do procedimento descrito em GOBATTO (1993), no qual realizamos análises sanguíneas após 12 horas de jejum. Essas duas condições interferem distintamente sobre a concentração sérica de AGL. O jejum precedente ao sacrifício, no trabalho de 1993, pode ter aumentado a disponibilidade dos AGL no sangue, o que poderia propiciar maior oxidação de gorduras por parte dos ratos treinados em relação aos sedentários. Acredita-se que a capacidade em oxidar gorduras, aumentada em animais treinados, possa poupar glicogênio muscular, elevando a resistência ao exercício.

Apesar do exposto acima, KOKUBUN (1990) sugeriu que a disponibilidade de AGL circulante (aumentada pelo efeito lipolítico da heparina intravenosa) parece não ser o principal fator de economia de glicogênio na realização do exercício físico em situação de jejum. Para o autor, deve-se considerar que a capacidade de utilização de lípidos talvez seja mais importante do que a disponibilidade de AGL. Dessa forma, alterações enzimáticas e o tipo de fibra muscular (considerando o tecido periférico) devem ser levados em conta na análise do mecanismo de economia de carboidratos.

As concentrações séricas de proteínas totais (tabela 11, figura 16) mostram-se menores nos grupos treinados (CT e RT), mas não foram

alteradas pelo tratamento alimentar anterior, ou seja, houve o restabelecimento das concentrações de proteínas totais, que apresentaram valores inferiores nos animais tratados com dieta hipoprotéica. Em estudos com humanos, alguns autores relataram a presença de valores reduzidos deste parâmetro em atletas treinados (BROTHERHOOD et al., 1975; WELLS et al., 1982), o que foi atribuído ao maior volume plasmático observado nesses indivíduos. Apesar disso, os resultados de hematócrito de animais treinados não foram alterados em relação aos controles, em modelo experimental parecido ao utilizado no presente trabalho (GOBATTO, 1993). Os valores de albumina no sangue foram semelhantes entre ratos recuperados e controles, treinados e sedentários. Esses resultados se somam aos parâmetros séricos citados anteriormente, o que revela total restabelecimento do estado nutricional dos animais anteriormente desnutridos quanto à bioquímica sanguínea (tabela 11, figura 17).

Os resultados de glicogênio hepático revelaram adaptação ao treinamento, já que os grupos treinados, independente do tratamento alimentar anterior, apresentaram valores superiores em relação aos respectivos grupos sedentários. Apesar disso, os animais recuperados tiveram estoques hepáticos inferiores de glicogênio (tabela 12, figura 18), o que parece ser um efeito “rebote” em relação aos resultados da primeira fase, onde os valores de glicogênio hepático foram bastante elevados entre os desnutridos.

CRACE et al. (1990) realizaram incubações do tecido hepático e verificaram forte tendência a maior incorporação de ^{14}C a glicogênio no fígado de animais submetidos à desnutrição protéica de apenas três semanas. Após seis semanas de recuperação nutricional, os autores não encontraram diferença na síntese de glicogênio hepático entre animais anteriormente desnutridos e controles.

CLAEYSSENS et al. (1990) verificaram uma série de alterações no metabolismo hepático de ratos submetidos à desnutrição protéica, incluindo aumento das atividades da piruvato quinase (PK) e fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK), o que pode se configurar em um ciclo fútil entre

piruvato e fosfoenolpiruvato no hepatócito. Como ambas as enzimas estão bastante envolvidas na neoglicogênese, é possível que o restabelecimento da atividade normal dessas enzimas, principalmente a da PK, que normalmente está inibida durante a neoglicogênese, possa ser fator importante na normalização do quadro metabólico hepático nos animais recuperados.

No que se refere ao treinamento físico, alterações nos estoques de glicogênio hepático é motivo de controvérsias entre autores. LUCIANO (1991) não observou diferenças entre animais sedentários e treinados, sacrificados após 12 horas de jejum. CURI et al. (1990) verificaram maiores concentrações em ratos sedentários quando comparados a animais treinados. GOBATTO (1993), encontrou aumento nos teores de glicogênio hepático em animais treinados, embora não tenha verificado alterações em animais recuperados de desnutrição protéica e posteriormente treinados. O aumento dos estoques de glicogênio hepático em animais treinados foi também relatado por AZEVEDO (1994).

Nos trabalhos citados acima, os dois primeiros (LUCIANO, 1991; CURI et al., 1990) não utilizaram sobrecarga nos exercícios diários de natação, ao passo que nos experimentos de GOBATTO (1993) e AZEVEDO (1994), foram utilizadas, respectivamente, cargas de 5% e 8% do peso corporal dos animais. Assim, a intensidade do treinamento pode conferir características diferentes de adaptação.

Estudos de KATZ & McGARRY (1984) parecem corroborar com a idéia de que a intensidade do exercício pode influenciar sobre os teores hepáticos de glicogênio. Os autores relataram que o lactato é um importante precursor para a síntese de glicogênio hepático, mais do que a própria glicose nesse tecido, o que denominaram "paradoxo da glicose". Essas observações foram confirmadas por MAGNUSSON & SHULMAN (1991), mostrando que o lactato sanguíneo é provavelmente o principal substrato fornecedor de carbono para a neoglicogênese hepática. Em exercício agudo de natação com cargas progressivas, verificamos anteriormente que a produção de lactato *in vivo* foi significativamente maior em ratos treinados quando estes realizaram

exercícios com 5% e 8% de carga em relação ao peso corporal, em comparação à natação livre. Entre essas duas cargas, os valores de lactato sanguíneo para 8% foram superiores em relação a 5% (GOBATTO, 1993). Assim sendo, a intensidade do exercício crônico pode fornecer maior ou menor quantidade de precursores para síntese de glicogênio no fígado, o que talvez explique as diferenças encontradas na literatura para esse parâmetro em animais treinados.

