
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO - CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO NA PREVENÇÃO DO
DIABETES MELLITUS EM
RATOS.**

Carla Ribeiro

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade.

Maio/2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS-RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO - CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

*DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO NA
PREVENÇÃO DO DIABETES MELLITUS EM
RATOS.*

Carla Ribeiro

*Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Ciências
da Motricidade.*

Maio/2012

796.077 Ribeiro, Carla
R484d Diferentes protocolos de treinamento na prevenção do diabetes mellitus em ratos / Carla Ribeiro. - Rio Claro : [s.n.], 2012
125 f. : il., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Alice Rostom de Mello

1. Esportes - Treinamento técnico. 2. Ratos neonatos. 3. DMT2. 4. Exercício físico. 5. Captação de glicose. 6. Estresse oxidativo. I. Título.

Dedicatória

Aos meus pais por toda dedicação carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a Deus por todas as oportunidades oferecidas, realizações e pelas conquistas alcançadas. Agradeço pela VIDA.

Aos meus pais por tudo que sou e conquistei até o momento. Agradeço por estarem sempre presentes nos momentos de insegurança, desespero, tristeza, alegrias e desabafos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado me apoiando, aconselhando e incentivando todas as minhas decisões. Enfim, obrigada por tudo.

Aos meus irmãos, pela força, incentivo e carinho.

Ao meu marido pela paciência, confiança e dedicação depositadas em mim. Obrigada por me incentivar em todos os momentos.

Aos familiares que são base e força.

Ao meu sogro e minha sogra, o meu agradecimento. Pelo carinho, pelos mimos, e por estarem presentes em minha vida me ajudando, torcendo por mim e me acompanhando em todas as etapas e conquistas.

Aos amigos, agradeço de coração, todos os momentos que passamos juntos. Amigos do laboratório, que foram muito importantes para o desenvolvimento deste projeto, que contribuíram muito para esta tese: Fulvia, Clecia, Amanda, Rodrigo Dalia, Rodrigo Moura, Michel, Leandro, Zé Diego, Fabricio, Carol, Pedro, Gustavo e Ivan. Agradeço de modo especial a Lucieli por me ajudar inteiramente no desenvolvimento do projeto me acompanhando em todos os testes, treinos, aulas, análises, estudos, conversas, risos, felicidades, desabafos, ansiedades, incertezas o tempo todo!!!!!!!

Ao Comitê de Ética para Experimentação Animal, da Universidade de Taubaté pela análise do presente projeto de pesquisa.

Aos técnicos Eduardo e José Roberto por tudo que me ensinaram, pelas conversas e brincadeiras. À Clarice por todo ensino, pelo esforço no desenvolvimento,

principalmente das dosagens, e pela amizade. Aos funcionários da UNESP, particularmente biblioteca, saepe, limpeza, cantina e pós-graduação, muito obrigada.

Aos professores Cláudio, Gobbi, Eliete, Eduardo, Lilian, Angelina e Samuel pelos ensinamentos, correções, incentivo e pela amizade.

De forma muito particular, agradeço à minha orientadora pela confiança depositada em mim durante todo o período de graduação e pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos, orientações, oportunidades, brincadeiras e por ser uma mãezona. Você é muito especial e importante, tenho imensa admiração pelo seu profissionalismo e pela sua pessoa.

AGRADEÇO DE MODO ESPECIAL O APOIO FINANCEIRO DA

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

FAPESP

Proc: 2009/51538-5

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR**

CAPES

RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o impacto de diferentes protocolos de treinamento físico sobre a evolução do quadro diabético em ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana. Ao longo do projeto de doutorado, foram realizadas às coletas de dados referentes à aplicação neonatal de aloxana e aplicação dos protocolos de treinamento contínuo, intermitente e de força de natação, em três séries de experimentos resultando quatro estudos. O primeiro estudo teve como objetivo comparar os efeitos do treinamento intermitente e do treinamento contínuo de natação no metabolismo muscular da glicose dos animais. Os resultados encontrados demonstraram eficácia da administração neonatal de aloxana, observando-se intolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina nos animais aloxânicos aos 28 dias. Aos 120 dias, os animais aloxânicos submetidos ao treinamento intermitente mostraram maior área sob a curva glicêmica no GTT_o que os respectivos controles. Em relação à captação de glicose pelo músculo sóleo isolado, os animais treinados pelo protocolo intermitente apresentaram maiores valores. A concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio foi aumentada pelo treinamento intermitente somente nos animais controles. Assim, conclui-se que o protocolo de exercício intermitente mostrou-se mais eficaz que o contínuo para a melhora da captação de glicose pelo músculo esquelético. O segundo estudo visou analisar os efeitos do treinamento intermitente bem como do treinamento contínuo no metabolismo protéico muscular. Foi verificado que, aos 28 dias, os animais aloxânicos apresentaram glicemia após sobrecarga de glicose maior do que os controles, mas não foram apresentadas diferenças na insulinemia. Aos 120 dias, não foram observadas diferenças nas análises séricas de albumina e proteínas totais entre os grupos estudados. Em relação a análises musculares de DNA e razão proteína/ DNA, observou-se maiores valores de DNA nos animais aloxânicos submetidos ao treinamento contínuo e maior razão proteína/DNA nos animais aloxânicos treinados intermitente. Nenhuma alteração foi obtida na síntese e na degradação protéica do músculo sóleo isolado. Assim conclui-se que os treinamentos contínuo e intermitente foram eficazes em alterar o crescimento por hiperplasia e por hipertrofia das células musculares nos animais aloxânicos. O terceiro estudo visou comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre os biomarcadores do estresse oxidativo no pâncreas de ratos aloxânicos. Foi verificado que aos 28 dias os animais aloxânicos apresentaram à resistência à insulina, avaliada através da remoção de glicose sérica (Kitt%/min) durante ITT. Aos 120 dias, foram encontradas diferenças na atividade da enzima SOD e na concentração de TBARS pancreáticos. Em relação à peroxidação lipídica (TBARS) o treinamento contínuo elevou a peroxidação lipídica no pâncreas dos animais aloxânicos quando comparado aos treinamentos intermitente e força. Além disso, os animais aloxânicos treinados pelo protocolo contínuo de natação apresentaram maior peroxidação do que o grupo controle. Após treinamento contínuo o grupo controle apresentou maior atividade da SOD quando comparado ao grupo aloxana contínuo, controle sedentário e controle força. Assim conclui-se que os treinamentos intermitente e de força mostraram eficácia na proteção ao estresse oxidativo no pâncreas de animais aloxânicos. O quarto estudo visou comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre as variáveis séricas e teciduais do metabolismo dos lipídios de ratos aloxânicos. Aos 28 dias observou-se que os animais aloxânicos apresentaram maior resistência à insulina,

avaliada através da remoção de glicose sérica (Kitt%/min) durante ITT. Aos 120 dias, foram encontradas diferenças nas concentrações séricas de AGLs, Colesterol total e Lipídios totais. Em relação aos valores de AGL, os animais aloxânicos sedentário mostraram maiores valores do que os animais aloxânicos após treinamento contínuo e intermitente de natação. Além disso, os animais aloxânicos que realizaram treinamento intermitente e força apresentaram menores valores desta variável em relação aos controles correspondentes; O protocolo de treinamento contínuo foi menos eficaz do que o protocolo de treinamento força em reduzir os níveis de colesterol total séricos nos animais aloxânicos. Os valores séricos de lipídios totais também avaliados mostraram que o treinamento intermitente aumentou os níveis séricos nos animais aloxânico. Diferenças foram encontradas no tecido hepático, onde os animais aloxânicos submetidos ao treinamento contínuo de natação apresentaram menores valores de lipídios totais. Conclui-se, portanto, que treinamento físico em diferentes intensidades de esforço é de grande importância na atenuação e controle das alterações sobre o metabolismo dos lipídios em animais aloxânicos. Assim sendo, acreditamos que o projeto de pesquisa realizado apresenta-se concluído com resultados relevantes obtidos, parcialmente já publicados em periódicos internacionais.

Palavras chave: Ratos neonatos, aloxana, DMT2, exercício físico, captação de glicose, hipertrofia muscular, estresse oxidativo e metabolismo dos lipídios.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effects of different training exercise protocols on the evolution of diabetic picture in neonatal alloxan-administered rats. During this research, data concerning neonatal alloxan administration and continuous, intermittent and strength swimming training protocols were analyzed in three sets of experiments which resulted in four different scientific articles.

The first study aimed to compare the effects of intermittent and continuous swimming training on glucose metabolism of the animals. The data from this study demonstrated the efficacy of the neonatal alloxan administration in impairing the glucose homeostasis of the animals, showing glucose intolerance and lower insulin sensitivity in the alloxan animals at 28 days. At 120 days, the alloxan treated animals subjected to the intermittent training showed higher serum glucose (AUC) than the controls after a GTT. The glucose uptake by isolated soleus muscle was higher in the animals trained by the intermittent protocol. The glycogen concentration of the gastrocnemius muscle was increased only in the control animals that performed intermittent training. In conclusion, intermittent exercise protocol was more effective than continuous exercise in improving glucose uptake by skeletal muscle.

The second study aimed to examine the effects of intermittent and continuous swimming training on muscle protein metabolism. At 28 days, the alloxan animals displayed higher glycemia after glucose overload than the control animals. No differences in insulinemia among the groups were detected. At 120 days, no differences in serum albumin and total protein among the groups were observed. In relation to muscle analysis for DNA and Protein/DNA ratio was observed higher DNA content in the alloxan animals that were subjected to continuous training and higher protein/DNA ratio in the alloxan animals after intermittent training. Protein synthesis and degradation in the soleus muscle did not differ among the groups. It was concluded that continuous and intermittent training sessions were effective in altering muscle growth by hyperplasia and hypertrophy, respectively, in alloxan-administered animals.

The third study aimed to compare the effects of continuous, intermittent, and strength training protocols on the biomarkers of oxidative stress in the pancreas of alloxanic rats. At the age of 28 days, alloxan animals exhibited a higher insulin resistance as assessed by the Kitt serum glucose removal (%/min) during the ITT. At the age of 120 days, differences were found in SOD activity and the TBARS concentration. Continuous training increased the level of TBARS in the pancreas of the alloxan animals as compared to the intermittent and strength training. Moreover, the alloxan animals subjected to the continuous training protocol presented higher levels of TBARS than the control group. After continuous training, the control group had a higher SOD activity as compared to the alloxan group subjected to continuous training, sedentary control and control group after strength training protocol. In conclusion, intermittent and strength training were efficient at protecting against oxidative stress in the pancreas of alloxan animals.

The fourth study aimed to compare the effects of continuous, intermittent, and strength training on serum and tissue variables on the lipid metabolism of alloxan rats. At 28 days, the alloxan animals exhibited higher insulin resistance as measured by the disappearance of glucose serum (% Kitt/min) during the ITT. At 120 days, differences were found in the serum concentrations of FFAs, total cholesterol, and total lipids. Sedentary alloxan animals showed higher FFA values than alloxan animals after

continuous training and intermittent swimming. In addition, the alloxan animals that underwent intermittent and strength training showed lower FFA values compared to the corresponding controls. The continuous training protocol was less effective than the strength training protocol for reducing the levels of total cholesterol in the alloxan animals. Serum total lipid values showed that intermittent training increased serum levels in alloxan animals. Differences were found in liver tissue, with alloxan animals that were subjected to continuous swim training showing lower values of total lipid. Thus, it was concluded that physical training at different intensities of effort is of great importance in the attenuation and control of changes in the lipid metabolism in alloxan animals. Therefore, we believe that the research has been finalized with relevant results obtained, partly already published in international journals.

Keywords: Neonatal rats, alloxan, T2DM, exercise training, glucose uptake, muscle hypertrophy, oxidative stress and lipid metabolism.

SUMÁRIO

	Páginas
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3.REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Diabetes Mellitus.....	4
3.2 Alterações Metabólicas no Diabetes Mellitus.....	5
3.3 Tratamento do Diabetes Mellitus	6
3.4 Diferentes protocolos de exercício e desenvolvimento do Diabetes Mellitus	6
3.5 Diabetes Mellitus experimental.....	8
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 Animais.....	10
4.2 Cruzamento dos animais.....	11
4.3 Aplicação Neonatal de Aloxana.....	11
4.4 Delineamento e Grupos Experimentais.....	11
4.5 Treinamento Físico.....	12
4.6.AVALIAÇÕES.....	13
4.6.1.Avaliações in vivo.....	13
4.6.1.1 Glicemia e insulinemia de Jejum	13
4.6.1.2 Teste de tolerância à Glicose Oral (Gtto).....	13
4.6.1.3 Sensibilidade à Insulina.....	13
4.6.1.4 Teste de esforço.....	14
4.6.2.Sacrifício dos animais.....	14
4.6.3 Avaliações após o sacrifício.....	15
4.6.3.1 Sangue.....	15
4.6.3.2 Tecidos.....	15
4.6.3.2.1 Tecido adiposo.....	15
4.6.3.2.2 Fígado, coração e músculo gastrocnêmio	15
4.6.3.3 Musculo Soleo.....	15
4.6.3.3.1 Metabolismo da Glicose.....	15
4.6.3.3.2 Metabolismo das proteínas.....	16
4.6.3.3.2.1 Síntese.....	16
4.6.3.3.2.2 Degradação.....	17
4.6.3.4 Pancreas.....	17
4.6.3.4.1 Biomarcadores do estado antioxidante.....	17
4.6.3.4.1.1 Atividade catalase (CAT).....	17
4.6.3.4.1.2 Atividade superóxido dismutase (SOD).....	18
4.6.3.4.2 Biomarcadores de peroxidação lipídica.....	18
4.6.3.4.2.1 Concentração de produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)..	18
4.6.3.4.3.-Secreção de Insulina Por Ilhotas Isoladas.....	19
4.6.3.4.4- Concentração de Insulina em Ilhotas Isoladas.....	19
5.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
6.RESULTADOS.....	21
 Primeiro estudo. Treinamento intermitente e contínuo de natação e metabolismo da glicose em ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana. <i>Journal of endocrinology and Metabolism</i>. v. 01, p. 107, 2010.....	 23

SUMARIO

Páginas

Segundo estudo- <i>Metabolismo protéico muscular de ratos submetidos à administração neonatal de aloxana e aos treinamentos intermitente e contínuo de natação. Diabetology& Metabolic Syndrome 2012, 4:5 doi:10.1186/1758-5996-4-5.....</i>	48
Terceiro estudo- <i>Diferentes protocolos de exercício e biomarcadores de estresse oxidativo no pâncreas de ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana.....</i>	67
Quarto estudo- <i>Efeitos do treinamento físico em diferentes intensidades de esforço sobre metabolismo dos lipídios de ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana.....</i>	86
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	109
8. CONCLUSÕES.....	112
9, REFERÊNCIAS DO PROJETO	113
APÊNDICES (Artigos Publicados e Submetidos)	
 <i>Apêndice 1- RIBEIRO,C; MOTA, C.S.A; MANCHADO-GOBATTO, F.B; VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; LEME, J.A.C.A; OLIVEIRA, C.A.M; MELLO, M.A.R. Effects of moderate intensity physical training in neonatal alloxan- administered rats. Journal of Diabetes & Metabolism, v. 01, p. 107, 2010.....</i>	120
 <i>Apêndice 2- RIBEIRO, C; CÂMBRI, L. T; DALIA, R. A; ARAÚJO,M,B; LEME, J. A. C. A; MOURA, R.F; VOLTARELLI, F. A ; MELLO, M. A. R. . Continuous and Intermittent Exercise Training and Glucose Metabolism in Neonatal Alloxan Administered Rats. Journal of Endocrinology and Metabolism, v. 1(3), p. 101-112, 2011.....</i>	121
 <i>Apêndice 3- RIBEIRO, C; CÂMBRI, L.T; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; GHEZZI, A.C; MOURA, L.P; ARAÚJO, G.G; BOTEZELLI, J.D; MELLO, M.A.R. Muscle protein metabolism in neonatal alloxan-administered rats: effects of continuous and intermittent swimming training. Diabetology & Metabolic Syndrome 2012, 4:5 doi:10.1186/1758-5996-4-5.....</i>	122
 <i>Apêndice 4- RIBEIRO, C; CÂMBRI, L.T; MOTA, C.S.A; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; MOURA, L.P; MELLO, M.A.R. The effect of different exercise protocols on biomarkers of oxidative stress in the pancreas of rats subjected to neonatal alloxan administration. Experimental Physiology (submitted).....</i>	123
 <i>Apêndice 5- RIBEIRO, C; CÂMBRI, L.T; DALIA, R.A; ARAÚJO, M.B;BOTEZELLI, J.D; SPONTON, A.C.S MELLO, M.A.R. Effects of physical training with different intensities of effort on lipid metabolism in rats submitted to the neonatal application of alloxan. Lipids In Health and Disease (submitted).....</i>	124
 ANEXO Declaração da aprovação do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU nº 022/08), sob protocolo nº 019/2005	125

1-INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a incidência do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) tem aumentado consideravelmente (WILD et al., 2004). Tal aumento se deve à mudança do estilo de vida incluindo dieta de alto índice calórico e inatividade física (ADA, 2008). Desta forma tornam-se necessárias novas formas de prevenção e tratamento desta doença, associada diretamente às várias complicações debilitantes, que podem levar a morte prematura.

Atualmente tem-se dado grande importância ao treinamento físico como forma de melhorar o nível de aptidão física e a qualidade de vida. O exercício físico tem sido cada vez mais recomendado na prevenção e na reabilitação de doenças cardiorespiratórias, osteoporose, diabetes e no combate ao estresse. (KNOWLER et al., 2002; LINDSTROM et al., 2003; LI et al., 2002).

Particularmente, no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, a prática regular de exercício físico, em diferentes intensidades, melhora a tolerância à glicose e reduz a resistência à insulina. Além disto, o exercício físico leva a uma redução no estresse oxidativo em indivíduos com diabetes tipo 2, devido ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes (ROBERTS et al., 2006; MEILHAC et al., 2001). Contudo, faltam evidências diretas quanto ao efeito preventivo do exercício sobre a instalação do quadro de DMT2, especialmente quando se leva em consideração a intensidade do esforço, uma vez que este tipo de pesquisa não é viável em seres humanos. Nesse contexto, modelos de animais proporcionam condições mais adequadas ao estudo dessa questão.

Portha et al. (1989) descreveram um modelo experimental de diabetes neonatal em ratos Wistar através da aplicação de streptozotocina no dia do nascimento. Nesse modelo foi demonstrado que a hiperglicemia é transitória. Os valores glicêmicos retornam ao normal após a primeira semana de vida, com recuperação da produção de insulina e da massa de células β . Isso caracteriza um modelo de DMT2 em ratos, no qual os animais experimentais apresentam boa sobrevivência (PORTHA et al., 1989).

Posteriormente, Kodama et al. (1993) desenvolveram um outro modelo, através da substituição da streptozotocina por aloxana. Nesse estudo a aloxana foi administrada aos 2, 4 ou 6 dias de vida. Quando analisados aos 60 dias de idade, os ratos que receberam aloxana no 2º dia de vida apresentaram glicemia, no estado alimentado, ligeiramente superior à de ratos controle, enquanto que aqueles que receberam a droga nos 4º e 6º dias mostraram glicemia significativamente maior que a dos controles. Os

autores consideraram o modelo útil aos estudos sobre complicações crônicas do diabetes. Contudo, salientaram que mais estudos são necessários para determinar se o mesmo também tem características de DMT2, como verificado no modelo streptozotocina neonatal. Oliveira et al. (2004) analisaram glicemia de jejum assim como tolerância à glicose em ratos de ambos os sexos aos 30, 60, 90 dias de idade, que receberam aplicação de aloxana aos 2 dias de vida. A glicemia de jejum não foi diferente da de ratos controles em nenhum momento.

Dados derivados de nossos estudos de iniciação científica e dissertação de Mestrado, (RIBEIRO et al., 2005), utilizando ratos que receberam aloxana ao 6º dia de vida mostraram que estes animais apresentaram valores de glicemia, durante teste de tolerância à glicose, maiores que o grupo controle tanto aos 28 quanto aos 60 dias de idade. Mostraram, ainda, que ilhotas pancreáticas isoladas de ratos tratados com aloxana aos 60 dias de vida, apresentaram redução da secreção de insulina quando estimulados por concentrações fisiológicas (5,6mM) e supra fisiológica (16,7mM) de glicose quando comparadas as ilhotas do grupo controle aos 60 dias de idade. Assim nota-se que o modelo de indução de diabetes neonatal reúne características interessantes para o estudo do papel do exercício na prevenção e tratamento do DMT2.

Estudos têm demonstrado que o treinamento físico possui papel importante na modulação das respostas metabólicas causadas no DMT2.

Mota et al. (2008) utilizando o modelo experimental de diabetes tipo 2 com administração neonatal de aloxana, mostraram melhora na tolerância à glicose dos animais diabéticos após 12 semanas de treinamento contínuo de natação, na intensidade de máxima fase estável de lactato (MFEL). Oliveira et al. (2004) não encontraram alteração quando analisaram os efeitos do treinamento contínuo de natação em intensidade moderada na captação de glicose de ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana. Estudo realizado com indivíduos diabéticos tipo 1 (DMT1), comparou o efeito de treinamento intermitente com alta intensidade de esforço e treinamento contínuo moderado e mostrou que a redução na glicose sanguínea foi menor no exercício intermitente quando comparado ao exercício contínuo moderado em indivíduos com diabetes tipo 1 (GUELFY et al., 2007). Farrel et al. (1998), mostrou que ratos diabéticos apresentam maior síntese protéica muscular após treinamento resistido moderado. Estudo realizado com ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana e treinamento contínuo de natação, em intensidade moderada, mostrou que o teor de proteína sérico bem como no músculo esquelético não apresentaram alterações após 8

semanas de treinamento contínuo (OLIVEIRA et al., 2004). Desta forma fica evidente a importância do treinamento físico sobre o metabolismo dos carboidratos e proteínas no DMT2.

Adicionalmente estudos têm demonstrado que exercícios regulares em diferentes intensidades podem melhorar capacidade de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo.

Coskun et al. (2004) mostraram que realização de exercício contínuo de natação em diferentes intensidades atenuou a peroxidação lipídica e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no pâncreas de ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de streptozotocina (diabetes tipo 1). Os efeitos mais acentuados foram observados com exercício de maior intensidade (COSKUN et al., 2004). Além disso, demonstrou-se que a melhoria na função e na sobrevivência de células beta, via ativação de uma cascata de sinalização insulina/IGF-1 induzida pelo exercício de corrida teve papel crucial na prevenção do desenvolvimento e progressão do diabetes tipo 2 em ratos 90% pancreatectomizados. (Choi et al., 2006). Faltam informações quanto aos efeitos exercício sobre o estresse oxidativo induzido no pâncreas de ratos pela aplicação neonatal de aloxana.

O conjunto dessas informações denota a importância do desenvolvimento de novas pesquisas que evidenciem os efeitos de diferentes protocolos de exercício, aeróbio e anaeróbio, na prevenção do DMT2 em modelo experimental.

2-OBJETIVOS

2.1-Objetivo geral

Visando analisar os efeitos do exercício na prevenção do diabetes, o presente trabalho foi delineado para analisar o impacto de diferentes protocolos de treinamento, de caráter aeróbio e anaeróbio, sobre a evolução do quadro diabético em ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana.

2.2- Objetivos específicos

Avaliar, em ratos submetidos à administração neonatal com aloxana, associada ao treinamento contínuo ou intermitente de natação ou ainda ao treinamento de força por saltos suportando sobrecarga:

- Glicemia e insulinemia de jejum;
- Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina;
- Cinética do lactato sanguíneo durante teste de esforço;
- Metabolismo da glicose e de proteínas pelo músculo sóleo;
- Biomarcadores de peroxidação lipídica e do estado antioxidante no pâncreas.
- Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- Diabetes Mellitus

Diabetes é um grupo de desordens metabólicas caracterizada por hiperglicemia resultante da deficiência parcial ou total na secreção de insulina ou de uma ação ineficiente da insulina nos tecidos periféricos (SNOWLING; HOPKINS, 2006). Assim, existem duas formas básicas da doença, o diabetes mellitus tipo 1 e o diabetes mellitus tipo 2.

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é uma doença autoimune multifatorial, cuja susceptibilidade é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (ROSSINI, 2004). Essa doença é caracterizada por hiperglicemia crônica e pelo desenvolvimento de patologias vasculares específicas (BROWNLEE, 2001). Neste tipo de diabetes, há destruição, mediada pelas células T, das células secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas (células beta). Esse processo destrutivo leva a severa depleção de insulina, sendo necessária à administração exógena do hormônio (KELLY et al., 2003).

O diabetes tipo 2 (DMT2) ocorre mais lenta e tardiamente do que o tipo 1. Caracteriza-se pela resistência à insulina e disfunção das células β , o que leva a um quadro hiperglicêmico característico (HAYASHIA et al., 2006). O diabetes tipo 2 representa cerca de 90% de todos os diabéticos e pode ser desencadeado por vários fatores tais como a obesidade, dieta hipercalórica e falta de atividade física (IVY et al., 1999). Considerando os diferentes estilos de vida, Oldroyd et al. (2006), avaliaram o desencadeamento do diabetes tipo 2 e concluíram que a mudança no estilo de vida resulta em melhora nos níveis de obesidade, sensibilidade à insulina e diminuição dos

fatores de riscos cardiovasculares, evidenciando à necessidade da prática diária de atividades físicas.

3.2- Alterações metabólicas no Diabetes Mellitus

A hiperglicemia é característica de ambos os tipos de diabetes (DMT1 e DMT2) e leva aos principais sintomas da doença. As elevações das cargas filtradas e excretadas de glicose pelos rins provocam glicosúria e diurese osmótica. Uma vez que o efeito osmótico impede a reabsorção do líquido, aparece poliúria, resultando em desidratação e, conseqüentemente, polidipsia.

Hiperglicemia crônica é tóxica e causa danos micro e macrovasculares sérios (LEE et al., 2005; STETTLER, 2006). Como conseqüência, a patologia microvascular no diabetes é uma das principais causas de cegueira, doença renal em estágio final e uma variedade de neuropatias debilitantes. O diabetes também está associado à doença macrovascular aterosclerótica, afetando artérias que suprem coração, cérebro e extremidades inferiores. Pacientes diabéticos correm risco maior de sofrer infarto do miocárdio, derrame e amputação de membros (BROWNLEE, 2001), uma vez que as complicações desta doença são fortemente correlacionadas com o tempo de duração da mesma. Os pacientes insulino-dependentes, cuja patologia se desenvolve mais cedo, são os mais atingidos. Conforme Portuese et al. (1995), a doença cardiovascular é a principal causa de morte no DMT2.

Existem quatro principais hipóteses sobre os mecanismos pelos quais a hiperglicemia causa as complicações no diabetes: fluxo aumentado na via poliol, aumento da formação de produtos finais de glicosilação avançada, ativação das isoformas da proteína kinase C, e aumento do fluxo na via das hexosaminas. Recentemente foi descoberto que, cada um dos quatro mecanismos patológicos diferentes, reflete um simples processo induzido pela hiperglicemia: a excessiva produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons (BROWNLEE, 2001).

O diabetes desencadeia também importantes alterações no metabolismo protéico em função do hipoinsulinismo, levando a um estado catabólico. Uma discreta alteração no equilíbrio entre síntese e degradação de proteína pode exercer profundo efeito, em longo prazo, sobre a viabilidade e metabolismo das células. Alterações na síntese e na degradação de proteínas podem ainda, afetar negativamente o reparo de tecidos após lesões ou infecções (CHARLTON; NAIR, 1998).

A deficiência de insulina causa, ainda, outra alteração metabólica significativa: o aumento da degradação e oxidação de gordura, resultando em excessiva produção de cetonas (KELLY et al., 2003). A cetoacidose diabética é um outro fator que pode levar a morte nessa patologia (PORTUESE et al., 1995).

3.3- Tratamento do Diabetes Mellitus

O tratamento para o diabetes mellitus tipo 1 inclui administração exógena de insulina, dieta e educação. Já o tratamento básico dos diabéticos tipo 2 inclui a administração de hipoglicemiantes orais, dieta e o exercício, para reduzir o peso corporal e auxiliar no controle da glicemia (KELLEY; GOODPASTER, 1999; GALLEN, 2003; ZINMAN et al., 2003). Além destas, os hormônios incretinas têm sido utilizados como forma de tratamento do diabetes tipo 2. As incretinas são hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal e liberadas quando da entrada de nutrientes no intestino. O hormônio incretina predominante é o peptídeo 1 tipo glucagon (GLP-1). Além de estimular a secreção de insulina o GLP-1 suprime a liberação de glucagon, melhora a sensibilidade à insulina e reduz o consumo de alimentos (CHACRA, 2006), evidenciando assim, a importância destes no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Esses cuidados permitem aos pacientes manterem uma vida normal e produtiva. Entretanto, uma significativa porção dos portadores dessa doença eventualmente desenvolve complicações no decorrer do tempo que, se não tratadas, levam progressivamente a uma piora do quadro diabético, diminuindo a expectativa e qualidade de vida dessas pessoas (EIZIRIK, 1995; KELLY et al., 2003).

O emprego do exercício é um dos mais fortes elementos das associações terapêuticas, principalmente quando agregado a dietoterapia (CONLEE, 1987). A otimização dos métodos de análise bioquímica é outro aliado no controle metabólico do diabetes, ao favorecer avaliações rápidas. Isso propicia retorno rápido e preciso, a ponto de permitir alteração das variáveis empregadas em uma sessão terapêutica de exercício, onde a via glicolítica, bem como o ciclo glicose-ácido graxo, sofrerão interferências constantes com um programa contínuo de exercício físico.

3.4- Diferentes protocolos de exercício e desenvolvimento do Diabetes Mellitus

A inatividade física é um fator que pode desencadear o diabetes tipo 2. Estudos epidemiológicos evidenciam que o nível de atividade física mostra-se inversamente correlacionado com a incidência do diabetes, independentemente da obesidade

(BORGHOUTS; KEIZER, 2000). Recentemente Fritz et al. (2006), observaram em seu estudo com humanos, que o treinamento físico reduziu o quadro hipertensivo e melhorou a sensibilidade à insulina em pacientes diabéticos tipo 2. Manson et al. (1991) mostraram que mulheres engajadas em algum tipo de exercício no mínimo uma vez por semana reduziram o risco de desenvolverem o diabetes tipo 2 em 33% em relação às mulheres sedentárias.

Com relação à aplicação de diferentes protocolos de exercícios no controle glicêmico de diabéticos tipo 2, observa-se ainda, algumas lacunas com relação ao melhor protocolo a ser utilizado. Ronald et al. (2007), realizaram estudo com diabéticos tipo 2 com idade entre 39 a 70 anos, visando a comparação entre exercício aeróbio moderado, exercício resistido com pesos e associação de ambos. Neste estudo observaram que tanto o grupo em que foi aplicado o exercício aeróbio quanto o grupo de treinamento resistido isoladamente obtiveram melhora no quadro glicêmico. O grupo que realizou treinamento resistido associado ao treinamento aeróbio teve melhora acentuada em comparação aos grupos treinados em um só protocolo.

Estudo realizado com indivíduos portadores de diabetes tipo 1, comparou o efeito de um treinamento intermitente com alta intensidade de esforço e treinamento contínuo moderado. Este estudo mostrou que a redução na glicose sanguínea foi menor no exercício intermitente quando comparado ao exercício contínuo moderado em indivíduos com diabetes tipo 1 (GUELFÍ et al., 2007). Guelfi et al. (2007), comparando os efeitos do exercício intermitente com alta intensidade e o exercício moderado, nos níveis glicêmicos de indivíduos diabéticos tipo 1, mostraram maior declínio nos níveis glicêmicos quando os sujeitos realizaram exercício moderado. Além disto, observaram maiores níveis de GH sérico nos indivíduos que realizaram exercício intermitente máximo quando comparado ao exercício moderado. O mesmo foi observado quanto analisaram concentrações de epinefrina. e norepinefrina.

Em ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de estreptozotocina, a realização de exercício contínuo de natação em diferentes intensidades, antes e após a indução do diabetes, atenuou os valores séricos de glicose. Os efeitos mais acentuados foram observados com exercício de maior intensidade (COSKUN et al., 2004). Farrel et al. (1998) mostraram que que ratos diabéticos apresentaram maior síntese protéica muscular após treinamento resistido moderado. Já Fedele et al. (2000) não encontraram alteração na síntese protéica muscular de ratos diabéticos após treinamento agudo resistido. Assim nota-se que o treinamento físico em diferentes protocolos tem sido

empregado, mas por outro lado a intensidade e a periodicidade a serem prescritas para a prática do exercício físico no diabetes tipo 2 são ainda motivos de divergências entre pesquisadores da área. Outro agravante é a ausência de evidências diretas quanto ao efeito preventivo do exercício sobre a instalação do quadro do diabetes tipo 2, uma vez que este tipo de pesquisa é de execução mais difícil.

Nesse sentido, estudos realizados por Kuwajima et al. (1999), utilizando animais geneticamente modificados (ratos que desenvolvem obesidade e intolerância à glicose com 10 semanas de idade), evidenciaram o efeito profilático da atividade física com relação ao desenvolvimento de diabetes tipo 2. A incidência cumulativa de diabetes tipo 2 em animais do grupo sedentário foi de 30, 67 e 78% em 10, 16 e 24 semanas de idade, respectivamente. Por outro lado, no grupo treinado a incidência desta doença permaneceu nula durante todo o período experimental.

Em ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de streptozotocina, a realização de exercício contínuo de natação em diferentes intensidades, antes e após a indução do diabetes, atenuou a peroxidação lipídica e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase no pâncreas. Os efeitos mais acentuados foram observados com exercício de maior intensidade (COSKUN et al., 2004). Os autores concluíram que o exercício exerce efeito terapêutico e/ou protetor no diabetes através de decréscimo no estresse oxidativo e preservação da integridade das células beta (COSKUN et al., 2004). Faltam informações quanto aos efeitos do exercício sobre o estresse oxidativo induzido no pâncreas de ratos pela aplicação neonatal de aloxana.

Desta forma nota-se que tanto o treinamento contínuo e o intermitente quanto o treinamento resistido possuem papel importante na prevenção e tratamento do diabetes mellitus, mas novos estudos são necessários para caracterizar adequadamente as melhores intensidade e periodicidade a cada um destes diferentes protocolos isoladamente.

