

EFEITOS DO EXERCÍCIO AGUDO SOBRE BIOMARCADORES SÉRICOS DE RATOS DIABÉTICOS



THE EFFECTS OF ACUTE EXERCISE ON SERUM BIOMARKERS IN DIABETICS RATS

EFFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO SOBRE BIOMARCADORES DE SUERO EM RATONES DIABÉTICOS

ARTIGO ORIGINAL

Fabio Milioni (Educador Físico)¹
Barbara de Moura Mello Antunes (Educadora Física)¹
Claudia Teixeira-Arroyo (Educadora Física)¹
João Paulo Loures (Educador Físico)¹
Pedro Paulo Menezes Scariot (Educador Físico)²
Paulo Cezar Rocha dos Santos (Educador Físico)¹
Maria Souza Silva (Educadora Física)¹
Eliete Luciano (Bióloga)^{1,3}

1. Ciências da Motricidade da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (Unesp), Campus Rio Claro, SP, Brasil.
2. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campus Limeira, SP, Brasil.
3. Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (Unesp), Campus Rio Claro, SP, Brasil.

Correspondência:

Rua Presidente Wenceslau, 13, Salto, SP, Brasil.
fmilioni@yahoo.com.br

RESUMO

Introdução: As respostas ao exercício agudo dos biomarcadores, como a fosfatase alcalina (FA) e a creatina quinase (CK) séricas têm sido pouco investigadas em ratos diabéticos. **Objetivos:** Verificar os efeitos do exercício físico aeróbio agudo sobre as concentrações de CK e FA, bem como, avaliar o estado hídrico em ratos diabéticos experimentais. **Materiais e métodos:** Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos jovens, distribuídos em dois grupos: diabéticos (DA) e controles (CA). O diabetes foi induzido por meio da administração de aloxana monohidratado Sigma® (32 mg/kg de peso corporal). Duas semanas após confirmação do diabetes, ambos os grupos foram submetidos a uma sessão aguda de natação por 30 min, com carga aeróbia (4,5 % do peso corporal). Foram avaliados: glicose, hematócrito, CK, FA, albumina e a cinética de lactato durante o exercício por meio de coletas 25 µL de sangue da cauda dos animais, nos minutos 0, 10, 20 e 30 de exercício. **Resultados:** ANOVA de dois fatores para medidas repetidas e o teste *post hoc* de Tukey apontaram diminuição significativa dos valores de glicemia após o exercício para o grupo DA, aumento significativo de CK pós-exercício para o grupo DA, aumento significativo de hematócrito para ambos os grupos após exercício e manutenção da FA após exercício para o grupo DA. **Conclusão:** O exercício agudo aeróbio foi eficiente no controle dos níveis glicêmicos de ratos diabéticos. Entretanto, deve ser aplicado com cautela, pois induziu altos valores de CK, sugerindo possíveis lesões teciduais.

Palavras-chave: exercício aeróbico, diabetes mellitus, aloxana, ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction: The responses to acute exercise on biomarkers, such as alkaline phosphatase (ALP) and creatine kinase (CK) serum levels have been little investigated in diabetic rats. **Objectives:** To investigate the effects of acute aerobic exercise on the concentrations of CK and ALP as well as evaluating the hydration status in diabetic rats. **Materials and methods:** Were used male Wistar rats, young adults, divided into two groups: diabetic (DA) and controls (CA). The diabetes was induced in the rats by administration of alloxan monohydrate Sigma® (32 mg/kg body weight). Two weeks after confirmation of diabetes, both groups were subjected to an acute swim session for 30 min, with aerobic load (4.5% body weight). Glucose, hematocrit, CK, ALP, albumin and lactate kinetics during exercise were evaluated by collecting 25µL of blood from the tail of the animals in minutes 0, 10, 20 and 30 of exercise. **Results:** Two-way ANOVA for repeated measures and *post hoc* Tukey test showed significant decrease of glycemia after exercise for the DA group, significant increase in CK after exercise for the DA group, significant increase in hematocrit for both groups after exercise and maintenance of ALP after exercise for the DA group. **Conclusion:** The acute aerobic exercise was effective in controlling glucose levels in diabetic rats. However, it should be applied with caution, because it induced high CK values, suggesting possible tissue damage.