Os valores do glicogênio do músculo sóleo não apresentaram alterações significativas entre os quatro grupos estudados (tabela 12, figura 19). Apesar disso, houve uma tendência a valores superiores nos ratos dos grupos recuperados (figura 19), que foi previamente relatado na literatura em animais submetidos a recuperação nutricional (ALLEYNE & SCULLARD, 1969).

Em resumo, na segunda fase experimental, observamos restauração dos parâmetros séricos e teciduais mais gerais nos animais anteriormente desnutridos.

Os estudos realizados *in vitro* após o período de recuperação nutricional e treinamento físico revelaram resultados bastante interessantes. Verificamos no músculo sóleo isolado respostas de fluxo glicolítico ainda alteradas entre animais recuperados e controles. A figura 24 (apresentada ao final dessa seção) mostra esquematicamente o fluxo glicolítico dos animais controles e recuperados, submetidos ou não ao treinamento físico. Como pode ser observado, algumas alterações do fluxo verificadas nos ratos recuperados sedentários desapareceram ou foram minimizadas quando os animais anteriormente desnutridos tiveram a restauração nutricional associada ao treinamento físico. Fica claro que, apesar dos valores séricos e teciduais referentes aos parâmetros analisados estarem restabelecidos, efeitos tardios da desnutrição ainda se manifestaram quando realizamos os estudos *in vitro*.

A captação de glicose pelo sóleo apresentou valores superiores nos animais controles em relação aos recuperados, independente da realização ou não do treinamento físico. Entretanto, os animais recuperados que realizaram

exercício físico (RT) apesar de captarem menor quantidade de glicose em relação aos CT, tiveram um transporte semelhante ao observado nos animais CS (tabela 13, figura 20). Essa comparação parece imprópria, mas se analisarmos a importância do fato na velocidade da recuperação nutricional, ou seja, o simples efeito do treinamento físico, podemos considerá-lo como potencializador da recuperação nutricional. Evidentemente, fica o registro da captação de glicose prejudicada nesses animais nessa fase, mas em um nível mais brando em relação aos animais recuperados que não realizaram atividade física.

O fato dos animais recuperados apresentarem captação inferior a dos controles evidencia um efeito tardio da desnutrição em relação a esse parâmetro, já que não verificamos tal resultado na primeira fase experimental, a despeito de outros autores terem descrito a reduzida sensibilidade à insulina em animais desnutridos. É oportuno destacar que nesse trabalho estamos analisando a captação de glicose em um meio contendo concentração única de insulina ($100\mu\text{UI/ml}$), e que seria necessária a realização de uma curva dose-resposta para determinarmos possíveis alterações na sensibilidade à insulina no transporte de glicose no sóleo. Assim, é provável que, com a menor captação de glicose nos músculos esqueléticos dos ratos recuperados, encontremos também menor sensibilidade à insulina. Esse aspecto será melhor explorado em futuros trabalhos.

Se considerarmos tal possibilidade, por quê os recuperados exibiriam menor sensibilidade à insulina nessa fase desenvolvimental e por quê o treinamento poderia reduzir esse quadro, como parecem indicar nossos resultados? Essas questões são difíceis de serem elucidadas à luz de nossos resultados. Porém, do ponto de vista da interação desenvolvimento corporal - sensibilidade à insulina, tem sido postulado que o ganho de peso corporal de ratos Wistar é progressivamente aumentado até a 10^a -12^a semanas, e que a maturação sexual, que ocorre entre a 7^a - 10^a semanas parece promover um ganho ainda mais pronunciado. Isso parece reduzir a sensibilidade da insulina (NAKAI et al., 1996), que fica ainda mais comprometida com o avanço da idade

desses animais. BARNARD et al. (1992) sugeriu que o maior declínio no transporte máximo de glicose estimulado pela insulina no músculo esquelético ocorre durante a maturação sexual, e que essa diminuição é maior do que a observada em qualquer outra fase do desenvolvimento. Nossa hipótese é que os animais recuperados tiveram, provavelmente, atraso desenvolvimental, acompanhado por aumento rápido de peso corporal. Essa brusca alteração pode ter reduzido significativamente a sensibilidade à insulina, principalmente nos animais que não realizaram treinamento físico.

Tem sido relatado maior transporte de glicose em músculos treinados, o que pode ser decorrente do aumento do número de transportadores de glicose no músculo esquelético, GLUT-4 (HOUMARD et al., 1995). Investigando o fator maturação sexual e idade, NAKAI et al. (1996) verificaram que ocorre aumento na concentração de GLUT-4 no gastrocnêmio dos ratos treinados (corrida voluntária) tanto após a maturação sexual quanto após a idade adulta. Esses resultados foram confirmados pelos mesmos autores em testes de clamp euglicêmico realizados nos animais. Os autores concluíram que o treinamento físico parece melhorar a sensibilidade à insulina.

Esses recentes dados confirmaram antigos achados de RODNICK et al. (1992), que mostraram que o aumento da concentração do GLUT-4 em músculo esquelético de ratos exercitados esteve relacionado à presença de insulina e à atividade contrátil muscular, sendo que outra isoforma presente no músculo, a GLUT-1 não respondeu a esses estímulos, ao menos nesse tecido.