3.5- Diabetes Mellitus experimental

Diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregado como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007). Estreptozotocina (STZ) é a droga mais popular para a indução do diabetes em ratos. A administração de STZ em ratos adultos produz diabetes severo, necessitando muitas vezes, de administração de insulina quando os

ratos precisam sobreviver por longo período (RERUP, 1970). Por outro lado, ratos recém nascidos tratados com STZ desenvolvem hiperglicemia leve a moderada na idade adulta, assemelhando-se ao DMT2 (PORTHA et al., 1989). Embora ambos os tipos de diabetes induzidos pela STZ sejam amplamente utilizados, existem alguns problemas para experimentos crônicos, especialmente recuperação espontânea da hiperglicemia pelo desenvolvimento de insulinoma funcionante (STEINER et al., 1970; YAMAGAMI et al., 1985; IWASE et al., 1991) e alta incidência de tumores no fígado e nos rins (ARISON; FEUDALE, 1967; MAUER et al., 1974; IWASE et al., 1989). Esses problemas são devido à forte ação oncogênica da STZ (KASUMI et al., 1978). Já a aloxana, uma droga mais antiga que a STZ, tem pequena ação oncogênica (YAMAGAMI et al., 1985), mas é menos empregada que esta, devido às dificuldades mostradas por alguns grupos de pesquisa em induzir o diabetes e manter os animais em boas condições. Em nossos laboratórios, muitas dessas dificuldades foram superadas devido ao aprimoramento na técnica de administração da droga (LUCIANO, 1991), de forma que nas últimas duas décadas temos conseguido induzir o diabetes e manter os animais em boas condições por longos períodos (MELLO; LUCIANO, 1995; LUCIANO; MELLO, 1998; GOMES et al, 2005; LEME et al, 2008).

A aloxana possui um efeito seletivamente tóxico sobre as células beta das ilhotas de Langerhans, no pâncreas (MROZIKIEWIC et al., 1994). A ação citotóxica deste agente diabetogênico é mediada por espécies reativas de oxigênio. Aloxana e o produto de sua redução, ácido dialúrico, estabelecem um ciclo redox com a formação de radicais superóxido. A ação de espécies reativas de oxigênio simultaneamente com o aumento da concentração de cálcio no citosol causa rápida destruição das células beta (SZKUDELSKI, 2001). Lenzen e Panten (1988) citam em seus estudos que no modelo experimental de diabetes aloxânico, os animais apresentam sintomas semelhantes aos encontrados no diabetes mellitus em humanos, tais como perda de peso corporal, polidipsia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorre não sejam totalmente conhecidos, acredita-se que haja envolvimento de reações mediadas por radicais livres que, como se sabe, danificam as células e provocam a ocorrência de doenças auto-imunes (MROZIKIEWIC et al., 1994).

Na última década acumularam-se evidências, a partir de dados experimentais obtidos em estudos “in vivo” e “in vitro”, de que células beta das ilhotas pancreáticas

são capazes de se recuperar após danos (EIZIRIK et al., 1993), especialmente quando provenientes de organismos jovens.

Baseados na premissa da recuperação da massa das células B após agressão precoce, Kodama et al. (1993) desenvolveram um modelo de diabetes menos severo através da administração neonatal de aloxana em ratos. Esses autores constataram que a diabetogenicidade da droga aumentou à medida que a idade da administração avançou do segundo para o sexto dia de vida e que a hiperglicemia observada persistiu por um ano com taxa elevada de sobrevivência. Ainda conforme os mesmos autores, mais estudos são necessários para verificar se esse modelo apresenta ou não características de DMT2.

Oliveira et al. (2004) analisaram glicemia de jejum assim como tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em ratos de ambos os sexos aos 28, 60, 90 dias de idade, que foram tratados com aloxana aos 2 dias de vida. A glicemia de jejum não foi diferente da de ratos controles em nenhum momento. Aos ratos tratados com aloxana mostraram-se intolerantes à glicose aos 28 e 60 dias. Este quadro regrediu espontaneamente aos 90 dias.

Dados mais recentes de nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2005) mostram, ainda, que ilhotas pancreáticas isoladas de ratos tratados com aloxana aos 6 dias de vida, apresentam redução da secreção de insulina quando estimulados por concentrações fisiológicas (5,6mM) e supra fisiológica (16,7mM) de glicose quando comparadas as ilhotas do grupo controle aos 60 dias de idade. Além disso, mostraram valores de área sob a curva de glicose, durante teste de tolerância à glicose, maiores que o grupo controle tanto aos 28 quanto aos 60 dias de idade. O conjunto desses dados evidencia que o modelo de indução de aloxana neonatal reúne características interessantes para o estudo do papel do exercício na prevenção e tratamento do DMT2.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Animais

Foram utilizados ratos adultos (90 dias) da linhagem Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP- Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos no Biotério do setor de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP - Campus de Rio Claro em sala com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e foto período claro/escuro de 12/12 horas com as luzes acesas das 6:00 às 18:00hs, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração

balanceada para roedores - Purina[®]). O presente estudo, Diferentes protocolos de treinamento na prevenção do diabetes mellitus em ratos, foi submetido à apreciação e aprovado (parecer- CEEA/UNITAU nº 019/08) pelo Comitê de ética para experimentação animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU), uma vez que a UNESP- Campus de Rio Claro ainda não conta com Comitê de Ética para experimentação animal instalado.

4.2- Cruzamento dos Animais

Para o cruzamento foi empregado o método de harém, 4 Fêmeas e 1 macho, colocados por uma noite em gaiolas coletivas. A confirmação da cobertura foi feita pela presença de espermatozóides em esfregaço vaginal realizado na manhã seguinte. As fêmeas cobertas foram colocadas em gaiolas individuais até o nascimento dos filhotes. Os machos foram descartados.

4.3- Aplicação neonatal de aloxana

A aplicação neonatal com aloxana em ratos neonatos leva a recuperação parcial da produção de insulina e da massa de células beta caracterizando um modelo de diabetes mellitus tipo 2. Assim aos seis dias de idade os filhotes machos, com peso médio (g) equivalente a $11,9 \pm 1,2$, receberam injeção intra-peritoneal (250mg/Kg de peso corporal) de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (LUCIANO; LIMA, 1997), após jejum de 16 horas. Como controles foram utilizados ratos (da mesma idade e sexo) injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamente 8 filhotes.

4.4- Delineamento e Grupos Experimentais

Aos 28 dias de idade, os filhotes compuseram 8 grupos com 12 animais em cada um, que permaneceram em observação até os 120 dias de idade:

- Controle: ratos injetados com tampão citrato não submetidos a treinamento;
- Controle Treinamento Contínuo: ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Controle Treinamento Intermitente: ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Controle Treinamento de Força: ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento de força.

- Aloxana: ratos injetados com aloxana não submetidos a treinamento.
- Aloxana Treinamento Contínuo: ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Aloxana Treinamento Intermitente: ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Aloxana Treinamento de Força: ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento de força.

O estudo foi desenvolvido em duas séries de experimentos. Na primeira, foram comparados os efeitos dos programas de exercício contínuo e intermitente sobre o quadro diabético dos ratos. Na segunda, foram analisados os efeitos do treinamento de força.

4.5- Treinamento físico

Os animais realizaram um período de adaptação que consistiu em: primeiramente, foram submetidos a um reconhecimento do meio aquático por 15 minutos; no dia seguinte aumentou-se o nível de água e realizaram natação durante 15 minutos; no 3º dia foram colocados para nadar no nível de água em que treinaram durante o experimento por 25 minutos; no 4º dia nadaram durante 30 minutos com carga (atada ao dorso) equivalente a 3% do peso corporal; no 5º dia de adaptação a sessão foi de 40 minutos com carga equivalente à 5% do peso corporal. Em seguida, foi iniciado o período de treinamento.

Os animais dos grupos treinados por programa de exercício contínuo foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais, suportando sobrecarga de 5 % do peso corporal. Esta intensidade de esforço corresponde à transição metabólica aeróbia/anaeróbia para ratos durante a natação (GOBATTO et al., 2001). Os animais dos grupos treinados por programa intermitente foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais, num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso (Protocolo adaptado, tendo como base o protocolo de BRAGA et al., 2004). Os animais que realizaram treinamento de força, foram submetidos a 4 séries de 10 saltos na água, interrompidos por 1 min de repouso entre elas, 5 dias por semana, em tanques individuais, com sobrecarga de 50% do peso corporal (ROGATTO et al., 2004). A temperatura da água foi mantida em $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante a realização do exercício, por ser esta temperatura

considerada termicamente neutra em relação à temperatura dos ratos (AZEVEDO, 1994; PAULI, 2005).

4.6- AVALIAÇÕES

4.6.1- Avaliações *in vivo*

Todos os animais tiveram peso corporal, ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana. Além disso, foram submetidos às seguintes avaliações:

4.6.1.1- Glicemia e insulinemia de Jejum

A verificação dos efeitos da aplicação neonatal com aloxana foi efetuada nos animais após o desmame (28 dias) e repetida aos 60, e 120 dias de idade, pela determinação da glicemia (glicose oxidase) e insulinemia (ELISA), após jejum de 12 horas, utilizando-se kits comerciais.

4.6.1.2- Teste de tolerância à Glicose oral (GTTO)

Foi realizado após 12 horas de jejum, com os animais aos 28, 60 e 120 dias de idade. Uma primeira coleta de sangue foi feita através de pequeno corte na extremidade da cauda do animal (tempo zero). Em seguida, uma sonda de polietileno foi introduzida no estômago, pôr via oral, e uma solução de glicose de 20% (2 g/Kg de peso corporal) foi administrada. Amostras de sangue foram coletadas após 30,60 e 120 minutos da administração da glicose, com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, para dosagens de glicose e de insulina. Uma única incisão na cauda é suficiente para a obtenção de todas as amostras. A determinação da glicemia foi realizada pelo método de glicose oxidase e da insulinemia, por ELISA, usando kits comerciais. Foram calculadas as áreas sob as curvas de glicemia durante o teste pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando o Software ORIGIN 6.0 (1999).

4.6.1.3- Sensibilidade à insulina

Para estimar a sensibilidade à insulina dos animais aos 28, 60 e 120 dias de idade foi utilizado o teste de tolerância à insulina (ITT). O teste foi realizado com os animais após 15 horas de jejum e consistiu na aplicação de solução de insulina (30mU/100g de peso corporal), via subcutânea, na região dorsal. Amostras de sangue (25µl) foram coletadas em capilares heparinizados, por meio de pequeno corte na extremidade da cauda, nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para determinação da glicose

(glicose oxidase), utilizando kits comerciais. Uma única incisão na cauda é suficiente para a obtenção de todas as amostras. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $0,0693/t/2) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose sérica enquanto houver decréscimo linear dos mesmos após a administração de insulina (LUNDBAEK, 1962).

4.6.1.4- Teste de esforço

Para avaliar o efeito do treinamento foram realizados testes de esforço, visando análise da cinética do lactato sanguíneo, aos 120 dias de idade. Os ratos treinados pelo protocolo contínuo foram submetidos a 30 min de natação ininterrupta com sobrecarga de 5% do peso corporal, aqueles treinados pelo protocolo intermitente, foram submetidos a 30 s de natação intercalados com 30 s de repouso, totalizando 20 min, com sobrecarga de 15% do peso corporal, e os animais treinados pelo protocolo de força realizaram 4 séries de 10 saltos na água, interrompidos por 1 min de repouso entre elas, com sobrecarga de 50% do peso corporal. Para fins de comparação, ratos sedentários foram também submetidos aos testes descritos anteriormente. Foram coletadas amostras sanguíneas (25 μ L) em capilares heparinizados para análise da concentração de lactato. O sangue foi coletado em repouso e a cada 5 minutos de exercício para o protocolo contínuo; e a cada 5 min de esforço no protocolo intermitente. Para protocolo de força as coletas foram realizadas, após a realização de cada série de salto, e 5, 7, 9, 13 e 15min após o término das quatro séries. As coletas foram feitas através de pequeno corte na extremidade distal da cauda do animal. Uma única incisão no início do teste é suficiente para a obtenção de todas as amostras. A dosagem do lactato foi realizada pelo método enzimático (ENGELS & JONES, 1978).

4.6.2- Sacrifício dos animais

Aos 120 dias de idade todos os animais foram sacrificados por decapitação, após anestesia profunda com amobarbital sódico (15 mg/kg de peso corporal), sem jejum prévio decorridas 48 horas dos testes de tolerância à glicose e/ou 48 horas após a última sessão de treino, para a obtenção de material biológico.

4.6.3. Avaliações após o sacrifício

4.6.3.1- Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação das concentrações de glicose, proteínas totais, albumina, triglicerídios, colesterol total, ácido graxo livre (AGL) e lipídios totais por espectrofotometria (kits comerciais) e insulina por ELISA (kits comerciais).

4.6.3.2- Tecidos

4.6.3.2.1- Tecido Adiposo

O tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica e retroperitoneal foi removido para pesagem e determinação das concentrações de lipídios totais. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). As concentrações de lipídios nesses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira et al. (1990).

4.6.3.2.2- Fígado, coração e músculo gastrocnêmio.

Nesses órgãos foram avaliadas as concentrações de glicogênio e lipídios totais. No músculo gastrocnêmio foram avaliados teores de proteínas totais (LOWRY et al., 1951) e DNA (GILES; MAYERS, 1965), visando inferir sobre o número (DNA) e tamanho (razão proteína/DNA) das células (WINICK et al., 1972).

4.6.3.3- Músculo Sóleo

4.6.3.3.1-Metabolismo da Glicose

Fatias longitudinais do músculo (25 - 35mg) foram colocadas em frascos de cintilação com capacidade de 20 ml siliconizados, contendo 1,5 ml de tampão Krebs - Ringer bicarbonato. Os frascos foram fechados com tampas de borracha, selados com anel plástico e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubnoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂/CO₂ (95%/5%). Após esse período, as fatias do músculo foram transferidas para novos frascos de cintilação (frasco externo) em cujo interior foram instalados pequenos tubos em forma de concha (frasco interno) com uma haste reta de aproximadamente 3 cm de comprimento que se insere nas tampas de borracha do frasco externo.

Cada frasco externo continha 1,5 ml de tampão Krebs-ringer e cada frasco interno, 700µl de hiamina10x. Após 60 minutos de incubação nesse sistema, com gaseamento durante os 15 primeiros minutos, foram adicionados 100µl de ácido tricloroacético (TCA) 25% ao frasco externo, visando à liberação de CO₂. A preparação foi mantida por mais 3 horas no sistema, porém com a fatia do músculo fora do alcance da solução com TCA. Decorrido esse tempo, 200µl do líquido contido no frasco interno foram retirados para a determinação do CO₂ produzido. A fatia de músculo imediatamente digerida em 0,5 ml de KOH para extração (SJÖRGREEN et al., 1938) e dosagem (DUBOIS et al., 1956) do glicogênio muscular. A temperatura na pré-incubação e incubação foi de 37° C.

O tampão Krebs-Ringer, base dos meios de pré-incubação e incubação, é constituído de: NaCl 0,6%, NaHCO₃ 0,19%, HEPES 6,64mM, KCl 0,032%, CaCl₂ 1,14nM, KH₂PO₄ 0,015%, MgSO₄ 0,03%. A solução assim preparada foi gaseada durante 20 a 30 minutos em O₂/CO₂ (95%/5%) e o pH ajustado a 7,4. A esta solução foram adicionados 20 volumes de albumina sérica bovina livre de gordura. Ao meio de pré-incubação foi adicionado piruvato de sódio para concentração de 5mM. Ao meio de incubação, foi adicionada glicose (5,5mM) contendo [U-¹⁴C] glicose (0,25 µCi/ml), [³H] 2-deoxiglicose (2DG=0,5µCi/ml) e insulina (100µUI/ml). Feitas às adições, o pH foi ajustado a 7,4 e os meios transferidos para os frascos que foram selados e equilibrados no banho a 37° C sob gaseamento em O₂/CO₂ (95%/5%) durante pelo menos 15 minutos. Fatias do mesmo músculo foram utilizadas, com peso semelhante àquelas incubadas, para determinação da concentração controle de glicogênio.

Foram avaliadas captação de glicose, utilizando-se a 2 DG como marcador, e incorporação do ¹⁴C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ³H da 2 DG ¹⁴C da glicose, respectivamente, através de contador de partícula beta. Para a estimativa da glicose oxidada (produção de CO₂), foi determinada a radioatividade do ¹⁴C presente no líquido (hiamina) coletado do frasco interno do sistema de incubação.

4.6.3.3.2- Metabolismo de proteínas

4.6.3.3.2.1-Síntese

Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina

[100u/ml], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloro acético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel foi lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em (SDS) 10% à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (LOWRY et al., 1951) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina por miligrama de proteína por 2 horas.

4.6.3.3.2.2- Degradação

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice da degradação protéica, conforme descrito previamente por Fulks et al. (1975). Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70mg) foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer [NaCl 1,2 mmol/L; KCl 4,8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2,5 mmol/L; KH₂PO₄ 1,2 mmol/L e MgSO₄ 1,2 mmol/L – pH 7,4] suplementado com glicose [5,5 mmol/L], BSA [1,34%], insulina [5u/ml] e ciclohexamida [5,0 mmol/L], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio de mesma composição e incubada por 2 horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para determinação do teor de tirosina pelo procedimento de Waalkes; Udenfriend (1957).

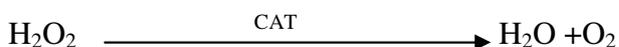
4.6.3.4- Pâncreas

4.6.3.4.1- Biomarcadores do estado antioxidante

4.6.3.4.1.1 -Atividade Catalase (CAT)

Amostras do pâncreas (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato pH, gelado e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -20° C para posterior ensaio.

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM, (AEBI, 1984). A queda nos valores de absorvância do H₂O₂ é seguida espectrofotometricamente a 240 nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase sanguínea foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde a é o volume de hemolisado na cubeta e b é o volume total da cubeta, A₁ o valor da absorvância em t=0 e A₂ é o valor da absorvância no tempo final, que em nosso caso se dá aos 15 segundos após o início da reação (AEBI, 1984).

4.6.3.4.1.2-Atividade superóxido dismutase (SOD)

Amostras do pâncreas (100 mg) foram inicialmente lavadas com tampão PBS pH 7,4, contendo heparina. Em seguida, foram homogeneizadas em tampão HEPES, contendo: EDTA 1 mM, manitol 210 mM e sacarose 70mM, em banho de gelo e centrifugadas a 100000 rpm por 15 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi estocado a -20° C para posterior análise. Os ensaios foram efetuados utilizando-se kits comerciais.

4.6.3.4.2- Biomarcadores de peroxidação lipídica

4.6.3.4.2.1- Concentração de produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), formam bases de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535 nm, ou por fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (OKAWA et al, 1979). Para esta determinação, amostras do pâncreas (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,05 N e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20° C para posterior dosagem.

4.6.3.4.3.-Secreção de Insulina Por Ilhotas Isoladas

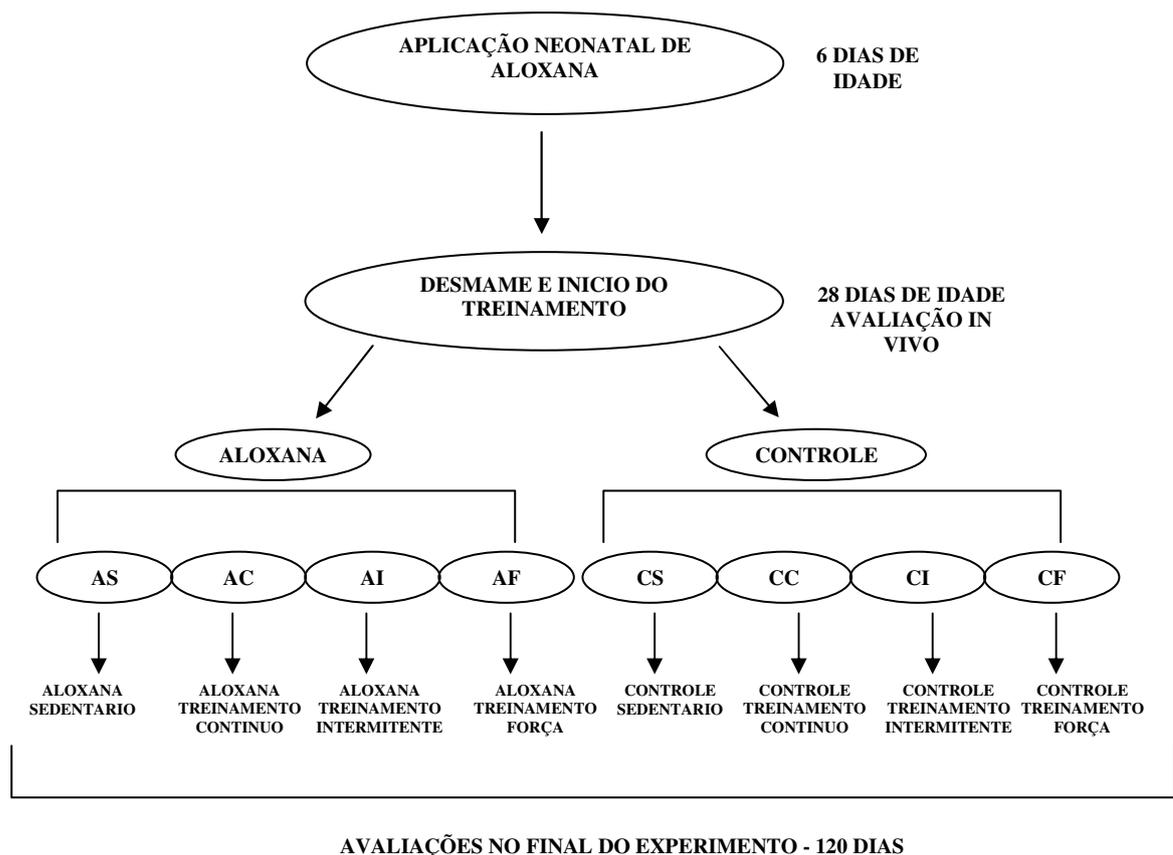
Em ilhotas pancreáticas isoladas através da digestão por colagenase (LACY; KOSTIANOVSKY, 1967), foi avaliada a secreção estática de insulina em resposta a concentrações crescentes de glicose. Após obtenção das ilhotas, estas foram colhidas com uma micropipeta siliconizada de 100 μ l e colocadas em recipientes plásticos (5 ilhotas por frasco), contendo 1 ml de Krebs (Na^+ 139 mM, K^+ 5mM, Ca^{+} 1 mM, Cl^- 124mM, HCO_3^- 24mM). Diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; e 16,7 mM) foram acrescentadas ao meio. Esses recipientes então foram colocados em frascos de vidro lacrados, nos quais foi criada uma atmosfera de carbogênio através da injeção, durante 10 minutos, de uma mistura de O_2/CO_2 (95%/ 5%). Posteriormente, os recipientes foram colocados em banho tipo Dubnoff com agitação a 37° C, durante 60 minutos. Terminada a incubação, o sobrenadante foi recolhido em microtubos de polietileno (eppendorf) e armazenado para determinação da insulina, através de radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

4.6.3.4.4- Concentração de Insulina em Ilhotas Isoladas.

Inicialmente foram isoladas 5 ilhotas e colocadas em tubos eppendorf . Posteriormente, o material foi centrifugado durante 20 minutos à temperatura de 15 °C, agitado e transferido para um outro tubo, contendo solução extratora (0,18M HCl em etanol 96 %). Foi, então, incubado por 24 horas a 4°C e diluído em tampão fosfato pH= 7,4 e armazenado para posterior análise da concentração de insulina por radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita utilizando teste t-student ou de Análise de Variância ANOVA bifatorial seguido de post hoc Bonferroni / Newman-Keuls, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5% ($p < 0,05$).



Desenho experimental

6- RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se apresentados em forma de quatro artigos científicos. Dois artigos publicados e dois submetidos à publicação em periódicos internacionais.

PRIMEIRO ESTUDO

RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; LEME, J.A.C.A; MOURA, R.F; VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A.R. *Treinamento intermitente e contínuo de natação e metabolismo da glicose em ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana. Journal of endocrinology and Metabolism. v. 01, p. 101-112, 2011 (publicado)*

SEGUNDO ESTUDO

RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; DALIA, R, A.; ARAÚJO, M.B; GHEZZI, A.C; MOURA, L.P; ARAÚJO, G.G; MELLO, M.A.R. *Metabolismo protéico muscular de ratos submetidos à administração neonatal de aloxana e aos treinamentos intermitente e contínuo de natação. Diabetology& Metabolic Syndrome 2012, 4:5 doi:10.1186/1758-5996-4-5 (publicado).*

TERCEIRO ESTUDO

RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; MOTA, C.S.A; DALIA, R.A; ARAÚJO, M.B; MOURA, L.P; MELLO, M.A.R. *Diferentes protocolos de exercício e biomarcadores de estresse oxidativo no pâncreas de ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana. Experimental Physiology (submetido).*

QUARTO ESTUDO

RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; DALIA, R.A; ARAÚJO, M.B; BOTEZELLI, J.D; SPONTON, A.C.S MELLO, M.A.R. *Efeitos do treinamento físico em diferentes intensidades de esforço sobre metabolismo dos lipídios de ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana. Lipids In Health and Disease (submetido).*

Além disso, nos Apêndices 1, 2, 3, 4 e 5 acham-se artigos publicados (referentes ao estudo piloto e estudos 1 e 2), e artigos submetidos a periódicos internacionais na versão em inglês (estudos 3 e 4).

APÊNDICE 1 : RIBEIRO,C; MOTA, C.S.A; MANCHADO-GOBATTO, F.B; VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; LEME, J.A.C.A; OLIVEIRA, C.A.M; MELLO, M.A.R. *Effects of moderate intensity physical training in neonatal alloxan- administered rats. Journal of Diabetes & Metabolism*, v. 01, p. 107, 2010.

APÊNDICE 2: RIBEIRO, C; CAMBRI, L. T; DALIA, R. A; ARAÚJO,M,B; LEME, J. A. C. A; MOURA, R.F; VOLTARELLI, F. A ; MELLO, M. A. R. . *Continuous and Intermittent Exercise Training and Glucose Metabolism in Neonatal Alloxan Administered Rats. Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 1(3), p. 101-112, 2011.

APÊNDICE 3: RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; GHEZZI, A.C; MOURA, L.P; ARAÚJO, G.G; BOTEZELLI, J.D; MELLO, M.A.R. *Muscle protein metabolism in neonatal alloxan-administered rats: effects of continuous and intermittent swimming training. Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012, 4:5 doi:10.1186/1758-5996-4-5.

APÊNDICE 4: RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; MOTA, C.S.A; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; MOURA, L.P; MELLO, M.A.R. *The effect of different exercise protocols on biomarkers of oxidative stress in the pancreas of rats subjected to neonatal alloxan administration. Experimental Physiology (submitted).*

APÊNDICE 5: RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; DALIA, R.A; ARAÚJO, M.B;BOTEZELLI, J.D; SPONTON, A.C.S MELLO, M.A.R. *Effects of physical training with different intensities of effort on lipid metabolism in rats submitted to the neonatal application of alloxan. Lipids In Health and Disease (submitted).*

**TREINAMENTO INTERMITENTE E CONTÍNUO DE NATAÇÃO E
METABOLISMO DA GLICOSE EM RATOS SUBMETIDOS À APLICAÇÃO
NEONATAL DE ALOXANA.**

Carla Ribeiro¹, Lucieli Teresa Cambri¹, Rodrigo Augusto Dalia¹, Michel Barbosa de Araújo¹, Jose Alexandre Curiacos de Almeida Leme¹, Rodrigo Ferreira de Moura¹, Fabrício Azevedo Voltarelli¹, Maria Alice Rostom de Mello¹.

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP , Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil.

Endereço para correspondência:

Carla Ribeiro

Av. 24 A, 1515, Bela Vista – Rio Claro –SP

CEP 13506-900

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Instituto de Biociências – Departamento de Educação Física

Laboratório de Biodinâmica

Tel: +55 19 35264308

E-mail: Carla_ef_rc@yahoo.com.br

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos do treinamento intermitente e do treinamento contínuo de natação no metabolismo da glicose em ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana. Ratos da linhagem wistar foram utilizados e divididos em seis grupos: Aloxana sedentário (AS), Controle sedentário (CS), Aloxana treinado contínuo (ATC), Aloxana treinado intermitente (ATI), Controle treinado contínuo (CTC) e Controle treinado intermitente (CTI). O diabetes foi induzido por aloxana em ratos neonatos aos 6 dias de vida (250mg/Kg p.c). O protocolo de treinamento contínuo consistiu em: 12 semanas de treinamento de natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. O protocolo de treinamento intermitente consistiu em 12 semanas de treinamento de natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso corporal. Os animais foram avaliados in vivo quanto a: tolerância à glicose (teste de tolerância à glicose oral- GTTo) e sensibilidade à insulina (teste de tolerância à insulina - ITT). Aos 120 dias de idade e decorridas 48 horas das avaliações in vivo, os animais foram sacrificados para a coleta de material, visando às análises da captação e oxidação de glicose, concentração e síntese de glicogênio pelo músculo sóleo isolado. Aos 28 dias observou-se que os animais aloxânicos apresentaram maiores valores de área sob a curva de glicose sérica (mg/dL x 120 min) no GTTo (Aloxana=18138 ±1992; Controle= 14792 ± 624), maiores valores referentes à resistência à insulina, avaliada através da remoção de glicose sérica (Kitt%/min) no ITT (Aloxana= 1,18 ± 0,41; Controle= 1,73± 0,82). Aos 120, dias os animais aloxânicos submetidos ao treinamento intermitente mostraram maior área sob a curva glicêmica (mg/dL x 120 min) no GTTo que os respectivos controles (AS= 13994 ±785; CS=12988 ± 688; CTC= 13152 ± 537; ATC= 13872 ± 1017; CTI= 12377 ± 571; ATI= 13986 ± 2182). Em relação à captação de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$) pelo músculo sóleo isolado, os animais treinados pelo protocolo intermitente apresentaram maiores valores (AS=2,64 ±0,55; CS= 3,17± 0,76; CTC= 3,70± 0,89; ATC= 3,13± 0,40; CTI= 5,09 ±0,49; ATI=5,59 ±0,99). A concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio foi aumentada pelo treinamento intermitente somente nos animais controles (AS= 0,44±0,11; CS= 0,40±0,12; CTC= 0,50±0,06; ATC= 0,55±0,10; CTI=0,62±0,16; ATI= 0,46±0,10). Assim, conclui-se que o protocolo de exercício intermitente mostrou-se mais eficaz que o contínuo para a melhora da captação de glicose pelo músculo esquelético.

Palavras Chave: Ratos neonatos, aloxana, DMT2, treinamento físico, captação de glicose.

1-INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a incidência do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) tem aumentado consideravelmente (WILD et al., 2004; ADA, 2010.). O diabetes mellitus tipo 2, caracteriza-se pela resistência à insulina e disfunção das células β , o que leva a um quadro hiperglicêmico característico (HAYASHIA et al., 2006; ADA, 2010). Representa cerca de 90 a 95% dos diabéticos e pode ser desencadeado por vários fatores tais como a obesidade, dieta hipercalórica e inatividade física (IVY et al., 1999; ADA, 2010).

A inatividade física é um dos elementos que pode desencadear o diabetes DMT2 enquanto, por outro lado, a prática regular de exercício físico, particularmente no tratamento dessa doença, melhora a tolerância à glicose e reduz a resistência à insulina (LUCIANO et al., 2002; IVEY et al., 2007; MANNERA et al., 2008; BAYNARD et al., 2008). Os possíveis mecanismos pelos quais o exercício físico induz mudanças benéficas na sensibilidade à insulina inclui o desenvolvimento da massa muscular, maior captação de glicose e redução no requerimento da quantidade de insulina na manutenção da homeostase glicêmica (THYFAULT, 2008; VENABLES; JEUKENDRUP., 2008; KOUTROUMPI et al., 2008). Por outro lado, faltam evidências diretas quanto ao efeito preventivo do exercício sobre a instalação do quadro de DMT2, especialmente quando se leva em consideração a intensidade do esforço, periodicidade e protocolo de treinamento a serem prescritos no diabetes tipo 2, uma vez que este tipo de pesquisa é de execução mais difícil em seres humanos. Nesse contexto, modelos de animais proporcionam condições mais adequadas ao estudo dessa questão. Desta forma, o diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregado como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007) bem como os efeitos do exercício físico.

Portha et al. (1989) descreveram um modelo experimental de diabetes neonatal em ratos Wistar através da aplicação de estreptozotocina no dia do nascimento. Nesse modelo foi demonstrado que a hiperglicemia é transitória. Os valores glicêmicos retornam ao normal após a primeira semana de vida, com recuperação da produção de insulina e da massa de células β . Isso caracteriza um modelo de (DMT2) em ratos, no qual os animais experimentais apresentam boa sobrevivência (PORTHA et al., 1989).

Posteriormente, Kodama et al. (1993) desenvolveram outro modelo, através da substituição da estreptozotocina por aloxana. Nesse estudo a aloxana foi administrada

aos 2,4 ou 6 dias de vida. Quando analisados aos 60 dias de idade, os ratos que receberam aloxana no 2º dia de vida apresentaram glicemia, no estado alimentado, ligeiramente superior à de ratos controle, enquanto os que receberam a droga nos 4º e 6º dias mostraram glicemia significativamente maior que a dos controles. Os autores consideraram o modelo útil aos estudos sobre complicações crônicas do diabetes. Contudo, salientaram que mais estudos são necessários para determinar se o mesmo também tem características de DMT2, como verificado no modelo estreptozotocina neonatal. Em seus estudos, Oliveira et al. (2004) analisaram a glicemia de jejum e a tolerância à glicose em ratos de ambos os sexos aos 30, 60, 90 dias de idade, que receberam aplicação de aloxana aos 2 dias de vida. A glicemia de jejum não foi diferente dos ratos controles em nenhum momento. Ribeiro et al. (2005) utilizando ratos que receberam aloxana ao 6º dia de vida mostraram que estes animais apresentaram valores de glicemia, durante teste de tolerância à glicose, maiores que o grupo controle tanto aos 28 quanto aos 60 dias de idade, o mesmo foi demonstrado por Contarteze et al. (2009), quando administraram aloxana nos animais com 2 dias de vida. Assim, estes dados evidenciam que o modelo de indução de diabetes neonatal reúne características interessantes para o estudo do papel do exercício na prevenção e tratamento desta doença. Em conjunto, esses resultados denotam a necessidade de mais estudos em ratos submetidos à administração neonatal de aloxana.

Estudos que utilizaram diferentes protocolos de treinamento na prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2 são escassos e apresentam resultados divergentes. Estudo realizado com indivíduos diabéticos tipo 1 (DMT1), comparou o efeito de treinamento intermitente com alta intensidade de esforço e treinamento contínuo moderado e mostrou que a redução na glicose sanguínea foi menor no exercício intermitente quando comparado ao exercício contínuo moderado em indivíduos com diabetes tipo 1 (GUELFY et al., 2007).