Keywords: aerobic exercise, diabetes mellitus, alloxan, Wistar rats.

RESUMEN

Introducción: Las respuestas al ejercicio agudo de los biomarcadores, como la fosfatasa alcalina (FA) y la creatina quinasa (CK) séricas han sido poco investigadas en ratones diabéticos. **Objetivos:** Verificar los efectos del ejercicio físico aeróbico agudo sobre las concentraciones de CK y FA, bien como evaluar el estado hídrico en ratones diabéticos experimentales. **Materiales y métodos:** Fueron utilizados ratones Wistar machos, adultos jóvenes, distribuidos en dos grupos: diabéticos (DA) y controles (CA). La diabetes fue inducida por medio de la administración de aloxana monohidratado Sigma® (32 mg/kg de peso corporal). Dos semanas después de la confirmación de la diabetes, ambos grupos fueron sometidos a una sesión aguda de natación por 30 minutos, con carga aeróbica (4,5% del peso corporal). Fueron evaluados: Glucosa, hematócrito, CK, FA, albumina y La cinética de lactato durante el ejercicio por medio de colectas de 25 µL de sangre de la cola de los animales, en los minutos 0, 10, 20 y 30 de ejercicio. **Resultados:** ANOVA de dos factores para medidas repetidas y el test *post hoc* de Tukey apuntaron disminución significativa de los valores de glicemia después del ejercicio para el grupo DA, aumento significativo de CK después del ejercicio para el grupo DA, aumento significativo de hematócrito para ambos grupos después del ejercicio y mantenimiento de la FA después del ejercicio para el grupo DA. **Conclusión:** El ejercicio agudo aeróbico fue eficiente en el control de los niveles glicémicos de ratones diabéticos. Entretanto, debe ser aplicado con cautela, pues indujo altos valores de CK, sugiriendo posibles lesiones tisulares.

Palabras-clave: ejercicio aeróbico, diabetes mellitus, aloxana, ratos Wistar.

Artigo recebido em 17/08/2012, aprovado em 26/11/2013.

INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo animais, especialmente ratos, têm sido extensivamente realizados em diferentes situações de intervenção experimental devido à fácil manipulação, boa resposta ao exercício, possibilidade de análises invasivas e constante monitoramento/controle de variáveis durante o período experimental, tais como, dieta, tempo de manipulação, temperatura, umidade e sono^{1,2}.

Dentre algumas intervenções experimentais utilizadas na literatura, a aplicação de agentes químicos beta-citotóxicos, como a aloxana, têm se destacado para promover a indução de diabetes mellitus (DM) em modelos animais³⁻⁵. Esta droga, apresenta efeito tóxico específico sobre as células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas⁵, causando a falência da secreção da insulina e, conseqüentemente, simulando o DM tipo 1 em animais submetidos a tal procedimento.

A DM é uma desordem metabólica caracterizada pela permanente hiperglicemia decorrente de defeitos na secreção ou ação da insulina e está associada com disfunções e alterações danosas de diferentes sistemas metabólicos⁶. A hiperglicemia por sua vez, pode inibir a diferenciação osteoblástica e alterar a resposta da paratireoide, produzindo um efeito deletério na matriz óssea⁷.

Fatores inerentes à condição diabética podem ser prejudiciais à qualidade óssea⁸. Evidências apontam que o prejuízo ósseo causado pelo DM1 (insulino-dependente) é geralmente acompanhado por elevadas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA). Além disso, as associações entre danos no metabolismo ósseo e elevadas concentrações de FA são observadas não somente em condições de DM9, mas também em outras patologias¹⁰. Além da FA, as concentrações de outras enzimas, como aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase e creatina quinase (CK) podem ser alteradas, como conseqüência de mudanças nos mecanismos de síntese, degradação, estoque e excreção de enzimas, causados pela DM¹¹. Nesse caso, a existência desses diferentes marcadores bioquímicos é de extrema relevância, uma vez que permitem o diagnóstico de diversas patologias e/ou alterações fisiológicas.

Usada no diagnóstico de condições clínicas tais como, infarto do miocárdio, distrofia muscular e outras doenças, a CK, é apontada como um biomarcador para detecção de lesão tecidual¹². Outra importante aplicação dessa enzima está inserida no contexto da fisiologia do exercício, uma vez que, numerosos estudos observam alterações da atividade da CK após uma sessão de exercício agudo, podendo variar substancialmente de acordo com as condições (tipo, intensidade e duração) do exercício realizado¹³.