Quanto a síntese de glicogênio, determinada *in vitro* a partir da incorporação do ^{14}C ao glicogênio muscular, verificamos maiores valores nos animais treinados em relação aos ratos sedentários, independente de estarem ou não no processo de recuperação nutricional (tabela 13, figura 21). Nossos dados estão de acordo aos relatos clássicos da literatura, que indicam a presença de estoques elevados de glicogênio muscular em humanos e animais treinados. BAGBY et al. (1978) e KUIPERS et al. (1986) verificaram que ratas submetidas ao treinamento físico apresentaram, após o exercício, ressíntese de glicogênio muscular maior que a esperada, de acordo com a prévia

ingestão de glicose. Isso sugeriu que o lactato, glicerol e alguns aminoácidos liberados no exercício tenham sido utilizados pelo fígado para a gliconeogênese, fornecendo glicose ao músculo para a ressíntese. Esses achados foram também verificados por DOHM et al. (1986), após o exercício agudo em ratos submetidos ao jejum, condição esta que sabidamente apresenta redução da insulinemia nesses animais.

HUTBER & BONEN (1989) sugeriram que é possível ocorrer glicogenólise e glicogênese durante o exercício físico e que o balanço entre essas duas vias parecem depender do tipo de fibra envolvida no trabalho muscular. Os pesquisadores observaram que nas fibras oxidativas ocorre maior síntese de glicogênio que nas glicolíticas.

Foi observado que no fígado de ratos a síntese de glicogênio está reduzida após a natação, o que é concomitante ao aumento da produção hepática de glicose (RYAN et al., 1993). Para os autores, no modelo de natação de ratos ocorre desvio da glicose do fígado para o tecido periférico durante a recuperação do exercício, demonstrando preferência do músculo esquelético na restauração dos estoques de glicogênio após a atividade física. GUNDERSON et al. (1996) relataram que o Km da glicoquinase para a glicose no fígado é 8 mM, fazendo com que, em concentrações fisiológicas (4-6 mM), a ressíntese do glicogênio hepático depletado no exercício utilize preferencialmente substratos neoglicogênicos, como citado por KATZ & McGARRY (1984). Essa característica é acentuada em animais treinados, principalmente por apresentarem maior tolerância à glicose, demonstrando que na recuperação ao exercício, esses ratos sintetizam mais glicogênio que os animais sedentários, não somente pela glicose produzida pelo fígado na neoglicogênese, mas também pela glicose proveniente do alimento ingerido.

As adaptações que ocorrem na fibra muscular para o maior acúmulo de glicogênio em animais treinados ainda não estão totalmente elucidadas. Apesar de ocorrer sabidamente a supercompensação, ou seja, os estoques de glicogênio aumentarem além dos teores que precederam a sessão do treinamento (NELSHOLME & LEECH, 1983; WILMORE & COSTILL, 1994),

não se sabe ao certo quais mecanismos estão envolvidos nesse processo. Entretanto, a maior sensibilidade à insulina em animais treinados tem sido citada por vários autores (DOLKAS et al., 1990, McARDLE et al., 1994, PHILLIPS et al., 1995) como possível responsável pela supercompensação.

Apesar da ativação da glicogênio sintetase (GS) pela insulina ser conhecida desde a década de 60, os mecanismos relacionados a esse fato permanecem ainda obscuros, principalmente em virtude da ativação da GS envolver a participação de uma complexa série de proteínas quinases (glicogênio sintetase quinases, GK1, GK2 e GK3). Até o momento, não foi possível determinar, com precisão, os efeitos da insulina sobre a quantidade do mRNA da glicogênio sintetase, a atividade da hexoquinase, o conteúdo muscular protéico ou a atividade catalítica muscular. Entretanto, como já mencionado anteriormente, MANDARINO et al. (1995) destacou que a infusão de insulina em músculo humano não promoveu aumento do mRNA ou do conteúdo da GS, mas mostrou ser eficaz em elevar a atividade da glicogênio sintetase.

Embora os achados de MANDARINO et al. (1995) tragam novas e importantes informações, a maior síntese de glicogênio em músculos treinados parece envolver processos complexos, com numerosos eventos regulatórios. HENRIKSEN et al. (1989) e HENRIKSEN & RITTER (1993) verificaram aumento rápido da síntese de glicogênio sem incremento na atividade da glicogênio sintetase ou redução na fosforilase. HENRIKSEN et al. (1996) encontraram relação direta entre aumento da glicogênese e maior transporte de glicose por mecanismos insulino-independentes, os quais parecem envolver a presença do Ca^{++} liberado nos processos contráteis do músculo. Os autores estudaram sóleos de ratos que tiveram suas patas traseiras suspensas e, após um período nessa condição, foram novamente estimuladas, colocando-as no piso das gaiolas e suportando o peso dos ratos. Além disso, REN et al. (1993) observaram que a deposição de glicogênio foi aumentada paralelamente à elevação intramuscular da expressão transgênica das proteínas GLUT-1 e GLUT-4, o que resultou no maior transporte de glicose.

Sejam os maiores depósitos de glicogênio do sóleo nos animais treinados, dependentes ou não de insulina, fica registrada a hipótese lançada por HENRIKSEN et al. (1996), de que a elevada taxa de síntese de glicogênio no músculo pode estar, entre outros fatores, relacionada ao maior transporte de glicose. Acreditamos que essas relações devam ser melhor estudadas em pesquisas futuras. Entretanto, no presente trabalho, isso foi confirmado a partir da maior síntese de glicogênio verificada nos músculos treinados e associada à elevada captação de glicose por esses tecidos exercitados.

Com relação à produção de lactato no meio de incubação, verificamos aumento dos valores nos animais CT e RS em relação aos CS. Já as concentrações verificadas no meio de incubação das fatias musculares dos RT foram semelhantes as obtidas em CT (tabela 14, figura 22).