Kuwajima et al. (1999), utilizando animais geneticamente modificados (ratos que desenvolvem obesidade e intolerância à glicose com 10 semanas de idade), evidenciaram o efeito profilático treinamento contínuo com relação ao desenvolvimento de diabetes tipo 2. A incidência cumulativa de diabetes tipo 2 em animais do grupo sedentário foi de 30, 67 e 78% em 10, 16 e 24 semanas de idade, respectivamente. Por outro lado, no grupo treinado a incidência desta doença permaneceu nula durante todo o período experimental. Oliveira et al. (2004) não encontraram alteração quando analisaram os efeitos do treinamento contínuo de natação em intensidade moderada na

captação de glicose de ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana. Mota et al. (2008) utilizando o modelo experimental de diabetes tipo 2 com administração neonatal de aloxana, mostraram melhora na tolerância à glicose dos animais diabéticos após 12 semanas de treinamento contínuo de natação, na intensidade de máxima fase estável de lactato (MFEL). Em ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de estreptozotocina, a realização de exercício contínuo de natação em diferentes intensidades, antes e após a indução do diabetes, atenuou os valores séricos de glicose. Os efeitos mais acentuados foram observados com exercício de maior intensidade (COSKUN et al., 2004).

Desta forma, tanto o treinamento contínuo quanto o treinamento intermitente possuem papel importante na prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2, contudo estudos adicionais são necessários para caracterizar as intensidade e periodicidades mais adequadas a cada um destes diferentes protocolos. Assim, o presente estudo visa comparar os efeitos do treinamento intermitente e do treinamento contínuo de natação, com carga total de treinamento equivalente, no metabolismo da glicose em ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos (90 dias) da linhagem Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP- Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos no Biotério do setor de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP - Campus de Rio Claro em sala com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e foto período claro/escuro de 12/12 horas com as luzes acesas das 6:00 às 18:00hs, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada para roedores - Purina[®]). Os procedimentos adotados com os animais foram aprovados pelo Comitê de ética para experimentação animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU), parecer- CEEA/UNITAU n° 019/08.

2.2 Cruzamento dos Animais

Para o cruzamento foi empregado o método de harém, 4 fêmeas e 1 macho, colocados por uma noite em gaiolas coletivas. A confirmação da cobertura foi feita pela presença de espermatozóides em esfregaço vaginal realizado na manhã seguinte.

2.3 Aplicação neonatal de aloxana

Aos seis dias de idade os filhotes machos, com peso médio de $11,9 \pm 1,2g$, receberam injeção intra- peritoneal (250mg/Kg de peso corporal) de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (LUCIANO; LIMA, 1997), após jejum de 15 horas. Como controles foram utilizados ratos da mesma idade e sexo injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamentasse 8 filhotes.

2.4 Delineamento e Grupos Experimentais

Aos 28 dias de idade, os filhotes compuseram 6 grupos com 10 animais em cada um, que permaneceram em observação até os 120 dias de idade:

- Controle (C): ratos injetados com tampão citrato não submetidos a treinamento;
- Controle Treinamento Contínuo (CTC): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Controle Treinamento Intermitente (CTI): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Aloxana(A): ratos injetados com aloxana não submetidos a treinamento.
- Aloxana Treinamento Contínuo (ATC): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Aloxana Treinamento Intermitente (ATI): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento intermitente.

2.5 Treinamento físico

Os animais realizaram inicialmente um período de adaptação que consistiu em: primeiramente, foram submetidos a um reconhecimento do meio aquático por 15 minutos; no dia seguinte aumentou-se o nível de água e realizaram natação durante 15 minutos; no 3º dia foram colocados para nadar no nível de água em que treinaram durante o experimento por 25 minutos; no 4º dia nadaram durante 30 minutos com sobrecarga atada ao dorso equivalente a 3% do peso corporal; no 5º dia de adaptação a sessão foi de 40 minutos com sobrecarga equivalente à 5% do peso corporal. Em seguida, foi iniciado o período de treinamento.

Os animais dos grupos treinados por programa de exercício contínuo foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais(50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de

5% do peso corporal. Esta intensidade de esforço corresponde à transição metabólica aeróbia/anaeróbia para ratos durante a natação (GOBATTO et al., 2001). Os animais dos grupos treinados por programa intermitente foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso (Protocolo adaptado, tendo como base o protocolo de BRAGA et al., 2004). A temperatura da água foi mantida em $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante a realização do exercício, por ser esta temperatura considerada termicamente neutra em relação à temperatura dos ratos (AZEVEDO, 1994; PAULI, 2005). Os protocolos de treinamento tiveram sua carga semanal total de treinamento (CST) equivalente. Segundo Araújo et al. (2010), a CST corresponde ao somatório de estímulos de treinamento obtido pelo produto do tempo de esforço (t) e a intensidade (%). Assim neste estudo o treinamento contínuo teve $\text{CST} = 60\text{min} \times 5\% = 300$ equivalente ao treinamento intermitente $\text{CST} = 20\text{min} \times 15\% = 300$.

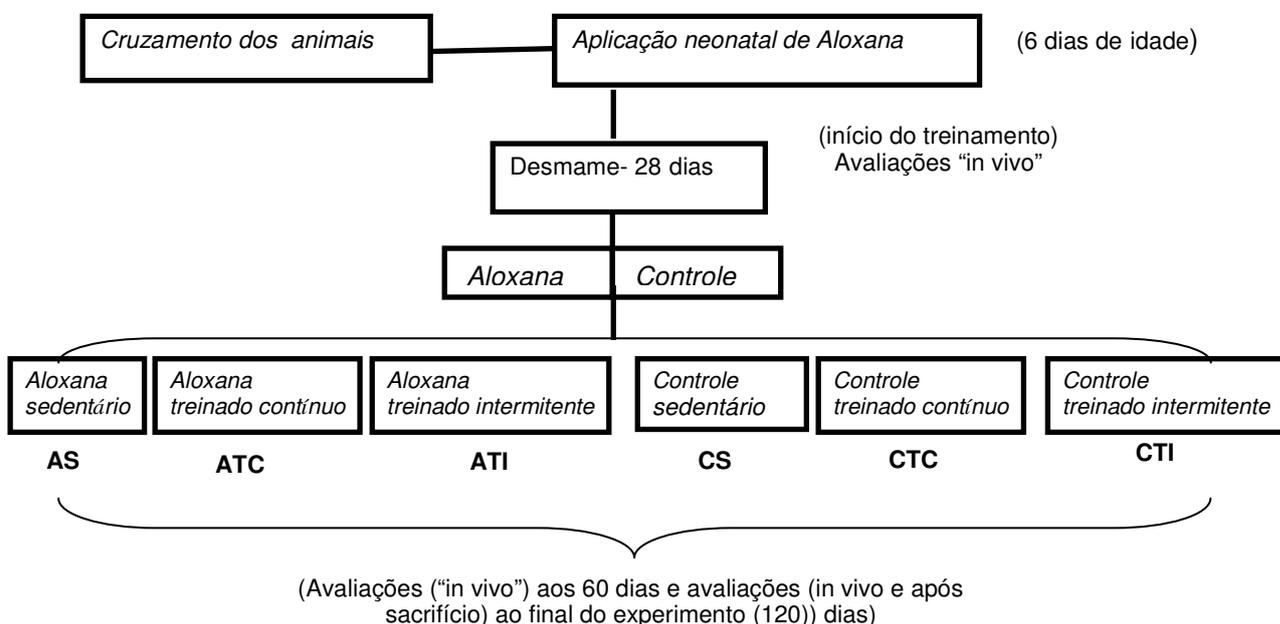


Fig 1- Desenho Experimental

2.6 Avaliações *in vivo*

Todos os animais tiveram peso corporal, ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana. Além disso, foram submetidos às seguintes avaliações:

2.6.1. Teste de tolerância à Glicose oral (GTTO)

Foi realizado após 12 horas de jejum, com os animais aos 28, 60 e 120 dias de idade. Uma primeira coleta de sangue foi feita através de pequeno corte na extremidade da cauda do animal (tempo zero). Em seguida, uma sonda de polietileno foi introduzida no estômago, pôr via oral, e uma solução de glicose de 20% (2 g/Kg de peso corporal) foi administrada. Amostras de sangue foram coletadas após 30,60 e 120 minutos da administração da glicose, com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL, para dosagens de glicose e de insulina. Uma única incisão na cauda é suficiente para a obtenção de todas as amostras. A determinação da glicemia foi realizada pelo método de glicose oxidase (Kit glicose - Laborlab: CAT nº 02200- Guarulhos- SP) e da insulinemia, por ELISA, (Kit Insulina- Diagnostic systems laboratories INC (DSL), REF: 10-1600, 445 medical Center BLVD, Webster, TX 77598, USA). Foram calculadas as áreas sob as curvas de glicemia e insulinemia durante o teste pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando o Software ORIGIN 6.0 (1999).

2.6.2. Sensibilidade à insulina

Para estimar a sensibilidade à insulina dos animais aos 28, 60 e 120 dias de idade foi utilizado o teste de tolerância à insulina (ITT). O teste consistiu na aplicação de solução de insulina (30mU/100g de peso corporal), via subcutânea, na região dorsal. Amostras de sangue (25µl) foram coletadas em capilares heparinizados, por meio de pequeno corte na extremidade da cauda, nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para determinação da glicose (Kit glicose - Laborlab: CAT nº 02200- Guarulhos- SP). Uma única incisão na cauda foi suficiente para a obtenção de todas as amostras. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $(0,693/t/2) \times 100$. A glicose sanguínea (t/2) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose sérica enquanto houver decréscimo linear dos mesmos após a administração de insulina (LUNDBAEK, 1962).

2.7. Sacrifício dos animais

Aos 120 dias de idade todos os animais foram sacrificados por decapitação, após anestesia profunda com amobarbital sódico (15 mg/kg de peso corporal), sem jejum prévio decorridas 48 horas dos testes de tolerância à glicose e/ou 48 horas após a última sessão de treino, para a obtenção de material biológico.

2.7.1. Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação das concentrações de glicose sérica (Kit glicose - Laborlab: CAT nº 02200- Guarulhos- SP) e insulina sérica por ELISA (Kit Insulina- Diagnostic systems laboratories INC (DSL), REF: 10-1600, 445 medical Center BLVD, Webster, TX 77598, USA).

2.7.2. Fígado, coração e músculo gastrocnêmio.

Esses órgãos foram retirados para a determinação das concentrações de glicogênio. Frações entre 26-35mg do fígado, coração e músculo gastrocnêmio foram pesadas após o sacrifício do animal e imediatamente digeridas em banho a 100°C em 0,5ml de KOH 1N durante 20 minutos. Foram adicionados 20µl de solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado através de duas passagens de 2,5ml de etanol quente, seguido de centrifugação, com o sobrenadante sendo descartado (SJÖRGREEN et al., 1938). O glicogênio precipitado foi ressuspenso em 4ml de água e a determinação colorimétrica realizada em 1ml de extrato, 20µl de fenol a 80% e 2,0ml de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 490nm. Soluções de glicose de concentração conhecida foram utilizadas para as curvas de calibração (DUBOIS et al., 1956).

2.7.3. Músculo Sóleo

Nesse músculo foram avaliadas captação e oxidação de glicose, síntese e concentração de glicogênio de acordo com procedimento descrito por Ribeiro et al. (2005). Fatias longitudinais do músculo (25 - 35mg) foram colocadas em frascos de cintilação com capacidade de 20 ml siliconizados, contendo 1,5 ml de tampão Krebs - Ringer bicarbonato. Os frascos foram fechados com tampas de borracha, selados com anel plástico e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubnoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂/CO₂ (95%/5%). Após esse período, as fatias do músculo foram transferidas para novos frascos de cintilação (frasco externo)

em cujo interior foram instalados pequenos tubos em forma de concha (frasco interno) com uma haste reta de aproximadamente 3 cm de comprimento que se insere nas tampas de borracha do frasco externo.

Cada frasco externo continha 1,5 ml de tampão Krebs-ringer e cada frasco interno, 700 μ l de hiamina10x. Após 60 minutos de incubação nesse sistema, com gaseamento durante os 15 primeiros minutos, foram adicionados 100 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 25% ao frasco externo, visando à liberação de CO₂. A preparação foi mantida por mais 3 horas no sistema, porém com a fatia do músculo fora do alcance da solução com TCA. Decorrido esse tempo, 200 μ l do líquido contido no frasco interno foram retirados para a determinação do CO₂ produzido. A fatia de músculo imediatamente digerida em 0,5 ml de KOH para extração (SJÖRGREEN et al., 1938) e dosagem (DUBOIS et al., 1956) do glicogênio muscular. A temperatura na pré-incubação e incubação foi de 37° C.

O tampão Krebs-Ringer, base dos meios de pré-incubação e incubação, é constituído de: NaCl 0,6%, NaHCO₃ 0,19%, HEPES 6,64mM, KCl 0,032%, CaCl₂ 1,14nM, KH₂PO₄ 0,015%, MgSO₄ 0,03%. A solução assim preparada foi gaseada durante 20 a 30 minutos em O₂/CO₂ (95%/5%) e o pH ajustado a 7,4. A esta solução foram adicionados 20 volumes de albumina sérica bovina livre de gordura. Ao meio de pré-incubação foi adicionado piruvato de sódio para concentração de 5mM. Ao meio de incubação, foi adicionada glicose (5,5mM) contendo [U-¹⁴C] glicose (0,25 μ Ci/ml), [³H] 2-deoxiglicose (2DG=0,5 μ Ci/ml) e insulina (100 μ UI/ml). Feitas às adições, o pH foi ajustado a 7,4 e os meios transferidos para os frascos que foram selados e equilibrados no banho a 37° C sob gaseamento em O₂/CO₂ (95%/5%) durante pelo menos 15 minutos. Fatias do mesmo músculo foram utilizadas, com peso semelhante àquelas incubadas, para determinação da concentração controle de glicogênio.

Foram avaliadas captação de glicose, utilizando-se a 2 DG como marcador, e incorporação do ¹⁴C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ³H da 2 DG ¹⁴C da glicose, respectivamente, através de contador de partícula beta. Para a estimativa da glicose oxidada (produção de CO₂), foi determinada a radioatividade do ¹⁴C presente no líquido (hiamina) coletado do frasco interno do sistema de incubação.

2.7.4. Análise estatística

A análise dos dados foi feita utilizando teste t-student ou de Análise de Variância ANOVA bifatorial seguido de post hoc Bonferroni, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Os valores referentes à área sob a curva da evolução do peso corporal dos animais ao longo do experimento estão representados na figura 2. O grupo ATI apresentou maior área quando comparado ao seu controle correspondente CTI. O grupo CS mostrou valores maiores do que os grupos CTC e CTI, mostrando a eficácia dos treinamentos contínuo e intermitente no controle ponderal dos animais. Nas figuras 3A e 3B estão apresentados os valores referentes à área sob a curva da ingestão alimentar e hídrica, respectivamente, dos animais. Nestes parâmetros não foram observadas diferenças entre os grupos estudados.

Foram realizados teste de tolerância à glicose (GTT_o) e teste de tolerância à insulina (ITT) aos 28, 60 e 120 dias de experimento. Os resultados do GTT_o foram analisados através do cálculo da área sob a curva de glicose e de insulina séricas durante o teste. A figura 4A e 4B mostra área sob a curva de glicose e insulina sérica durante teste de tolerância à glicose aos 28 dias. O grupo aloxana apresentou maior área sob a curva de glicose (figura 4A) quando comparado ao controle, evidenciando uma intolerância à glicose no grupo aloxana. O mesmo foi observado quando se avaliou a área sob a curva de insulina (figura 4B). O grupo aloxana apresentou maiores valores do que o controle. A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo ITT e apresentada pelo cálculo da taxa de remoção da glicose $K_{itt}(\%/min)$ durante o teste (figura 5), o qual apresentou menores valores no grupo aloxana quando comparado ao controle, mostrando a instalação da resistência à insulina nos animais aloxânicos. Desta forma nota-se a eficácia da administração neonatal de aloxana nos animais.

A figura 6A e 6B mostra a área sob as curvas de glicose e de insulina séricas realizada durante teste de tolerância à glicose oral (GTT_o) aos 60 dias. Os grupos ATI e CTC apresentaram maiores valores de área sob a curva glicêmica (figura 6A) quando comparado ao grupo CTI. Com relação à área sob a curva insulinêmica (figura 6B) o grupo AS apresentou maior valor quando comparado aos grupos ATC e ATI; o grupo ATC apresentou menor valor do que o grupo CTC; os grupos CS e CTC tiveram maiores valores de área do que o grupo CTI. Em relação à sensibilidade à insulina

(figura 7), avaliada através do Kitt(%/min), não foram apresentadas diferenças estatísticas. A figura 8A mostra área sob a curva de glicose sérica durante o GTTO realizado aos 120 dias. O grupo ATI apresentou maior área do que o grupo CTI. Com relação à área sob a curva de insulina (figura 8B) e sensibilidade à insulina (figura 9), avaliada através do Kitt(%/min), não foram apresentadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Glicose e insulina séricas e concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio, no fígado e no coração mensuradas aos 120 dias estão representadas na tabela 1. Foram encontradas diferenças apenas na concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio, onde os grupos CS e ATI apresentaram menores concentrações em relação ao grupo CTI. A tabela 2 apresenta as análises referentes à oxidação, captação de glicose bem como síntese e concentração de glicogênio no músculo sóleo isolado dos animais aos 120 dias. Com relação à oxidação de glicose observou-se que o grupo AS apresentou menor valor do que o grupo ATC. Os valores referentes à captação de glicose também apresentaram diferenças entre os grupos: os grupos AS e ATC apresentaram menores valores de captação do que o grupo ATI bem como os grupos CS e CTC apresentaram menores valores do que o grupo CTI. Desta forma nota-se uma maior eficácia do treinamento intermitente na captação de glicose. Em relação a concentração de glicogênio no músculo sóleo observou-se diferenças apenas entre os grupos AS e ATC, onde o grupo treinado obteve maiores concentrações de glicogênio.

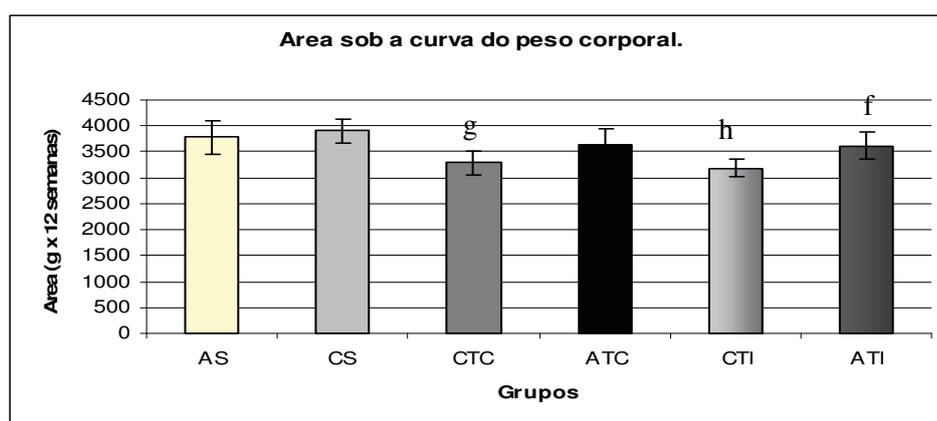


Figura 2: Área sob a curva do peso corporal dos animais do desmame (28 dias) ao final do experimento (120 dias). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, $p < 0,05$) entre os grupos, referente à área sob a curva do peso corporal. f, diferença estatística ($p < 0,05$) entre ATI vs CTI; g, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CS vs CTC; h, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CS vs CTI.

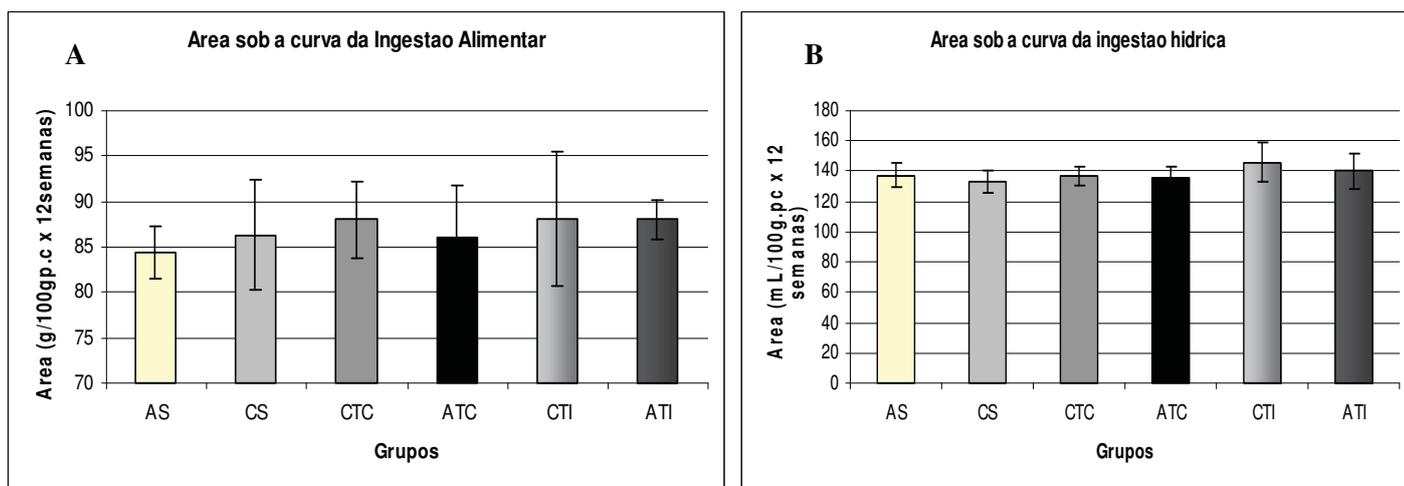


Figura 3A e 3B : Área sob a curva da ingestão alimentar (A) e da ingestão hídrica (B) dos animais do desmame (28 dias) ao final do experimento (120 dias). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente.

Teste de tolerância à glicose oral (GTT) - 28 dias

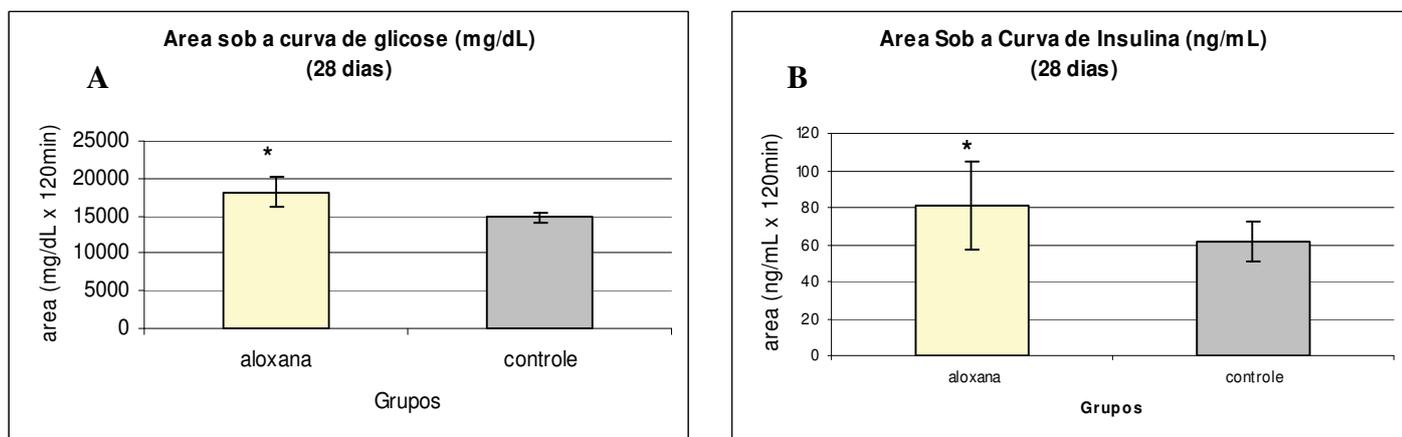


Figura 4A e 4B: Área sob a curva de glicose (A) ao desmame (28 dias) e área sob a curva de insulina (B) ao desmame (28 dias) durante teste de tolerância à glicose oral (GTT). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. O* símbolo indica diferença estatística (teste t student, $p < 0,05$) entre os grupos (Aloxana e Controle).

Teste de tolerância à insulina (ITT) - 28 dias

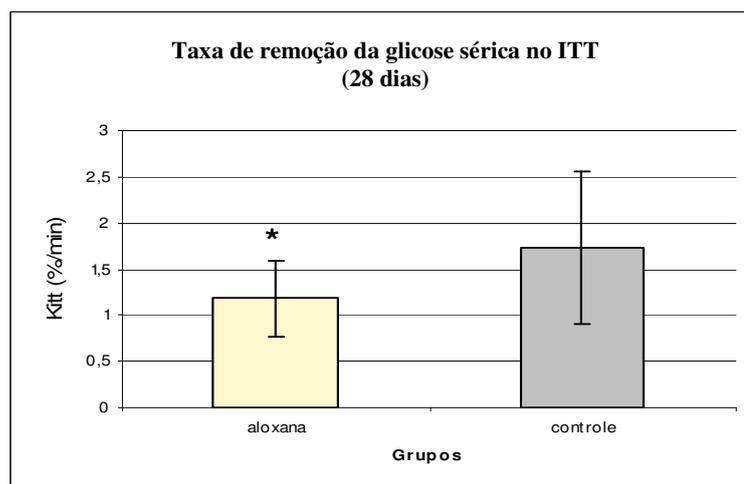


Figura 5: Taxa de remoção da glicose sérica (Kitt, %/min) durante teste de tolerância à insulina (ITT) ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. O símbolo* indica diferença estatística (teste t student, $p < 0,05$) entre os grupos (Aloxana e Controle).

Teste de tolerância à glicose oral (GTT) - 60 dias

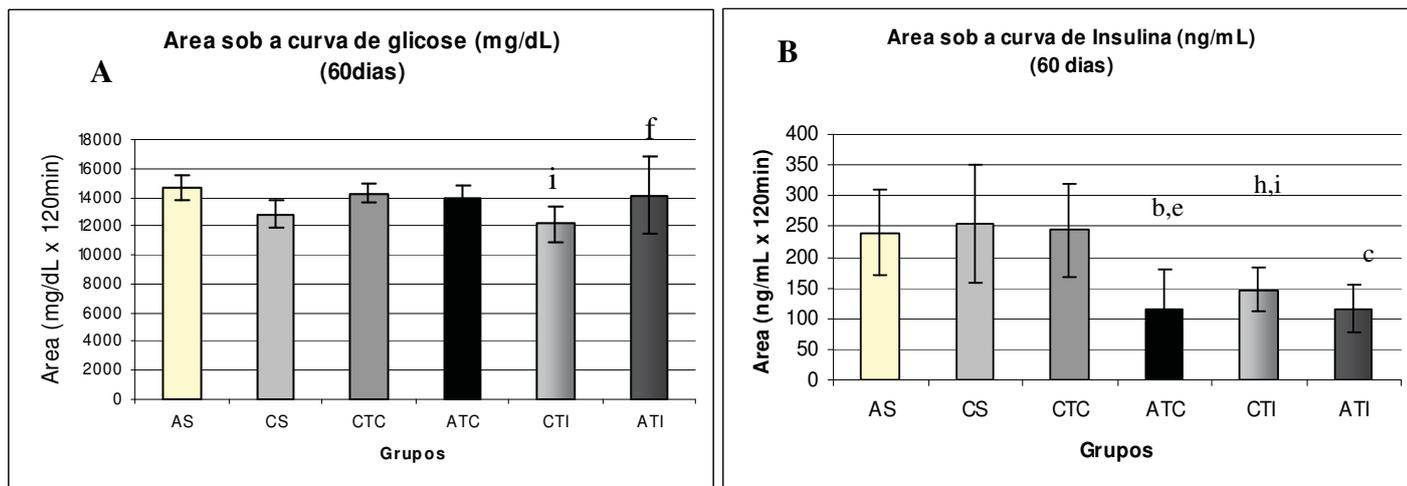


Figura 6A e 6B: Área sob a curva de glicose (A) aos 60 dias e área sob a curva de insulina (B) aos 60 dias durante teste de tolerância à glicose oral (GTT). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, $p < 0,05$) entre os grupos, referente à área sob a curva de glicose e insulina. b, diferença estatística ($p < 0,05$) entre AS vs ATC; c, diferença estatística ($p < 0,05$) entre AS vs ATI; e, diferença estatística ($p < 0,05$) entre ATC vs CTC; f, diferença estatística ($p < 0,05$) entre ATI vs CTI; h, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CS vs CTI; i, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CTC vs CTI.

Teste de tolerância à insulina (ITT) - 60 dias

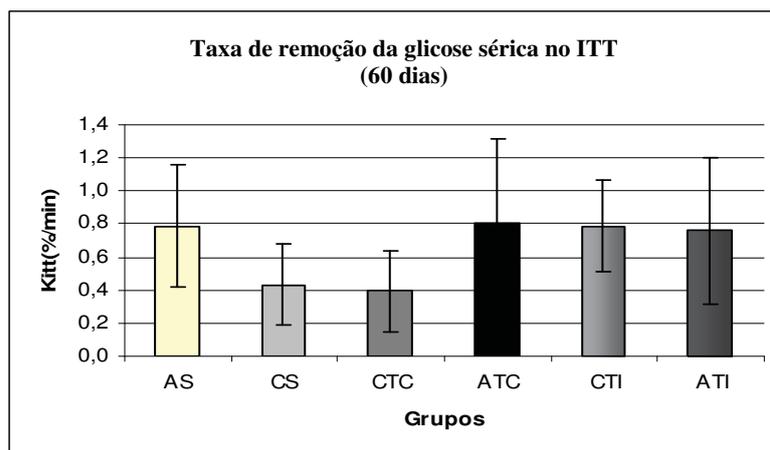


Figura 7: Taxa de remoção da glicose sérica (Kitt, %/min) durante teste de tolerância à insulina (ITT) aos 60 dias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente.

Teste de tolerância à glicose oral (GTT) - 120 dias

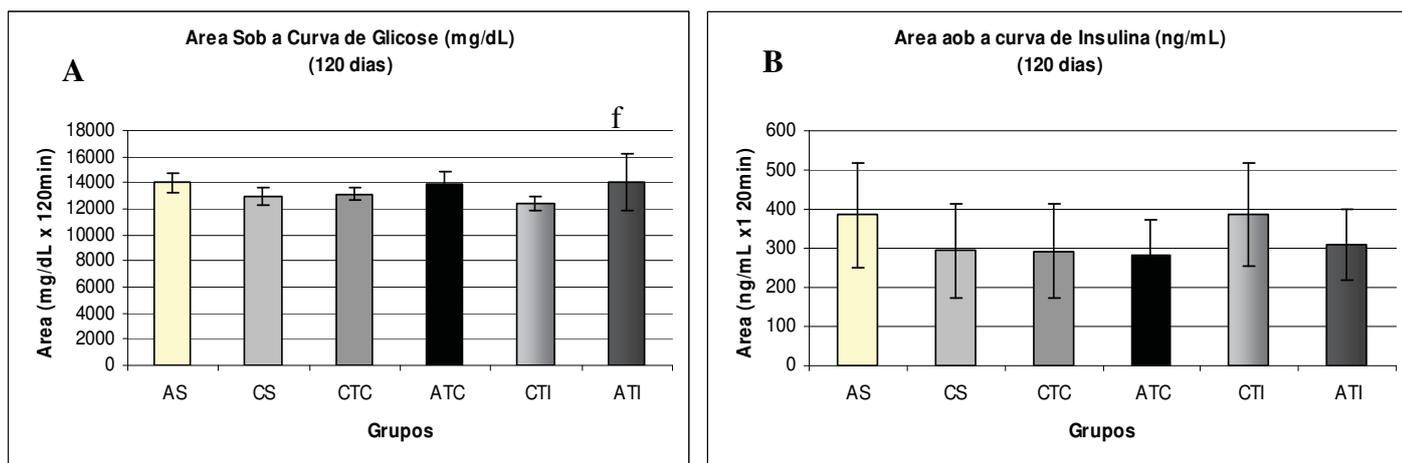


Figura 8A e 8B: Área sob a curva de glicose (A) aos 120 dias e área sob a curva de insulina (B) aos 120 dias durante teste de tolerância à glicose oral (GTT). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, $p < 0,05$) entre os grupos, referente à área sob a curva de glicose. f, diferença estatística ($p < 0,05$) entre ATI vs CTI.

Teste de tolerância à insulina (ITT) - 120 dias

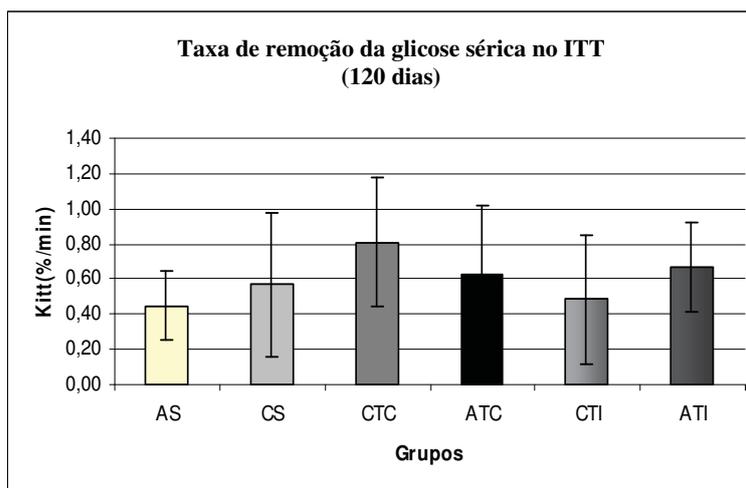


Figura 9: Taxa de remoção da glicose sérica (Kitt, %/min) durante teste de tolerância à insulina (ITT) aos 120 dias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente.

Tabela 1: Glicose e insulina séricas e concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio, fígado e coração mensuradas aos 120 dias dos animais.

	AS	CS	CTC	ATC	CTI	ATI
Glicose sérica (mg/dL)	94,68 \pm 5,51	88,73 \pm 7,90	88,80 \pm 6,83	94,13 \pm 9,22	90,98 \pm 8,66	94,95 \pm 8,16
Insulina Sérica (ng/mL)	2,40 \pm 1,97	2,83 \pm 1,90	2,98 \pm 2,22	3,03 \pm 2,00	3,25 \pm 2,49	2,81 \pm 2,15
Glicogênio Gastrocnêmio (mg/100 mg)	0,44 \pm 0,11	0,40 \pm 0,12	0,50 \pm 0,06	0,55 \pm 0,10	0,62 \pm 0,16 ^h	0,46 \pm 0,10 ^f
Glicogênio Fígado (mg /100 mg)	7,36 \pm 0,98	7,18 \pm 0,94	7,64 \pm 1,11	7,29 \pm 1,38	8,13 \pm 1,34	7,38 \pm 0,79
Glicogênio Coração (mg/100 mg)	0,148 \pm 0,022	0,133 \pm 0,019	0,144 \pm 0,019	0,150 \pm 0,027	0,164 \pm 0,051	0,149 \pm 0,041

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, p<0,05) entre os grupos, referente ao glicogênio do músculo gastrocnêmio. f, diferença estatística (p<0,05) entre ATI vs CTI; h, diferença estatística (p<0,05) entre CS vs CTI.

Tabela 2: Oxidação, Captação de glicose, síntese e concentração de glicogênio pelo músculo sóleo isolado dos animais durante processo de incubação (120 dias).