Apesar dos efeitos benéficos do exercício físico crônico sobre a DM serem bem explorados^{14,15}, vale lembrar que apenas uma sessão de exercício agudo já pode promover interessantes alterações^{16,15}. Assim, esse estudo justifica-se pela importância do entendimento das relações entre o exercício físico e seus efeitos agudos no âmbito dessa patologia.

As respostas ao exercício agudo sobre as concentrações séricas dos biomarcadores supracitados têm sido pouco investigadas em ratos diabéticos submetidos a exercício aeróbio de natação, dessa forma, os objetivos desse estudo foram verificar os efeitos do exercício físico aeróbio agudo sobre as concentrações de creatina quinase e fosfatase alcalina, bem como, monitorar o estado de hidratação em ratos diabéticos experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram induzidos a DM 20 ratos Wistar machos, adultos jovens e média de 380,71±43,39g de peso corporal. 10 ratos com a mesma idade e peso corporal médio de 416,14±32,38g formaram o grupo controle.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 (cinco ratos por gaiola), sob condições de temperatura ambiente de 21° C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, alimentados com ração balanceada (Purina®) e água "ad libitum" para os grupos experimentais no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociência, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para indução da DM os 20 ratos receberam aloxana monoidratada Sigma® (32 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (i.v.). Posteriormente receberam uma solução de água e glicose (15%) durante 24h, além de ração³. Sete dias após a administração da droga, foi realizado teste de glicemia (Laborlab® método enzimático colorimétrico - glicose oxidase-peroxidase) para comprovação do estado diabético. Foram considerados diabéticos, os animais que apresentaram nível glicêmico igual ou superior a 200 mg/dL, sendo que os ratos que não atingiram esse nível foram excluídos do estudo.

Os animais foram distribuídos em dois grupos de acordo com a glicemia:

Controle agudo (CA n=10) e diabético agudo (DA n=8). Duas semanas depois da confirmação da DM os animais de ambos os grupos foram submetidos a uma sessão aguda de natação por 30 min. Uma carga equivalente a 4,5% do peso corporal foi anexada no dorso dos animais, por representar uma intensidade de exercício predominantemente aeróbia conforme Oliveira *et al.*,⁽⁴⁾ e Araújo *et al.*,⁽¹⁷⁾.

As análises bioquímicas foram realizadas pré e pós-exercício com a retirada de dois capilares com sangue. O sangue retirado foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos e o hematócrito foi analisado para verificação do balanço hídrico dos animais. Posteriormente o sobrenadante foi utilizado para as dosagens de albumina, creatina quinase (CK) e fosfatase alcalina (FA) por meio de métodos enzimáticos colorimétricos utilizando kits comerciais.

Para análise da cinética de lactato e glicose durante o exercício agudo foram coletados previamente, nos minutos 10, 20 e 30 de exercício, 25µL de sangue da cauda do animal. O lactato sanguíneo foi analisado pelo método enzimático segundo Engel & Jones¹⁸ e as concentrações de glicose sanguínea foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase¹⁹, usando kits comerciais (Laborlab®).

Análise Estatística

As variáveis analisadas no presente estudo foram submetidas ao teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilks. Foi utilizada análise de variância (ANOVA two-way) para medidas repetidas seguidas por *post hoc* de Tukey. Com nível de significância pré-fixado em 5% (p<0,05).

RESULTADOS

Ao analisar os resultados pode-se observar que o grupo DA apresentou valores glicêmicos elevados, em relação ao grupo CA tanto na situação pré quanto na situação pós-exercício agudo (p=0,006 e p=0,02; respectivamente). Diferenças significativas também foram encontradas na análise do grupo DA em relação as situações pré e imediatamente após o exercício, sendo observados menores valores para a situação pós-exercício (p=0,003) (figura 1).

Em relação a CK, o grupo DA apresentou nível sérico significativamente maior que o grupo CA na situação pós-exercício (p=0,01), assim como o mesmo grupo DA apresentou diferenças significativas entre as situações pré e pós-exercício agudo (p=0,002) (figura 2).