É importante ressaltar que nessa fase do experimento, não realizamos incubações contendo oleato no meio. Isso revela um efeito mantido da desnutrição nos animais RS, pois esses ratos apresentaram, na fase anterior, valores extremamente elevados de produção de lactato após 60 minutos de incubação em meio sem oleato (tabela 7, figura 11). Como os animais RT tiveram respostas semelhantes aos CT nesse parâmetro, podemos sugerir que o treinamento físico auxiliou na restauração do fluxo glicolítico nos animais recuperados. Entretanto, isso pode ter sido observado ao acaso, já que não houve diferença entre as concentrações de lactato no meio entre RS e RT (figura 22).

O aumento do lactato no meio de incubação nos ratos treinados parece estar de acordo com a literatura. JACOBS (1986), em estudos envolvendo humanos, sugeriu que indivíduos treinados apresentaram aumento na capacidade de transporte do lactato da fibra muscular para a circulação sanguínea. Essas observações também foram relatadas por OYONO-ENGUELLE et al. (1990), quando associaram o aumento da concentração de lactato sanguíneo ao maior efluxo muscular desse substrato durante exercício físico agudo envolvendo indivíduos bem condicionados.

ROTH (1991), em estudos com ratos submetidos a diferentes treinamentos de velocidade e resistência muscular, verificou aumento da atividade de transporte do lactato para fora do tecido muscular. PILEGAARD et al. (1993) submeteram animais a programas de treinamento de sete semanas, com aumento progressivo da intensidade do treinamento. Os autores verificaram em estudos com vesículas de sarcolema gigantes, maior atividade de transporte do lactato do músculo para a corrente sanguínea, com correlação positiva com a intensidade do treinamento. BONEN & McCULLAGH (1994) submeteram camundongos ao exercício agudo em esteira rolante durante 60 minutos, sendo que após isso retiraram músculos para procedimentos de incubação. Nesse trabalho os autores verificaram aumento do transporte de lactato pelos sóleos anteriormente exercitados, mas relataram que os mecanismos responsáveis por isso ainda são desconhecidos. Estes autores, assim como PILEGAARD et al. (1993) sugeriram que o treinamento físico pode aumentar a atividade do carreador de lactato, ou ainda, que o trabalho físico regular induz a síntese de mais proteínas carreadoras.

Recentemente, McCULLAGH et al. (1996) verificaram em sarcolema gigantes que a estimulação elétrica muscular crônica aumenta o transporte de lactato no músculo tibial anterior de ratos. O mesmo músculo contralateral dos animais foi utilizado como controle. Os autores sugeriram a existência de duas proteínas transportadoras de lactato, MCT_1 e MCT_2 (monocarboxylate transporters), as quais foram previamente encontradas em ovários de hamsters chineses e fígados de hamsters sírios, respectivamente. Entretanto, essas isoformas apresentam cinéticas de transporte diferentes no músculo, o que levou os autores a sugerirem a existência de uma isoforma específica nesse tecido. Isso já havia sido mencionado por GARCIA et al. (1994), que verificou a presença do MCT_1 no coração e no músculo vermelho, mas não no músculo branco. DUBOUCAUD et al. (1996) verificaram diminuição da captação de lactato em músculo desestimulado por elevação das patas traseiras de ratos. PILEGAARD et al. (1995) observaram o mesmo resultado em músculo desnervado.