	AS	CS	CTC	ATC	CTI	ATI
Oxidação Glicose ($\mu\text{mol/g.h}$)	2,07 \pm 0,62	2,84 \pm 0,82	3,65 \pm 1,60	5,81 \pm 2,25 ^b	4,64 \pm 2,13	3,77 \pm 1,68
Captação Glicose ($\mu\text{mol/g.h}$)	2,64 \pm 0,55	3,17 \pm 0,76	3,70 \pm 0,89	3,13 \pm 0,40	5,09 \pm 0,49 ^{h,i}	5,59 \pm 0,99 ^{c,d}
Síntese de Glicogênio ($\mu\text{mol/g.h}$)	0,27 \pm 0,13	0,29 \pm 0,13	0,36 \pm 0,09	0,32 \pm 0,06	0,32 \pm 0,11	0,42 \pm 0,21
Concentração de Glicogênio (mg/100mg)	0,30 \pm 0,04	0,40 \pm 0,11	0,37 \pm 0,04	0,44 \pm 0,08 ^b	0,37 \pm 0,04	0,41 \pm 0,08

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, $p<0,05$) entre os grupos, referente à oxidação, captação de glicose e concentração de glicogênio. b, diferença estatística ($p<0,05$) entre AS vs ATC; c, diferença estatística ($p<0,05$) entre AS vs ATI; d, diferença estatística ($p<0,05$) entre ATC vs ATI; h, diferença estatística ($p<0,05$) entre CS vs CTI; i, diferença estatística ($p<0,05$) entre CTC vs CTI.

4. DISCUSSAO

Sabe-se que o DMT2 é caracterizado por resistência à insulina bem como intolerância à glicose e que a associação do diabetes mellitus e exercício físico irão desencadear ajustes metabólicos que poderão favorecer o organismo diabético minimizando as complicações desta doença. Desta forma, o exercício físico é de extrema importância na prevenção e no tratamento do DMT2. Assim o presente estudo visa comparar os efeitos do treinamento intermitente e do treinamento contínuo de natação no metabolismo da glicose em ratos submetidos à aplicação neonatal com aloxana.

Os dados do presente estudo demonstraram uma eficácia da administração neonatal de aloxana na alteração da homeostase glicêmica dos animais. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo (Kodama et al.,1993; Oliveira et al., 2004; Ribeiro et al., 2005; Mota et al., 2008; Contarteze et al., 2009).

Muitos pacientes com DMT2 são obesos, e a obesidade por si só pode levar a um quadro de resistência à insulina. Este quadro pode melhorar com a redução do peso corporal aliada a atividade física regular (ADA, 2009). Assim neste estudo todos os animais tiveram peso corporal, ingestão hídrica e alimentar registrado uma vez por

semana. Quando se avaliou a área sob a curva da evolução do peso corporal dos animais durante o experimento observou-se que os aloxânicos sedentários tiveram valores semelhantes aos dos controles correspondentes. Os animais que realizaram treinamento intermitente e contínuo de natação tiveram menores valores deste parâmetro do que os sedentários equivalentes mostrando a eficácia dos protocolos de treinamento no controle ponderal dos animais. Isto é de grande importância na prevenção do desenvolvimento da obesidade bem como resistência à insulina. Kodama et al. (1993), utilizando o mesmo modelo de administração neonatal de aloxana também não mostraram nenhuma alteração do peso corporal de ratos aloxânicos comparados aos controles sedentários. Oliveira et al. (2004), encontraram resultados similares aos relatados neste estudo quando demonstraram redução ponderal após treinamento contínuo moderado de natação em ratos que tiveram aplicação neonatal de aloxana. Em relação à ingestão alimentar, não foram constatadas diferenças entre os grupos. Resultados semelhantes foram relatados em estudo anterior (OLIVEIRA et al., 2004). Em contraste, Kodama et al. (1993) mostraram menor ingestão alimentar nos animais aloxânicos. No que tange a ingestão hídrica no presente estudo não foram observadas diferenças entre os grupos, enquanto que Oliveira et al. (2004) verificaram aumento nos animais treinados. Cabe ressaltar que no presente estudo os animais tiveram redução corporal devido ao maior gasto energético requerido durante exercício físico e não devido a uma menor ingestão alimentar.

Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina foram avaliada pelos testes GTTo e ITT aos 28, 60 e 120 dias de idade. Aos 28 dias, observou-se intolerância à glicose assim como resistência à insulina nos animais aloxânicos, visto uma maior área sob a curva de glicose e insulina séricas apresentadas no GTTo, bem como um menor taxa de remoção de glicose Kitt (%/minuto) durante o ITT. Resultados similares foram encontrados por Oliveira et al. (2004) e Contarteze et al. (2009), quando avaliaram, em animais aloxânicos neonatos, parâmetros similares. Assim nota-se a eficácia da administração neonatal de aloxana em ratos neonatos na alteração da homeostase glicêmica. Em relação à área sob a curva de glicose sérica no GTTo aos 60 dias, observou-se uma tendência dos animais aloxânicos sedentários à intolerância à glicose devido à área sob a curva glicêmica ligeiramente maior em comparação ao controle correspondente. Além disto, nota-se que, após 4 semanas de treinamento intermitente e/ou contínuo, o treinamento contínuo foi mais eficaz na melhora da tolerância à glicose em animais controles do que o treinamento intermitente de natação, mostrando

benefícios deste tipo de treinamento para a homeostase glicêmica. Além disso, tanto o treinamento contínuo quanto o intermitente foram eficazes na redução da área sob a curva insulinêmica dos grupos controle e aloxana. Diferentemente de Contarteze et al. (2009), que encontraram diferenças entre o grupo aloxana e controle quando avaliaram a resistência à insulina através do índice HOMA, o presente estudo não encontrou diferenças entre os grupos no parâmetro destinado à avaliação da sensibilidade à insulina quando analisou-se a taxa de remoção de glicose sérica K_{it} (%/minuto).

Aos 120 dias quando se avaliou a área sob a curva glicêmica no GTTo e a taxa de remoção da glicose no ITT não foram observadas diferenças na tolerância à glicose bem como na sensibilidade à insulina entre os grupos estudados. Após 12 semanas de treinamento nenhuma diferença foi evidenciada nestes parâmetros, contrastando com os resultados de Mota et al. (2008), que após 12 semanas de treinamento contínuo na intensidade de máxima fase estável de lactato observaram melhora na tolerância à glicose nos grupos treinados.

Também foram avaliadas neste estudo, glicose e insulina sérica no momento do sacrifício, no estado alimentado. Não foram encontradas diferenças entre os grupos apesar de os ratos aloxânicos apresentarem quadro de intolerância à glicose quando submetidos à sobrecarga oral de glicose aos 28 dias.

Sabe-se que a síntese de glicogênio no músculo esquelético possui papel importante na homeostase glicêmica (DANIEL et al., 1975; BARON et al., 1988; SHULMAN et al., 1990). A habilidade da insulina em aumentar a utilização de glicose pelo músculo envolve estimulação dos transportadores de glicose e da ativação da glicogênio sintase (RODNICK et al., 1992; MANCHESTER., 1996). Tanto a atividade basal da enzima glicogênio sintase como a resposta à insulina estão prejudicadas no músculo esquelético de diabéticos tipo 2 e pode ter um papel importante no desenvolvimento da intolerância à glicose e resistência à insulina (BOGARDUS et al., 1984; BAK et al., 1994; THORBURN et al., 1990; HENRY et al., 1996). O glicogênio no fígado de ratos adultos diabéticos encontra-se aumentado quando comparado aos controles e após treinamento de alta intensidade estes estoques hepáticos reduziram (FERREIRA et al., 2001). Assim, no presente estudo foram realizadas análises das concentrações de glicogênio no músculo gastrocnêmio, no fígado e no coração, com objetivo de verificar a influência do treinamento sobre o armazenamento deste substrato em animais aloxânicos. Foi possível observar diferenças apenas na concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio, onde o treinamento intermitente

foi mais eficaz em aumentar o armazenamento deste substrato do que o treinamento contínuo no grupo controle. Isto se deve talvez a intensidade de exercício e metabolismo requerido durante o treinamento associado ao tipo de fibras (glicolíticas) predominantes neste músculo. Além disso, os animais aloxânicos que realizaram treinamento intermitente tiveram menores reservas de glicogênio no músculo gastrocnêmio do que o grupo controle correspondente.

Neste estudo foi realizado o isolamento do músculo sóleo para análises de oxidação, captação de glicose, síntese e concentração de glicogênio durante o processo de incubação do músculo. Em relação à oxidação de glicose observou-se que o grupo aloxana sedentário apresentou menores valores do que o aloxana treinado contínuo. Já em relação à captação de glicose os grupos sedentários bem como treinado contínuo tiveram menores valores que os animais treinados pelo protocolo intermitente, evidenciando uma maior captação de glicose por este protocolo. Em relação à concentração de glicogênio do sóleo, observou-se que o treinamento contínuo aumentou os estoques no grupo aloxana, quando comparado ao sedentário. Desta forma nota-se que o treinamento contínuo teve participação maior no armazenamento de músculos com características oxidativas.

Assim pode-se perceber que o exercício físico regular pode influenciar na homeostase glicêmica dos ratos submetidos à administração neonatal de aloxana, por aumentar a captação de glicose muscular durante o exercício, aumentando desta forma sua sensibilidade à insulina. O exercício e a insulina estimulam a utilização de glicose sinergicamente e em animais diabéticos o exercício crônico induz diminuição da glicose sanguínea (ZINMAN et al., 2004; LEME et al., 2007). Os mecanismos que agem na melhora da captação de glicose podem estar relacionados com aumento do fluxo sanguíneo muscular, ligação da insulina a seu receptor (receptor de insulina-IR), ativação da via IRS/PI3 quinase (LUCIANO et al., 2002), estimulação da AMPK (Ativação da AMP, proteína quinase) da AS 160 (substrato AKT) e aumento dos transportadores de glicose estimulando a translocação do GLUT 4 (ZINMAN et al., 2004; MANETTA et al., 2002).

Resumidamente, embora o modelo experimental aqui utilizado para a indução do DMT2 (administração neonatal de aloxana) não tenha conduzido ao quadro diabético, foi eficaz em induzir alterações na homeostase glicêmica tais como intolerância à glicose e resistência periférica à insulina nos animais. O treinamento contínuo mostrou-se eficaz em atenuar o aumento exacerbado da insulina dos ratos

aloxânicos após sobrecarga oral de glicose, sem prejudicar a resposta glicêmica. O treinamento intermitente também atenuou a resposta insulinêmica dos ratos aloxânicos à sobrecarga oral de glicose, mas piorou a resposta glicêmica. Por outro lado, este protocolo de treinamento intermitente melhorou a captação de glicose pelo músculo esquelético dos ratos aloxânicos enquanto o treinamento contínuo não apresentou tal efeito. Assim, conclui-se que tanto o protocolo contínuo quanto o intermitente exerceram efeitos benéficos para a homeostase glicêmica dos ratos aloxânicos. Estudos adicionais no modelo de administração neonatal de aloxana são necessários para otimizar as alterações metabólicas visando a obtenção do quadro diabético (DMT2).

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 09/51538-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por financiarem esse estudo.

5.REFERÊNCIAS

A. D. A, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: **A position statement of the American Diabetes Association** *Diabetes Care* 32: S62- S67, 2009.

A.D.A, Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care.** 33: S62-S69, 2010.

ARAÚJO, G.G; PAPOTI, M; MANCHADO-GOBATTO, F.B; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Padronização de um Protocolo Experimental de Treinamento Periodizado em Natação Utilizando Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte.** v. 16, p. 51-56, 2010.

AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação.** 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiologia) Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BAK, J; PEDERSEN, O. Glycogen synthase: characteristics and putative role in insulin insensitivity. **Diabetes Annals.** v. 8, p. 75–105, 1994.

BARON, A.D; BRECHTEL, G; WALLACE, P; EDELMAN, S.V. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. **American Journal of Physiology.** v . 255, p. E769–E774, 1988.

BAYNARD, T; CARHART, R.L. J.R; PLOUTZ-SNYDER, L.L; WEINSTOCK, R.S; KANALEY, J.A. Short-term training effects on diastolic function in obese persons with the metabolic syndrome. **Obesity.**v .16, p 1277–83, 2008.

BOGARDUS, C; LILLIOJA, S; STONE, K; MOTT, D. Correlation between muscle glycogen synthase activity and *in vivo* insulin action in man. **J Clin Invest** . v.73, p.1185–1190, 1984.

BRAGA, L. R., MELLO, M. A., ou de MELLO, M. AR, GOBATTO, C. A.Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.** v.54, p.58 - 65, 2004.

CONTARTEZE, R.V.L; MOTA, C.S.A; OLIVEIRA, C.A.M; LEME, J.A.C.A; BOTTCHEER, L.B; MELLO, M.A.R; LUCIANO, E. Exercise test and glucose homeostasis in rats treated with alloxan during the neonatal period or fed a high calorie diet. **Journal of Diabetes.** v. 1, p. 65–72, 2009.

COSKUN O.; OCAKCI A.; BAYRAKTAROGLU T.; KANTER N. Exercise training prevents and protects streptozotocin induced oxidative stress and B cell damage in rat pancreas. **Tohoku J. Exp. Med.**v. 203, p.145-154, 2004.

DANIEL, P.M; LOVE, E.R; PRATT, O.E. Insulin-stimulated entry of glucose into muscle *in vivo* as a major factor in the regulation of blood glucose. **Journal of Physiology** v. 247, p 273–288, 1975.

DUBOIS, B.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. et al. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p. 350-356, 1956.

FERREIRA, L. D. M. C.-B; BRAU, L; NIKOLOVSKIS; RAJA, G; PALMER,T.N; FOURNIER, P.A. Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**. v.280, p.E83-E91, 2001.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.130, n.1, p. 21-27, 2001.

GUELFY K. J.; RATNAM N.; SMYTHE G. A.; JONES T. W.; FOURNIER P. A. Effect of intermittent high-intensity compared with continuous moderate exercise on glucose production and utilization in individuals with type 1 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.292,p.865–E870, 2007.

HAYASHIA, T.; HIRANO, T.; YANAMOTO, T.; ITOH, Y.; ADACHI, M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. **Metabolism Clinical and experimental**, New York, v.55, p. 879-884, 2006.

HENRY, R.R; CIARALDI, T.P; ABRAMS-CARTER, L; MUDALIAR, S; PARK, K.S; NIKOULINA, S.E. Glycogen synthase activity is reduced in cultured skeletal muscle cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. Biochemical and molecular mechanisms. **J Clin Invest**. v. 98, p.1231–1236, 1996.

IVEY, F.M; RYAN, A.S; HAFER-MACKO, C.E; GOLDBERG, A.P; MACKO, R.F. Treadmill aerobic training improves glucose tolerance and indices of insulin sensitivity in disabled stroke survivors: A preliminary report. **Stroke**. v. 38, p. 2752–8, 2007.

IVY, J. L.; ZDERIC, T. D.; FOGT, D. L. Prevention and treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, Hagerstown, v.27, p.1-35, 1999.

KODAMA, T.; IWASE, M.; NUNOI, K.; et al. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v.20, n.3, p. 183-189, 1993.

KOUTROUMPI, M; PITSAVOS, C; STEFANADIS, C. The role of exercise in cardiovascular rehabilitation: A review. **Acta Cardiology**. v. 63, p. 73–9, 2008.

KUWAJIMA, M. D. M. et al. The preventive effect of caloric restriction and exercise training on the onset of NIDDM in a rat model. **Nutrition Research**, New York, v.19, p.401-413, 1999.

LEME, J.A; GOMES, R.J; MELLO, M.A; LUCIANO, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Factors**. v. 25, p. 9–14, 2007.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v.18, p.47-60, 1997.

LUCIANO, E; CARNEIRO, E.M; CARVALHO, C.R; CARVALHEIRA, J.B; PERES, S.B; REIS, M.A; SAAD, M.J; BOSCHERO, A.C; VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinology**. v. 147, p149–157, 2002.

LUNDBAECK K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **British Medical Journal**. v.2, p. 1507-1513, 1962.

MANCHESTER, J; SKURAT, A; ROACH, P; HAUSCHKA, S.D; LAWRENCE JR, L.C. Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci**, v . 93, p. 10707–10711, 1996.

MANETTA, J; BRUN, J.F; MAIMOUN, L; CALLIS, A. PREFAUT, C; MERCIER, J. Effect of training on the GH/IGF-I axis during exercise in middle-aged men: relationship to glucose homeostasis. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**. v. 283, p. E929–E936, 2002.

MANNERA, S. L; JONSDOTTIR, I.H; HOLMA, N.G. A; LO´N.N .M; STENER-VICTORIN, E. Low frequency electro-acupuncture and physical exercise improve metabolic disturbances and modulate gene expression in adipose tissue in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome. **Endocrinology**. v. 149, p. 3559–68, 2008.

MATHEWS, J. N. S.; ALTMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, London, v.27, p.230-235, 1990.

MOTA, C.S.A; RIBEIRO, C; ARAÚJO, G.G; ARAÚJO, M.B; MANCHADO-GOBATTO, F.B; VOLTARELLI, F.A; OLIVEIRA, C.A.M; LUCIANO, E; MELLO, M.A.R Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. **BMC Endocrine Disorders**. v.11, p.1-9, 2008.

OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO.; MELLO, M.A R. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Experimental Physiology**, New York, v.90, n.1, p. 79-86, 2004.

PAULI, J.R. **Efeitos do treinamento físico sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos administrados com dexametasona**. 2005,154p, tese (dissertação-mestrado em Ciências da Motricidade- Biodinâmica) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P.; et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabetes & Metabolism**, Paris, v.31, p. 61-75, 1989.

RIBEIRO C.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO,E.; MELLO, M. A. R. Diabetes evolution in rats after neonatal treatment with alloxan. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.177-178, 2005.

RODNICK, K; PIPER, R; SLOT, J; JAMES, D. Interaction of insulin and exercise on glucose transport in muscle. **Diabetes Care**. v . 15, p. 1679–1689, 1992.

SHULMAN, G. I; ROTHMAN, D.L; JUE, T; STEIN, P; DeFRONZO, R.A; SHULMAN, R.G. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **The New England Journal of Medicine**. v.322; p. 223–228, 1990.

SJÖRGREEN, B.; NORDENSKJOLD, D. T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Bertrag zur Kentnin des le birrhythmik. **Pfluger Arch. Gesante Physiol.** Menschen Terre. v. 240, p. 247, 1938.

SRINIVASAN K.; RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, p. 451-472, 2007.

THORBURN, A.W; GUMBINER, B; BULACAN, F; WALLACE, P; HENRY, R.R. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in noninsulin- dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. **J Clin Invest**. v. 85, p.522–529, 1990.

THYFAULT, J.P. Setting the stage: Possible mechanisms by which acute contraction restores insulin sensitivity in muscle. **American Journal Physiology Regular Integr Comp Physiology**. v. 294, p. R1103–10, 2008.

VENABLES, M.C; JEUKENDRUP, A.E. Endurance training and obesity: Effect on substrate metabolism and insulin sensitivity. **Medice and Science and Sports Exercise**. v. 40, p. 495–502, 2008.

WILD, S.H; ROGLIC, G; GREEN, A; SICREE, R; KING, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, p.1047–1053, 2004.

ZINMAN, B; RUDERMAN, N; CAMPAIGNE, B.N; DEVLIN, J.T; SCHNEIDER, S.H. American Diabetes Association Physical activity/ exercise and diabetes. **Diabetes Care**. v. 27, p.S58–S62, 2004.

**METABOLISMO PROTEICO MUSCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À
ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE ALOXANA E AOS TREINAMENTOS
INTERMITENTE E CONTÍNUO DE NATAÇÃO.**

Carla Ribeiro¹, Lucieli Teresa Cambri¹, Rodrigo Augusto Dalia¹, Michel Barbosa de Araújo¹, Ana Carolina Ghezzi¹, Leandro Pereira de Moura¹, Gustavo Gomes de Araújo¹, José Diego Botezelli¹, Maria Alice Rostom de Mello¹.

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP , Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil.

Endereço para correspondência:

Carla Ribeiro

Av. 24 A, 1515, Bela Vista – Rio Claro –SP

CEP 13506-900

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Instituto de Biociências – Departamento de Educação Física

Laboratório de Biodinâmica

Tel: +55 19 35264308

E-mail: Carla_ef_rc@yahoo.com.br

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do treinamento intermitente bem como do treinamento contínuo, no metabolismo protéico muscular em ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana. Ratos da linhagem wistar foram divididos em seis grupos: Aloxana sedentário (AS), Controle sedentário (CS), Aloxana treinado contínuo (ATC), Aloxana treinado intermitente (ATI), Controle treinado contínuo (CTC) e Controle treinado intermitente (CTI). A administração de aloxana foi efetuada em ratos neonatos aos 6 dias de vida (250mg/Kg p.c). O protocolo de treinamento contínuo consistiu em: 12 semanas de treinamento de natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. O protocolo de treinamento intermitente consistiu em 12 semanas de treinamento de natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso corporal. Os animais foram avaliados “in vivo” aos 28 e 120 dias quanto a glicemia e insulinemia de jejum e após sobrecarga de glicose. Aos 120 dias de idade e decorridas 48 horas das avaliações in vivo, foram sacrificados para a coleta de material visando análises de albumina, proteínas totais séricas; teores de proteínas totais, DNA e razão proteína/DNA no músculo gastrocnêmio e síntese e degradação no músculo sóleo isolado. Aos 28 dias observou-se que os animais aloxânicos apresentaram glicemia (mg/dL) após sobrecarga de glicose maior do que os controles (aloxana= 200,6± 35,0; controle=155,3± 11,2), mas não apresentaram diferenças insulinêmicas (ng/mL). Aos 120 dias não foram observadas diferenças nas análises séricas de albumina (g/L) e proteínas totais (g/L) entre os grupos estudados. Em relação a análises musculares de DNA e razão proteína/ DNA, observou-se maiores valores de DNA(mg/100mg) (AS=0,053 ±0,013; CS=0,058± 0,010; CTC= 0,069± 0,016; ATC= 0,071± 0,021; CTI=0,051± 0,012; ATI= 0,050± 0,016) nos animais aloxânicos submetidos ao treinamento contínuo e maior razão proteína/DNA nos animais aloxânicos treinados intermitente (AS=110,35±20,37; CS=108,2±27,80; CTC=95,35±15,17; ATC=84,95±37,15; CTI= 115,61±39,29; ATI=146,27±69,28). Nenhuma alteração foi obtida na síntese (pmol/mg.h) (AS=11,06± 2,21; CS= 12,77± 5,76; CTC= 19,40± 3,82; ATC= 13,68± 6,37; CTI=14,46± 2,59; ATI=11,14 ± 2,21) e degradação (pmol/mg.h) (AS= 350,56±90,71; CS=287,93±37,38; CTC=271,29±89,94; ATC=244,04±44,26; CTI=387,00±95,74; ATI=322,49±93,99) do músculo sóleo. Assim conclui-se que os treinamentos contínuo e intermitente foram eficazes em alterar o crescimento por hiperplasia e por hipertrofia das células musculares nos animais aloxânicos.

Palavras Chave: Ratos neonatos, aloxana, treinamento físico, hipertrofia muscular.

1. INTRODUÇÃO

Diabetes é um grupo de desordens metabólicas caracterizada por hiperglicemia resultante da deficiência parcial ou total na secreção de insulina ou de uma ação ineficiente do hormônio nos tecidos periféricos (SNOWLING; HOPKINS, 2006; ADA, 2010) o que leva a alterações no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada à disfunção e falha de vários órgãos e tecidos inclusive o tecido muscular.

Existem duas formas básicas da doença, o diabetes mellitus tipo1 (DMT1) e o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). O diabetes mellitus tipo 1, (DMT1) é uma doença autoimune multifatorial, cuja susceptibilidade é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (ROSSINI., 2004; ADA, 2010). Essa doença é caracterizada por uma deficiência absoluta da secreção de insulina (ADA, 2009) que leva a hiperglicemia crônica e ao desenvolvimento de patologias vasculares específicas (BROWNLEE, 2001). Neste tipo de diabetes, há destruição, mediada pelas células T, das células secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas (células beta). Por outro lado, DMT2 é caracterizado por uma combinação da resistência à ação da insulina bem como uma resposta compensatória inadequada da secreção de insulina, que leva a um quadro hiperglicêmico característico (HAYASHIA et al., 2006; ADA, 2010). Atualmente tem-se observado que o DMT2 altera níveis de vários aminoácidos séricos que podem contribuir aos distúrbios na secreção e ação da insulina (MENGE et al., 2010). Além disso, representa cerca de 90 a 95% dos diabéticos e pode ser desencadeado por diversos fatores tais como obesidade, dieta hipercalórica e falta de atividade física (IVY et al., 1999; ADA, 2010).

Nos últimos anos, a incidência do DMT2 tem aumentado consideravelmente (WILD et al., 2004; ADA, 2010). Tal aumento se deve à mudança do estilo de vida incluindo dieta de alto índice calórico e inatividade física (ADA, 2010). Desta forma tornam-se necessárias novas formas de prevenção e tratamento desta doença, associada diretamente às várias complicações debilitantes, que podem levar a morte prematura.

Atualmente tem-se dado grande importância ao treinamento físico como forma de melhorar o nível de aptidão física e a qualidade de vida. O exercício físico tem sido cada vez mais recomendado na prevenção e na reabilitação de doenças

cardiorespiratórias, osteoporose, diabetes e no combate ao estresse. (KNOWLER et al., 2002; LINDSTROM et al., 2003; LI et al., 2002).

Particularmente, no tratamento do DMT2, a prática regular de exercício físico, em diferentes intensidades, melhora a tolerância à glicose e reduz a resistência à insulina. Contudo, faltam evidências diretas quanto ao efeito preventivo do exercício sobre a instalação do quadro de DMT2, especialmente quando se leva em consideração a intensidade do esforço e diferentes protocolos de exercício, uma vez que este tipo de pesquisa é de execução mais difícil em seres humanos. Nesse contexto, modelos de animais proporcionam condições mais adequadas ao estudo dessa questão.

Portha et al. (1989) descreveram um modelo experimental de diabetes neonatal em ratos Wistar através da aplicação de estreptozotocina no dia do nascimento. Nesse modelo foi demonstrado que a hiperglicemia é transitória. Os valores glicêmicos retornam ao normal após a primeira semana de vida, com recuperação da produção de insulina e da massa de células β . Isso caracteriza um modelo de DMT2 em ratos, no qual os animais experimentais apresentam boa sobrevida (PORTHA et al., 1989).

Posteriormente, Kodama et al. (1993) desenvolveram outro modelo, através da substituição da estreptozotocina por aloxana. Nesse estudo a aloxana foi administrada aos 2,4 ou 6 dias de vida. Quando analisados aos 60 dias de idade, os ratos que receberam aloxana no 2º dia de vida apresentaram glicemia, no estado alimentado, ligeiramente superior à de ratos controle, enquanto que aqueles que receberam a droga nos 4º e 6º dias mostraram glicemia significativamente maior que a dos controles. Os autores consideraram o modelo útil aos estudos sobre complicações crônicas do diabetes. Contudo, salientaram que mais estudos são necessários para determinar se o mesmo também tem características de DMT2, como verificado no modelo estreptozotocina neonatal. Oliveira et al. (2004) analisaram glicemia de jejum assim como tolerância à glicose em ratos de ambos os sexos aos 30, 60, 90 dias de idade, que receberam aplicação de aloxana aos 2 dias de vida. A glicemia de jejum não foi diferente da de ratos controles em nenhum momento.

Ribeiro et al. (2005), utilizando ratos que receberam aloxana ao 6º dia de vida mostraram que estes animais apresentaram valores de glicemia, durante teste de tolerância à glicose, maiores que o grupo controle tanto aos 28 quanto aos 60 dias de idade. Estes dados evidenciam que o modelo de indução de diabetes neonatal reúne características interessantes para o estudo do papel do exercício na prevenção e tratamento desta doença. Estudos que utilizaram diferentes protocolos de treinamento na

prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2 são escassos no que tange ao metabolismo protéico.

Estudo realizado com ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana e treinamento contínuo de natação, em intensidade moderada, mostrou que o teor de proteína sérico bem como no músculo esquelético não apresentaram alterações após 8 semanas de treinamento contínuo (OLIVEIRA et al., 2004). Luciano e Mello (1999), utilizando o modelo de diabetes em ratos adultos pela aplicação de aloxana, não observaram diferenças nos teores séricos de proteína e albumina nos animais após 4 semanas de treinamento contínuo moderado de natação.

Segundo Leme et al. (2009), em ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de aloxana, não foi observada alteração na concentração sérica de albumina após 8 semanas de exercício contínuo de natação a 90% da máxima fase estável de lactato (MFEL). Por outro lado, ratos Sprague-Dawley eutróficos submetidos a treinamento intermitente de alta intensidade apresentaram maior expressão do conteúdo protéico-GLUT-4 no músculo esquelético (FUJIMOTO et al., 2009). Fedele et al. (2000), mostraram que, diferentemente dos animais não diabéticos, os animais tornados diabéticos por pancreatectomia parcial não apresentaram aumento na síntese protéica após treinamento agudo resistido.

Dessa forma, observa-se que tanto o treinamento contínuo quanto o treinamento intermitente podem ter papel importante na prevenção e tratamento do diabetes, mas novos estudos são necessários para caracterizar intensidade e periodicidade mais adequadas a cada um destes diferentes protocolos. Assim o presente estudo visa analisar os efeitos do treinamento intermitente bem como do treinamento contínuo, no metabolismo protéico muscular em ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos adultos (90 dias) da linhagem Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP- Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos no Biotério do setor de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP - Campus de Rio Claro em sala com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e foto período claro/escuro de 12/12 horas com as luzes acesas das 6:00 às 18:00hs, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada para roedores - Purina[®]). Os procedimentos adotados com os animais foram

aprovados pelo Comitê de ética para experimentação animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU), parecer- CEEA/UNITAU nº 019/08.

2.2. Cruzamento dos Animais

Para o cruzamento foi empregado o método de harém, 4 fêmeas e 1 macho, colocados por uma noite em gaiolas coletivas. A confirmação da cobertura foi feita pela presença de espermatozóides em esfregaço vaginal realizado na manhã seguinte.

2.3. Aplicação neonatal de aloxana

Aos seis dias de idade os filhotes machos, com peso médio equivalente a $11,9 \pm 1, 2$ g, receberam injeção intra-peritoneal (250mg/Kg de peso corporal) de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (LUCIANO; LIMA, 1997), após jejum de 15 horas. Como controles foram utilizados ratos (da mesma idade e sexo) injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamentasse 8 filhotes.

2.4. Delineamento e Grupos Experimentais

Aos 28 dias de idade, os filhotes compuseram 8 grupos com 12 animais em cada um, que permaneceram em observação até os 120 dias de idade:

- Controle (C): ratos injetados com tampão citrato não submetidos a treinamento;
- Controle Treinamento Contínuo (CTC): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Controle Treinamento Intermitente (CTI): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Aloxana (A): ratos injetados com aloxana não submetidos a treinamento.
- Aloxana Treinamento Contínuo (ATC): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Aloxana Treinamento Intermitente (ATI): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento intermitente.

2.5. Treinamento físico

Os animais inicialmente realizaram um período de adaptação que consistiu em: primeiramente, foram submetidos a um reconhecimento do meio aquático por 15

minutos; no dia seguinte aumentou-se o nível de água e realizaram natação durante 15 minutos; no 3º dia foram colocados para nadar no nível de água em que treinaram durante o experimento por 25 minutos; no 4º dia nadaram durante 30 minutos com sobrecarga atada ao dorso equivalente a 3% do peso corporal; no 5º dia de adaptação a sessão foi de 40 minutos com sobrecarga equivalente à 5% do peso corporal. Em seguida, foi iniciado o período de treinamento.

Os animais dos grupos treinados por programa de exercício contínuo foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. Esta intensidade de esforço corresponde à transição metabólica aeróbia/anaeróbia para ratos durante a natação (GOBATTO et al., 2001). Os animais dos grupos treinados por programa intermitente foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso (Protocolo adaptado, tendo como base o protocolo de BRAGA et al., 2004). A temperatura da água foi mantida em $31^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, durante a realização do exercício, por ser esta temperatura considerada termicamente neutra em relação à temperatura dos ratos (AZEVEDO, 1994; PAULI, 2005). Os protocolos de treinamento tiveram sua carga semanal total de treinamento (CST) equivalente. Segundo Araújo et al. (2010), a CST corresponde ao somatório de estímulos de treinamento obtido pelo produto do tempo de esforço (t) e a intensidade (%). Assim neste estudo o treinamento contínuo teve $\text{CST} = 60\text{min} \times 5\% = 300$ equivalente ao treinamento intermitente $\text{CST} = 20 \text{ min} \times 15\% = 300$.

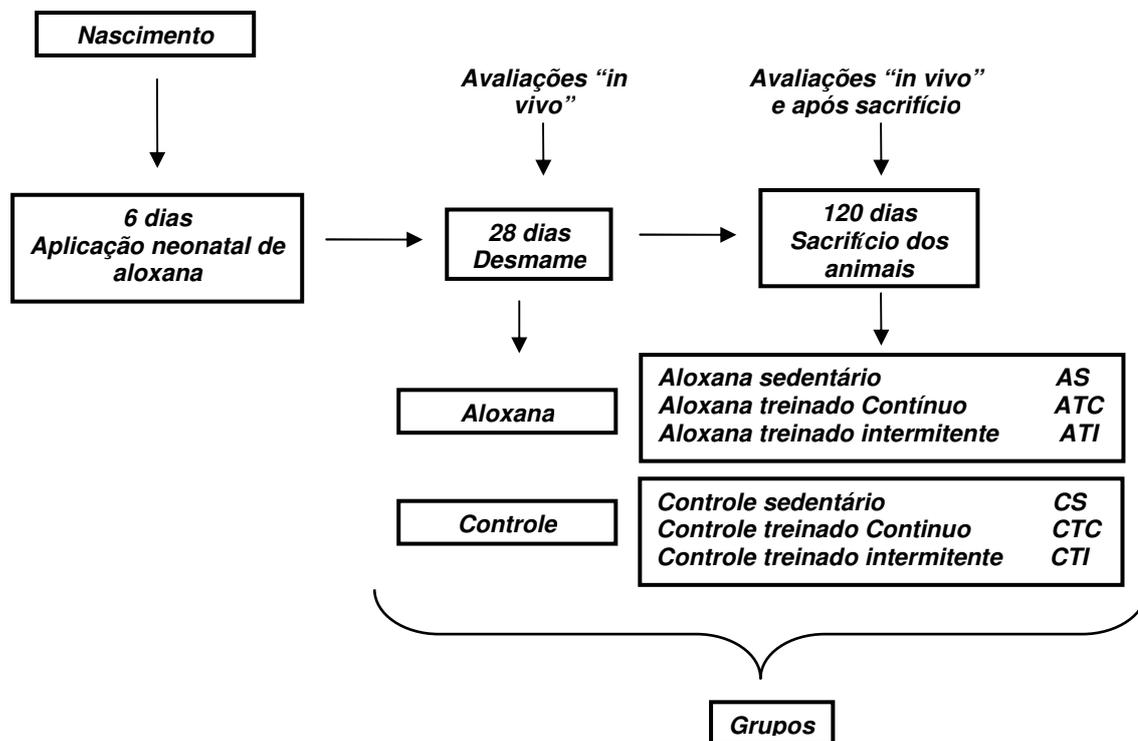


Fig 1- Desenho Experimental

2.6. Avaliações *in vivo*

Todos os animais tiveram peso corporal, ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana. Além disso, foram submetidos às seguintes avaliações:

2.6.1. Glicemia e insulinemia de Jejum e após sobrecarga de glicose

A verificação dos efeitos da aplicação neonatal com aloxana foi efetuada nos animais após o desmame (28 dias) e repetida aos 120 dias de idade, pela determinação da glicemia pelo método glicose oxidase (Kit glicose - Laborlab: CAT nº 02200-Guarulhos- SP) e insulinemia por ELISA (Kit Insulina- Diagnostic systems laboratories INC (DSL), REF: 10-1600, 445 medical Center BLVD, Webster, TX 77598, USA), após jejum de 12 horas e 30 min após sobrecarga oral de glicose (80%) na dose de 2g/kg de peso corporal.