Quanto à fosfatase alcalina (FA) o grupo DA apresentou maiores valores em comparação com o grupo CA na situação pré-exercício agudo (p=0,028) (figura 3).

A análise da albumina não revelou diferenças significativas para nenhuma das comparações propostas, situações pré e pós-exercício aeróbio agudo e grupos DA e CA (figura 4A).

Já em relação ao hematócrito o exercício agudo ocasionou diferença significativa tanto para o grupo DA ($p=0,0001$) quanto para o grupo CA ($p=0,02$) em relação ao pós-exercício comparado com o pré-exercício (figura 4B).

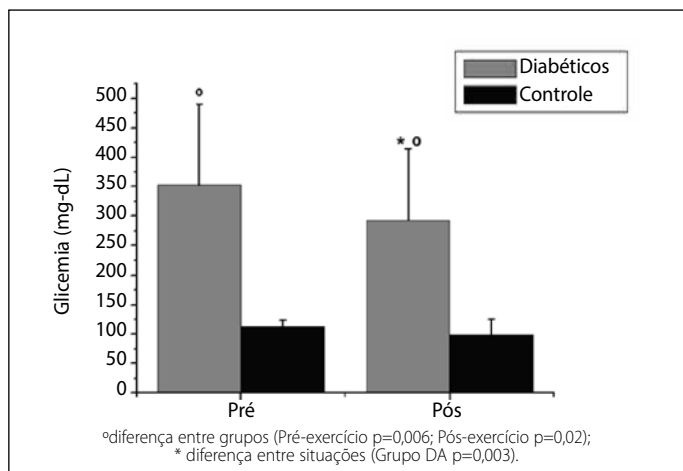


Figura 1. Níveis glicêmicos dos grupos diabético agudo (DA) e controle agudo (CA) nas situações pré e pós-exercício.

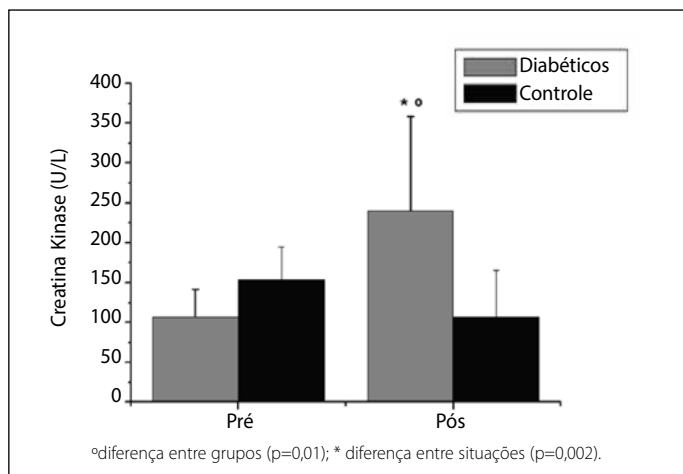


Figura 2. Níveis séricos de creatina quinase (CK) dos grupos diabético agudo (DA) e controle agudo (CA) nas situações pré e pós-exercício.

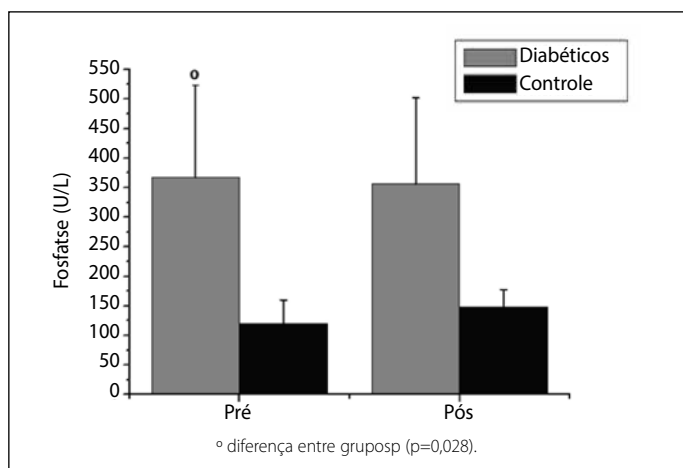


Figura 3. Níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) dos grupos diabético agudo (DA) e controle agudo (CA) nas situações pré e pós-exercício.