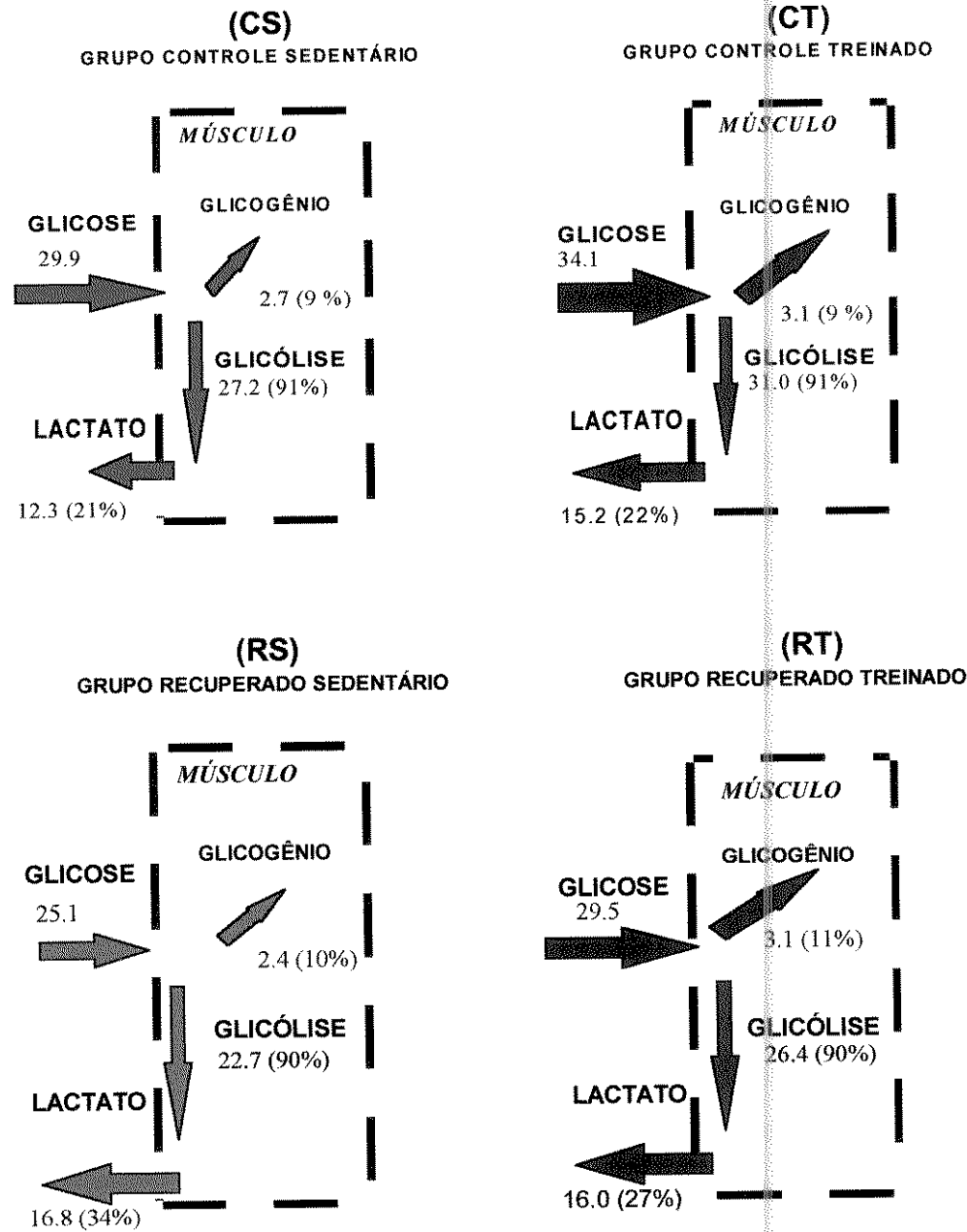


Figura. 24. Fluxo glicolítico proposto para o sóleo de ratos controles e recuperados, submetidos (T) ou não (S) ao treinamento físico, após incubação de 60 minutos. Os valores são expressos em $\mu\text{mol/g.h}$ e em porcentagem em relação à glicose captada.

O quadro abaixo mostra um resumo dos resultados *in vitro* (músculo sóleo), referentes à captação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato no meio de incubação, na primeira fase experimental (desnutrição), envolvendo os efeitos do estado nutricional e da presença ou não de AGL (oleato - 0.8 mM) no meio.

Quadro 2. Efeitos isolados do estado nutricional e da presença de oleato no meio de incubação (primeira fase experimental).

Efeito:	Nutrição		Oleato (mM)	
	Controle	Desnutrido	0.0	0.8
Captação de Glicose	★	★	★	★
Síntese de Glicogênio	★	★	★	★
Produção de Lactato no meio	★	★	★	★

No quadro 3, apresentamos resumidamente, a interação entre o estado nutricional e a presença de oleato no meio (primeira fase experimental).

Quadro 3. Efeitos da presença do AGL no meio de incubação sobre o organismo desnutrido.

Parâmetro	Oleato (0.8 mM) no meio de incubação
Captação de Glicose	Não há alteração
Síntese de Glicogênio	Não há alteração
Produção de Lactato no meio	Reduz, desaparecendo o efeito isolado da desnutrição.

O quadro 4 mostra um resumo dos resultados *in vitro* (músculo sóleo), referentes à captação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato no meio de incubação, na segunda fase experimental (recuperação e treinamento físico), envolvendo os efeitos da recuperação nutricional e do treinamento físico.

Quadro 4. Efeitos isolados do estado nutricional e do treinamento físico dos animais.

Efeito:	Nutrição		Treinamento	
	Controle	Recuper.	Sedent.	Treinado
Captação de Glicose	★	★	★	★
Síntese de Glicogênio	★	★	★	★
Produção de Lactato no meio	★	★	★	★

O quadro 5 mostra a influência do treinamento físico na recuperação nutricional, nos parâmetros estudados *in vitro* (segunda fase experimental).

Quadro 5. Efeitos do treinamento físico sobre a recuperação nutricional

Parâmetro	Treinamento (natação 1h/dia, 5% do peso corporal)
Captação de Glicose	Aumentou, desaparecendo o efeito tardio da desnutrição.
Síntese de Glicogênio	Não há alteração
Produção de Lactato no meio	⇒ Desapare o efeito da tardio da desnutrição. ou ⇒ ? : pode ter ocorrido ao acaso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEYNE, G.A.O. & SCULLARD, G.H. Alterations in carbohydrate metabolism in Jamaican children with severe malnutrition. **Clin. Sci. (London)**, **37**:631-42. 1969.
- ANTHONY, L.E. & EDOZIEN, J.C. Experimental protein and energy deficiencies in the rat. **J. Nutr.**, **105**:631-48. 1975.
- ANTHONY, L.E. & FALONA, G.R. Plasma insulin and glucagon levels in protein-malnourished rats. **Metabolism**, **23**:303-6. 1974.
- AZEVEDO, J.R.M. de **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados durante e após o exercício agudo de natação**. Campinas, 1994. 172p. [Tese de Doutorado - I.B. - UNICAMP].
- BAGBY, G.J.; GREEN, H.J.; KATSUTA, S. & GOLLNICK, P.D. Glycogen depletion in exercising rats infused with glucose, lactate, or pyruvate. **J. Appl. Physiol.**, **45**: 425-9, 1978.
- BARNARD, R.J.L.; LAWANI, L.O.; MARTIN, D.A.; YOUNGREN, J.F.; SINGH, R. & SCHECK, S.H. Effects of maturation and aging on the skeletal muscle glucose transport system. **Am. J. Physiol.**, **262**: E619-E26, 1992.
- BARZILAI, N. & ROSSETTI, L. Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. **Am. J. Physiol.** **269**: E591-E7, 1995.
- BELDA, M.C.R. & ZUCAS, S.M. Some effects of the quality of protein, food restriction and physical exercise on liver development: hepatic total lipids. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOCHEMISTRY OF