2.7. Sacrifício dos animais

Aos 120 dias de idade todos os animais foram sacrificados por decapitação, após anestesia profunda com amobarbital sódico (15 mg/kg de peso corporal), sem jejum prévio decorridas 48 horas dos testes de tolerância à glicose e/ou 48 horas após a última sessão de treino, para a obtenção de material biológico.

2.7.1. Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação das concentrações de proteínas totais e albumina, por espectrofotometria (Kit proteínas totais - Laborlab: CAT nº 03801 e Kit albumina - Laborlab: CAT nº 03802- Guarulhos- SP) e de insulina por ELISA (Kit Insulina- Diagnostic systems laboratories INC (DSL), REF: 10-1600, 445 medical Center BLVD, Webster, TX 77598, USA).

2.7.2. Músculo gastrocnêmio

No músculo gastrocnêmio foram avaliados teores de proteínas totais (LOWRY et al., 1951) e DNA (GILES; MAYERS, 1965), visando inferir sobre o número (DNA) e tamanho (razão proteína/DNA) das células (WINICK et al., 1972).

2.7.3. Músculo Sóleo

Nesse músculo foram avaliadas as taxas de síntese e degradação protéicas.

2.7.3.1. Síntese

Fatias longitudinais (70mg) musculares foram pré-incubadas por 30 minutos em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem fenol vermelho e bicarbonato de sódio), suplementado com albumina sérica bovina desengordurada (BSA) [0,1%] e insulina [100u/ml], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 uCi/ml] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloro acético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos a 4°C. O material TCA-insolúvel foi lavado 3 vezes com TCA 5%. O precipitado resultante foi dissolvido em (SDS) 10% à temperatura ambiente por 30 minutos, para a determinação do conteúdo protéico e da radioatividade incorporada às proteínas musculares. O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol (LOWRY et al., 1951) e a radioatividade incorporada à proteína muscular foi medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica foi calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação.

2.7.3.2. Degradação

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice da degradação protéica, conforme descrito previamente por Fulks et al. (1975). Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70mg) foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer [NaCl 1,2 mmol/L; KCl 4,8 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; CaCl₂ 2,5 mmol/L; KH₂PO₄ 1,2 mmol/L e MgSO₄ 1,2 mmol/L – pH 7,4] suplementado com glicose [5,5 mmol/L], BSA [1,34%], insulina [5u/ml] e ciclohexamida [5,0 mmol/L], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para novo meio de mesma composição e incubada por 2 horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para determinação do teor de tirosina pelo procedimento de Waalkes; Udenfriend (1957).

2.8. Análise estatística

A análise dos dados foi feita utilizando teste t-student ou de Análise de Variância ANOVA bifatorial seguido de post hoc Bonferroni, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Os dados referentes à evolução do peso corporal dos animais durante o período experimental acham-se na figura 2A e foram analisados através do ganho de peso durante experimento, mostrado na figura 2B. O grupo CTI apresentou menores valores de ganho de peso do que o grupo CS, mostrando a eficácia do treinamento intermitente no controle ponderal dos animais controles. Nas figuras 3A e 3B estão apresentados os valores referentes à ingestão alimentar e hídrica, respectivamente, dos animais. Nestes parâmetros, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados.

A tabela 1 apresenta os dados referentes à glicemia e insulinemia de jejum e após sobrecarga de glicose aos 28 dias. Foram encontradas diferenças apenas na variável glicemia após sobrecarga de glicose, onde o grupo aloxana apresentou maiores valores em relação ao grupo controle. Na tabela 2 estão apresentados os dados referentes à glicemia e insulinemia de jejum e após sobrecarga de glicose aos 120 dias. Diferenças foram encontradas apenas nos valores referentes à glicemia após sobrecarga de glicose, onde o grupo ATI apresentou maiores valores do que o grupo CTI.

Em relação às concentrações de proteínas totais e albumina séricas e teores de proteínas, DNA e razão proteína/DNA no músculo gastrocnêmio, apresentados na tabela 3, pode-se observar o seguinte comportamento. Não houve diferenças entre os grupos nas concentrações sérica de proteínas totais a albumina. O grupo ATC apresentou maiores valores de DNA no músculo gastrocnêmio do que o grupo ATI enquanto que a razão proteína/DNA foi maior no grupo ATI do que no grupo ATC. Isso indica maior hipertrofia muscular após o treinamento intermitente. A tabela 4 apresenta os dados referentes à síntese e degradação protéicas do músculo sóleo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

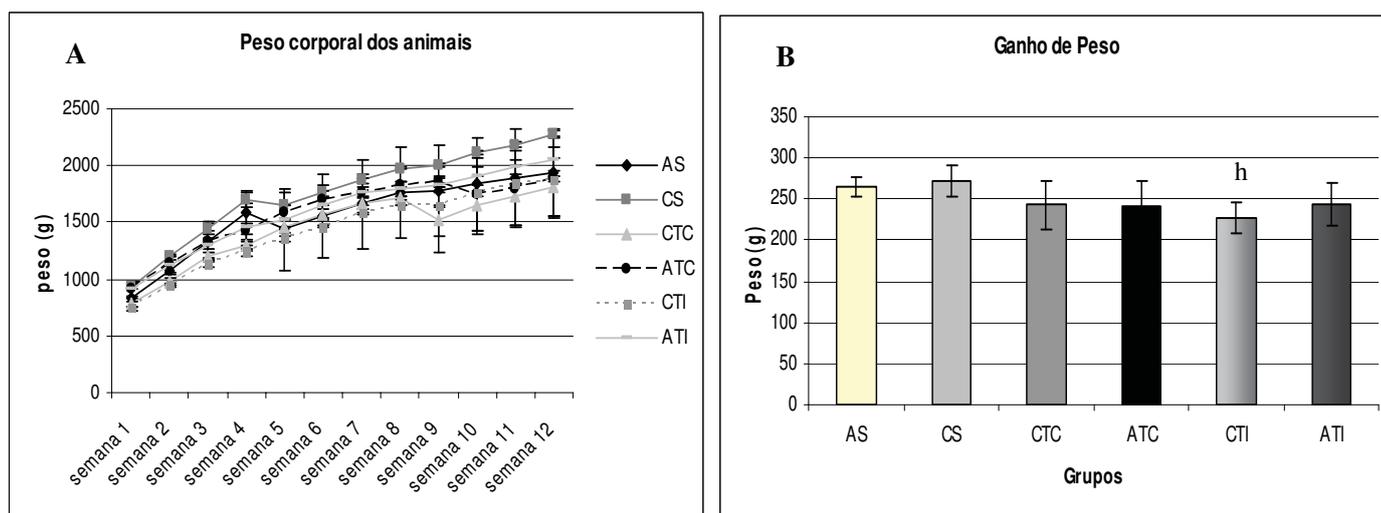


Figura 2A e 2B: Evolução do peso corporal (A) e ganho de peso (B) do desmame (28 dias) ao final do experimento (120 dias). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 10$ animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, $p < 0,05$) entre os grupos, referente ao ganho de peso. h, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CS vs CTI.

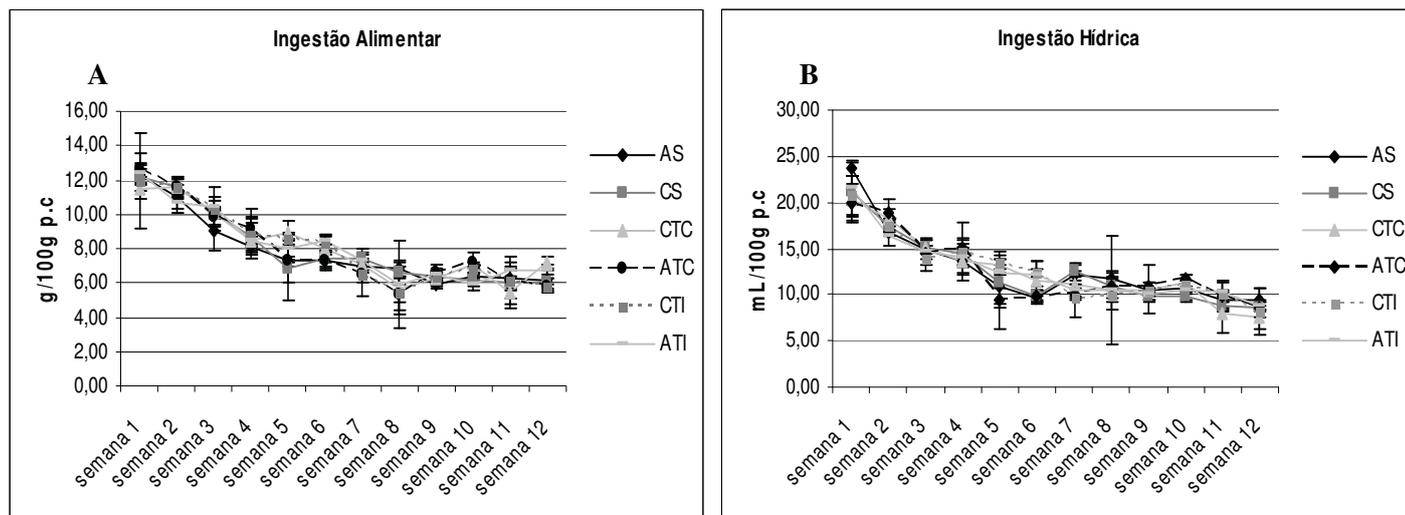


Tabela 1: Glicemia e insulinemia após jejum de 12hs e 30 minutos após sobrecarga oral de glicose ao desmame (28 dias).

28 dias	Aloxana	Controle
Glicemia Jejum (mg/dL)	82,1 ± 8,6	81,8 ± 6,7
Glicemia após sobrecarga de glicose (mg/dL)	200,6 ± 35,0 *	155,3 ± 11,2
Insulinemia jejum (ng/mL)	0,43 ± 0,27	0,61 ± 0,41
Insulinemia após sobrecarga de glicose (ng/mL)	0,84 ± 0,39	0,79 ± 0,48

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. O símbolo* indica diferença estatística (teste t student, p<0,05) entre os grupos (Aloxana e Controle), referente à glicemia após sobrecarga de glicose.

Tabela 2: Glicemia e insulinemia após jejum de 12hs e 30 minutos após sobrecarga oral de glicose aos 120 dias.

120 dias	AS	CS	CTC	ATC	CTI	ATI
Glicemia Jejum (mg/dL)	79,38±6,62	78,93± 3,54	75,83± 4,28	77,61± 4,28	78,00 ±7,05	77,74± 5,96
Glicemia após sobrecarga de glicose (mg/dL)	132,03 ±16,38	115,74± 5,16	118,77 ± 8,07	124,42 ±13,17	105,42 ± 5,41	125,44±18,80 ^f
Insulinemia jejum (ng/mL)	0,84± 0,61	1,90 ±1,04	2,10 ±1,59	0,72 ±0,44	1,28 ±1,00	1,53 ± 0,94
Insulinemia após sobrecarga de glicose (ng/mL)	3,72 ±2,71	2,74 ±1,98	2,29 ±1,66	1,97 ±1,40	3,96 ±2,55	3,71± 1,85

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, p<0,05) entre os grupos, referente à glicemia após sobrecarga de glicose. f, diferença estatística (p<0,05) entre ATI vs CTI;

Tabela 3: Proteínas totais e albumina séricas, teores de proteínas, DNA e razão proteína/DNA no músculo gastrocnêmio dos animais aos 120 dias.

	AS	CS	CTC	ATC	CTI	ATI
Proteínas Totais Séricas (g/L)	7,08± 0,08	7,05± 0,22	7,12± 0,16	7,20± 0,13	7,17 ±0,18	7,19 ±0,11
Albumina Sérica (g/L)	4,78 ±0,37	4,82 ±0,28	4,98 ±0,36	4,87 ±0,45	5,04 ± 0,36	5,33 ± 0,86
Proteínas Gastrocnêmio (mg/100mg)	6,01± 1,37	6,09± 0,86	6,51± 1,25	5,39± 1,32	5,55 ±1,22	6,38 ±0,81
DNA Gastrocnêmio (mg/100mg)	0,053 ±0,013	0,058±0,010	0,069 ±0,016	0,071 ±0,021	0,051 ± 0,012	0,050 ± 0,016 ^d
Proteína/DNA Gastrocnêmio	110,35 ± 20,37	108,02 ± 27,80	95,35 ± 15,17	84,95 ± 37,15	115,61 ± 39,29	146,27 ± 69,28 ^d

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Bonferroni, p<0,05) entre os grupos, referente ao DNA e razão proteína/DNA do gastrocnêmio. d, diferença estatística (p<0,05) entre ATC vs ATI.

Tabela 4: Síntese e degradação de proteína no músculo sóleo dos animais avaliados aos 120 dias

	AS	CS	CTC	ATC	CTI	ATI
Síntese Protéica (pmol/mg.h)	11,06± 2,21	12,77±5,76	19,40± 3,82	13,68± 6,37	14,46 ±2,59	11,14 ± 2,21
Degradação Proteica (pmol/mg.h)	350,56 ±90,71	287,93±37,38	271,29 ±89,94	244,04 ±44,26	387,00 ± 95,74	322,49 ± 93,99

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, CTC: Controle treinado contínuo, ATC: Aloxana treinado contínuo, CTI: Controle treinado intermitente e ATI: Aloxana treinado intermitente.

4. DISCUSSAO

Sabe-se que a insulina exerce efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas. Particularmente no metabolismo das proteínas, este hormônio aumenta a intensidade do transporte de aminoácidos através da membrana celular, o que aumenta as quantidades disponíveis de aminoácidos para a síntese protéica. No diabetes mellitus devido a alterações na produção e/ou ação da insulina o metabolismo protéico apresenta-se alterado. Por sua vez o exercício físico promove o anabolismo protéico muscular resultando em adaptações metabólicas e morfológicas no músculo esquelético. Atualmente, tem-se observado que o exercício de alta intensidade pode efetivamente aumentar a força e massa musculares bem como melhorar o desempenho físico e a capacidade funcional. Assim, o presente estudo visou analisar os efeitos no metabolismo protéico do treinamento intermitente bem como do treinamento contínuo, em ratos submetidos à aplicação neonatal de aloxana.

Inicialmente o presente estudo, analisou o ganho de peso corporal dos animais. A administração neonatal de aloxana não afetou o ganho de peso corporal dos animais. Resultados similares foram relatados por Ribeiro et al. (2005), que utilizando o mesmo modelo experimental não encontraram alterações no peso corporal entre os animais aloxânicos e controles. Por outro lado, os animais controles sedentários tiveram maiores valores de ganho de peso corporal do que os animais controles submetidos ao treinamento intermitente, evidenciando um efeito benéfico deste protocolo no controle ponderal. Além disto, quando se avaliou a ingestão alimentar e hidrica dos animais

nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos estudados, mostrando que a administração neonatal de aloxana não levou a um quadro de polifagia e polidipsia, o que é encontrado em animais adulto tornados diabéticos por administração de aloxana (LEME et al., 2010).

Sabe-se que o diabético tipo 2 apresenta intolerância à glicose bem como resistência periférica à insulina. Assim como forma de avaliar alterações na homeostase glicêmica dos animais determinou-se a glicemia e insulinemia em jejum e após sobrecarga de glicose aos 28 e 120 dias de vida dos animais. Aos 28 dias, pode-se notar uma intolerância à glicose nos animais aloxânicos visto os maiores valores de glicemia apresentado 30 minutos após sobrecarga oral de glicose, quando comparado ao grupo controle, corroborando com estudo prévio (CONTARTEZE et al., 2009). Em relação à insulinemia nenhuma diferença foi constatada. Aos 120 dias, diferenças foram encontradas apenas nos valores referentes à glicemia após sobrecarga de glicose, onde o grupo aloxana treinado intermitente apresentou maiores valores quando comparado ao controle correspondente. Com relação às proteínas totais e albumina séricas, não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados, o que pode ser relevante uma vez que estas medidas refletem o estado nutricional e de hidratação dos animais.

O crescimento de qualquer órgão pode ser causado por aumento no número de células (hiperplasia), por aumento no tamanho das células já existentes (hipertrofia) ou por ambos os processos simultaneamente. O número total de células pode ser medido, com algumas exceções, determinando-se o conteúdo total de DNA do órgão e dividindo-se por uma constante que representa o conteúdo de DNA por núcleo diplóide na espécie em estudo (WINICK et al., 1972).

Determinado o número de células, o peso médio por célula, o conteúdo protéico por célula, o conteúdo de RNA por célula, entre outros, podem ser avaliados através da determinação da quantidade total de cada um desses elementos e dividindo-se pelo número de células. O resultado pode ser expresso como razões peso/DNA; proteína/DNA; RNA/DNA, etc (WINICK et al., 1972). O aumento do conteúdo de DNA representa um tipo de crescimento, ou seja, aumento do número de células; enquanto que o aumento das razões peso/DNA, proteína /DNA e RNA/DNA representam outro aspecto do crescimento, isto é, o aumento da massa tecidual sem aumento no número de células (WINICK et al., 1972). No rato, de zero a 20 dias de idade, todos os órgãos crescem por divisão celular exclusivamente; dos 21 aos 42 dias a maioria dos órgãos, inclusive o músculo estriado esquelético, cresce tanto por hiperplasia quanto por

hipertrofia celular enquanto que dos 64 aos 86 dias, todos os órgãos crescem por hiperplasia celular (WINICK et al., 1972). Alterações fisiológicas durante o período de crescimento hiperplásico e/ou hipertrófico de um órgão pode resultar em alteração no número e/ou no tamanho das células nesse órgão. Assim no presente estudo analisaram-se os teores de proteínas, DNA e razão proteína/DNA no músculo gastrocnêmio e observou-se que o grupo aloxana submetido ao treinamento contínuo apresentou maior teor de DNA e menor razão proteína/DNA do que o aloxana treinado intermitente indicando que o treinamento contínuo foi eficaz na hiperplasia muscular e o treinamento intermitente levou a maior hipertrofia muscular.

Na tentativa de elucidar possíveis mecanismos envolvidos nas alterações do crescimento celular no músculo esquelético induzidas pelo treinamento físico, as taxas de síntese e degradação protéica foram avaliadas no músculo sóleo. Dados referentes à síntese e degradação protéica não apresentaram diferenças entre os grupos. Fedele et al. (2000) também não encontraram alteração na síntese protéica muscular de ratos diabéticos após treinamento agudo resistido. Já Farrel et al. (1998), mostrou que ratos diabéticos apresentam maior síntese protéica muscular após treinamento resistido moderado. Sabe-se que o treinamento de alta intensidade que envolve maior participação das fibras do tipo glicolíticas, leva a um maior aumento de massa bem como maior síntese protéica que o treinamento aeróbio. Este envolve principalmente fibras oxidativas e gera um aumento mitocondrial e menor efeito protéico. Assim neste presente estudo alterações protéicas podem não ter sido evidenciadas após treinamento intermitente, devido o músculo analisado que possui fibras de característica predominantemente oxidativa.

Conclui-se que o modelo de indução neonatal de aloxana foi eficaz em alterar homeostase glicêmica dos animais visto a intolerância apresentada pelos animais aloxânicos. Os protocolos de treinamento contínuo e intermitente foram eficazes em alterar o crescimento por hiperplasia e por hipertrofia, respectivamente, das células musculares nos animais aloxânicos. Estudos adicionais são necessários para o esclarecimento dos possíveis mecanismos envolvido.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 09/51538-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por financiarem esse estudo.

5. REFERÊNCIAS

A. D. A, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: **A position statement of the American Diabetes Association** Diabetes Care 32: S62- S67, 2009.

A.D.A, Standards of Medical Care in Diabetes Diabetes Care 33: S62-S69, 2010.

ARAÚJO, G.G; PAPOTI, M; MANCHADO-GOBATTO, F.B; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Padronização de um Protocolo Experimental de Treinamento Periodizado em Natação Utilizando Ratos Wistar. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. v. 16, p. 51-56, 2010.

AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação.** 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiologia) Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BRAGA, L. R., MELLO, M. A., ou de MELLO, M. AR, GOBATTO, C. A.Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.** v.54, p.58 - 65, 2004.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, London, v.414, p.813-821, 2001.

CONTARTEZE, R.V.L; MOTA, C.S.A; OLIVEIRA, C.A.M; LEME, J.A.C.A; BOTTCHER, L.B; MELLO, M.A.R; LUCIANO, E. Exercise test and glucose homeostasis in rats treated with alloxan during the neonatal period or fed a high calorie diet. **Journal of Diabetes.** v. 1, p. 65–72, 2009.

FARRELL, P. A; FEDELE, M.J; VARY, T.C; KIMBALL, S.R; JEFFERSON, L.S. Effects of intensity of acute-resistance exercise on rates of protein synthesis in moderately diabetic rats. **Journal of Applied Physiology.** v. 85, p.2291-2297, 1998.

FEDELE, M. J; HERNANDEZ, J. M; LANG, C. H; VARY, T. C;KIMBALL, S. R; JEFFERSON, L. S; FARRELL, P.A. Severe diabetes prohibits elevations in muscle protein synthesis after acute resistance exercise in rats. **Journal of Applied Physiology.** v. 88, p.102–108, 2000.

FUJIMOTO, E; MACHIDA, S; HIGUCHI, M; TABATA, I. Effects of nonexhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. **The Journal of Physiological Science.** v. 60, p.95-101, 2009.

FULKS, R.M; LI, J.B; GOLDBERG, J.L. **J. Biol. Chem.** v.250,p. 290-298, 1975.

GILES,K.W.; MAYERS,A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, London, v.206,p. 93, 1965.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.130, n.1, p. 21-27, 2001.

HAYASHIA, T.; HIRANO, T.; YANAMOTO, T.; ITO, Y.; ADACHI, M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. **Metabolism Clinical and experimental**, New York, v.55, p. 879-884, 2006.

IVY, J. L.; ZDERIC, T. D.; FOGT, D. L. Prevention and treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, Hagerstown, v.27, p.1-35, 1999.

KNOWLER W.C.; BARRETT –CONNOR, E.; FOWLER, S.E.; HAMMAN, R.F.; LACHIN, J.M.; WALKER, E.A.; NATHAN, D.M. Diabetes prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 346, n.6, p. 393-403, 2002.

KODAMA, T.; IWASE, M.; NUNOI, K.; et al. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v.20, n.3, p. 183-189, 1993.

LEME J.A.C.A.; CASTELLAR, A.; REMEDIO, R. N.; BARBOSA, R. A.; MOURA, L.P.; DALIA, R. A.; GOMES, R. J.; CAETANO, F. H.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos wistar. **Bioscience Journal**. v. 26, p. 451-456, 2010.

LEME, J.A. C. A.; ARAÚJO, M. B.; MOURA, L. P.; GOMES, R. J.; MOURA, R. F.; ROGATTO, G.P.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Effects of physical training on serum and pituitary growth hormone contents in diabetic rats. **Pituitary**, 2009.

LI, G.; HU Y.; YANG, W.; JIANG, Y.; WANG, J.; XIAO, J.; HU, Z.; PAN, X.; HOWARD, B.V.; BENNETT, P.H. Effects of insulin resistance and insulin secretion on the efficacy of interventions to retard development of type 2 Diabetes Mellitus: **Diabetes Research Clinical Practice**, Amsterdam, v.58, n. 3, p. 193-200, 2002.

LINDSTROM, J.; LOUHERANTA, A.; MANNELIN, M.; RASTAS, M.; SALMINEN, V.; ERICSSON, J.; UUSITUPA, M.; TUOMIHETO, J. Finnish diabetes Prevention Study Group: Lifestyle intervention and 3- year Results on diet and Physical activity. **Diabetes care**, Alexandria, v.26, n.12, p. 3230-3236, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.93, p. 265-275, 1951.
LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v.18, p.47-60, 1997.

LUCIANO, E; MELLO, M.A.R. efeitos do exercício físico crônico sobre as proteínas no diafragma de ratos diabéticos. **Motriz**. v.5, p. 146-151, 1999.

MENGE, B.A; SCHRADER, H; RITTER, P.R; ELLRICHMANN, M; UHL, W; SCHMIDT, W.E; MEIER, J.J. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Regul. Pept.** v.160, p. 75-80, 2010.

OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO.; MELLO, M.A R. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Experimental Physiology**, New York, v.90, n.1, p. 79-86, 2004.

PAULI, J.R. **Efeitos do treinamento físico sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos administrados com dexametasona**. 2005,154p, tese (dissertação-mestrado em Ciências da Motricidade- Biodinâmica) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P.; et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabetes & Metabolism**, Paris, v.31, p. 61-75, 1989.

RIBEIRO C.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO,E.; MELLO, M. A. R. Diabetes evolution in rats after neonatal treatment with alloxan. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.177-178, 2005.

ROSSINI, A. A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. **Diabetes**, Alexandria, v.53, p.267-75, 2004.

SNOWLING, N.J.; HOPKINS, W.G. Effects of Different Modes of Exercise Training on Glucose Control and Risk Factors for Complications in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes care**, Alexandria, v. 30, n.4, p.26, 2006.

WAALKES, T.P; UDENFRIEND, S. Tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** v.50p. 733-736, 1957.

WILD, S.H; ROGLIC, G; GREEN, A; SICREE, R; KING, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, p.1047–1053, 2004.

WINICK,M.; BASEL,J.A.; BOSSO,P.A. A nutrition and cell growth. In: WINICK,M. **Nutrition and development**. N.Y, p.49-97, 1972.

**DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO E BIOMARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO NO PÂNCREAS DE RATOS SUBMETIDOS À
APLICAÇÃO NEONATAL COM ALOXANA.**

Carla Ribeiro¹, Lucieli Teresa Cambri¹, Clecia Soares de Alencar Mota¹, Rodrigo Augusto Dalia¹, Michel Barbosa de Araújo¹, Leandro Pereira de Moura¹, Maria Alice Rostom de Mello¹.

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil.

Endereço para correspondência:

Carla Ribeiro

Av. 24 A, 1515, Bela Vista – Rio Claro –SP

CEP 13506-900

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Instituto de Biociências – Departamento de Educação Física

Laboratório de Biodinâmica

Tel: +55 19 35264308

E-mail: Carla_ef_rc@yahoo.com.br

RESUMO

Estudos sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no desencadeamento do DMT2. Os níveis anormalmente elevados de radicais livres e a redução simultânea de mecanismos de defesa antioxidante pode levar a danos de organelas celulares e enzimas e aumento de peroxidação lipídica da membrana. No entanto, tem sido sugerido que exercícios regulares podem melhorar a capacidade de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo. Portanto, o presente estudo visa comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre os biomarcadores do estresse oxidativo no pâncreas de ratos aloxânicos. Ratos da linhagem wistar foram utilizados e divididos em oito grupos: Aloxana sedentário (AS), Controle sedentário (CS), Aloxana treinado contínuo (AC), Aloxana treinado intermitente (AI), Aloxana treinado força (AF), Controle treinado contínuo (CC), Controle treinado intermitente (CI) e Controle treinado força (CF). A aloxana foi administrada a ratos neonatos aos 6 dias de vida (250mg/Kg p.c). O protocolo de treinamento contínuo consistiu em: 12 semanas de treinamento de natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. O protocolo de treinamento intermitente consistiu em 12 semanas de treinamento de natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso corporal. O protocolo de treinamento de força consistiu em 12 semanas de treinamento, 4 series de 10 saltos na água em tanques individuais (50cm altura x 25 largura) com 1 min de intervalo entre as series suportando sobrecarga de 50% do peso corporal. Os animais foram avaliados in vivo quanto a: taxa de remoção da glicose avaliada pelo Kitt (%/min) durante teste de tolerância à insulina - ITT. Aos 120 dias de idade e decorridas 48 horas das avaliações in vivo, os animais foram sacrificados para a coleta de material, visando análises dos biomarcadores de peroxidação lipídica (TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes (SOD e catalase) no pâncreas dos animais. Aos 28 dias observou-se que os animais aloxânicos apresentaram maior resistência à insulina, avaliada através da remoção de glicose sérica (Kitt%/min) durante ITT. Aos 120 dias, Foram encontradas diferenças na atividade da enzima SOD e na concentração de TBARS. Após treinamento contínuo o grupo controle (CC) apresentou maior atividade da SOD quando comparado ao grupo aloxana contínuo (AC), controle sedentário (CS) e controle força (CF). Em relação à peroxidação lipídica (TBARS) o treinamento contínuo elevou a peroxidação lipídica no pâncreas dos animais aloxânicos (AC) quando comparado aos treinamentos intermitente e força (AI e AF). Além disso, os animais aloxânicos treinados pelo protocolo contínuo de natação (AC) apresentaram maior peroxidação do que o grupo controle (CC). Assim conclui-se que os treinamentos intermitente e força mostraram ser mais eficaz na proteção ao estresse oxidativo no pâncreas de animais aloxânicos.

Palavras Chave: Ratos neonatos, aloxana, treinamento físico, estresse oxidativo.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a incidência do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) tem aumentado consideravelmente (ADA, 2010). É uma doença crônica caracterizada por resistência à insulina e disfunção das células beta pancreáticas (HAYASHIA et al., 2006, ADA, 2011) e seu desenvolvimento pode estar associado ao stress oxidativo (SHAH et al, 2007). O estresse oxidativo crônico é altamente prejudicial às células do pâncreas, pois o aumento dos radicais livres prejudica a secreção de insulina, e pode induzir à morte celular (SIMMONS, 2006).

Para proteger o organismo contra o aumento na produção de radicais livres e prejuízos nas defesas antioxidantes causados pelo DMT2 (CERIELLO, 2000), o exercício físico tem sido amplamente empregado. Este leva a aumentos na atividade celular bem como no ataque oxidativo por elevação da produção de espécies reativas de oxigênio- EROS, contudo, estes dois aspectos são compensados por aumento nas defesas antioxidantes (TERBLANCHE, 2000) consequente as alterações adaptativas da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase nos tecidos e órgãos. Assim, o treinamento físico possui papel importante na modulação do estresse oxidativo e consequentemente na prevenção do DMT2.

No entanto, estudos referentes aos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas adaptações metabólicas ao exercício físico e seus efeitos sobre a secreção de insulina e o estresse oxidativo são de difícil execução em seres humanos. Sendo assim, modelos animais tem sido bastante utilizados no estudo desta questão.

A indução de diabetes em ratos com estreptozotocina ou aloxana resulta em aumento de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no pâncreas indicando de forma indireta produção de radicais livres (MARITIM et al., 2003) e peroxidação lipídica, que prejudicam a secreção de insulina.

Oliveira et al. (2004) utilizando modelo de administração neonatal de aloxana, não encontraram diferença na secreção estática de insulina entre os animais sedentários controle e aloxânicos. Após treinamento contínuo de natação em intensidade moderada, os animais aloxânicos tiveram maior secreção de insulina quando comparados ao grupo sedentário correspondente, sugerindo que o exercício físico pode ter levado a maior atividade de enzimas antioxidantes e mantendo a funcionabilidade das células beta. Ribeiro et al. (2005) administraram aloxana em ratos aos 6 dias de vida e observaram

que frente a concentrações elevadas de glicose a secreção estática de insulina por ilhotas isoladas dos animais aloxânicos foi menor do que dos animais controles.

Ozkaya et al. (2002), investigaram o efeito de 8 semanas de exercício aeróbio em esteira sob estado antioxidante no cérebro de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os autores relataram que os animais diabéticos apresentaram níveis elevados de TBARS e após exercício aeróbio a peroxidação lipídica se manteve, mas a defesa antioxidante (atividade da glutathione peroxidase -GSH-Px) dos animais melhorou.

A administração de estreptozotocina em ratos adultos levou à maior peroxidação lipídica (TBARS) e menor atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no pâncreas dos animais (KAKKAR et al., 1998).

Em ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de estreptozotocina, a realização de exercício contínuo de natação em diferentes intensidades, antes e após a indução do diabetes, atenuou a peroxidação lipídica e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no pâncreas. Os efeitos mais acentuados foram observados com exercício de maior intensidade (COSKUN et al., 2004). Os autores concluíram que o exercício exerce efeito terapêutico e/ou protetor no diabetes através de decréscimo no estresse oxidativo e preservação da integridade das células beta (COSKUN et al., 2004).

Contudo, faltam informações sobre os efeitos da administração neonatal de aloxana bem como a aplicação de diferentes protocolos de exercício físico sobre os biomarcadores do estresse oxidativo no pâncreas. Deste modo, o presente estudo visa comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre os biomarcadores do estresse oxidativo no pâncreas de ratos aloxânicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos adultos (90 dias) da linhagem Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP- Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos no Biotério do setor de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP - Campus de Rio Claro em sala com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e foto período claro/escuro de 12/12 horas com as luzes acesas das 6:00 às 18:00hs, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada para roedores - Purina[®]). Os procedimentos adotados com os animais foram

aprovados pelo Comitê de ética para experimentação animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU), parecer- CEEA/UNITAU n° 019/08.

2.2. Cruzamento dos Animais

Para o cruzamento foi empregado o método de harém, 4 fêmeas e 1 macho, colocados por uma noite em gaiolas coletivas. A confirmação da cobertura foi feita pela presença de espermatozóides em esfregaço vaginal realizado na manhã seguinte.

2.3. Aplicação neonatal de aloxana

Aos seis dias de idade os filhotes machos, com peso médio de $11,9 \pm 1,2g$, receberam injeção intra-peritoneal (250mg/Kg de peso corporal) de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (LUCIANO; LIMA, 1997), após jejum de 15 horas. Como controles foram utilizados ratos da mesma idade e sexo injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamentasse 8 filhotes.

2.4. Delineamento e Grupos Experimentais

Aos 28 dias de idade, os filhotes compuseram 8 grupos com 10 animais em cada um, que permaneceram em observação até os 120 dias de idade (Figura 1).