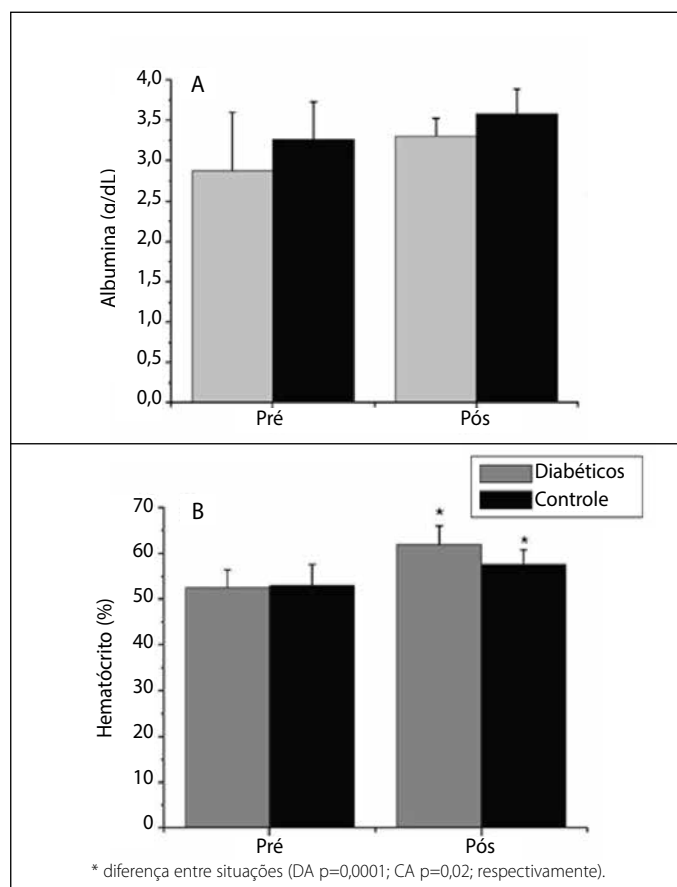


Figura 4. A) Albumina dos grupos diabético agudo (DA) e controle agudo (CA) nas situações pré e pós-exercício. B) Hematócrito dos grupos diabético agudo (DA) e controle agudo (CA) nas situações pré e pós-exercício.

DISCUSSÃO

Estudos experimentais propiciam ações favoráveis para pesquisas de novos mecanismos celulares e metabólicos, e/ou, melhor compreensão das adaptações, comportamento e resposta do organismo ao exercício físico que, isoladamente, desempenha um papel fundamental para o controle metabólico principalmente em estados patológicos como na diabetes *mellitus* (DM)²⁰.

Os valores de estabilização do lactato sanguíneo do presente estudo (DA= $4,7 \pm 0,75$ mmol/L e CA= $5,46 \pm 0,79$ mmol/L) corroboram tanto com estudos prévios que investigaram o comportamento da lactacidemia em ratos durante exercício de natação de caráter aeróbio, quanto com estudos que investigaram a concentração de lactato no momento de transição entre os metabolismos aeróbio/anaeróbio^{1,2,21}, comprovando de fato o predomínio do metabolismo aeróbio que caracterizou a sessão de exercício agudo.

Segundo a *American Diabetes Association*²² a prática de exercício físico regular atua como modulador dos níveis plasmáticos de glicose, aproximando-os aos valores normativos, em decorrência da facilitação da captação periférica da glicose independentemente da ação da insulina. Evidências apontam que uma sessão aguda de exercício também é capaz de promover esses efeitos²³. No presente estudo, nós observamos um declínio das concentrações de glicose no grupo de ratos diabético (DA) com apenas uma sessão aguda de exercício aeróbio (figura 2), semelhante aos achados de Rogatto²³.

Ao analisar os valores absolutos de glicemia nos momentos pré e pós-sessão aguda de exercício aeróbio verifica-se redução das concentrações de glicose após a sessão em ambos os grupos, com alterações estatisticamente significantes para o grupo DA (figura 1). Entretanto, em nossos achados, verificou-se diminuição significativa dos valores

de glicemia do grupo DA após realização de exercício aeróbio agudo, evidenciando a possível contribuição dessa prática no controle da hiperglicemia de ratos induzidos ao DM.