- EXERCISE, 5_, Boston, 1982. **Proceedings**. Champaign, I 11., Human Kinetics Publ., 1983. p. 487-96.
- BONEN, A.; CLUNE, P.A. & TAN, M.H. Chronic exercise increases insulin binding in muscles but not liver. **Am. J. Appl. Physiol.**, **251**: E196-E203, 1986.
- BONEN, A. & McCULLAGH, K.J.A. Effects of exercise on lactate transport into mouse skeletal muscles. **Can. J. Appl. Physiol.** **19**: 275-85, 1994.
- BROTHERHOOD, J.; BROZOVIC, B.; PUGH, L.G.C. Haematological status of middle and long-distance runners. **Clin. Sci. Mol. Med.**, **48**:139-45. 1975.
- CARNEIRO, E.M.; MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. & BOSCHERO, .A.C. Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ⁴⁵Ca uptake by pancreatic rat islets. **Nut. Biochem.** **6**:314-8, 1995.
- CARPINELLI, A.R. **Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos**. São Paulo, 1978. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- CLAEYSSSENS, S.; LAVOINNE, A.; FRESEL-RAGOT, M.; BOIS-JOYEUX, B. CHANEZ, M. & PERET, J. Metabolic changes in rats fed a low protein diet during post-weaning growth. **Metabolism**, **39**: 676-81, 1990.
- COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. São Paulo, Edgard Blucher, 1977. 264p.
- CRACE, C.J.; SWENNE, I. & MILNER, R.D.G. Long-term follow-up after early protein-calorie malnutrition in young rats: sex difference in glucose tolerance and serum insulin levels. **Metabolism**, **38**: 933-8, 1989.

- CRACE, C.J.; SWENNE, I.; HILL, D.L. & MILNER, R.D.G. Tissue and serum insulin-like growth factor I (IGF I) concentrations in rats subjected to temporary protein-energy malnutrition early in life. **Upsala J. Med. Sci.**, **96**: 17-22, 1991.
- CRETIAZ, M.; PRENTKI, M. ZANINETTI, D. & JEANRENAUD, B. Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. **Biochem. J.**, **186**: 525-34, 1980.
- CURI, R.; HELL, N.S. & TIMO-IARIA, C. Meal-feeding and physical effort. 1. Metabolic changes induced by exercise training. **Physiol. Behav.**, **47**: 869-73, 1990a.
- CURI, R.; HELL, N.S. & TIMO-IARIA, C. Meal-feeding and physical effort. 2. Metabolic changes induced by an acute exercise. **Physiol. Behav.**, **47**: 875-9, 1990b.
- DOHM, G.L.; BEEKER, R.T.; ISRAEL, R.G. & TAPSCOTT, E.B. Metabolic responses to exercise after fasting. **J. Appl. Physiol.**, **61**:1363-8, 1986.
- DOLLET, J.M.; BECK, B.; VILLAUME, C.; MAX, J.P. & DEBRI, G. Progressive adaptation of endocrine pancreas during long term protein deficiency in rats: effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagon and somatostatin concentrations. **J. Nutr.**, **115**: 1581-8, 1985.
- DOUKAS, C.B.; RODNICK, K.J. & MONDON, C.E. Effect of body weight gain on insulin sensitivity after retirement from exercise training. **J. Appl. Physiol.**, **68**: 520-6, 1990.

- DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A. & BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clin. Chim. Acta**, **31**:87-96, 1971.
- DUBOUCHAUD, H.; GRANIER, P.; MERCIER, J.; PEUCH, C. LE & PREFAUT, C. Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. **J. Appl. Physiol.**, **80**: 416-21, 1996.
- ENGEL, R.C. & JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Anal. Biochem**, **88**: 475-84, 1978.
- ESCRIVA, F.; KERGOAT, M.; BAILBÉ, D.; PASCUAL-LEONE, A.M. & PORTHA, B. Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. **Diabetologia**, **34**: 559-64, 1991.
- ESPINAL, J. ; DOHM, G.L. & NEWSHOLME, E.A. Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised and exercise-trained rats. **Biochem. J.**, **212**: 453-8, 1983a.
- ESPINAL, J. ; CHALLISS, J. & NEWSHOLME, E.A. Effect of adenosine deaminase and an adenosine analogue on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. **FEBS LETT**, **158**: 103-6, 1983b.
- FLETCHER, K. Observations on the origin of liver fat in infantile malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, **19**:170-4, 1966.
- GARCIA, C.K.; GOLDSTEIN, J.L. PATHAK, R.K. ; ANDERSON, R.G.W. & BROWN, M.S. Molecular characterization of a membrane transporter for

lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. **Cell**, **75**: 865-73, 1994.

GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; SIBUYA, C.Y. & MELLO, M.A.R. Efeitos da desnutrição protéica calórica e do treinamento físico na produção de ácido láctico em ratos machos adultos após teste de cargas progressivas. Dados preliminares. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, **43** supl. :725-6, 1991

GOBATTO, C.A. & MELLO, M.A.R. Desnutrição, Recuperação e Treinamento Físico. Um Modelo Experimental utilizando ratos jovens. Resultados Preliminares. **Anais da VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)**: 255, 1991.

GOBATTO, C.A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados**. Campinas, 1993. 122p. [Tese de Mestrado - I.B. - UNICAMP].