- Controle (CS): ratos injetados com tampão citrato não submetidos a treinamento;
- Controle Treinamento Contínuo (CC): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Controle Treinamento Intermitente (CI): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Controle Treinamento de Força (CF): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento de força.
- Aloxana(AS): ratos injetados com aloxana não submetidos a treinamento.
- Aloxana Treinamento Contínuo (AC): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Aloxana Treinamento Intermitente (AI): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Aloxana Treinamento de Força (AF): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento de força.

2.5. Treinamento físico

Os animais realizaram inicialmente um período de adaptação que consistiu em: primeiramente, foram submetidos a um reconhecimento do meio aquático por 15 minutos; no dia seguinte aumentou-se o nível de água e realizaram natação durante 15 minutos; no 3º dia foram colocados para nadar no nível de água em que treinaram durante o experimento por 25 minutos; no 4º dia nadaram durante 30 minutos com sobrecarga atada ao dorso equivalente a 3% do peso corporal; no 5º dia de adaptação a sessão foi de 40 minutos com sobrecarga equivalente à 5% do peso corporal. Em seguida, foi iniciado o período de treinamento.

Os animais dos grupos treinados por programa de exercício contínuo foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. Esta intensidade de esforço corresponde à transição metabólica aeróbia/anaeróbia para ratos durante a natação (GOBATTO et al., 2001). Os animais dos grupos treinados por programa intermitente foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50 cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso (Protocolo adaptado, tendo como base o protocolo de BRAGA et al., 2004). Os protocolos de treinamento tiveram sua carga semanal total de treinamento (CST) equivalente. Segundo Araújo et al. (2010), a CST corresponde ao somatório de estímulos de treinamento obtido pelo produto do tempo de esforço (t) e a intensidade (%). Assim neste estudo o treinamento contínuo teve $CST = 60\text{min} \times 5\% = 300$ equivalente ao treinamento intermitente $CST = 20\text{min} \times 15\% = 300$.

Os animais que realizaram treinamento de força, foram submetidos a 4 séries de 10 saltos na água, interrompidos por 1 min de repouso entre elas, 5 dias por semana, em tanques individuais, com sobrecarga de 50% do peso corporal (ROGATTO et al., 2004). A temperatura da água foi mantida em $31^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante a realização do exercício, por ser esta temperatura considerada termicamente neutra em relação à temperatura dos ratos (AZEVEDO, 1994; PAULI, 2005).



Figura 1. Desenho experimental

2.6. Avaliação *in vivo*

2.6.1. Sensibilidade à insulina

Para estimar a sensibilidade à insulina dos animais aos 28 dias de idade foi utilizado o teste de tolerância à insulina (ITT). O teste consistiu na aplicação de solução de insulina (30mU/100g de peso corporal), via subcutânea, na região dorsal. Amostras de sangue (25µl) foram coletadas em capilares heparinizados, por meio de pequeno corte na extremidade da cauda, nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para determinação da glicose (Kit glicose - Laborlab: CAT nº 02200- Guarulhos- SP). Uma única incisão na cauda foi suficiente para a obtenção de todas as amostras. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $(0,693/t/2) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose sérica enquanto houver decréscimo linear dos mesmos após a administração de insulina (LUNDBAEK, 1962).

2.6.2. Sacrifício dos animais

Aos 120 dias de idade todos os animais foram sacrificados por decapitação, após anestesia profunda com amobarbital sódico (15 mg/kg de peso corporal), sem jejum prévio decorridas 48 horas após a última sessão de treino, para a obtenção de material biológico.

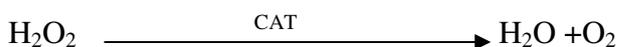
2.7. Avaliações após o sacrifício

2.7.1. Biomarcadores do estado antioxidante no pâncreas

2.7.1.1 -Atividade Catalase (CAT)

Amostras do pâncreas (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato pH, gelado e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -20° C para posterior ensaio.

Os ensaios para dosagem da atividade da catalase foram conduzidos adicionando-se as amostras a tampão fosfato 50 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM, (AEBI, 1984). A queda nos valores de absorvância do H₂O₂ foi seguida espectrofotometricamente a 240 nm, segundo a reação:



O cálculo da atividade da catalase sanguínea foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A_1/A_2)$, onde a é o volume de hemolisado na cubeta e b é o volume total da cubeta, A₁ o valor da absorvância em t=0 e A₂ é o valor da absorvância no tempo final, que em nosso caso se dá aos 15 segundos após o início da reação (AEBI, 1984).

2.7.1.2. Atividade superóxido dismutase (SOD)

Amostras do pâncreas (100 mg) foram inicialmente lavadas com tampão PBS pH 7,4, contendo heparina. Em seguida, foram homogeneizadas em tampão HEPES, contendo: EDTA 1 mM, manitol 210 mM e sacarose 70mM, em banho de gelo e centrifugadas a 100000 rpm por 15 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi estocado a -20° C para posterior análise. Os ensaios foram efetuados utilizando-se kits comerciais.

2.7.2. Biomarcadores de peroxidação lipídica

2.7.2.1- Concentração de produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), formam bases de Schiff. Esses complexos são coloridos e sua concentração foi determinada por espectrofotometricamente a 535 nm (OKAWA et al, 1979). Para esta determinação, amostras do pâncreas (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,05 N e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20° C para posterior dosagem.

2.7.3. Secreção de Insulina Por Ilhotas Isoladas

Em ilhotas pancreáticas isoladas através da digestão por collagenase (LACY; KOSTIANOVSKY, 1967), foi avaliada a secreção estática de insulina em resposta a concentrações crescentes de glicose. Após obtenção das ilhotas, estas foram colhidas com uma micropipeta siliconizada de 100 µl e colocadas em recipientes plásticos (5 ilhotas por frasco), contendo 1 ml de Krebs (Na⁺ 139 mM, K⁺ 5mM, Ca⁺ 1 mM, Cl⁻ 124mM, HCO₃⁻ 24mM). Diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 11,1; e 16,7 mM) foram acrescidas ao meio. Esses recipientes então foram colocados em frascos de vidro lacrados, nos quais foi criada uma atmosfera de carbogênio através da injeção, durante 10 minutos, de uma mistura de O₂/CO₂ (95%/ 5%). Posteriormente, os recipientes foram colocados em banho tipo Dubnoff com agitação a 37° C, durante 60 minutos. Terminada a incubação, o sobrenadante foi recolhido em microtubos de polietileno (eppendorf) e armazenado para determinação da insulina, através de radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

2.7.4. Concentração de Insulina em Ilhotas Isoladas.

Inicialmente foram isoladas ilhotas e colocadas em tubos eppendorf. Posteriormente, o material foi centrifugado durante 20 minutos à temperatura de 15 °C, agitado e transferido para um outro tubo, contendo solução extratora (0,18M HCl em

etanol 96 %). Foi, então, incubado por 24 horas a 4°C e diluído em tampão fosfato pH= 7,4 e armazenado para posterior análise da concentração de insulina por radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

2.8. Análise estatística

A análise dos dados foi feita utilizando teste t-student ou de Análise de Variância ANOVA bifatorial seguido de post hoc Newman-Keuls, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Aos 28 dias foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT) visando avaliar a sensibilidade à insulina apresentada pela taxa de remoção da glicose Kitt(%/min). Os animais aloxânicos apresentaram menor remoção quando comparados aos controles mostrando uma eficácia da administração neonatal de aloxana na instalação de um quadro de resistência à insulina (Figura 2).

A figura 3, mostra a secreção estática de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas em resposta a diferentes concentrações de glicose (5,6mM; 8,3mM e 16,7mM). Aos 120 dias em concentrações mais elevadas de glicose (16,7mM) o grupo aloxana sedentário (AS) apresentou menor secreção do que o controle correspondente, mostrando que a administração da droga levou a uma redução na secreção de insulina indicando destruição parcial das células beta. Em concentração fisiológica de glicose (5,6mM), foi possível observar que o treinamento intermitente aumentou a secreção do hormônio nos animais aloxânicos, (AI>AS, AC e AF). Quando se elevou a concentração de glicose a 8,3mM, observou-se uma maior secreção de insulina nos animais aloxânicos após treinamento contínuo de natação (AC) quando comparado aos grupos AS, AI e AF. Nos animais controles, os treinamentos contínuo e força (CC e CF) reduziram a secreção do hormônio quando comparados ao controle sedentário (CS). O treinamento contínuo foi mais eficaz na elevação da secreção de insulina dos animais aloxânicos (AC), quando comparado aos grupos sedentários e submetidos aos protocolos intermitente e força (AS, AI e AF). Nos animais controles foi possível observar que o treinamento intermitente (CI) levou a menor secreção estática do que os grupos sedentários e treinado contínuo (CS e CC), mas maior secreção do que os animais submetidos ao treinamento de força (CF).

Com relação à concentração total de insulina nas ilhotas pancreáticas, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Figura 4). Além disso foram avaliados os biomarcadores do estado antioxidante (figura 5A e 5B) e de peroxidação lipídica (Figura 6) no pâncreas dos animais. Foram encontradas diferenças na atividade da enzima SOD e na concentração de TBARS. Após treinamento contínuo o grupo controle (CC) apresentou maior atividade da SOD quando comparado ao grupo aloxana contínuo (AC), controle sedentário (CS) e controle força (CF). Em relação à peroxidação lipídica (TBARS) o treinamento contínuo elevou a peroxidação lipídica no pâncreas dos animais aloxanicos (AC) quando comparado aos treinamentos intermitente e força (AI e AF). Além disso, os animais aloxânicos treinados pelo protocolo contínuo de natação (AC) apresentaram maior peroxidação do que o grupo controle (CC).

Teste de tolerância à insulina (ITT) - 28 dias

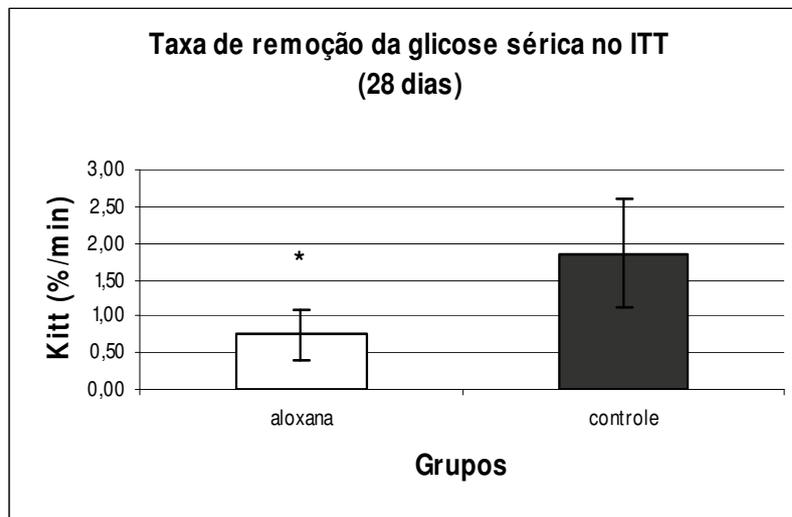


Figura 2. Taxa de remoção da glicose sérica (Kitt, %/min) durante teste de tolerância à insulina (ITT) ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. O símbolo* indica diferença estatística (teste t student, $p < 0,05$) entre os grupos (Aloxana e Controle).

Secreção estática de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas - 120 dias

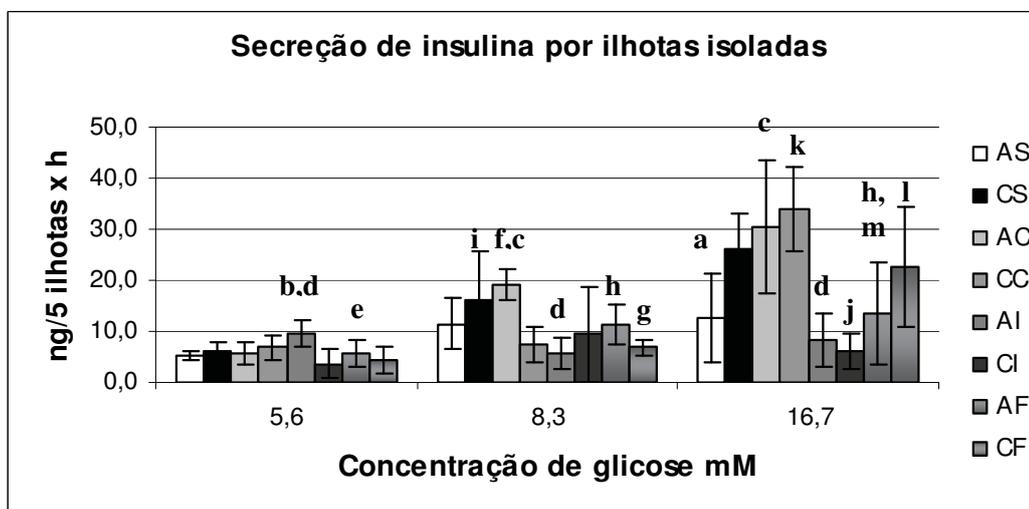


Figura 3. Secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas em resposta a diferentes concentrações de glicose (5,6mM; 8,3mM; 16,7mM) aos 120 dias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinado contínuo, CC: Controle treinado contínuo, AI: Aloxana treinado intermitente, CI: Controle treinado intermitente, AF: Aloxana treinado força, CF: controle treinado força. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman-Keuls, $p < 0,05$) entre os grupos. **a**, diferença estatística entre AS vs CS; **b**, diferença estatística entre AS vs AI; **c**, diferença estatística entre AS vs AC; **d**, diferença estatística entre AC vs AI; **e**, diferença estatística entre AI vs AF; **f**, diferença estatística entre AC vs CC; **g**, diferença estatística entre CS vs CF; **h**, diferença estatística ($p < 0,05$) entre AC vs AF; **i**, diferença estatística entre CS vs CC; **j**, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CS vs CI; **k**, diferença estatística entre CC vs CI; **l**, diferença estatística entre CI vs CF; **m**, diferença estatística entre AF vs CF.

Concentração de insulina em ilhotas isoladas- 120 dias

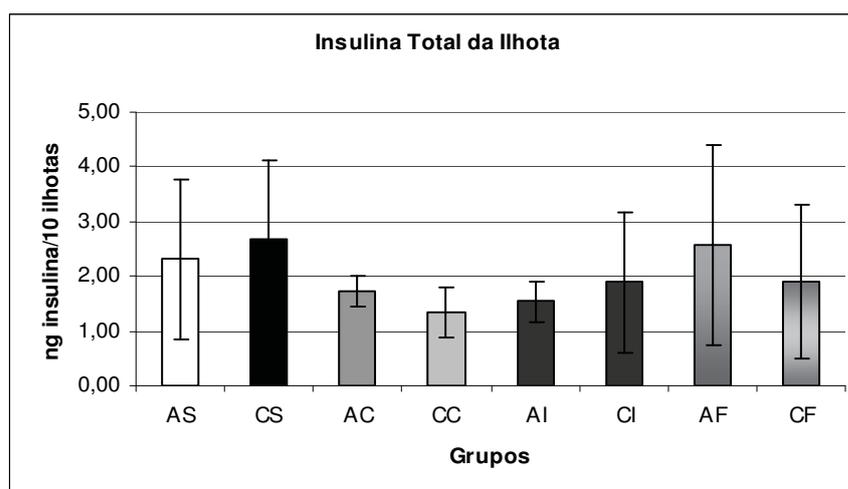


Figura 4. Concentração da insulina em ilhotas isoladas aos 120 dias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinado contínuo, CC: Controle treinado contínuo, AI: Aloxana treinado intermitente, CI: Controle treinado intermitente, AF: Aloxana treinado força, CF: controle treinado força.

Biomarcadores do estado antioxidante pancreático

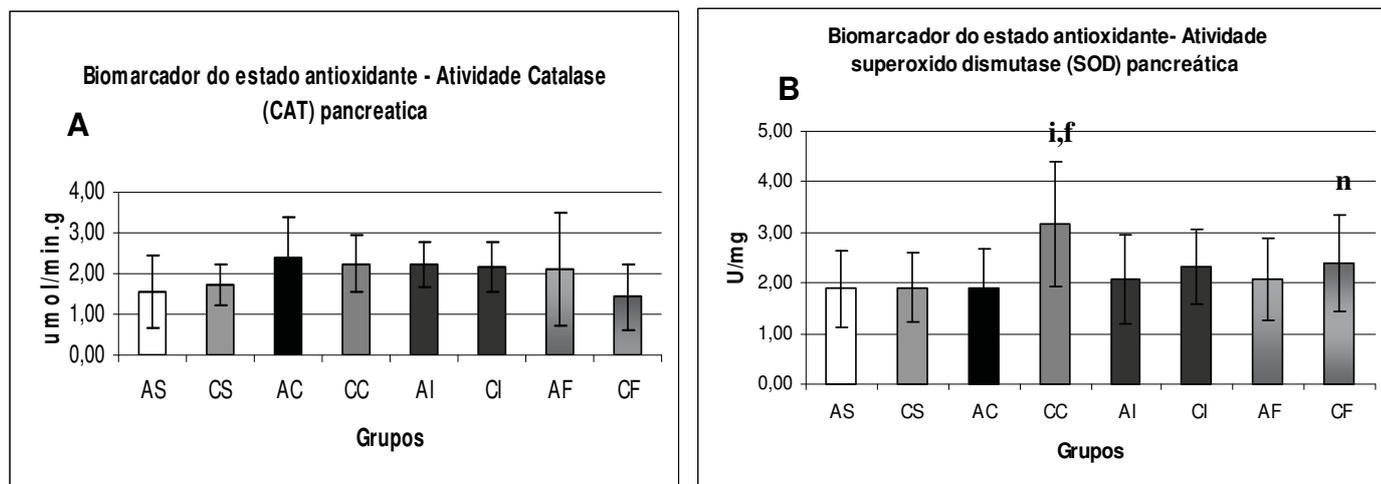


Figura 5A e 5B. Biomarcadores do estado antioxidante no pâncreas dos animais aos 120 dias. Atividade catalase (A) e atividade superóxido dismutase (B). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 10$ animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinado contínuo, CC: Controle treinado contínuo, AI: Aloxana treinado intermitente, CI: Controle treinado intermitente, AF: Aloxana treinado força, CF: controle treinado força. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman-Keuls, $p < 0,05$) entre os grupos. **f**, diferença estatística entre AC vs CC; **i**, diferença estatística entre CS vs CC; **n**, diferença estatística ($p < 0,05$) entre CC vs CF.

Biomarcador de peroxidação lipídica pancreático

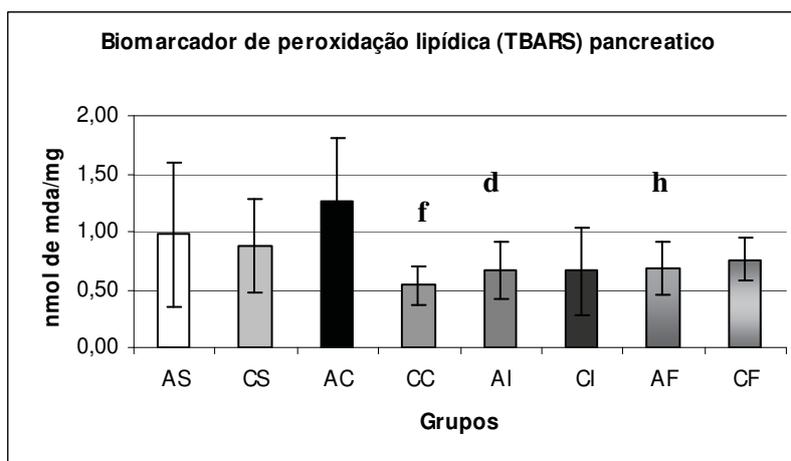


Figura 6. Biomarcador de peroxidação lipídica (TBARS) no pâncreas dos animais aos 120 dias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 10$ animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinado contínuo, AI: Aloxana treinado intermitente, CI: Controle treinado intermitente, AF: Aloxana treinado força, CF: controle treinado força. As diferentes letras indicam diferença estatística (ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman-Keuls, $p < 0,05$) entre os grupos. **d**, diferença estatística entre AC vs AI; **f**, diferença estatística entre AC vs CC; **h**, diferença estatística ($p < 0,05$) entre AC vs AF.

4. DISCUSSÃO

Estudos sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no desencadeamento do (DMT2) (SATO et al., 1979). Os níveis elevados de radicais livres e a simultânea redução dos mecanismos de defesa antioxidante podem levar a danos de organelas celulares e enzimas desencadeando a peroxidação lipídica da membrana. No entanto, tem sido sugerido que exercícios físicos regulares podem melhorar a capacidade de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo (RADAK et al., 2008). Portanto, o presente estudo visa investigar diferentes protocolos de exercício sobre os biomarcadores de estresse oxidativo no pâncreas de ratos aloxânicos.

Os dados do presente estudo demonstraram uma eficácia da administração neonatal de aloxana nos animais visto alteração na sensibilidade à insulina apresentada pelos animais aloxânicos quando avaliada a taxa de remoção da glicose sérica no ITT, aos 28 dias. Estes achados são consistentes a estudos prévios realizados em modelo neonatal com aloxana (OLIVEIRA et al, 2004; CONTARTEZE et al, 2009), que demonstraram menor sensibilidade à insulina nos animais aloxânicos.

Sabe-se que o DMT2 além do quadro de resistência à insulina, apresenta disfunção nas células beta pancreáticas que pode estar associada a diminuição das defesas antioxidantes e ao estado de peroxidação lipídica. Desta forma o presente estudo avaliou a secreção estática de insulina por ilhotas isoladas pancreáticas visando avaliar o efeito da administração neonatal de aloxana bem como o estresse oxidativo. Os animais aloxânicos apresentaram menor secreção de insulina quando comparado aos controles demonstrando disfunção pancreática causada pela aplicação neonatal de aloxana em altas concentrações de glicose (16,7mM) corroborando estudo anterior (OLIVEIRA et al., 2010). Entretanto, Oliveira et al. (2004) não encontraram alteração na secreção de insulina quando utilizaram modelo de indução neonatal de aloxana administrada aos 2 dias de vida nos animais. Assim fica evidente que a administração de aloxana levou a uma destruição parcial das células beta.

Analisando a concentração total de insulina nas ilhotas pancreáticas aos 120 dias nenhuma alteração foi observada entre os grupos estudados. Oliveira et al.(2010), por outro lado, demonstraram maior conteúdo de insulina nas ilhotas pancreáticas nos animais treinados na intensidade do limiar anaeróbio.

Por outro lado quando se avaliou os animais após 12 semanas de treinamento físico nos diferentes protocolos de treinamento observou-se que em diferentes

concentrações de glicose os animais aloxânicos apresentaram melhor resposta a secreção de insulina após treinamento contínuo e intermitente de natação, quando comparados aos animais sedentários e que realizaram treinamento de força. Nos animais controles, os treinamentos contínuo e intermitente geraram melhor resposta secretoria de insulina quando comparados ao treinamento de força. Estudos prévios utilizando modelo de indução neonatal com aloxana demonstraram que o treinamento contínuo de natação em intensidade moderada levou a uma restauração na secreção de insulina em resposta a elevadas concentrações de glicose, nos animais aloxânicos após 4 e 8 semanas de treinamento (OLIVEIRA et al, 2004, 2010). Por outro lado Zawalich et al. (1982) demonstraram que o treinamento aerobio em animais reduziu a secreção de insulina em resposta a diferentes concentrações de glicose. Fluckey et al. (1995) mostraram que após 4 dias de treinamento de força os animais apresentaram maior secreção de insulina por ilhotas pancreáticas. Desta forma nota-se que o treinamento físico em diferentes intensidades e protocolos possui papel importante na função das células beta pancreáticas.

Sugere-se que o comportamento da secreção de insulina induzida por glicose nos animais aloxânicos, possa estar ligada a redução da atividade das enzimas antioxidante bem como aumento na peroxidação lipídica, visto que o estresse oxidativo esta diretamente relacionado ao desencadeamento das alterações pancreáticas causadas pela administração de aloxana (MARITIM et al., 2003). Como forma de avaliar os possíveis efeitos do estresse oxidativo na secreção de insulina foram realizadas análises dos biomarcadores do estado de peroxidação lipídica (TBARS) bem como a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase no pâncreas dos animais.

Com relação a atividade da enzima catalase, nenhuma alteração foi encontrada, mostrando que a administração de aloxana bem como a aplicação de diferentes protocolos de exercício não levaram a modulação deste biomarcador do estado antioxidante. Em ratos adultos tornados diabéticos por estreptozotocina a realização de exercício de alta intensidade aumentou a atividade da enzima catalase no pâncreas dos animais (COSKUN et al., 2004). Atalay et al. (1997) demonstraram que sujeitos diabéticos tipo 1 apresentaram menor atividade da catalase nos eritrócitos quando comparado ao grupo controle mas nenhuma alteração foi apresentada entre os grupos após exercício de intensidade moderada.

Com relação aos biomarcadores do estado de peroxidação lipídica avaliados pela concentração de TBARS entre os grupos treinados, o treinamento contínuo quando

comparado ao treinamento intermitente e força, elevou a peroxidação lipídica no pâncreas dos animais aloxânicos. Coskun et al. (2004) analisando ratos adultos diabéticos mostraram que exercício de natação em diferentes intensidades atenuaram os biomarcadores do estado de peroxidação lipídica no pâncreas dos animais.

A peroxidação lipídica pode ser atenuada por mecanismos de defesa químicos e enzimáticos. Enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase constituem o principal sistema de defesa antioxidante (YU, 1994). Sabe-se que o treinamento físico de endurance ou intervalado induz proteção e diminuição do ataque oxidativo contra os tecidos através da elevação da atividade das enzimas antioxidantes que parecem responder de maneira adaptativa ao exercício físico gerando proteção contra o estresse oxidativo induzido (JENKINS, 1987; ATALAY et al., 1997; PEREIRA et al., 1996).

No presente estudo quando se avaliou a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi possível observar que o treinamento contínuo foi mais eficaz do que o treinamento de força no aumento da atividade enzimática nos animais controles do que nos aloxânicos. A administração de aloxana gerou menor atividade enzimática no grupo aloxana contínuo do que no controle contínuo. Isto se deve ao fato de que a aplicação de aloxana acarretou um prejuízo celular no pâncreas. Coskun et al. (2004) demonstraram maior atividade da SOD no pâncreas dos animais após treinamento de alta intensidade, diferentemente ao encontrado no presente estudo.

Em resumo percebe-se que o treinamento físico em diferentes protocolos, intensidades e periodicidade atua na proteção contra o estresse oxidativo, aumentando as defesas antioxidantes e atenuando o estado de peroxidação lipídica.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 09/51538-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por financiarem esse estudo.

4. REFERENCIAS

- A.D.A Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes care.** 34: S62-S69, 2011
- A.D.A, Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care.** 33: S62-S69, 2010.
- AEBI, H. **Catalase.** In: Methods in Enzymology, edited by L. Packer. Orlando FL: Academic, v.105, p. 121-126, 1984.
- ARAÚJO, G.G; PAPOTI, M; MANCHADO-GOBATTO, F.B; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Padronização de um Protocolo Experimental de Treinamento Periodizado em Natação Utilizando Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte.** v. 16, p. 51-56, 2010.
- ATALAY, M.; LAAKSONEN, D.E.; NISKANEN, L.; UUSITUPA, M.; HANNINEN, O.; SEN, C.K. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise induced oxidative stress. **Acta Physiologica Scandinavica.** v 161, p. 195-201, 1997.
- AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação.** 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiologia) Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- BRAGA, L. R., MELLO, M. A., ou de MELLO, M. AR, GOBATTO, C. A.Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.** v.54, p.58 - 65, 2004.
- CERIELLO A. Oxidative stress and glycemic regulation. **Metabolism.** v. 49, p.27–29, 2000.
- CONTARTEZE, R.V.L; MOTA, C.S.A; OLIVEIRA, C.A.M; LEME, J.A.C.A; BOTTCHEER, L.B; MELLO, M.A.R; LUCIANO, E. Exercise test and glucose homeostasis in rats treated with alloxan during the neonatal period or fed a high calorie diet. **Journal of Diabetes.** v. 1, p. 65–72, 2009.
- COSKUN O.; OCAKCI A.; BAYRAKTAROGLU T.; KANTER N. Exercise training prevents and protects streptozotocin induced oxidative stress and B cell damage in rat pancreas. Tohoku **J. Exp. Med.**v. 203, p.145-154, 2004.
- FLUCKEY, J.D.; KRAEMER, W.J.; FARRELL, PA. Pancreatic islet insulin secretion is increased after resistance exercise in rats. **J Appl Physiol.**v. 79, p.1100-5, 1995.
- GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology,** New York, v.130, n.1, p. 21-27, 2001.

HAYASHIA, T.; HIRANO, T.; YANAMOTO, T.; ITO, Y.; ADACHI, M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. **Metabolism Clinical and experimental**, New York, v.55, p. 879-884, 2006.

HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTLIEB, C.W.; BLEICHER, S.T. Coated Charcoal immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology**, Baltimore, v. 25, p.1375-1384, 1965.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry: Relationship to exercise. **Sports Med.** v.5, p.156-170, 1987.

KAKKAR, R.; MANTHA, S. V.; RADHI, J.; PRASAD, K.; KALRA, J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. **Clinical Science** v. 94, p. 623- 632, 1998.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of the intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, Alexandria, v. 16, p. 35, 1967.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v.18, p.47-60, 1997.

LUNDBAECK K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **British Medical Journal**. v.2, p. 1507-1513, 1962.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **J biochem molecular toxicology**. v 17, p. 24-38, 2003.

OKAWA, H., NOBUKO, O. AND YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem** v.95,p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO.; MELLO, M.A R. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Experimental Physiology**, New York, v.90, n.1, p. 79-86, 2004.

ÖZKAYA, Y.G.; AGAR, A.; YARGICOGLU, P.; et al. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. **Diab. Metab**, vol.28, p.377-84, 2002.

PAULI, J.R. **Efeitos do treinamento físico sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos administrados com dexametasona**. 2005,154p, tese (dissertação-mestrado em Ciências da Motricidade- Biodinâmica) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

PEREIRA., B.; COSTA ROSA, L. F. P. B.; BECHARA, E. J. H.; CURI, R. Antioxidant enzymes in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to moderate exercise. **Cienc. Cult.** São Paulo, v.48, n.43-46, 1996.

RADAK, Z.; CHUNG, H.Y.; GOTO. S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med.** v. 44, p.153–159, 2008.

RIBEIRO C.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO,E.; MELLO, M. A. R. Diabetes evolution in rats after neonatal treatment with alloxan. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.177-178, 2005.

ROGGATO,G.P.; OLIVEIRA,C.A.M.; FARIA,M.C.; LUCIANO,E. Respostas metabólicas agudas de ratos wistar ao exercício intermitente de saltos. **Motriz**, v.10,p. 61-66, 2004.

SATO, Y.; HOTTA, N.; SAKAMOTO, N.; MATSUOKA, S.; OHISHIN YAGI, K. Lipid peroxide level in the plasma of diabetic patients. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**.v. 21, p. 104-107, 1979.

SHAH, S.; IQBAL, M.; KARAM, J.; SALIFU, M.; Mc-FARLANE, S.I. Oxidative stress, glucose metabolism, and the prevention of type 2 diabetes: pathophysiological insights. **Antioxid Redox Signal**. v. 9, p.911–929, 2007.

SIMMONS, R.A. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**. v.40, p.917–922, 2006.

TERBLANCHE, S.E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. **Cell Biol Int**. v. 23, p.749-53, 2000.

YU., B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev**. Washington, v.74, p.139-161, 1994.

ZAWALICH, W.; MATURO, S.; FELIG, P. Influence of physical training on insulin release and glucose utilization by islet cell and liver glucokinase activity in the rat. **Am J Physiol**. v.243, p.464-9, 1982.

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO EM DIFERENTES INTENSIDADES
DE ESFORÇO SOBRE METABOLISMO DOS LIPÍDIOS DE RATOS
SUBMETIDOS À APLICAÇÃO NEONATAL DE ALOXANA.**

Carla Ribeiro¹, Lucieli Teresa Cambri¹, Rodrigo Augusto Dalia¹, Michel Barbosa de Araújo¹, José Diego Botezelli, Amanda Christine da Silva Sponton, Maria Alice Rostom de Mello¹.

1-Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Educação Física, Rio Claro – São Paulo – Brasil.

Endereço para correspondência:

Carla Ribeiro

Av. 24 A, 1515, Bela Vista – Rio Claro –SP

CEP 13506-900

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Instituto de Biociências – Departamento de Educação Física

Laboratório de Biodinâmica

Tel: +55 19 35264308

E-mail: Carla_ef_rc@yahoo.com.br

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença crônica caracterizada por resistência à insulina e seu desenvolvimento está diretamente associado a incapacidade da insulina em exercer suas ações não apenas no metabolismo dos carboidratos mas principalmente no metabolismo dos lipídios. Portanto, o presente estudo visa comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre as variáveis séricas e teciduais no metabolismo dos lipídios de ratos aloxânicos. Ratos da linhagem wistar foram utilizados e divididos em oito grupos: Aloxana sedentário (AS), Controle sedentário (CS), Aloxana treinado em exercício contínuo (AC), Aloxana treinado em exercício intermitente (AI), Aloxana treinado em exercício força (AF), Controle treinado em exercício contínuo (CC), Controle treinado em exercício intermitente (CI) e Controle treinado em exercício força (CF). O diabetes foi induzido por aloxana em ratos neonatos aos 6 dias de vida (250mg/Kg p.c). O protocolo de treinamento contínuo consistiu em: 12 semanas de treinamento de natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. O protocolo de treinamento intermitente consistiu em 12 semanas de treinamento de natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso corporal. O protocolo de treinamento de força consistiu em 12 semanas de treinamento, 4 series de 10 saltos na água em tanques individuais (50cm altura x 25 largura) com 1 min de intervalo entre as series suportando sobrecarga de 50% do peso corporal. Os animais foram avaliados in vivo quanto a: taxa de remoção da glicose avaliada pelo Kitt (%/min) durante teste de tolerância à insulina - ITT. Aos 120 dias de idade e decorridas 48 horas das avaliações in vivo, os animais foram sacrificados para a coleta de material, visando análises séricas (AGLs, Triglicerídios, Colesterol total e lipídios totais) e teciduais (Gastrocnêmio, fígado e coração) do metabolismo dos lipídios. Aos 28 dias observou-se que os animais aloxânicos apresentaram maior resistência à insulina, avaliada através da remoção de glicose sérica (Kitt%/min) durante ITT. Aos 120 dias, foram encontradas diferenças nas concentrações séricas de AGLs, Colesterol total e Lipídios totais. Em relação aos valores de AGL, os animais aloxânicos sedentário (AS) mostraram maiores valores do que os animais aloxânicos após treinamento contínuo (AC) e intermitente de natação (AI); Além disso, os animais aloxânicos que realizaram treinamento intermitente (AI) e força (AF) apresentaram menores valores desta variável em relação aos controles correspondentes (CI e CF); O protocolo de treinamento contínuo foi menos eficaz do que o protocolo de treinamento força em reduzir os níveis de colesterol total nos animais aloxânicos (AC>AF). Os valores séricos de lipídios totais também avaliados mostraram que o treinamento intermitente aumentou os níveis séricos nos animais aloxânicos (AI> AS, AC, AF e CI). Diferenças foram encontradas no tecido hepático, onde os animais aloxânicos submetidos ao treinamento contínuo de natação apresentaram menores valores (AC< AS,AI,AF). Assim,

conclui-se que treinamento físico em diferentes intensidades de esforço é de grande importância na atenuação e controle das alterações sobre o metabolismo dos lipídios em animais aloxânicos.