Exercícios intensos aumentam a atividade enzimática muscular em função de danos mecânicos ocasionados na membrana celular do músculo esquelético responsáveis pela perda da integridade das mesmas²⁴. A creatina quinase (CK) é um biomarcador fortemente ligado a esse fenômeno, e em níveis plasmáticos elevados indica a presença de microlesões musculares altamente relacionadas com a diminuição da capacidade contrátil e alterações no desempenho do músculo esquelético²⁴. No presente estudo os animais do grupo DA apresentaram maiores valores de CK em relação ao momento pré e em relação ao grupo CA imediatamente após o exercício aeróbio sugerindo que tais alterações de concentrações podem ser em função das debilidades endócrinas e metabólicas decorrentes da DM.

É consenso na literatura, que a DM tipo I colabora sensivelmente para a perda das funções neurais, como diminuição das ramificações dos dendritos e da quantidade de neurotransmissores, afetando a qualidade da condução sináptica e conseqüentemente prejudicando a musculatura esquelética²⁵. Além de debilitar o sistema nervoso central, a hiperglicemia ocasionada pela patologia acentua a formação de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez irão promover um estado de estresse oxidativo²⁶.

Em humanos o excesso de radicais livres contribui com a perda da integridade da membrana da célula muscular em função da reação de oxidação dos radicais livres com a camada bilipídica que forma as membranas celulares^{27,28}. Esse cenário de diminuição da integridade das membranas, somado a perda da função neural e de transmissão de impulso nervoso com conseqüente perda da capacidade contrátil do músculo esquelético, podem ter contribuído para o rompimento mecânico das células musculares durante o exercício e explicariam o fato dos maiores valores observados de CK em ratos diabéticos em comparação com ratos normais e com a situação pré-exercício.

As altas concentrações de FA verificadas em nosso estudo corroboram com outros trabalhos que sugerem um comprometimento da remodelagem óssea em ratos diabéticos contribuindo para a redução da qualidade dos ossos⁸, massa óssea e aumento da probabilidade

de desenvolver osteopenia⁹, decorrente da resposta da paratireoide frente à hiperglicemia, por uma inibição da atividade osteoblástica⁷.

Cabe resaltar que os níveis séricos de FA nos ratos diabéticos foram mantidos após o exercício, sendo significativamente maiores quando comparados com os ratos não diabéticos. Isso também pode indicar que os ratos diabéticos necessitam de maiores teores minerais oriundos do osso e que um exercício agudo, mesmo causando diminuição nos níveis glicêmicos, não é capaz de promover diminuição na captação de minerais ósseos contrapondo aos efeitos da doença. Sendo assim, possivelmente fatores como o desbalanço hídrico podem influenciar na perda de minerais.

A DM ocasiona sintomas como a polifagia, polidipsia e poliúria, sendo o último sintoma um fator responsável por desencadear a desidratação de células teciduais que culminaria em diminuição do volume hídrico e concomitantemente, alterações nas taxas de hemácias e hematócrito²⁹. Ao analisar as variáveis albumina e hematócrito, que estão relacionadas com o estado nutricional e hídrico, observou-se um acréscimo em ambas as variáveis após a sessão de exercício aeróbio, com significância estatística para hematócritos no grupo diabético e controle (DA $p=0,0001$ e CA $p=0,02$; respectivamente), sugerindo que em resposta ao esforço e estresse houve uma hemoconcentração causada por perda hídrica resultante dos mecanismos de sudorese e ofego na tentativa de manter a termorregulação³⁰.

CONCLUSÃO

Dessa forma é possível concluir que o exercício agudo aeróbio é um modelo eficiente para o controle dos níveis glicêmicos de ratos induzidos a diabetes *mellitus* tipo 1, contudo sua aplicação deve ser feita com cautela, pois induziu a altos valores de concentração sérica de CK e diferenças significativas na hemoconcentração, sugerindo possíveis lesões teciduais, assim como alterações no estado hídrico.