GOBATTO, C.A., SIBUYA, C.Y., KOKUBUN, E. & MELLO, M.A.R. Fluxo glicolítico em músculo isolado de ratos submetidos à desnutrição protéica. **Anais da VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)**: 234, 1995.

GREEN, A & NEWSHOLME, E.A. Sensitivity of glucose uptake and lipolysis of white adipocytes of the rat to insulin and effects of some metabolites. **Biochem. J.**, **180**: 365-70, 1979.

GUNDERSON, H.; WEHMEYER, N.; BURNETT, D.; NAUMAN, J.; HARTZELL, C. & SAVAGE, S. Exercise and exhaustion effects on glycogen synthesis pathways. **J. Appl. Physiol.** **81**: 2020-6, 1996.

- HASSID, W.Z. & ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods Enzymol.**, 3:34-6. 1957.
- HEARD, C.R.C.; FRANJI, S.M.; WRIGHT, P.M.; Mc CARTNEY, P.R. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. **Br. J. Nutr.**, 37:1-21. 1977.
- HENRIKSEN, E.J.; KIRBY, C.R. & TISCHLER, M.E. Glycogen supercompensation in the rat soleus muscle during recovery from non-weight bearing. **J. Appl. Physiol.** 65: 2782-7, 1989.
- HENRIKSEN, E.J. & RITTER, L.S. Effect of soleus unweighting on insulin-independent glucose transport activity. **J. Appl. Physiol.** 74: 1653-7, 1993.
- HENRIKSEN, E.J.; STUMP, C.S.; TRINH, T.H.T. & BEATY, S.D. Role of glucose transport in glycogen supercompensation in reweighted rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** 80: 1540-6, 1996.
- HENRY, R.J. **Clinical chemistry principles and techniques.** 2nd Ed. Hargeston, Harper & How, 1974.
- HOUMARD, J.A.; HICKEY, M.S.; TYNDALL, G.L.; GAVIGAN, K.E. & DOHM, G.L. Seven days of exercise increase GLUT-4 protein content in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, 79: 1936-8, 1995.
- HUTBER, C.A. & BONEN, A. Glycogenesis in muscle and liver during exercise. **J. Appl. Physiol.**, 66:2811-7, 1989.
- JACOBS, I. Blood lactate: implications for training and sports performance. **Sports Med.**, 3:10-25, 1986.

- JAMES, W.P.T. & COORE, H.G. Persistent impairment of insulin secretion and glucose tolerance after malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, **23**: 386-9. 1970.
- KABADI, U.M.; EISENSTEIN, A.B.; STRACK, I. Decreased plasma insulin but normal glucagon in rats fed low protein diets. **J. Nutr.**, **106**:1247-53. 1976.
- KATZ, J. & McGARRY, J.D. The glucose paradox: Is glucose a substrate for liver metabolism ? **J. Clin. Invest.**, **74**:1901- 9, 1984.
- KOKUBUN, E. **Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos. Efeito do exercício e do estado alimentar.** São Paulo, 1990. 105p. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo].
- KUIPERS, H.; COSTILL, D.L.; PORTER, D.A.; PINK, W.J.; MORSE, W.M. Glucose feeding and exercise in trained rats: mechanisms for glycogen sparing. **J. Appl. Physiol.**, **61**:859-63. 1986.
- LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; JEANRENAUD, B. & FREYCHET, P. Insulin binding and effects in isolated soleus muscle of lean and obese mice. **Am. J. Physiol.** **234**(Endocrinol. Metab. 3): E348-E58, 1978
- LUCIANO, E. **Influências do treinamento físico sobre o metabolismo de carboidratos em ratos diabéticos experimentais.** São Paulo, 1991. 108p. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo].
- LUNN, P.G. & AUSTIN, S. Differences in nitrogen metabolism between protein-deficient and energy-deficient rats with similarly restricted growth rates. **Ann. Nutr. Metab.**, **27**:242-51. 1983.

- MAGNUSSON, I. & SHULMAN, G. Pathways of hepatic glycogen synthesis in humans. **Med. Sci. Sports Exercise**, **23**: 939-43, 1991.
- MANDARINO, L.J.; PRINTZ, R.L.; CUSI, K.A.; KINCHINGTON, P.; O'DOHERTY, R.M.; OSAWA, H. SEWELL, C.; CONSOLI, A. ; GRANNER, D.K. & DEFRONZO, R.A. Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. **Am. J. Physiol.** **234**:E701-E8, 1995.
- MARCONDES, E. **Desnutrição**. Savier, São Paulo, 1976. 288p.
- McARDLE, W.D.; KATCH, F.I. & KATCH, V.L. **Essentials of exercise physiology**. Malvern, Lea&Febiger, 1994. 563p.
- McCULLAGH, K.J.A.; JUEL, C.; O'BRIEN, M. & BONEN, A. Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **156**: 51-7, 1996.
- McLAREN, D.S. & MEGUID, M.M. **Nutrition and its disorders**. 4^a ed., New York, Churchill Livingstone, 1988. 293 p.
- MELLO, M.A.R. de **Desnutrição Protéico-Calórica, gravidez e Desenvolvimento materno. Estudo comparativo de alterações corporais e metabólicas entre ratas jovens e adultas**. São Paulo, 1985. 125p. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- MELLO, M.A.R. & CURY, L. Effects of protein-calorie malnutrition on endocrine pancreatic function in young pregnant rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **22**:791-4. 1989.