Palavras Chave: Ratos neonatos, aloxana, treinamento físico, metabolismo dos lipídios.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a incidência do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) tem aumentado consideravelmente (ADA, 2010). Esta, trata-se de uma doença crônica caracterizada por resistência à insulina (HAYASHIA et al., 2006, ADA, 2011) e seu desenvolvimento está diretamente associado a incapacidade da insulina em exercer suas ações não apenas no metabolismo dos carboidratos mas principalmente no metabolismo dos lipídios além de sua ação anabólica e anticatabólica (MAY, 1989, ADA, 2012).

Desta forma, para proteger o organismo contra esta resposta diminuída às ações biológicas da insulina nos tecidos periféricos e reduzir as alterações metabólicas geradas pela resistência à insulina, o exercício físico tem sido amplamente empregado. Este leva a aumentos na captação de glicose (THYFAULT, 2008; VENABLES & JEUKENDRUP, 2008) principalmente em tecido muscular e adiposo, através do aumento da translocação do Glut-4 (MISRA et al., 2008, TSUKUMO et al., 2007) para a membrana durante a contração muscular, redução da gordura corporal, aumento da oxidação do tecido adiposo (SOLOMON et al, 2008), diminuindo a atividade de proteínas inflamatórias de efeito negativo a ação da insulina, além da melhora no perfil lipídico e sensibilidade à insulina (MISRA et al., 2008).

Assim, nota-se que o treinamento físico possui papel importante na modulação das respostas metabólicas causadas pela resistência à insulina no DMT2. No entanto, faltam evidências diretas quanto ao efeito preventivo do exercício sobre a instalação do quadro de DMT2, especialmente quando se leva em consideração a intensidade do esforço, periodicidade e protocolo de treinamento a serem prescritos no diabetes mellitus tipo 2, uma vez que este tipo de pesquisa é de execução mais difícil em seres humanos. Nesse contexto, modelos de animais proporcionam condições mais adequadas ao estudo dessa questão. Desta forma, o diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregado como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007) bem como os efeitos do exercício físico na resistência à insulina e metabolismo das gorduras.

Oliveira et al. (2004) utilizando modelo neonatal de aloxana encontraram maiores níveis de AGL e lipídios do fígado nos animais aloxânicos e após 8 semanas de treinamento contínuo de natação em intensidade moderada estes valores reduziram, evidenciando a importância do exercício físico no metabolismo das gorduras. Ribeiro et

al. (2005) não encontraram alteração no teor de AGL dos animais quando administraram aloxana em ratos aos 6 dias de vida. Já em ratos adultos tornados diabéticos pela aplicação de estreptozotocina os autores encontraram maiores concentrações de AGL nos animais após exercício agudo de alta intensidade (FERREIRA et al., 2001). Moura et al. (2011) analisando metabolismo dos lipídios de animais aloxânicos adultos não encontraram diferenças nas concentrações de triglicerídios, colesterol total e AGL nos animais, após 44 dias de treinamento contínuo em intensidade moderada de natação. Barakat et al. (1987) mostraram que a capacidade do fígado de animais aloxânicos em sintetizar lipídios totais, diglicerídios ou triglicerídios foi semelhante aos animais controles. Após 7 dias de treinamento em esteira com intensidade moderada esta situação se manteve. Diabetes induzido pela aplicação de aloxana resultou em hipertrigliceridemia em animais adulto (LEME et al., 2009). O exercício físico contínuo de natação em intensidade moderada reduziu estes níveis (LEME et al., 2009). Sugeriu-se que esta alteração induzida pelo treinamento físico na trigliceridemia dos animais se deva a uma modulação na atividade da enzima lipase lipoproteica (KRAUS et al., 2001, HAMILTON et al., 2001).

Por outro lado, informações sobre os efeitos da administração neonatal de aloxana bem como a aplicação de diferentes protocolos de exercício físico sobre o metabolismo dos lipídios são escassas. Deste modo, o presente estudo visa comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre as variáveis séricas e teciduais no metabolismo dos lipídios de ratos aloxânicos.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos adultos (90 dias) da linhagem Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP- Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos no Biotério do setor de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP - Campus de Rio Claro em sala com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e foto período claro/escuro de 12/12 horas com as luzes acesas das 6:00 às 18:00hs, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada para roedores - Purina®). Os procedimentos adotados com os animais foram aprovados pelo Comitê de ética para experimentação animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU), parecer- CEEA/UNITAU nº 019/08.

2.2. Aplicação neonatal de aloxana

Aos seis dias de idade os filhotes machos, com peso médio de $11,9 \pm 1,2g$, receberam injeção intra-peritoneal (250mg/Kg de peso corporal) de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (LUCIANO; LIMA, 1997), após jejum de 15 horas. Como controles foram utilizados ratos da mesma idade e sexo injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamentasse 8 filhotes.

2.3. Delineamento e Grupos Experimentais

Aos 28 dias de idade, os filhotes compuseram 8 grupos com 10 animais em cada um, que permaneceram em observação até os 120 dias de idade (Figura 1).

- Controle (CS): ratos injetados com tampão citrato não submetidos a treinamento;
- Controle Treinamento Contínuo (CC): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Controle Treinamento Intermitente (CI): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Controle Treinamento de Força (CF): ratos injetados com tampão citrato e submetidos ao programa de treinamento de força.
- Aloxana(AS): ratos injetados com aloxana não submetidos a treinamento.
- Aloxana Treinamento Contínuo (AC): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento contínuo.
- Aloxana Treinamento Intermitente (AI): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento intermitente.
- Aloxana Treinamento de Força (AF): ratos injetados com aloxana e submetidos ao programa de treinamento de força.

2.4. Treinamento físico

Os animais realizaram inicialmente um período de adaptação que consistiu em: primeiramente, foram submetidos a um reconhecimento do meio aquático por 15 minutos; no dia seguinte aumentou-se o nível de água e realizaram natação durante 15

minutos; no 3^o dia foram colocados para nadar no nível de água em que treinaram durante o experimento por 25 minutos; no 4^o dia nadaram durante 30 minutos com sobrecarga atada ao dorso equivalente a 3% do peso corporal; no 5^o dia de adaptação a sessão foi de 40 minutos com sobrecarga equivalente à 5% do peso corporal. Em seguida, foi iniciado o período de treinamento.

Os animais dos grupos treinados por programa de exercício contínuo foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação, 1 hora ininterrupta por dia, 5 dias por semana, em tanques individuais (50cm altura x 25 largura), suportando sobrecarga de 5% do peso corporal. Esta intensidade de esforço corresponde à transição metabólica aeróbia/anaeróbia para ratos durante a natação (GOBATTO et al., 2001). Os animais dos grupos treinados por programa intermitente foram submetidos, do desmame aos 120 dias, à natação 30 s de atividade intercalados com 30 s de repouso, em tanques individuais (50 cm altura x 25 largura), num total de 20 min por dia, 5 dias por semana, com sobrecarga de 15 % do peso (Protocolo adaptado, tendo como base o protocolo de BRAGA et al., 2004). Os protocolos de treinamento tiveram sua carga semanal total de treinamento (CST) equivalente. Segundo Araújo et al. (2010), a CST corresponde ao somatório de estímulos de treinamento obtido pelo produto do tempo de esforço (t) e a intensidade (%). Assim neste estudo o treinamento contínuo teve $CST = 60\text{min} \times 5\% = 300$ equivalente ao treinamento intermitente $CST = 20\text{min} \times 15\% = 300$.

Os animais que realizaram treinamento de força, foram submetidos a 4 séries de 10 saltos na água, interrompidos por 1 min de repouso entre elas, 5 dias por semana, em tanques individuais, com sobrecarga de 50% do peso corporal (ROGATTO et al., 2004). A temperatura da água foi mantida em $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante a realização do exercício, por ser esta temperatura considerada termicamente neutra em relação à temperatura dos ratos (AZEVEDO, 1994; PAULI, 2005).

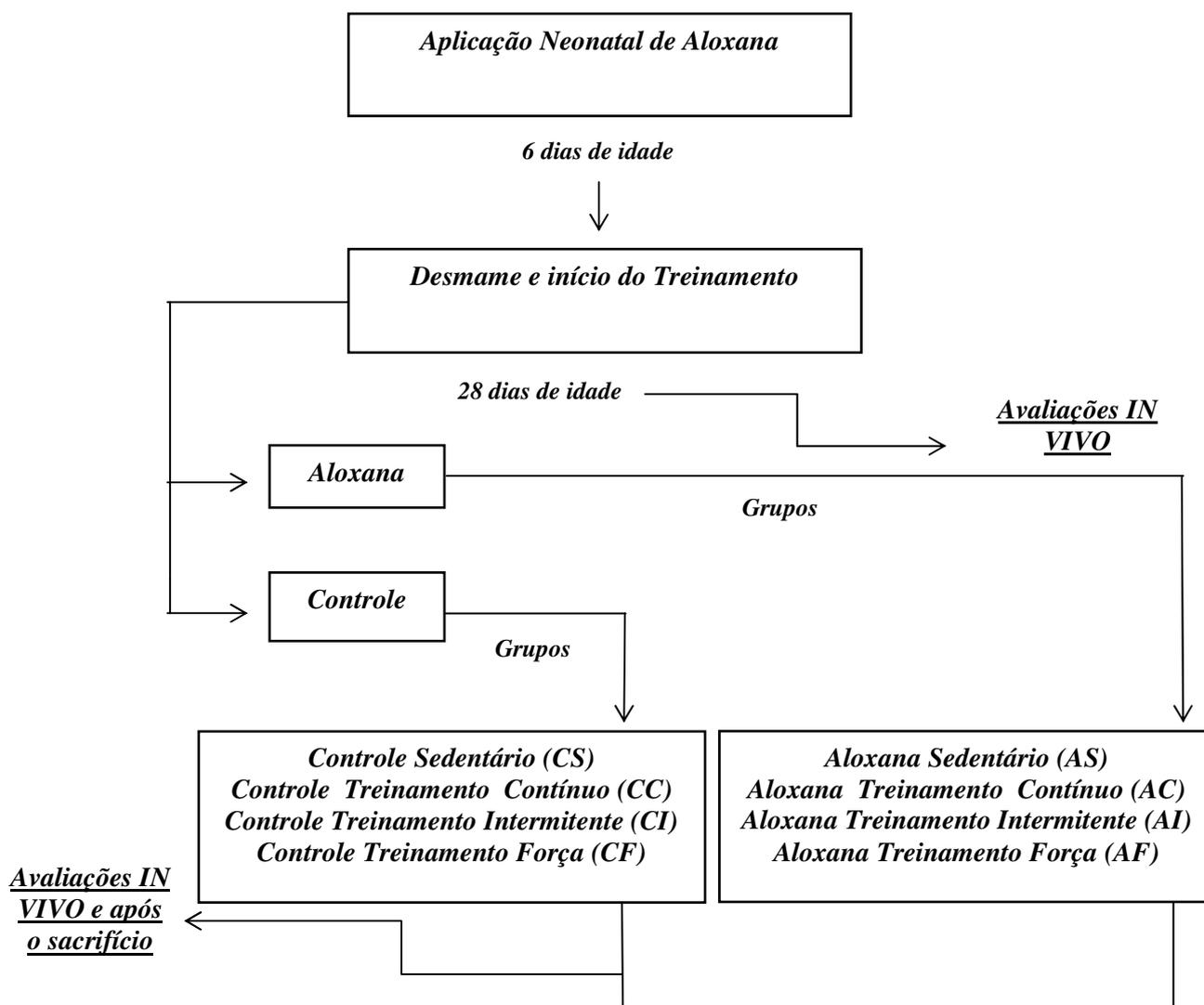


Figura 1. Desenho experimental

2.5. Avaliações *in vivo*

2.5.1. Sensibilidade à insulina

Para estimar a sensibilidade à insulina dos animais aos 28 dias de idade foi utilizado o teste de tolerância à insulina (ITT). O teste consistiu na aplicação de solução de insulina (30mU/100g de peso corporal), via subcutânea, na região dorsal. Amostras de sangue (25µl) foram coletadas em capilares heparinizados, por meio de pequeno corte na extremidade da cauda, nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para determinação da glicose (Kit glicose - Laborlab: CAT nº 02200- Guarulhos- SP). Uma única incisão na cauda foi suficiente para a obtenção de todas as amostras. A taxa de remoção de glicose (Kitt) expressa em %/minuto foi calculada pela fórmula $(0,693/t/2) \times 100$. A glicose sanguínea ($t/2$) foi calculada pela curva de análise dos mínimos quadrados dos

teores de glicose sérica enquanto houver decréscimo linear dos mesmos após a administração de insulina (LUNDBAEK, 1962).

2.5.2. Teste de esforço

Para avaliar o efeito do treinamento foram realizados testes de esforço, visando análise da cinética do lactato sanguíneo aos 120 dias de idade. Os ratos treinados pelo protocolo contínuo foram submetidos a 30 min de natação ininterrupta com sobrecarga de 5% do peso corporal, aqueles treinados pelo protocolo intermitente, foram submetidos a 30 s de natação intercalados com 30 s de repouso, totalizando 20 min, com sobrecarga de 15% do peso corporal, e os animais treinados pelo protocolo de força realizaram 4 séries de 10 saltos na água, interrompidos por 1 min de repouso entre elas, com sobrecarga de 50% do peso corporal. Para fins de comparação, ratos sedentários foram, também submetidos aos testes descritos anteriormente. Foram coletadas amostras sanguíneas (25µL) em capilares heparinizados para análise da concentração de lactato. O sangue foi coletado em repouso e a cada 5 minutos de exercício para o protocolo contínuo; e a cada 5 min de esforço no protocolo intermitente. Para protocolo de força as coletas foram realizadas, após a realização de cada série de salto, e 5, 7, 9, 13 e 15min após o término das quatro séries. As coletas foram feitas através de pequeno corte na extremidade distal da cauda do animal. Uma única incisão no início do teste é suficiente para a obtenção de todas as amostras. A dosagem do lactato foi realizada pelo método enzimático (ENGELS & JONES, 1978).

2.6. Sacrifício dos animais

Aos 120 dias de idade todos os animais foram sacrificados por decapitação, após anestesia profunda com amobarbital sódico (15 mg/kg de peso corporal), sem jejum prévio decorridas 48 horas dos testes de tolerância à glicose e/ou 48 horas após a última sessão de treino, para a obtenção de material biológico.

2.6.1. Avaliações após o sacrifício

2.6.1.1 Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação das concentrações de ácido graxo livre (AGL), triglicerídios, colesterol total, e lipídios totais por espectrofotometria com kit comercial (Laborlab®, Guarulhos - SP/Brazil).

2.6.2 Tecidos

2.6.2.1- Tecido Adiposo

O tecido adiposo das regiões subcutânea posterior, mesentérica e retroperitoneal foi removido para pesagem e determinação das concentrações de lipídios totais. A excisão dos diferentes depósitos de gordura foi realizada de acordo com a descrição de Cinti (2005). As concentrações de lipídios nesses depósitos foram determinadas pelo procedimento descrito por Nogueira et al. (1990).

2.6.2.2- Fígado, coração e músculo gastrocnêmio.

Nesses órgãos foram avaliadas as concentrações de lípidios totais.

2.7. Análise estatística

A análise dos dados foi feita utilizando teste t-student ou de Análise de Variância ANOVA bifatorial seguido de post hoc Newman-Keuls, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Aos 28 dias foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT) visando avaliar a sensibilidade à insulina apresentada pela taxa de remoção da glicose Kitt (%/min). Os animais aloxânicos apresentaram menor remoção quando comparados aos controles mostrando uma eficácia da administração neonatal de aloxana na instalação de um quadro de resistência à insulina (Figura 2).

Além disso, foi realizado teste de esforço aos 120 dias (figura 3) para avaliar o efeito dos diferentes protocolos de treinamento contínuo intermitente e força através da cinética do lactato. Analisando as concentrações de lactato do treinamento contínuo foi possível observar que o grupo aloxana treinado (AC) apresentou maior lactacidemia de repouso em relação ao seu correspondente sedentário (AS) e ao controle treinado (CC). Diferenças também foram encontradas no teste referente ao treinamento intermitente. A cinética do lactato indicou que o grupo aloxana sedentário (AS) obteve maiores valores do que o grupo aloxana treinado (AI) que apresentou menor concentração do que seu correspondente controle (CI) no repouso. Além disso, o grupo controle sedentário (CS) mostrou menor concentração de lactato em relação ao controle treinado (CI) ao final do teste. Analisando a lactacidemia dos animais submetidos ao protocolo de treinamento de força foi possível observar que durante todo o teste os animais controle sedentário (CS) apresentaram maiores concentrações do que os animais controle treinado (CF). Os animais aloxana sedentário (AS) mostraram maiores valores do que os grupos controle sedentário (CS) e aloxana treinado (AF) 5 min após término do teste e após a terceira série de saltos respectivamente. Após 9 min do término do teste os animais aloxana treinado (AF) mostraram maiores concentrações do que o grupo controle correspondente (CF) evidenciando maior lactacidemia dos animais aloxânicos e sedentários.

Com relação às variáveis AGL, Triglicerídios, Colesterol total e Lipídios totais séricas apresentadas na tabela 1 foram observadas as seguintes alterações: Em relação aos valores de AGL, os animais aloxânicos sedentário (AS) mostraram maiores valores do que os animais aloxânicos após treinamento contínuo e intermitente de natação (AC e AI); o grupo controle após treinamento contínuo (CC) apresentou menores valores de AGL do que os grupos controles sedentário (CS), treinado intermitente (CI) e força (CF). Além disso, os animais aloxânicos que realizaram treinamento intermitente (AI) e força (AF) apresentaram menores valores desta variável em relação aos controles correspondentes (CI e CF). Nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações de triglicerídios. Em relação aos valores referentes ao colesterol total, o protocolo de treinamento contínuo foi menos eficaz do que o protocolo de treinamento força em reduzir os níveis nos animais aloxânicos (AC>AF). Os valores séricos de lipídios totais também avaliados mostraram que o treinamento intermitente aumentou os níveis séricos nos animais aloxânicos (AI> AS, AC, AF e CI). Já em relação aos lipídios avaliados nas

porções retroperitoneal, mesentérica e subcutânea do tecido adiposo dos animais, nenhuma diferença foi encontrada (Tabela 2).

A tabela 3 apresenta os resultados referentes aos lipídios do músculo gastrocnêmico, tecido hepático e coração mensurado nos animais aos 120 dias. Diferenças foram encontradas apenas no fígado, onde os animais aloxânicos submetidos ao treinamento contínuo de natação apresentaram menores valores (AC < AS, AI, AF e CC), mostrando a importância do treinamento aeróbio no controle de possíveis alterações lipídicas causadas no tecido hepático pela resistência à insulina.

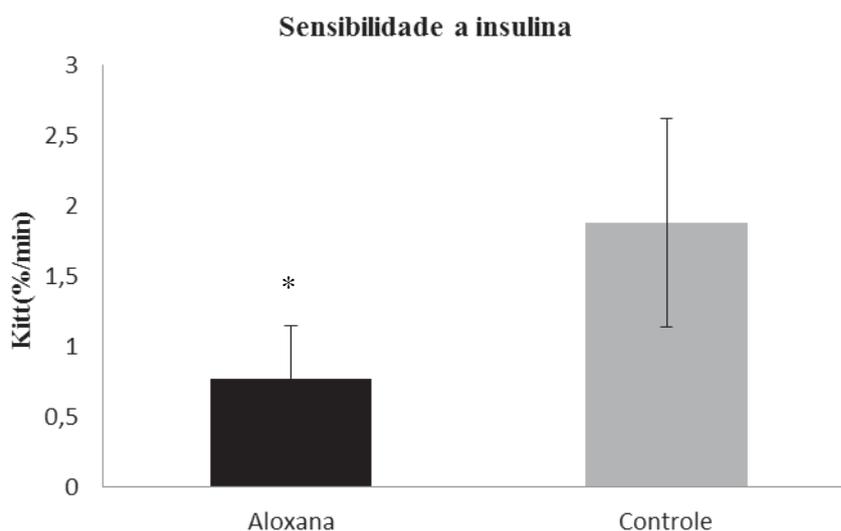


Figura 2. Taxa de remoção da glicose sérica (Kitt, %/min) durante teste de tolerância à insulina (ITT) ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média \pm desvio padrão, n= 10 animais por grupo. O símbolo* indica diferença estatística (teste t student, $p < 0,05$) entre os grupos (Aloxana e Controle).

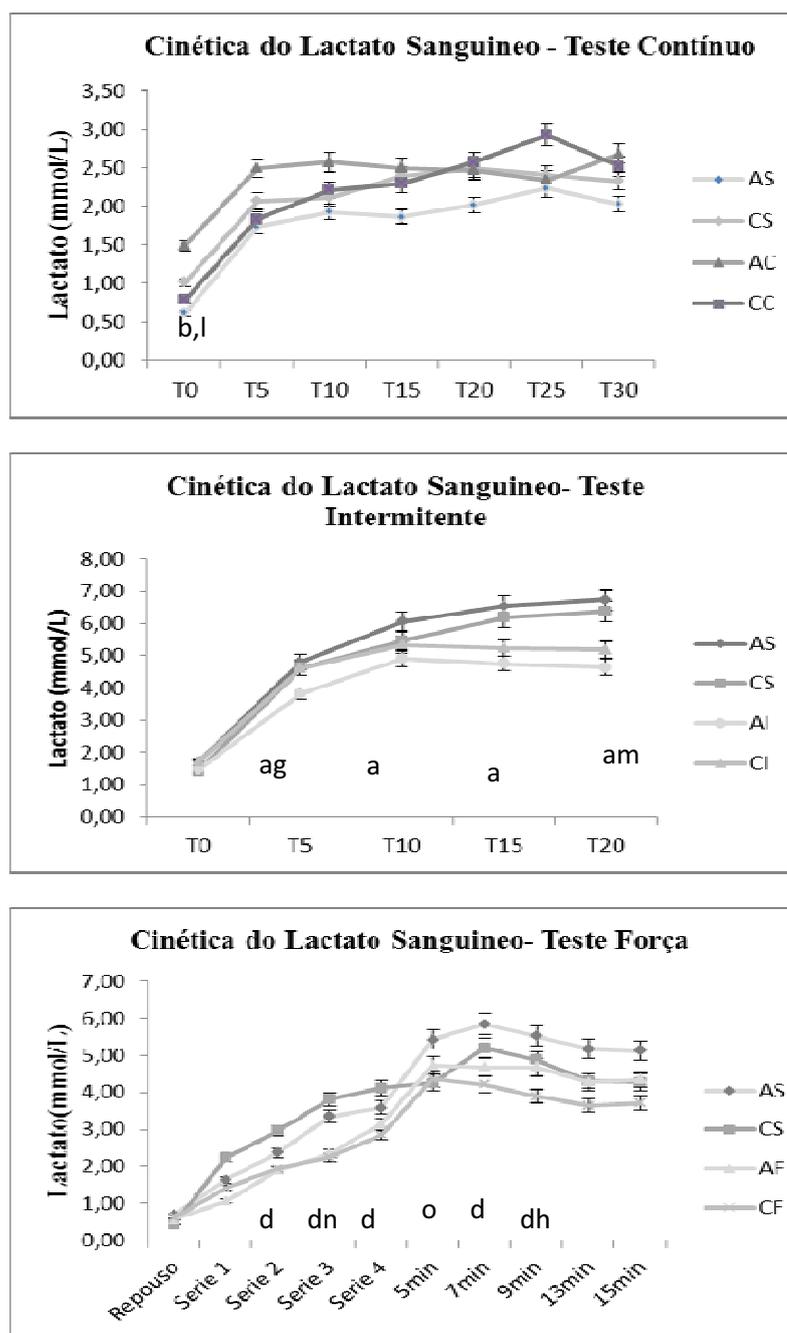


Figura 3. Cinética do Lactato Sanguíneo durante teste de esforço no Treinamento Contínuo, Intermitente e Força realizado ao final do experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n=10$ animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinamento contínuo, CC: Controle treinamento contínuo, AI: Aloxana treinamento intermitente, CI: Controle treinamento intermitente, AF: Aloxana treinamento força e CF: Controle treinamento força. As letras indicam diferença estatística ((ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman-Keuls, $p<0,05$)) entre os grupos. a, diferença estatística entre AS vs AI; d, diferença estatística entre CS vs CF; g, diferença estatística entre AI vs CI; h, diferença estatística entre AF vs CF; m, diferença estatística entre CS vs CI; n, diferença estatística entre AS vs AF; o, diferença estatística entre AS vs CS.

Tabela 1: AGL, Triglicerídios, Colesterol Total e Lipídios séricos mensurados aos 120 dias dos animais.

Variáveis	AS	CS	AC	CC	AI	CI	AF	CF
AGL séricos (µEq/L)	539,2± 116,5 _{ab}	498,6± 111,7 _{cd}	392,5± 111,3	334,9± 105,6 _{ef}	390,0± 92,4 _g	564,8± 120,7	438,2± 94,4 _h	659,1± 78,7
Triglicerídios (mg/dL)	215,3± 47,8	245,0± 69,2	274,0± 67,1	197,5± 57,5	278,3± 93,9	262,7± 58,2	228,5± 51,8	280,3± 106,1
Colesterol Total(mg/dL)	85,4± 14,8	89,1± 14,2	88,5± 21,1 _i	85,9± 15,3	84,9± 9,1	77,0± 6,7	70,4± 7,1	79,9± 10,6
Lipídios Totais(mg/dL)	345,5± 53,3 _a	328,0± 73,6	379,7± 58,3 _j	315,9± 53,6	444,1± 107,7 _{gk}	362,9± 54,7	330,1± 53,3	329,1± 78,8

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinamento contínuo, CC: Controle treinamento contínuo, AI: Aloxana treinamento intermitente, CI: Controle treinamento intermitente, AF: Aloxana treinamento força e CF: Controle treinamento força. As letras indicam diferença estatística ((ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman- Keuls, p<0,05)) entre os grupos. a, diferença estatística entre AS vs AI; b, diferença estatística entre AS vs AC; c, diferença estatística entre CS vs CC; d, diferença estatística entre CS vs CF; e, diferença estatística entre CC vs CI; f, diferença estatística entre CC vs CF; g, diferença estatística entre AI vs CI; h, diferença estatística entre AF vs CF; i, diferença estatística entre AC vs AF; j, diferença estatística entre AC vs AI; k, diferença estatística entre AI vs AF.

Tabela 2: Lipídios do tecido adiposo avaliado nas porções retroperitoneal, mesentérica e subcutânea dos animais aos 120 dias.

Lipídios Tecido Adiposo	AS	CS	AC	CC	AI	CI	AF	CF
Retroperitoneal (mg/100mg)	62,6 ± 11,7	54,2± 15,0	57,0± 17,8	62,5 ± 9,7	53,2± 8,6	49,5± 7,5	60,1± 16,0	55,3± 16,0
Mesentérica (mg/100mg)	44,5 ± 11,4	43,6± 11,4	43,6 ± 10,2	36,7 ± 10,5	42,0 ± 7,4	38,0 ± 3,2	36,7 ± 4,3	42,5 ± 8,7
Subcutânea (mg/100mg)	43,2± 8,0	43,0± 9,4	41,1± 8,0	40,7± 12,0	37,8± 6,8	42,8± 6,0	38,9± 6,7	32,5± 4,2

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinamento contínuo, CC: Controle treinamento contínuo, AI: Aloxana treinamento intermitente, CI: Controle treinamento intermitente, AF: Aloxana treinamento força e CF: Controle treinamento força. As letras indicam diferença estatística ((ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman- Keuls, p<0,05)) entre os grupos.

Tabela 3: Lipídios do músculo gastrocnêmico, tecido hepático e coração mensurados nos animais aos 120 dias.

Lipídios	AS	CS	AC	CC	AI	CI	AF	CF
Músculo Gastrocnêmico (mg/100mg)	3,0 ± 0,8	2,6± 0,5	2,9± 0,8	2,4 ± 0,4	2,6± 0,5	2,6± 0,8	2,7± 0,4	2,4± 0,5
Fígado (mg/100mg)	5,7 ± 1,0 _b	5,0± 0,9	4,5 ± 0,9 _{i,j}	5,8 ± 0,9	5,9 ± 0,9	5,5 ± 0,6	5,7 ± 0,7	5,4 ± 0,6
Coração (mg/100mg)	5,2± 0,8	5,5± 1,4	7,2± 2,1	6,2± 1,1	6,3± 1,9	6,3± 1,6	6,5± 1,9	6,2± 0,9

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 10 animais por grupo. AS: Aloxana sedentário, CS: Controle sedentário, AC: Aloxana treinamento contínuo, CC: Controle treinamento contínuo, AI: Aloxana treinamento intermitente, CI: Controle treinamento intermitente, AF: Aloxana treinamento força e CF: Controle treinamento força. As letras indicam diferença estatística ((ANOVA bifatorial (3x2) e teste post hoc Newman- Keuls, p<0,05)) entre os grupos. b, diferença estatística entre AS vs AC; i, diferença estatística entre AC vs AF; j, diferença estatística entre AC vs AI; l, diferença estatística entre AC vs CC.

4. DISCUSSÃO

O Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença crônica que acomete cerca de 90 a 95% dos diabéticos (ADA, 2012) e tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. A causa do DMT2 é uma combinação de uma resistência à ação da insulina bem como uma resposta compensatória da secreção do hormônio, levando a alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas devido a uma ação deficiente da insulina nos tecidos alvos periféricos os quais apresentam uma diminuição na resposta em um ou mais pontos da via de sinalização do hormônio (ADA, 2012, MAY, 1989). O risco de desenvolver este tipo de diabetes aumenta com idade, obesidade e inatividade física contribuindo assim por um desbalanço metabólico principalmente no perfil lipídico. Deste modo, o presente estudo visou comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre as variáveis séricas e teciduais no metabolismo dos lipídios de ratos aloxânicos.

Os dados do presente estudo demonstraram uma eficácia da administração neonatal de aloxana nos animais visto alteração na sensibilidade à insulina apresentada pelos animais aloxânicos quando avaliada a taxa de remoção da glicose sérica no ITT, aos 28 dias. Estes achados são consistentes a estudos prévios realizados em modelo

neonatal com aloxana (OLIVEIRA et al., 2004; CONTARTEZE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011), que demonstraram menor sensibilidade à insulina nos animais aloxânicos.

Sabe-se que o treinamento físico crônico possui papel importante na melhora da sensibilidade à insulina no DMT2 (CASTANEDA, 2001; CASTANEDA et al., 2002) bem como no perfil lipídico (MISRA et al., 2008) mas existem ainda algumas lacunas em relação a melhor intensidade de esforço a ser aplicada. Desta forma o presente estudo utilizou três protocolos de treinamento físico com diferentes intensidades de esforço visando avaliar os efeitos da capacidade aeróbia e anaeróbia dos animais aloxânicos.

A avaliação da capacidade aeróbia é realizada através de procedimentos que avaliam uma zona de transição durante o exercício verificando onde há predomínio do metabolismo aeróbio sobre o metabolismo anaeróbio no fornecimento de adenosina trifosfato para a atividade muscular. Como forma de avaliar parte destes procedimentos tem-se realizado a análise da concentração do lactato sanguíneo por ser um parâmetro metabólico confiável para medida da transição permitindo não só a caracterização do esforço bem como os efeitos do treinamento crônico (BILLAT et al., 2003). Assim foi realizado no presente estudo teste de esforço para a verificação da lactacidemia dos animais após 12 semanas de treinamento contínuo, intermitente e força de natação.

Em relação ao protocolo de treinamento contínuo não foi encontrada diferença na cinética do lactato entre os grupos. Estes achados são consistentes a estudo prévio realizados em modelo neonatal com aloxana (RIBEIRO et al., 2010) que demonstraram lactacidemia semelhante entre os grupos estudados. Evidenciando uma intensidade moderada com predominância do metabolismo aeróbio, visto os valores de lactato atingidos e uma intensidade moderada para que se inicie um programa de treinamento, haja vista a resposta dos animais sedentários ao teste. Quando se avaliou o protocolo de treinamento intermitente, o qual possui mesma carga semanal total de treinamento do que o contínuo observou-se que a remoção de lactato foi menor nos animais sedentários mostrando uma eficácia do treinamento. Em relação à cinética de lactato referente ao treinamento de força foi possível observar uma maior lactacidemia dos animais sedentários em relação aos animais controles durante todo o teste caracterizando positivamente o treinamento aplicado. Tais resultados confirmam o efeito crônico do

exercício além de demonstrar uma resposta positiva dos animais aloxânicos aos diferentes protocolos e intensidades de esforço.

Devido à relação existente entre as alterações na sensibilidade à insulina e o metabolismo dos lipídios no DMT2 e o papel do exercício físico, o presente estudo avaliou o perfil lipídico dos animais.

Elevados níveis de AGLs circulantes está associado a uma menor fosforilação e ativação da via da insulina (IRS/PI3q). A presença destes AGLs apontam um relação direta com a resistência à insulina que pode ser decorrente do acúmulo de triglicerídios no músculo e no fígado. Além disso, o aumento destes metabólitos provenientes da oxidação das gorduras no músculo é capaz de provocar ativação da PKC e também causar fosforilação em serina do receptor de insulina (IR) e de seus substratos, sendo estes importantes mecanismos que explicam a relação entre acúmulo de gordura tecidual e resistência á insulina (SHULMAN, 2004., SAVAGE et al., 2007). Por isso o presente estudo avaliou as concentrações séricas de AGLs, Triglicerídios, Colesterol Total e Lipídios Totais além dos lipídios do tecido adiposo, musculo gastrocnêmio, fígado e coração.