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

REFERÊNCIAS

1. Araujo GG, Papoti M, dos Reis IGM, de Mello MAR, Gobatto CA. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011;112(3): 839-52.
2. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos L, Kokubun, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2001; Parte A. 130:21-7.
3. Luciano E, Lima FB. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. *Revista de Ciências Biomédicas*. 1997; 18:47-60.
4. Oliveira CAM, Luciano E, Marcondes MCCG, Mello MAR: Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2007;21:258-64.
5. Ribeiro C, Cambri LT, Dalia RA, Araújo MB, Ghezzi AC, Moura LP, et al. Muscle protein metabolism in neonatal alloxan administered rats: effects of continuous and intermittent swimming training. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2012; 4:5.
6. Snowling NJ, Hopkins WG. Effects of Different Modes of Exercise Training on Glucose Control and Risk Factors for Complications in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes care*. 2006; 29:2518-27.
7. Santana, RB Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52:1502-10.
8. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in Patients With Diabetes *Mellitus*. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007; 22:1317-28.
9. Miazgowski T, Czekalski S. A 2-years Follow-up Study on Bone Mineral and Markers of Bone Turnover in Patients with Long-standing Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Osteoporosis International*. 1998; 8:399-403.
10. Guerin, MR, Santi, FP, Silveira, RF, Luciano, E. Influence of ultrasound and physical activity on bone healing. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2008; 34(9):1408-13.
11. Scott FW, Trick KD, Lee LPK, Hynie I, Heick HMC and Nera EA. Serum enzymes in the BB rat before and after onset of the overt diabetic syndrome. *Clinical Biochemistry*. 1984; (17):270-5.
12. Braccaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British Medical Bulletin*. 2007; 81-82 (1):209-30.
13. Schneider CM, Dennehy CA, Rodearmel SJ, Hayward JR. Effects of physical activity on creatine phosphokinase and the isoenzyme creatine kinase-MB. *Ann Ernerg Med*. 1995; 25:520-4.
14. Hevener AL, Reichart D, and Olefsky J. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes* 2000; 49:2154-2159.
15. Henriksen, EJ. Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol*. 2002; 93:788-96.
16. Gao J, Sherman WM, McCune SA, Osei K. Effects of acute running exercise on whole body insulin action in obese male SHHF/Mcc-facp rats. *J Appl Physiol*. 1994; 77:534-41.
17. Araujo GG, Papoti M, Manchado FDB, Mello MAR, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry and Physiology* Parte A. 2007;148:888-92.
18. Engels RC, Jones JB. Causes and elimination of erratic blank 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*. 1978; 88:475-84.
19. Henry RJ, Cannon DC, Wilkeman J. *Clinical chemistry, principles and techniques*. 2.ed. New York: Harper and Harper Row Publishers. 1974;1288.
20. Gomes RJ, Leme JACA, Mello MAR, Luciano E, Caetano FH: Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. *Motriz*. 2008; 14:320-8.
21. Contartezze RVL, Manchado FDB, Gobatto CA, De Mello MAR. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Parte A. 2007;151:415-22.
22. American Diabetes Association. *Physical activity/exercise and diabetes* (Position Statement). *Diabetes Care*. 2004; 27: S58-S62.
23. Rogatto GP. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre parâmetros endócrino-metabólicos relacionados ao estresse [Dissertação de mestrado]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2001.
24. Lee J, Clarkson PM. Plasma Creatine kinase activity and glutathione after eccentric exercise. *Medicine And Science In Sports And Exercise*. 2003;35:930-936.
25. Ceretta LB, R'Eus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF et al. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of Alloxan-induced diabetic rats. *Experimental Diabetes Research*. 2012;1-8.
26. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003;26:1589-96.
27. Pires ACL, Boaventura MFC, Gorrão R, Hirabara SM, Puggina EF, Pellegrinotti IL, Filho LAD, Cury R, Cury TCP. Induction of lymphocyte death by short-and-long duration triathlon competitions. *Medicine And Science In Sports And Exercise*. 2009; 41:1896-901.
28. Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, Talbert EE. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*. 2011,95:1-9.
29. Queiroga MR, Silveira RF, Oliveira MFM, Crespillo D, Kokubun E, Luciano E: Efeitos do exercício físico agudo sobre a glicemia e lipidemia de ratos diabéticos tratados com metformina. *Maringá*. 2006;17:169-75.
30. Cunningham JG. *Termorregulação*. In: *Tratado de fisiologia veterinária*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.