- MELLO, M.A.R. Effects of intrauterine and postnatal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **27**:2461-6. 1994.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. & RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. 6^a ed. São Paulo, Atheneu, 1990. 705p.
- NAKAI, N.; SHIMOMURA, Y.; OHSAKI, N.; SATO, J.; OSHIDA, Y.; OHSAWA, I.; FUJITSUKA, N. & SATO, Y. Exercise training prevents maturation-induced decrease in insulin sensitivity. **J. Appl. Physiol.**, **80**: 1963-7, 1996.
- NEWSHOLME, E.A. & LEECH, A.R. **Biochemistry for the medical sciences**. Chichester, John Wiley & Sons, 1983. 952p.
- NOLTE, L.A.; GALUSKA, D.; MARTIN, I.K.; ZIERATH, J.R. & WALLBERG-HENRIKSSON, H. Elevated free fatty acid levels inhibit glucose phosphorylation in slow-twitch rat skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, **151**: 51-9, 1994.
- OKITOLONDA, W.; BRICHARD, S.M. & HENQUIN, J.C. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. **Diabetologia**, **30**: 946-51, 1987.
- OYONO-ENGUELLE, S.; MARBACH, J.; HEITZ, A.; OTT, C. ; GARTNER, M.; PAPE, A.; VOLLMER, J.C. & FREUND, H. Lactate removal ability and graded exercise in humans. **J. Appl. Physiol.**, **68**: 905-11, 1990.
- PAYNE-ROBINSON, H.M. & BROWN, R. The effect of malnutrition on insulinbinding to rat erythrocytes. **Br. J. Nutr.**, **67**: 279-86, 1992.

- PHILLIPS, S.M.; GREEN, H.J.; TARNOPOLSKY, M.A. & GRANT, S.M. Decreased glucose turnover after short-term training is unaccompanied by changes in muscle oxidative potencial. **Am. J. Physiol.**, **269**: E222-E30, 1995.
- PILEGAARD, H.; CARSTEN, J. & WIBRAND, F. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: effect of training. **Am. J. Physiol.**, **264**: E156-60, 1993.
- PILEGAARD, H. & JUEL, C. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats skeletal muscles: effect of denervation. **Am. J. Physiol.**, **269**:E679-E82, 1995.
- RANDLE, P.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N. & NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty acids cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet I**: 785-9, 1963.
- RAO, R.H. Fasting glucose homeostasis in the adaptation to chronic nutritional deprivation in rats. **Am. J. Physiol.**, **268**: E873-E9, 1995.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H. & FAHEY Jr, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, **123**: 1939-51, 1993.
- REGOUW, B.J.M.; CORNELISSEM, P.J.H.C.; HELDER, R.A.P.; SPIJKERS, J.B.F. & WEEBER, Y.M.M. Specific determination of free fatty acid in plasma. **Clin.Chim.Acta**, **31**:187-95, 1971.
- REIS, M.A. B.; CARNEIRO, E.M.; MELLO, M.A.R.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Glucose induced insulin secretion is impaired and

- insulin phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-I are increased in protein - deficient rats. **J.Nutr.** ,**127**: 403-10, 1997.
- REN, J.M.; MARSHALL, B.A.; GULVE, E.A.; GAO, J.; JOHNSON, D.W.; HOLLOSZY, J.O. & MUECKLER, M. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. **J. Biol. Chem.** **268**: 16113-5, 1993.
- RODNICK, K.J.; HENRIKSEN, E.J.; JAMES, D.E. & HOLLOSZY, J.O. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol.**, **262**: C9-14, 1992.
- ROTH, D.A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. **Med. Sci. Sports Exerc.**, **23**: 925-34, 1991.
- RYAN, C.K.; FERGUSON, K. & RADZIUK, J. Glucose dynamics and gluconeogenesis during and after prolonged swimming in rats. **J. Appl. Physiol.** **74**: 2404-11, 1993.
- SLOBODIANIK, N.H.; MARCILLA de PARADA, N.; RIO, M.E.; SANABUJA, J.C.; MARTINEZ-SEEBER, A. Efectos especificos de diferentes tipos de malnutricion sobre las proteinas plasmaticas, estudiados en un modelo experimental en ratas. **Arch. Latinoam. Nutr.**, **27**:377-93. 1977.
- SWENNE, I.; CRACE, C.J. & MILNER, R.D.G. Persistente impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after limited period of protein-calorie malnutrition early in life. **Diabetes**, **36**: 454-8, 1987.
- SWENNE, I.; CRACE, C.J. & JANSSON, L. Intermittent protein-calorie malnutrition in the young rat causes long-term impairment of the insulin

- secretory response to glucose in vitro. **J. Endocrinol.** , **118**: 295-302, 1988.
- TORUN, B. & VITERI, F.E. Influence of exercise on linear growth. **Eur. J. Clin. Nutrition** **48**: S186-S90, 1994.
- WATERLOW, J.C. & ALLEYNE, G.A.O. **Má nutrição protéica em crianças. Evolução dos conhecimentos nos últimos dez anos.** L.P.M. Editora. São Paulo. 120 pp. 1974.
- WEINKOVE, C.; WEINKOVE, E. A. & PIMSTONE, B.L. Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats. **Clin. Sci. Mol. Med.**, **50**: 156-63. 1976.
- WELLS, C.L.; STERN, J.R.; HECHT, L.H. Haematological changes following a marathon race in male and female runners. **Eur. J. Appl. Physiol.**, **48**: 41-9. 1982.
- WHITEHEAD, R.G. & HARLAND, P.S.E.G. Blood glucose, lactate and pyruvate in kwashiorkor. **Br. J. Nutr.**, **20**: 825-31. 1966.
- WILMORE, J.H. & COSTILL, D.L. **Physiology of sports and exercise.** Champaign, Human Kinetics, 1994. 549p.
- WINICK, M. **Nutrition and development.** New York, John Wiley, 1972. 245p.