Os teores séricos de AGLs mostraram uma maior concentração nos animais aloxânicos sedentários, mas uma redução dos níveis após treinamento contínuo e intermitente de natação. Adicionalmente, entre os grupos treinados, o treinamento intermitente e força foram mais eficazes em reduzir os teores de ácidos graxos nos animais aloxânicos do que nos controles. Oliveira et al. (2004) encontraram resultados similares em modelo neonatal de aloxana. Os animais aloxânicos apresentaram maiores teores de AGLs e estes foram reduzidos após treinamento contínuo de natação. Stolen et al. (2009) encontraram resultados em animais db/db similares em relação à concentração de AGLs após 13 semanas de treinamento intervalado. Ghelfi et al. (2005) não encontraram diferenças nas concentrações de AGLs em indivíduos diabéticos tipo 1 após treinamento intermitente de alta e moderada intensidade. Resultados similares foram encontrados nas concentrações séricas de AGLs em animais adultos tornados diabéticos pela aplicação de aloxana (MOURA et al., 2011). O mesmo foi encontrado em estudo realizado com indivíduos diabéticos tipo 2 após treinamento de força (HOLTEN et al., 2004). Desta forma nota-se que os protocolos de treinamento aplicados foram eficazes em reduzir o acúmulo de AGLs séricos nos animais sugerindo

um papel importante na prevenção e tratamento de alterações metabólicas no metabolismo dos lipídios causadas pela resistência à insulina no DMT2. Analisando as concentrações de triglicerídios nenhuma alteração foi observada entre os grupos. Diferentemente de estudo com animais aloxânicos adultos, que após 7 dias de treinamento em esteira apresentaram menores concentrações de triglicerídios (BARAKAT et al., 1987). No presente estudo o treinamento de força foi mais eficaz em reduzir os valores de colesterol total nos animais aloxânicos. Os treinamentos força e contínuo foram melhores na manutenção dos lipídios totais séricos. Em modelo experimental de diabetes induzida nos animais adultos pela aplicação de aloxana, Moura et al. (2011) não encontraram diferenças significativas nos níveis de colesterol séricos mesmo após 44 dias de treinamento contínuo de natação em intensidade moderada. Estudo utilizando ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF) como modelo de DMT2 mostraram que os animais diabéticos tiveram os níveis de colesterol séricos reduzidos após 12 semanas de treinamento de natação em intensidade moderada sugerindo a importância do treinamento físico no perfil lipídico de DMT2 (LEMOS et al., 2011).

Muitos indivíduos com DMT2 apresentam sobrepeso ou são obesos. Desta forma apresentam diferenças na distribuição (GALLAGHER. et al., 2009) e acúmulo de lipídios no tecido adiposo. Assim análises de lipídios do tecido adiposo nas regiões retroperitoneal, mesentérica e subcutânea foram realizadas. Mas nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações destes lipídios.

O presente estudo também avaliou lipídios totais do músculo gastrocnêmio, fígado e coração. Diferenças foram apontadas apenas no tecido hepático onde os animais aloxânicos que realizaram treinamento contínuo de natação apresentaram menores concentrações. Estes resultados corroboram aquele de Oliveira et al. (2004) que, utilizando o mesmo modelo de indução neonatal de aloxana, reportaram uma maior utilização de lipídios no fígado após treinamento físico, reduzindo desta forma os estoques no tecido. Dados similares foram encontrados por Moura et al.(2011) em modelo experimental de diabetes tipo 1, evidenciando a importância do exercício físico no controle dos lipídios totais no tecido hepático.

Em resumo, percebe-se que o treinamento físico em diferentes intensidades de esforço e periodicidade foi de grande importância na atenuação e controle das alterações sobre o metabolismo dos lipídios nos animais aloxânicos. Assim, conclui-se que tanto o

treinamento de alta intensidade bem como o treinamento de intensidade moderada foram eficazes em reduzir o perfil lipídico dos animais aloxânicos, sugerindo um papel importante destes na prevenção e tratamento de alterações metabólicas no metabolismo dos lipídios causadas pela resistência à insulina no DMT2.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc. 09/51538-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por financiarem esse estudo.

5. REFERENCIAS

- A.D.A Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes care**. 34: S62-S69, 2011.
- A.D.A Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes care**. 35: S64-S71, 2012.
- A.D.A, Standards of Medical Care in Diabetes **Diabetes Care** 33: S62-S69, 2010.
- ARAÚJO, G.G; PAPOTI, M; MANCHADO-GOBATTO, F.B; MELLO, M.A.R; GOBATTO, C.A. Padronização de um Protocolo Experimental de Treinamento Periodizado em Natação Utilizando Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 16, p. 51-56, 2010.
- AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação**. 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiologia) Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- BARAKAT, H.A; CARPENTER, J.W; LENNON, Y.A; HANNA, W.R JR; O'BRIEN, K.F; DOHM, G.L; The effects of exercise on lipogenic enzyme activity and glyceride synthesis by liver homogenates of diabetic rats. **Metabolism**. v. 36,p. 983-7, 1987.
- BILLAT, V.L; SIRVENT, P; PY, G; KORALSZTEIN, J.P; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med**. v. 33, n. 6, p. 407-426, 2003.
- BRAGA, L. R., MELLO, M. A., ou de MELLO, M. AR, GOBATTO, C. A.Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v.54, p.58 - 65, 2004.
- CASTANEDA, C. Type 2 diabetes mellitus and exercise. **Nutr Clin Care**. v.3,p. 349-58, 2001.
- CASTANEDA, C; LAYNE, L.E; ORIAN, L.M; GORDON, P.L; WALSMITH, J; FOLDVARI, M; ROUBENOFF, R; TUCKER, K.L; NELSON, M.E. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 25, p. 2335-41, 2002.
- CINTI, S. The adipose organ. **Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids** 2005, **73**:9-15.
- CONTARTEZE, R.V.L; MOTA, C.S.A; OLIVEIRA, C.A.M; LEME, J.A.C.A; BOTTCHE, L.B; MELLO, M.A.R; LUCIANO, E. Exercise test and glucose homeostasis in rats treated with alloxan during the neonatal period or fed a high calorie diet. **Journal of Diabetes**. v. 1, p. 65-72, 2009.
- 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 1- glutamate, 1- lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 88, p. 475-84, 1978.

FERREIRA, L. D. M. C.-B; BRAU, L; NIKOLOVSKI,S; RAJA, G; PALMER,T.N; FOURNIER, P.A. Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*. v.280, p.E83-E91, 2001.

GALLAGHER, D; KELLEY, D.E; YIM, J.E; SPENCE, N; ALBU, J; BOXT, L; PISUNYER, F.X; HESHKA, S: Adipose tissue distribution is different in type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**. v. 89, p. 807– 14, 2009.

GOBATTO, C. A; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.130, n.1, p. 21-27, 2001.

GUELFY K. J; RATNAM N.; SMYTHE G. A.; JONES T. W.; FOURNIER P. A. Effect of intermittent high-intensity compared with continuous moderate exercise on glucose production and utilization in individuals with type 1 diabetes *Am J Physiol Endocrinol Metab* v.292,p.865–E870, 2007.

HAMILTON, M.T; AREIQAT, D.G; HAMILTON, A.M. Bey plasma triglyceride metabolism in humans and rats during aging and physical inactivity. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**. v. 11, p. S97–S104, 2001.

HAYASHIA, T.; HIRANO, T.; YANAMOTO, T.; ITO, Y.; ADACHI, M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. **Metabolism Clinical and experimental**, New York, v.55, p. 879-884, 2006.

HOLTEN, M.K; ZACHO, M; GASTER, M; JUEL, C; WOJTASZEWSKI, J.F; DELA, F. Strength Training Increases Insulin-Mediated Glucose Uptake, GLUT4 Content, and Insulin Signaling in Skeletal Muscle in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes**. v. 53, p.294–305, 2004.

KRAUS, W.E; HOUMARD, J.A; DUSCHA, B.D; KNETZGER, K.J; WHARTON, J.S; CCARTNEY, M et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **Eur J Med**. v. 7, p.1483–1489, 2001.

LEME, J.A. C. A; ARAÚJO, M. B; MOURA, L. P; GOMES, R. J; MOURA, R. F; ROGATTO, G.P; MELLO, M. A. R; LUCIANO, E. Effects of physical training on serum and pituitary growth hormone contents in diabetic rats. **Pituitary**, 2009.

LEMONS, E.T; PINTO, R; OLIVEIRA, J; GARRIDO, P; SERENO, J; MASCARENHAS-MELO, F; PÁSCOA-PINHEIRO, J; TEIXEIRA, F; REIS F. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. **Mediators Inflamm**. 2011.

LUNDBAECK K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **BR. Med. J**. v.2, p. 1507-1513, 1962.

MAY, M. E; BUSE, M. G. Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. **Diabetes Metabolism Reviews**, v.5, n.3, p.227-245, 1989.

MISRA, A; ALAPPAN, N.K; VIKRAM, N.K; GOEL, K; GUPTA, N; MITTAL, K; BHATT, S; LUTHRA, K. Effect of Supervised Progressive Resistance-Exercise Training Protocol on Insulin Sensitivity, Glycemia, Lipids, and Body Composition in Asian Indians With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 31, p.1282-7, 2008.

MOURA, L. P; PUGA, G ; BECK, W.R ; TEIXEIRA, I.P ; GHEZZI, A.C ; SILVA, G.A ; MELLO, M. A. R. . Exercise and spirulina control non-alcoholic hepatic steatosis and lipid profile in diabetic Wistar rats. **Lipids in health and disease**, v. 10, p. 10.1186/1476-51, 2011.

NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; et al. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H. et al. **Métodos de bioquímica clínica**, p. 153-168, 1990.

OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO.; MELLO, M.A R. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Experimental Physiology**, New York, v.90, n.1, p. 79-86, 2004.

PAULI, J.R. **Efeitos do treinamento físico sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos administrados com dexametasona**. 2005,154p, tese (dissertação-mestrado em Ciências da Motricidade- Biodinâmica) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; BOTEZELLI, J.D; OLIVEIRA, C.A.M; MELLO, M.A.R: Effects of Moderate Intensity Physical Training in Neonatal Alloxan- Administered Rats. **Journal of diabetes and metabolism** 2010, 1:1-5.

RIBEIRO C.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO,E.; MELLO, M. A. R. Diabetes evolution in rats after neonatal treatment with alloxan. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.177-178, 2005.

RIBEIRO, C; CAMBRI, L. T; DALIA, R. A; ARAÚJO,M,B; LEME, J. A. C. A; MOURA, R.F; VOLTARELLI, F. A ; MELLO, M. A. R. . Continuous and Intermittent Exercise Training and Glucose Metabolism in Neonatal Alloxan Administered Rats. **Journal of endocrinology and Metabolism**, v. 1(3), p. 101-112, 2011.

ROGGATO,G.P.; OLIVEIRA,C.A.M.; FARIA,M.C.; LUCIANO,E. Respostas metabólicas agudas de ratos wistar ao exercício intermitente de saltos. **Motriz**, v.10,p. 61-66, 2004.

SAVAGE, D.B; PETERSEN, K.F; SHULMAN, G.I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol Rev**. v. 87, p. 507-20, 2007.

SHULMAN, G.I. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. **Physiology**. v. 19, p. 183-90, 2004.

SOLOMON, T.P; SISTRUN, S.N; KRISHNAN, R.K; DEL AGUILA, L.F; MARCHETTI, C.M; O'CARROLL, S.M; O'LEARY, V.B; KIRWAN, J.P. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. **Journal of Applied Physiology**. v. 104, p. 1313–1319, 2008.

SRINIVASAN K.; RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*, New Delhi, p. 451-472, 2007.

STØLEN, T.O; HØYDAL, M.A; KEMI, O.J; CATALUCCI, D; CECI, M; AASUM, E; LARSEN, T; ROLIM, N; CONDORELLI, G; SMITH, G.L; WISLØFF, U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. **Circ Res**. v.105, p. 527-36, 2009.

THYFAULT, J.P. Setting the stage: Possible mechanisms by which acute contraction restores insulin sensitivity in muscle. **American Journal Physiology Regular Integr Comp Physiology**. v. 294, p. 1103–10, 2008.

TSUKUMO, D.M; CARVALHO-FILHO, M.A; CARVALHEIRA, J.B; PRADA, P.O; HIRABARA, S.M; SCHENKA, A.A. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced and insulin resistance. **Diabetes**. v.56, p. 1986-8, 2007.

VENABLES, M.C; JEUKENDRUP, A.E. Endurance training and obesity: Effect on substrate metabolism and insulin sensitivity. **Medicine and Science and Sports Exercise**. v.40, p. 495–502, 2008.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS TRABALHOS DESENVOLVIDOS

Ao se prescrever ou recomendar a prática do exercício físico deve-se levar em consideração o volume, a frequência e a intensidade do esforço realizado. Conhecendo-se esses três fatores, será possível saber os efeitos do exercício com mais precisão e descobrir a “dose” mais eficaz para se obter os efeitos desejados, de forma a otimizar a utilização do exercício físico. Por motivos óbvios, a determinação da intensidade do esforço não é tão simples, e esse aspecto muitas vezes é negligenciado. A importância em determinar com precisão a intensidade e periodicidade de treinamento é ainda mais importante quando se trata da prevenção e tratamento de doenças particularmente, no DM2 cuja incidência tem aumentado consideravelmente. Assim, devido à dificuldade de execução de alguns protocolos em seres humanos, modelos experimentais utilizando animais são elaborados para simular situações ocorridas com humanos e solucionar os eventuais problemas decorrentes das alterações observadas.

O exercício de natação é muito utilizado para o treinamento de ratos em distintas condições fisiopatológicas, mas tornam-se necessários estudos direcionados a especificidade do treinamento a ser aplicado. Desta forma, os protocolos sugeridos nos trabalhos apresentados no presente relatório fornecem a possibilidade da determinação do papel de treinamentos com estímulos aeróbio/ anaeróbio em diferentes intensidades, na redução de alterações na homeostase glicêmica, no metabolismo protéico de animais, no combate ao estresse oxidativo bem como efeitos dos diferentes protocolos de treinamento no metabolismo dos lipídios em animais submetidos à aplicação neonatal de aloxana.

De forma geral, os resultados obtidos mostraram os efeitos crônicos do treinamento por natação, uma vez que as avaliações foram feitas com um intervalo de 48 horas após a sessão de exercício ao final das 12 semanas de treinamento. Tal procedimento foi adotado justamente para evitar interferência dos efeitos agudos do exercício. No primeiro estudo constatou-se que ambos os protocolos de treinamento exerceram efeitos benéficos diversos sobre a homeostase glicêmica, com resultados variando em expressividade. Contudo, isso não significa que os animais não tenham se beneficiado dos efeitos agudos do exercício sobre a captação de glicose. A contração muscular aumenta a captação de glicose independentemente de insulina, devido provavelmente à ação da AMPK e do Ca²⁺, que aumentam a translocação de

glut-4 para a membrana muscular (CANTÓ et al., 2006; JESSEN; GOODYEAR, 2005). A quantidade de glut-4 no sarcoplasma permanece elevada por até 2 horas após o fim da sessão de exercício mesmo na ausência da insulina, mas os efeitos de uma única sessão de exercício permanecem por pelo menos 16 horas, com maior sensibilidade à insulina e maior expressão de RNA mensageiro para glut-4e da própria proteína glut-4 (BORGHOUTS; KEIZER,2000).

No segundo experimento, a proposta foi a aplicação dos protocolos intermitente e contínuo de natação em ratos aloxânicos e os efeitos no metabolismo proteico muscular. Resultados variados foram obtidos com relação ao metabolismo protéico muscular: aumentos na concentração de DNA e na razão proteína/DNA na ausência de alteração no turnover protéico. Sabe-se que o tipo de exercício mais apropriado para promover anabolismo muscular é o resistido, via ativação da via PKB/ mTOR (BAAR, 2006; BODINE, 2006; NADER, 2006), promovendo desta forma maior síntese e menor degradação protéicas. Assim, os protocolos de treinamento aqui empregados não são os mais indicados para obter respostas anabólicas máximas.

No terceiro experimento, o objetivo foi investigar diferentes protocolos de exercício sobre os biomarcadores de estresse oxidativo no pâncreas de ratos aloxânicos. Os resultados apresentados demonstram que a administração neonatal de aloxana foi eficaz em alterar a taxa de remoção da glicose através da análise do Kitt (%/min) durante o ITT. Além disso, apresentou redução na secreção de insulina nos animais aloxânicos estimulada por altas concentrações de glicose e recuperação da secreção após diferentes protocolos de exercício. Neste estudo ainda, foi possível observar alterações no estado oxidativo quando se avaliou os biomarcadores do estado de peroxidação lipídica bem como a atividade das enzimas antioxidantes, mostrando o papel importante do exercício em atenuar a peroxidação lipídica e aumentar a defesa antioxidante (RADAK et al., 2008). Além disso, sabe-se que o desenvolvimento do DMT2 está diretamente associado a incapacidade da insulina em exercer suas ações não apenas no metabolismo dos carboidratos mas principalmente no metabolismo dos lipídios além de sua ação anabólica e anticatabólica (MAY, 1989; ADA, 2012) e para proteger o organismo contra esta resposta diminuída às ações biológicas da insulina nos tecidos periféricos e reduzir as alterações metabólicas geradas pela resistência à insulina, o exercício físico tem sido amplamente empregado pois leva a aumentos na captação de glicose

(THYFAULT, 2008; VENABLES & JEUKENDRUP, 2008) principalmente em tecido muscular e adiposo, através do aumento da translocação do Glut-4 (MISRA et al., 2008, TSUKUMO et al., 2007) para a membrana durante a contração muscular, redução da gordura corporal além do aumento da oxidação do tecido adiposo (SOLOMON et al., 2008). Deste modo, o quarto estudo visou comparar os efeitos dos treinamentos contínuo, intermitente e força sobre as variáveis séricas e teciduais no metabolismo dos lipídios de ratos aloxânicos. Os resultados deste estudo demonstraram que os treinamentos contínuo e intermitente de natação foram eficazes em reduzir as concentrações de AGLs e lipídios do fígado dos animais aloxânicos, enquanto o treinamento de força reduziu os níveis de colesterol total destes animais. Desta forma nota-se que tanto o treinamento de alta intensidade bem como o treinamento de intensidade moderada foram eficazes em reduzir o perfil lipídico dos animais aloxânicos, sugerindo um papel importante destes na prevenção e tratamento de alterações metabólicas no metabolismo dos lipídios causadas pela resistência à insulina no DMT2.

Em resumo, foi possível observar, nos diferentes estudos apresentados, que o treinamento contínuo de natação em intensidade moderada apresentou papel importante em atenuar níveis de colesterol total entre os grupos treinados, reduzir as concentrações de AGLs além de controlar alterações lipídicas nos tecidos hepático dos animais e melhor resposta à secreção de insulina nos animais aloxânicos. O treinamento intermitente e de força levaram a uma maior captação de glicose muscular sugerindo uma melhora da sensibilidade à insulina nos animais aloxânicos, uma hipertrofia muscular podendo beneficiar possíveis alterações nos níveis de vários aminoácidos encontradas no DMT2, além de atenuar os biomarcadores do stress oxidativo e melhorar resposta secretória do hormônio insulina nos animais aloxânicos. Desta forma conclui-se que os diferentes protocolos de treinamento analisados em diferentes intensidades de esforço possuem papel importante na modulação metabólica dos animais aloxânicos sendo de grande importância a prática de exercício de alta bem como moderada intensidade para a população diabética haja vista os achados metabólicos apresentados.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados na presente tese nos permitem concluir que:

- A indução neonatal de aloxana foi eficaz em alterar a homeostase transitória glicêmica dos animais, mas estudos adicionais são necessários para o esclarecimento dos possíveis mecanismos envolvidos.
- A administração neonatal de aloxana levou a uma redução na secreção de insulina dos animais aloxânicos indicando destruição parcial das células beta pancreáticas.
- Os protocolos de treinamento contínuo e intermitente exerceram efeitos benéficos na homeostase glicêmica dos ratos aloxânicos. Particularmente o protocolo intermitente é mais eficaz na captação de glicose muscular.
- Os protocolos de treinamento intermitente e contínuo empregados demonstraram eficácia em alterar o crescimento celular das células musculares nos animais aloxânicos.
- Não foram constatadas alterações na síntese e degradação proteica muscular, mostrando que os protocolos de treinamento intermitente e contínuo utilizados não são os mais indicados a respostas anabólicas máximas.
- Os protocolos de treinamento intermitente e força mostraram ser mais eficazes no combate ao estresse oxidativo no pâncreas de animais aloxânicos.
- O treinamento de força e intermitente bem como o treinamento contínuo de natação foram eficazes em reduzir o perfil lipídico dos animais aloxânicos, sugerindo um papel importante destes na prevenção e tratamento de alterações metabólicas no metabolismo dos lipídios causadas pela resistência à insulina no DMT2.

REFERÊNCIAS DO PROJETO

AEBI, H. **Catalase**. In: Methods in Enzymology, edited by L. Packer. Orlando FL: Academic, v.105, p. 121-126, 1984.

AMERICAM DIABETES ASSOCIATION. Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association **Diabetes Care**, Alexandria, v. 31, p. 61-78, 2008.

ARISON, R.N.; FEUDALE, E. L. Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. **Nature**, London, v. 214, p. 1254-1255, 1967.

AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados após exercício agudo de natação**. 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiologia) Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BAAR, K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.38, n.11, p.1939-1944, 2006.

BODINE, S. C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.38, n.11, p.1950-1957, 2006.

BORGHOUTS, L.B.; KEIZER, H.A. Exercise and insulin sensitivity: a review. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.21, p.1-12, 2000.

BRAGA, L. R., MELLO, M. A., ou de MELLO, M. AR, GOBATTO, C. A. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. , v.54, p.58 - 65, 2004.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, London, v.414, p.813-821, 2001.

CANTÓ, C. et al. Neuregulins mediate calcium-induced glucose transport during muscle contraction. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.31, p.21690-21697, 2006.

CHACRA, A.R. Efeito fisiológico das incretinas. **Advanced studies in medicine**, v.6, p.613-17, 2006.

CHARLTON, M.; NAIR, K. S. Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.128, p.323-27, 1998.

CHOI SB, JANG JS.; HONG SM.; JUN WH.; PARK S. Exercise and dexamethasone oppositely modulate *b*-cell function and survival via independent pathways in 90% pancreatectomized rats. **Journal of Endocrinology** v. 190 p. 471–482, 2006.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostagl Leukotr Essent Fatty Acids** 2005, 73:9-15.

CONLEE, R.K. Muscle and Glycogen and Exercise Endurance: the twenty- year perspective. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, Hagerstown, v.15, p. 1-28, 1987.

COSKUN O.; OCAKCI A.; BAYRAKTAROGLU T.; KANTER N. Exercise training prevents and protects streptozotocin induced oxidative stress and B cell damage in rat pancreas. **Tohoku J. Exp. Med.**v. 203, p.145-154, 2004.

DUBOIS, B.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. et al. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p. 350-356, 1956.

EIZIRIK, D. L.; SANDLER, S.; PALMER, J. P. Repair of pancreatic β -cells: a relevant phenomenon in early IDDM? **Diabetes**, Alexandria, v. 42, p. 1383-1391, 1993.

EIZIRIK, D.L. Insulin-dependent diabetes mellitus and gothic cathedrals. **Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.2, p.167-68, 1995.

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 1- glutamate, 1- lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 88, p. 475-84, 1978.

FRITZ, T.; KRAMER, D.K.; KARISSON, H.K.R.; GALUSKA, D.; ENGFELDT, P.; ZIERATH, J.R.; KROOK, A. Low-Intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPAR δ and UCP3 in type 2 diabetic patients. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, Chichester, v. 22, p.492-498, 2006.

FULKS, R.M; LI, J.B; GOLDBERG, J.L. **J. Biol. Chem.** v.250,p. 290-298, 1975.

GALLEN, I. Exercise in type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, Chichester, v.20, p.2-5, 2003.

GILES,K.W.; MAYERS,A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, London, v.206,p. 93, 1965.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.130, n.1, p. 21-27, 2001.

GOMES, R. J. ; CAETANO, F. H. ; MELLO, M. A.R, ou de MELLO, M. A., ou ROSTOM de MELLO M.A. ; LUCIANO, E. . Effects of chronic exercise on growth factors in diabetic rats. *Journal of exercise physiology online*, v. 8, p. 16-25, 2005.

GUELFY K. J.; RATNAM N.; SMYTHE G. A.; JONES T. W.; FOURNIER P. A. Effect of intermittent high-intensity compared with continuous moderate exercise on glucose production and utilization in individuals with type 1 diabetes **Am J Physiol Endocrinol Metab** v.292,p.865–E870, 2007.

HAYASHIA, T.; HIRANO, T.; YANAMOTO, T.; ITO, Y.; ADACHI, M. Intensive insulin therapy reduces small dense low-density lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to triglyceride-rich lipoprotein subspecies. **Metabolism Clinical and Experimental**, New York, v.55, p. 879-884, 2006.

HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTLIEB, C.W.; BLEICHER, S.T. Coated Charcoal immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology**, Baltimore, v. 25, p.1375-1384, 1965.

IVY, J. L.; ZDERIC, T. D.; FOGT, D. L. Prevention and treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, Hagerstown, v.27, p.1-35, 1999.

IWASE, M. et al. Liver, kidney and islet cell tumors in spontaneously hypertensive and normotensive rats treated neonatally with streptozotocin. **Tohoku journal of Experimental Medicine**, Aobu-ku, v.159, p. 83-90, 1989.

IWASE, M.; NUNOI, K.; WAKISAKA, M. et al. Spontaneous recovery from non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Metabolism**, Rome, v.40, p. 10-14, 1991.

KAZUMI, T. et al. Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male Wistar rats. **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, p. 2144-2147, 1978.

KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B. H. Effects of physical activity on insulin action and glucose tolerance in obesity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.31, n. 11, suppl., p.619-623, 1999.

KELLY, M. A. et al. Molecular aspects of type 1 diabetes. **Molecular Pathology**, London, v.56, n.1, p.1-10, 2003.

KNOWLER W.C.; BARRETT –CONNOR, E.; FOWLER, S.E.; HAMMAN, R.F.; LACHIN, J.M.; WALKER, E.A.; NATHAN, D.M. Diabetes prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 346, n.6, p. 393-403, 2002.

KODAMA, T.; IWASE, M.; NUNOI, K.; et al. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v.20, n.3, p. 183-189, 1993.

KUWAJIMA, M. D. M. et al. The preventive effect of caloric restriction and exercise training on the onset of NIDDM in a rat model. **Nutrition Research**, New York, v.19, p.401-413, 1999.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of the intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, Alexandria, v. 16, p. 35, 1967.

LE ROITH D: Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center: insulin-like growth factors. **N Engl J Med** 336:633– 640, 1997.

LEE, C. H.; TEO, S.G.; HONG, E.; WONG, H.B.; LOW, A.; SUTANDAR, A.; TAN, H.C.; LIM, Y.T. et al. Impact of glycemic control on occurrence of no-reflow and 30-day outcomes in diabetic patients undergoing primary angioplasty for myocardial infarction. **Journal of Invasive Cardiology**, Singapore, v. 17, n. 8, p. 422-426, 2005.

LEME, J. A. C. A. ; SILVEIRA, R. F. ; GOMES, R. J. ; MELLO, M. A. R. ; LUCIANO, E. . Efeitos do Treinamento físico sobre Parâmetros Metabólicos em Ratos Diabéticos Experimentais. *Journal of Metabolism and Nutrition / Revista do Metabolismo e Nutrição*, v. 9, p. 01-10, 2008.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, New York, v.31, p. 337-42, 1988.

LI, G.; HU Y.; YANG, W.; JIANG, Y.; WANG, J.; XIAO, J.; HU, Z.; PAN, X.; HOWARD, B.V.; BENNETT, P.H. Effects of insulin resistance and insulin secretion on the efficacy of interventions to retard development of type 2 Diabetes Mellitus: **Diabetes Research Clinical Practice**, Amsterdam, v.58,n. 3, p. 193-200, 2002.

LINDSTROM, J.; LOUHERANTA, A.; MANNELIN, M.; RASTAS, M.; SALMINEN, V.; ERICSSON, J.; UUSITUPA, M.; TUOMIHETO, J. Finnish diabetes Prevention Study Group: Lifestyle intervention and 3- year Results on diet and Physical activity. **Diabetes care**, Alexandria, v.26, n.12, p. 3230-3236, 2003.

LOWRY, O.H; ROSEBROUG, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.T. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.93,p. 265-275, 1951.

LUCIANO, E. **Influências do treinamento físico sobre o metabolismo de carboidratos em ratos diabéticos experimentais**. 1991, tese (tese- doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 1991.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v.18, p.47-60, 1997.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v.2, n.12, p.202-9, 1998.

LUNDBAECK K. Intravenous glucose tolerance test as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **BR. Med. J.** v.2, p. 1507-1513, 1962.

MANSON, J. E. et al. Physical activity and incidence of non-insulin dependent diabetes mellitus in women. **Lancet**, New York, v.338, p.774-778, 1991.

MATHEWS, J. N. S.; ALTMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, London, v.27, p.230-235, 1990.

MAUER, S. M.; LEE, C.S.; NAJARIAN, J.S. et al. Induction of malignant kidney tumors in rats with streptozotocin. **Cancer Research**, Baltimore, v.34, p. 158-160, 1974.

MEILHAC,O.; RAMACHANDRAN,S.; CHIANG,K.; SANTANAM, N.; PARTHASARATHY,S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**.p. 1681-8, 2001.

MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E. Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan-induced diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.28, p. 467-470, 1995.

MORIIZUMI S, UNNO M, TANAKA O, KONDO H, et al.: Pancreatic beta-cell replication and amelioration of surgical diabetes by Reg protein. **Proc Natl Acad Sci, U S A** v.91,p.3589 –3592, 1994.

MROZIKIEWICZ, A.; KIELCZEWSKA- MROZIKIEWICZ, D; LOWICKI, Z. et al. Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, Berlim, v. 31, n.4, p. 236-7, dec 1994.

NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; et al. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H. et al. **Métodos de bioquímica clínica**, p. 153-168, 1990.

OKAWA, H., NOBUKO, O. AND YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem** v.95,p. 351-358, 1979.

OLDROYD, J.C.; UNWIN, N.C.; WHITE, M. et al. Randomized controlled trial evaluating lifestyle interventions in people with impaired glucose tolerance. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v.72, p. 117-127, 2006.

OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO.; MELLO, M.A R. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. **Experimental Physiology**, New York, v.90, n.1, p. 79-86, 2004.

PAULI, J.R. **Efeitos do treinamento físico sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos administrados com dexametasona**. 2005,154p, tese (dissertação-mestrado em Ciências da Motricidade- Biodinâmica) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P.; et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabetes & Metabolism**, Paris, v.31, p. 61-75, 1989.

PORTUESE, E. I. et al. High mortality from unidentified CVD in IDDM: time to start screening? **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v.30, p.223-231, 1995.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, Baltimore v.22, p. 485-518, 1970.

RIBEIRO C.; OLIVEIRA, C. A. M.; LUCIANO,E.; MELLO, M. A. R. Diabetes evolution in rats after neonatal treatment with alloxan. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.177-178, 2005.

ROBERTS, C.K.; WON, D.; PRUTHI,S.;LIN,S.S.;BARNARD,R.S.; Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress inflammation an monocyte adhesion in diabetic men. **Diabetes Research Clinical Practice**, 2006.

ROGGATO,G.P.; OLIVEIRA,C.A.M.; FARIA,M.C.; LUCIANO,E. Respostas metabólicas agudas de ratos wistar ao exercício intermitente de saltos. **Motriz**, v.10,p. 61-66, 2004.

RONALD J. S. ; GLEN P. K; NORMAND G. B; GEORGE A. W; DENIS PRUD'HOMME, MICHELLE F; ROBERT D. R; HEATHER T; COYLE D; PHILLIPS P ; JENNINGS A; JAFFEY J. Effects of Aerobic Training, Resistance Training, or Both on Glycemic Control in Type 2 Diabetes. A Randomized Trial. **Annals Internal Medicine**.v.147,p.357-369, 2007.

ROSSINI, A. A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. **Diabetes**, Alexandria, v.53, p.267-75, 2004.

SJÖRGREEN, B.; NORDENSKJOLD, D. T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. **Bertrag zur Kentnin des le birrhythmik**. Pfluger Arch. Gesante Physiol. Menschen Terre. v. 240, p. 247, 1938.

SNOWLING, N.J.; HOPKINS, W.G. Effects of Different Modes of Exercise Training on Glucose Control and Risk Factors for Complications in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes care**, Alexandria, v. 30, n.4, p.26, 2006.

SRINIVASAN K.; RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, p. 451-472, 2007.

STEINER, H.; OELZ, O.; ZAHND, G. et al. Studies on islet cell regeneration, hyperplasia and intrainsular cellular interrelations in long lasting streptozotocin diabetes in rats. **Diabetologia**, New York, v. 6, p.558-564, 1970.

STETTLER, C. et al. Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: meta analysis of randomized trials. **American Heart Journal**, Saint Louis, v.152, p.27-38, 2006.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, Praha, v.50, p.536-46, 2001.

WAALKES, T.P; UDENFRIEND, S. Tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** v.50p. 733-736, 1957.

WINICK,M.; BASEL,J.A.; BOSSO,P.A. A nutrition and cell growth. In: WINICK,M. **Nutrition and development**. N.Y, p.49-97, 1972.

YAMAGAMI, T.; MIWA, A.; TAKASAWA, S. et al. Induction of rat pancreatic B-cell tumors by the combined administration of streptozotocin or alloxan and poly (adenosine

diphosphate ribose) synthetase inhibitors. **Cancer Research**, Baltimore, v.45, p.1845-1849, 1985.

ZINMAN, B. RUDERMAN, N.; CAMPAIGNE, B.N.; DEVLIN, J.T.; SCHNEIDER, S.H.. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v.26, supl.1, p.73-77, 2003.

APÊNDICE 1

(Artigo Publicado)

*RIBEIRO, C; MOTA, C.S.A; MANCHADO-GOBATTO, F.B; VOLTARELLI, F.A; ARAÚJO, M.B; LEME, J.A.C.A; OLIVEIRA, C.A.M; MELLO, M.A.R. Effects of moderate intensity physical training in neonatal alloxan-administered rats. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 01, p. 107, 2010.*

APÊNDICE 2

(Artigo Publicado)

*RIBEIRO, C; CAMBRI, L. T; DALIA, R. A; ARAÚJO, M, B; LEME, J. A. C. A; MOURA, R. F; VOLTARELLI, F. A ; MELLO, M. A. R. . Continuous and Intermittent Exercise Training and Glucose Metabolism in Neonatal Alloxan Administered Rats. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 1(3), p. 101-112, 2011.*

APÊNDICE 3

(Artigo Publicado)

*RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; GHEZZI, A.C; MOURA, L.P; ARAÚJO, G.G; BOTEZELLI, J.D; MELLO, M.A.R. Muscle protein metabolism in neonatal alloxan-administered rats: effects of continuous and intermittent swimming training. **Diabetology & Metabolic Syndrome** 2012, 4:5 doi:10.1186/1758-5996-4-5.*

APÊNDICE 4

(Artigo Submetido)

*RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; MOTA, C.S.A; RODRIGO, A.D; ARAÚJO, M.B; MOURA, L.P; MELLO, M.A.R. The effect of different exercise protocols on biomarkers of oxidative stress in the pancreas of rats subjected to neonatal alloxan administration. **Experimental Physiology** (submitted).*

APÊNDICE 5

(Artigo Submetido)

*RIBEIRO, C; CAMBRI, L.T; DALIA, R.A; ARAÚJO, M.B;BOTEZELLI, J.D; SPONTON, A.C.S MELLO, M.A.R. Effects of physical training with different intensities of effort on lipid metabolism in rats submitted to the neonatal application of alloxan. **Lipids In Health and Disease (submitted).***

ANEXO

Declaração da aprovação do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté (CEEA/UNITAU nº 022/08), sob protocolo nº 019/08